

Struktur und Funktion des energieumwandelnden Systems der Mitochondrien

Von Gebhard von Jagow und Wolf Dieter Engel^[*]

Professor Otto H. Wieland zum 60. Geburtstag gewidmet

Die wichtigste Energiequelle für alle in lebenden Organismen vorkommenden endergonischen Prozesse ist die Energie der Phosphorsäureanhydrid-Bindung der Nucleosidtriphosphate, speziell des Adenosintriphosphats (ATP). In aeroben Organismen, zum Beispiel Säugetieren, wird mehr als 90% des ATP in einem oxidative Phosphorylierung genannten Vorgang gebildet. Wie bei der Muskelkontraktion und der Nervenerregung bedient sich die Natur auch bei der oxidativen Phosphorylierung vektorieller Prozesse, die an einer Membran ablaufen, welche verschiedene Räume voneinander abgrenzt. Der vorliegende Übersichtsartikel befaßt sich mit der Funktion einer Reihe von wasserunlöslichen Membranproteinen und Enzymen, die vektoriell Elektronen sowie Protonen und andere Ionen transportieren und letztendlich zur Bildung von ATP führen. Die Maschinerie, welche die Substratoxidationsenergie in chemische Energie in Form der Phosphorsäureanhydrid-Bindung von ATP umwandelt, arbeitet mit sehr hohem Wirkungsgrad. In diesem Beitrag werden Struktur und Funktion des Systems der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien behandelt. Das Gesamtsystem besteht aus der Elektronen-transportkette, der ATP-Synthetase, der Adeninnucleotid-Translokase und dem Phosphat-Transportsystem. Die Elektronentransportkette kann in vier Multiprotein-Komplexe – an drei davon findet eine Energieumwandlung statt – und in die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom c unterteilt werden. Die bei der Substratoxidation freigesetzte Energie wird in chemische Energie in Form von ATP umgewandelt, wobei ein elektrochemischer Protonengradient als Zwischenform auftritt. Die energetischen Aspekte dieser Prozesse lassen sich mit der linearen irreversiblen Thermodynamik behandeln. Die letzten Jahre haben große Fortschritte bei der strukturellen Charakterisierung der beteiligten Proteine gebracht. Die Funktion der genannten Systeme ist teilweise auf molekularer Ebene erforscht; dies gilt insbesondere für den Protonen- und Adeninnucleotid-Transport sowie die ATP-Bildung.

1. Einleitung

Das Zusammenwirken der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzyme wird in diesem Beitrag auf der Grundlage der chemiosmotischen Theorie^[1, 2] behandelt. Diese Theorie läßt sich nicht nur zur Interpretation der energieumwandelnden Prozesse in Mitochondrien, sondern auch in Bakterien, Algen und grünen Pflanzen anwenden^[3-6]. Als intermediäre Form der Energie wird hierbei ein Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran postuliert^[7]. Es sei allerdings erwähnt, daß es Vorbehalte hinsichtlich der Freisetzung der Protonen gibt: Es könnten abgegrenzte Bezirke an der inneren Mitochondrienmembran bestehen, die eine Protonenfreisetzung verhindern^[8]. Dieser Beitrag zeigt, daß der Hauptteil der Protonen durch einen Pumpmechanismus durch die Membran befördert wird.

Neuere wie ältere Ergebnisse erhielten eine neue Interpretation durch die Anwendung der irreversiblen Thermodynamik^[9, 10].

Die Protonen/Elektronen-Stöchiometrien, die seit der Entwicklung der chemiosmotischen Theorie vor 20 Jahren umstritten sind, wurden nun sehr sorgfältig gemessen und stimmen jetzt mit den thermodynamischen Erfordernissen überein. Die Anzahl der Protonen, die für ein vom Substrat auf Sauerstoff übertragenes Elektron durch die innere Mitochondrienmembran transportiert werden, ist doppelt so

groß wie früher berichtet^[11, 12]. Dasselbe gilt für die zur Synthese eines ATP-Moleküls benötigte Anzahl von Protonen. Die früheren Daten erwiesen sich als falsch, da der Protonenverbrauch des Phosphat-Protonen-Cotransports nicht in Betracht gezogen wurde.

Bei der vorliegenden Beschreibung des mitochondrialen Systems wurde besonderes Augenmerk auf die Vielzahl neuer Ergebnisse über die Struktur der beteiligten Enzyme gerichtet. Die meisten davon sind Multiprotein-Komplexe.

2. Das Mitochondrion

Das System für die Umwandlung von Substrat-Oxidationsenergie in chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) befindet sich im Mitochondrion, einer Organelle der meisten eukaryotischen Zellen. Das Mitochondrion enthält zwei Membranen: die äußere und die innere Membran (Abb. 1). Die äußere Membran, die für

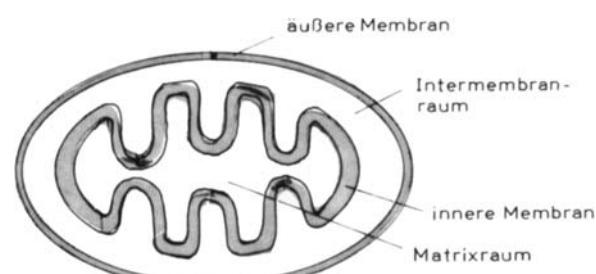


Abb. 1. Schematische Darstellung der Struktur des Mitochondrions.

[*] Prof. Dr. G. von Jagow, Dipl.-Biochem. W. D. Engel

Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität
Goethestraße 33, D-8000 München 2

Moleküle mit Molekulargewichten bis zu einigen Tausend^[13] frei durchlässig ist, umschließt die Organelle. Diese Membran ist von untergeordneter Bedeutung für den Mechanismus der Energieumwandlung; sie wird deshalb in diesem Beitrag nicht weiter behandelt. Die innere Mitochondrienmembran, die für die meisten Metabolite undurchlässig ist, faltet sich zur Vergrößerung der Oberfläche in cristae mitochondriales. Diese Membran enthält die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung. Darüber hinaus befindet sich in der inneren Membran eine Vielzahl von Proteinen – „integrale Membranproteine“, die in die Phospholipid-Doppelschicht eingelagert sind –, z. B. die Acyl-CoA-Dehydrogenase^[14], die α -Glycerophosphat-Dehydrogenase^[15], die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase^[16] und die energieabhängige Pyridinucleotid-Transhydrogenase^[17-19]. Des Weiteren enthält die innere Membran zahlreiche Transportsysteme^[20], da sie für ein- und mehrwertige Ionen undurchlässig ist. All diese Systeme sorgen für einen außergewöhnlich hohen Proteingehalt der inneren Membran (>70%). Der Lipidanteil der inneren Membran setzt sich hauptsächlich aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin zusammen. Im Gegensatz zu den meisten eukaryotischen Membranen enthält die innere Mitochondrienmembran kein Cholesterin.

Die beiden Membranen grenzen zwei Räume ab. Die innere Membran umschließt den Matrixraum, zwischen den

beiden Membranen liegt der Intermembranraum. Die äußere Membran trennt das Mitochondrium vom Cytosol der Zelle. Bei der Behandlung des Prozesses der Energieumwandlung sollen hier nur die beiden Begriffe „Matrixraum“ und „Cytosol“ benutzt werden. (Zur Lokalisation der Enzyme und zum Stoffwechsel mit seinen Wechselwirkungen zwischen den mitochondrialen Räumen siehe die ausführlichen Übersichten^[21,22].)

3. Die Elektronentransportkette

Die mitochondriale Elektronentransportkette kann sowohl nach ihrem Aufbau als auch nach funktionellen Gesichtspunkten in Multiprotein-Komplexe aufgeteilt werden, die durch die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrome c verbunden sind^[23,24]. Jeder der Multiprotein-Komplexe reicht durch die Phospholipid-Doppelschicht hindurch^[25]. Das relativ kleine, bewegliche Ubichinonmolekül, das sich in der Phospholipidphase befindet, bewegt sich wahrscheinlich von der einen zur anderen Seite der Membran^[26]. Cytochrome c schließlich ist ein auf der cytoplasmatischen Oberfläche angeheftetes „peripheres“ Membranprotein, das wahrscheinlich auf der Oberfläche diffundiert und Drehbewegungen ausführt^[27]. Die vier Multiprotein-Komplexe der Atmungskette werden üblicherweise mit den römischen Ziffern I–IV bezeichnet.

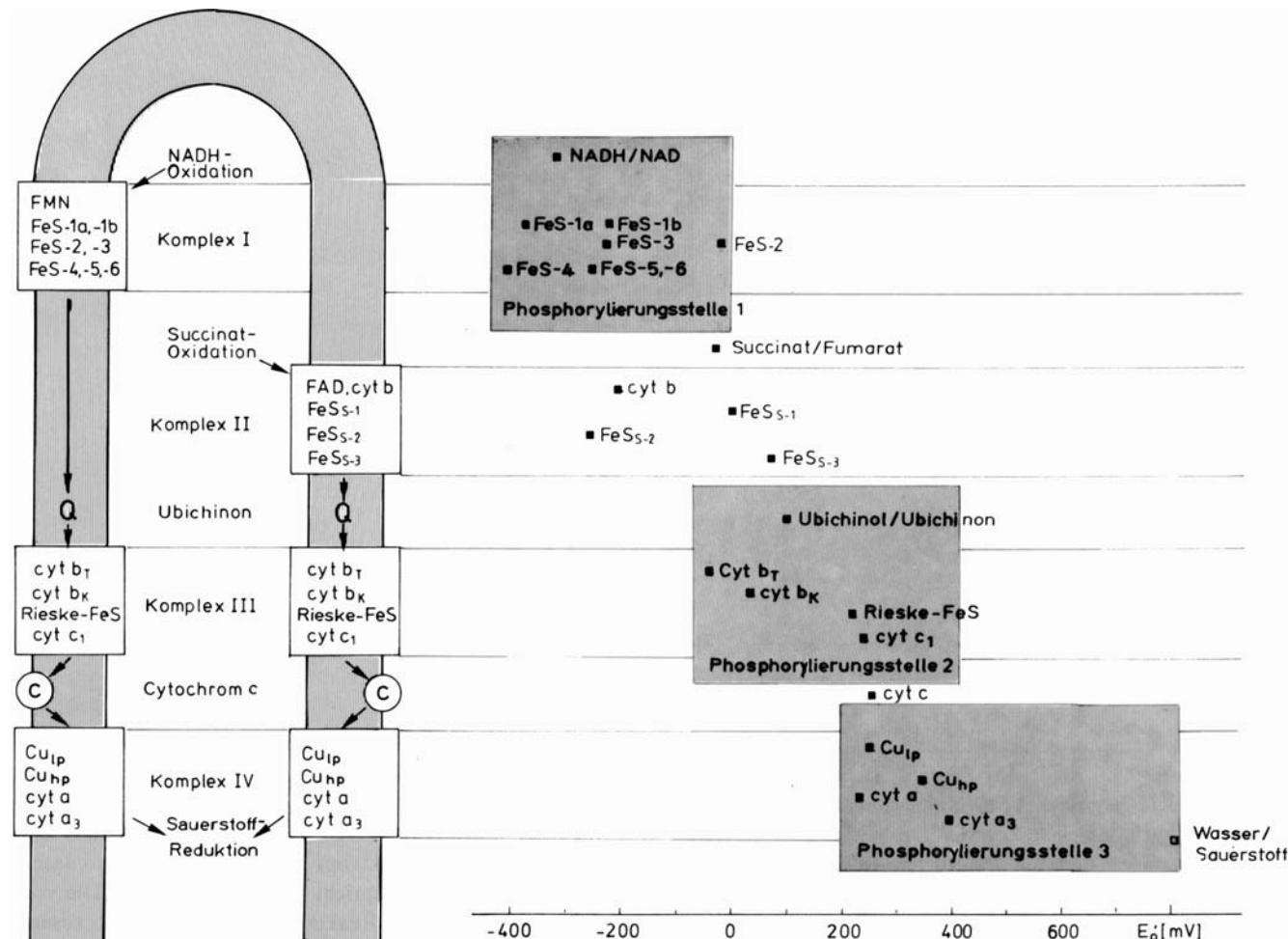


Abb. 2. Schematische Darstellung der Anordnung und der elektrochemischen Beziehung der vier elektronenübertragenden Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran. Auf der linken Membranseite ist die Beziehung der Komplexe I, III und IV, auf der rechten Membranseite die der Komplexe II, III und IV dargestellt. Die Komplexe I und III sowie II und III sind durch Ubichinon (Q), die Komplexe III und IV durch Cytochrome c (C) verbunden. Das Diagramm auf der rechten Seite der Abbildung zeigt die Halb reduktionspotentiale ($E_{\frac{1}{2}}$) der Redoxkomponenten bei pH = 7.0. Um die freie Energie der einzelnen Reduktionsschritte zu berechnen, müssten die tatsächlichen Redoxpotentiale angegeben werden, die allerdings von der jeweiligen Stoffwechselleage abhängen. Die Abweichungen betragen im allgemeinen jedoch nicht mehr als 50–100 mV. cyt = Cytochrome, Index lp bzw. hp = niedriges bzw. hohes Potential.

3.1. Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase)

Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase ist der Komplex der Atmungskette, über den man am wenigsten weiß. In Komplex-I-Präparationen wurden bedeutend mehr Polypeptide (Untereinheiten) als in Präparationen der drei anderen Atmungsketten-Komplexe gefunden (Tabelle 1)^[28-30]. Dies deutet, ebenso wie enzymatisch messbare Verunreinigungen, darauf hin, daß die bisherigen Komplex-I-Präparationen

Der Komplex I ist die Eingangspforte für Reduktionsäquivalente in Form von NADH. Die Reduktionsäquivalente werden vor allem durch die Nahrungsoxidation nach der allgemeinen Gleichung (1) bereitgestellt (S = Substrat):



Die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon ist an einen Protonentransport durch die Membran gekoppelt,

Tabelle 1. Molekulargewicht, Polypeptid-Zusammensetzung und Gehalt an prosthetischen Gruppen der Komplexe I-V aus Rinderherz-Mitochondrien.

Komplex	Molekulargewicht der kleinsten Einheit	Anzahl der Untereinheiten	Molekulargewicht der Untereinheiten ($\times 10^3$)	Bezeichnung oder Zuordnung der Untereinheiten	Gehalt an prosthetischen Gruppen [$\mu\text{mol/g}$]
I NADH: Ubichinon- Oxidoreduktase	670000	16-18	75; 52; 49; 45; 36; 33; 27; 24; 21; 19; 16; 13; 9; 8	—	FMN 1.5 Fe; S 26; 26
II Succinat: Ubichinon- Oxidoreduktase	125000	4	70 27 15 13	FAD; 2·Fe ₂ S ₂ Fe ₄ S ₄ Cyt b	FAD 5.0 Fe; S 38; 38 Häm b 4.8
III Ubichinol: Cytochrom-c- Oxidoreduktase	250000	9	49 } 47 }	Core- Proteine 2 × 30 29 25 12 11 8	Häm b 8.0 Häm c 4.0 Fe; S 8; 8
IV Cytochrom-c- Oxidase	166000	12	36 26 22 17 12 14 11 11 10.5 5.5 6 6	I keine II sichere III Zuordnung IV V VIa VIb VIc VII VIIIa VIIIb VIIIc	Häm a 12.0 Cu 12.0
V ATP- Synthetase	295000	5	2 × 55 2 × 52 2 × 30 2 × 13 2 × 8	α feste β Bindungs- γ stellen δ ϵ	FAD 1.0 Fe; S 4; 4
F ₀	(?)	4	29 20 10 7	DCCD-Bindung [a]	unsicher, ob pro- sthetische Gruppen zugehörige Kompo- nenten sind

[a] DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid.

noch Fremdproteine enthalten, z. B. Pyridinnucleotid-Transhydrogenase^[29, 31]. An Redox-Zentren hat der Komplex ein nichtkovalent gebundenes Flavinmononucleotid (FMN) und mehrere Nichthämeisen-Zentren (Abb. 2). ESR-Untersuchungen ermöglichen die Identifizierung von sieben Eisen-Schweifel-Zentren^[32], die Zugehörigkeit einiger dieser Zentren zu Komplex I ist jedoch umstritten^[33]. Die genaue Anordnung dieser Zentren wie auch die von FMN ist noch unbekannt. Aus dem spezifischen FMN-Gehalt von 1.5 $\mu\text{mol/g}$ Protein der saubersten Komplex-I-Präparation läßt sich ein minimales Molekulargewicht von 670000 berechnen. Dies ist etwa dreimal so viel wie bei den anderen Komplexen.

was für Mitochondrien^[34], submitochondriale Partikeln^[35] und auch für den in Phospholipid-Vesikeln eingebauten Komplex I^[36] gezeigt werden konnte. Die Protonen werden mit einer Stöchiometrie von 4 H^{\oplus} /oxidiertem NADH und reduziertem Ubichinon vom Matrixraum ins Cytoplasma transportiert^[7]; das entspricht 4 H^{\oplus} /2 e^{\ominus} (Abb. 3). Die vom Komplex I katalysierte Reaktion ist in Gleichung (2) zusammengefaßt; die transportierten Protonen sind kursiv geschrieben. Auf die Funktion der beiden von Ubichinon (Q) aufgenommenen Protonen wird in Abschnitt 3.4 eingegangen.



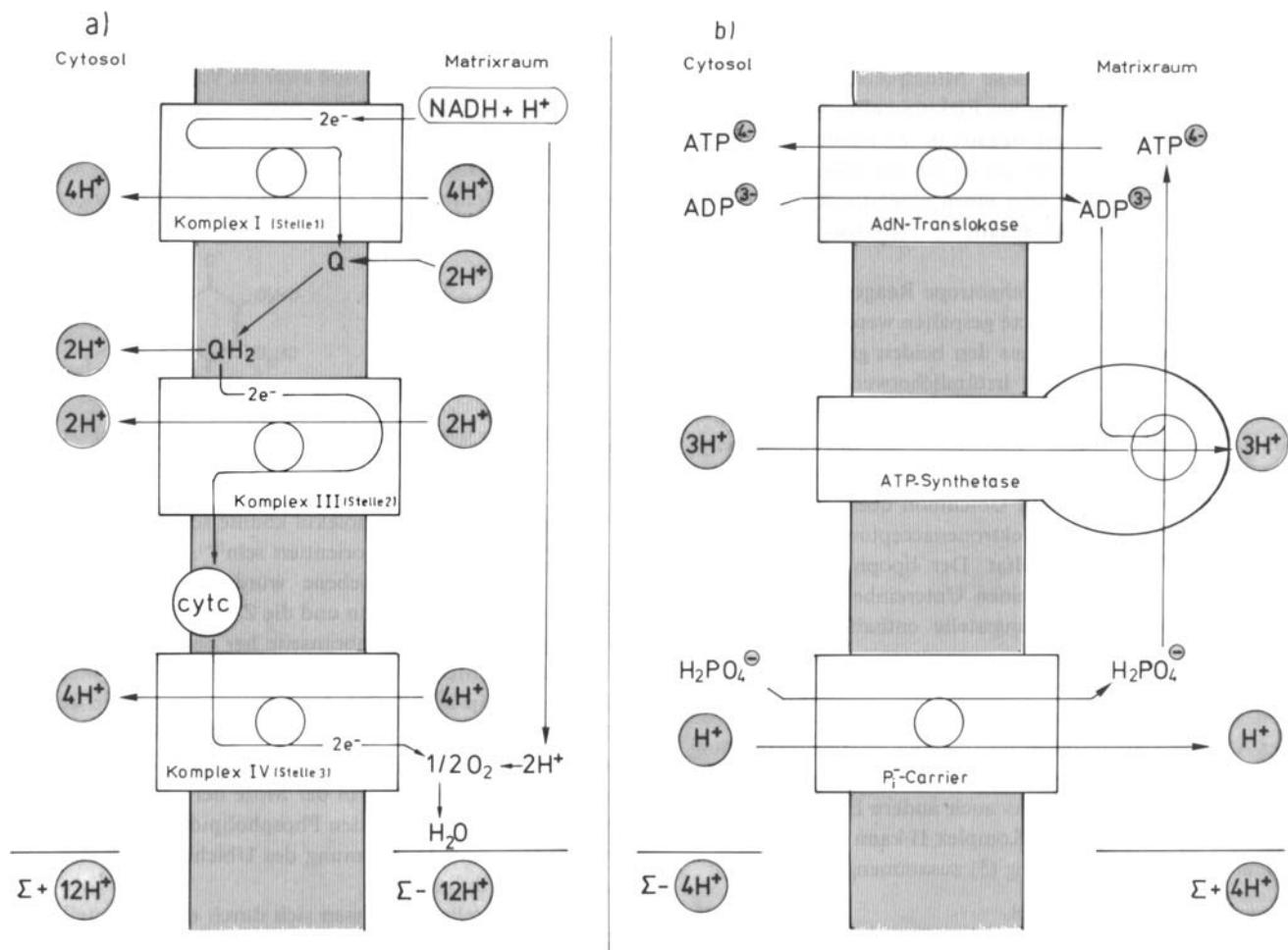


Abb. 3. Schematische Darstellung der Bildung und Nutzung des Protonengradienten bei der oxidativen Phosphorylierung. a) Bildung des elektrogenen Protonengradienten an den Komplexen I, III und IV sowie an Ubichinon (Q) beim Fluß von $2e^-$ von NADH auf Sauerstoff (schraffierte Fläche: Mitochondrienmembran; Rechtecke: Komplexe); b) Protonenrückfluß bei der ATP-Synthese. Die Ladungsbilanz beim Adeninucleotid-(ADN-)Transport wird durch die beim elektroneutralen Phosphat-Protonen-Cotransport auf der Cytosolseite verbleibende positive Ladung ausgeglichen.

Der Mechanismus dieses Protonentransports an der ersten Phosphorylierungsstelle ist noch nicht geklärt. In der ersten Fassung der chemiosmotischen Theorie wurde ein Wasserstofftransport durch FMN angenommen^[1]. Dies erforderte eine gerichtete Wasserstoffübertragung durch die Membran hindurch. Der Vorgang wäre mit der Freisetzung von zwei Protonen bei der Oxidation von $FMNH_2$ verbunden, d. h. es ergäbe sich eine $2H^+/2e^-$ -Stöchiometrie. Da aber andererseits eine $4H^+/2e^-$ -Stöchiometrie für die erste Phosphorylierungsstelle als gesichert angesehen wird, muß noch ein anderer Reaktionsmechanismus am Protonentransport beteiligt sein, der entweder für die beiden noch fehlenden Protonen oder aber für alle vier Protonen (falls FMN nicht am Protonentransport beteiligt ist) verantwortlich ist. Hierfür gibt es bisher zwei Vorschläge: 1) Ein Ubichinon-Radikal-Mechanismus mit einem die Eisen-Schwefel-Zentren FeS_1 und FeS_2 verbindenden proteingebundenen Ubichinon^[3]. Während der Übertragung eines Elektrons von FeS_1 auf dieses Ubichinon würde ein Proton von der Matrixseite aufgenommen; bei der Oxidation des hierbei entstandenen Ubisemichinons an FeS_2 würde dieses Proton ins Cytoplasma freigesetzt. 2) Im Gegensatz dazu könnten über einen Pumpmechanismus^[37] die beiden fehlenden Protonen, im Fall einer

FMN-Beteiligung am Protonentransport aber auch alle vier Protonen transportiert werden (siehe Abschnitt 3.4).

3.2. Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase)

Der zweite Multiprotein-Komplex, der Reduktionsäquivalente auf Ubichinon übertragen kann, ist die Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase. Die kleinstmögliche Einheit besteht aus nur vier Proteinuntereinheiten^[38] (Tabelle 1). An Redox-Zentren enthält Komplex II ein kovalent gebundenes Flavinadenindinucleotid (FAD), ein Häm b und drei Nichthäm-eisen-Zentren (Abb. 2)^[39]. Die Untereinheit vom Molekulargewicht 70 000 trägt das FAD, das über seine C-8-Methylgruppe an N-3 eines Histidinrestes gebunden ist^[40,41]. Die beiden Eisen-Schwefel-Zentren $FeS_{1,1}$ und $FeS_{1,2}$ (FeS_2 -Typ)^[42] befinden sich ebenfalls auf der größten Untereinheit, das dritte Eisen-Schwefel-Zentrum $FeS_{1,3}$ (Fe_4S_4 -Typ)^[43] dagegen auf der zweitgrößten Untereinheit^[44]. Das Häm-b-Zentrum kann wahrscheinlich der Untereinheit mit dem Molekulargewicht 15 000 zugeordnet werden. Das minimale Molekulargewicht des Komplexes II beträgt 125 000, wenn man eine 1:1-Stöchiometrie der vier Untereinheiten annimmt.

Die Sequenz der Redox-Zentren im Elektronenfluß ist bisher nur teilweise geklärt. Die Funktion des Häm-b-Zentrums ist unklar, da das gemessene Mittelpotential von -200 mV^[45] für eine Beteiligung am Elektronenfluß von Succinat zu Ubichinon viel zu stark negativ ist. Es wurde daher argumentiert, daß Cytochrom b an einem speziellen Stoffwechselweg beteiligt ist oder aber einen regulatorischen Einfluß auf den Elektronenfluß ausübt^[46]. Dasselbe gilt für das FeS_{x-2}-Zentrum.

Komplex II kann durch chaotrope Reagentien, z. B. Perchlorat, in zwei Teilkomplexe gespalten werden^[47]. Der wasserlösliche Anteil besteht aus den beiden großen Untereinheiten. Dieser Teil wurde irrtümlicherweise Succinat-Dehydrogenase genannt – eine Bezeichnung, die normalerweise für das Gesamtenzym als Bestandteil des Citronensäurezyklus gebraucht wird. Der Teilkomplex kann keine Elektronen mehr von Succinat auf Ubichinon übertragen, sondern nur noch auf künstliche Elektronenacceptoren, z. B. N-Methylphenazonium-methylsulfat. Der lipophile Teilkomplex besteht aus den beiden kleinen Untereinheiten, von denen eine die Ubichinon-Bindungsstelle enthalten könnte^[48-51] (siehe auch Abschnitt 3.3).

Der Elektronenfluß von Succinat zu Ubichinon ist an keinen vektoriellen Protonentransport gekoppelt. Dieser Teil der Atmungskette ist daher nicht an der Energieübertragung beteiligt, sondern überträgt Reduktionsäquivalente von Succinat zu Ubichinon, wie das auch andere Enzyme tun. Die katalytische Aktivität von Komplex II kann daher durch die einfache Reaktionsgleichung (3) zusammengefaßt werden:



An Komplex II ist ein Regulationsmechanismus wirksam^[52]. Das Enzym kann zumindest zwei Zustände annehmen. Der inaktive Zustand wird durch Oxalacetat stabilisiert, das in einer 1:1-Stöchiometrie fest an den Komplex gebunden ist^[53, 54]. Das Enzym kann durch Inkubation mit aktivierenden Liganden (z. B. einigen Dicarbonsäuren^[55], einigen Anionen wie Perchlorat, Nitrat oder Bromid^[56, 57], aber auch ATP^[58], Ubichinol^[59] oder Succinyl-CoA^[60]) in die aktive Form umgewandelt werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der aktiven und der inaktiven Form betrifft das Mittelpotential von gebundenem FAD, das von ungefähr 0 mV im aktiven auf weniger als -190 mV im inaktiven Zustand fällt. Diese Abnahme wird durch eine Konformationsänderung erklärt: Das planare oxidierte Flavin nimmt eine geknickte Form an, wie sie vom reduzierten Flavin bekannt ist^[52]. Bisher gibt es noch keine Daten für Cytochrom b und das FeS_{x-2}-Eisen-Schwefel-Zentrum, die sich vielleicht ähnlich verhalten können. Komplex II ist sehr empfindlich gegenüber SH-Gruppen-blockierenden Verbindungen. Die reaktiven SH-Gruppen können durch Substrate und kompetitive Inhibitoren geschützt werden^[61].

3.3. Ubichinon

Ubichinone sind Derivate von 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon, die an C-6 eine sechs bis zehn Isopren-Einheiten umfassende Seitenkette enthalten (Abb. 4). Die Länge dieser Seitenkette ist speziesabhängig und beträgt beispielsweise bei Säugetieren zehn Einheiten^[62], bei der Bäckerhefe nur sechs^[63]. Die stark lipophilen Ubichinonmoleküle finden sich ausschließlich in der Membran und liegen dort in ca. 10fachem Überschuß zum Komplex III vor^[64, 65].

Um die Funktion des Ubichinons zu veranschaulichen, die immer noch diskutiert wird, seien einige Bemerkungen vorangestellt. Ubichinone sind zwar im Vergleich zu den anderen Redoxkomponenten der Atmungskette (Proteinmolekülen) relativ klein, doch ist ausgestrecktes Ubichinon-10 mit ca. 5.5 nm fast lang genug, um die Phospholipid-Doppelschicht der Membran (ca. 6 nm dick) zu überbrücken (siehe

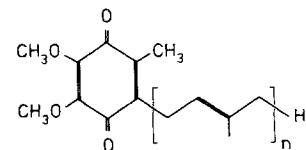


Abb. 4. Oxidiertes Ubichinon (Q); $n = 6-10$. Q-6 kommt in einigen Mikroorganismen, Q-10 in der Mitochondrienmembran der Säugetiere vor.

Abb. 5). Das Ubichinonmolekül könnte senkrecht oder parallel zur Membranebene orientiert sein^[66]. Eine Anordnung senkrecht zur Membranebene würde, wie erwähnt, ein Durchstoßen der Membran und die Zugänglichkeit des Chinonringes von einer Membranseite her bedeuten. Eine Diffusion in der Membranebene wäre leicht möglich, nicht jedoch ein „Flip-Flop“, der den Chinonring auf die andere Seite der Membran brächte, da derartige Vorgänge eine hohe Aktivierungsenergie benötigen^[67]. Die Vorstellung einer planaren Anordnung in der Mitte der Membran an der Berührungsfläche der beiden Phospholipidschichten bedachte hingegen eine Abschirmung des Ubichinonmoleküls von hydrophilen Substanzen.

Beide Vorstellungen lassen sich durch experimentelle Ergebnisse stützen wie auch in Frage stellen. Einerseits ist das Chinonsystem in der Mitochondrienmembran für hydrophile Substanzen wie Dithiothreit unzugänglich, und zwar unabhängig von der Angriffsseite dieser Substanz; andererseits können aber kurz- und langketige Ubichinone die Reduktion von in Phospholipid-Vesikeln eingeschlossenem Eisen(III)-cyanid durch externes Dithionit vermitteln^[68]. Hierbei zeigen sich allerdings bemerkenswerte kinetische Unterschiede in Abhängigkeit von der Länge der Isoprenoid-Seitenkette. Ubichinon-9 katalysiert die Reduktion schneller als Ubichinon-1, die Aktivierungsenergie dieser Reaktion ist aber bei den langketigen Ubichinonen viel höher als bei den kurzketten. Eine denkbare Beteiligung des Doppelbindungssystems an der Reaktion wurde durch Experimente mit einem Ubichinon-9-Analogon mit gesättigter Seitenkette ausgeschlossen, da sich dieses wie Ubichinon-9 verhielt^[68].

Die widersprüchlichen Ergebnisse über die Zugänglichkeit des in die Membran eingebetteten Ubichinons für polare Reduktionsmittel könnten sowohl durch die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Membranen (die mitochondriale Innenmembran hat einen hohen Gehalt an negativ geladenem Cardiolipin und mehr als 70% Proteinanteil, während die Phospholipid-Vesikeln aus neutralem Phosphatidylcholin bestehen) als auch durch die unterschiedliche Krümmung der Membranen, die die Packungsdichte der Moleküle beeinflußt, bedingt sein. In einem direkteren Versuch, die Lokalisierung des Ubichinons in der Membran aufzuklären, wurde die Fluoreszenzlösung der Verbindung 12-(9-Anthroyl)stearinsäure verfolgt, die 1.4 nm in die Membran eindringt^[69]. Die Lösung wurde dem Chinonring in Ubichinon zugeschrieben, der sich in dieser Entfernung von der Membran-Oberfläche befindet.

Die Anordnung des unteren Ubichinonmoleküls in Abbildung 5 zeigt unsere gegenwärtigen Vorstellungen über die Orientierung des Ubichinons in der Membran. Wir gehen von einer Kombination der beiden diskutierten Orientierungsmöglichkeiten aus. Der Hauptteil der Isopren-Seitenkette der langkettigen Ubichinone befindet sich demnach zwischen den beiden Phospholipidschichten, und die Kopfregion mit den beiden ersten Isopren-Einheiten steht senkrecht zur Membranebene. Das Eindringen der Kopfregion in die Phospholipidschicht wird durch einen Knick zwischen der zweiten und dritten Isopren-Einheit der Seitenkette er-

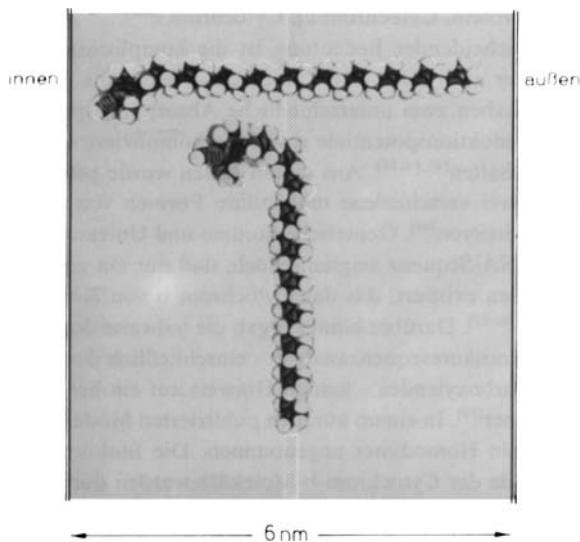


Abb. 5. Hypothetische Anordnung von Ubichinon-10 (Q-10) in der inneren Mitochondrienmembran, dargestellt durch das untere Ubichinonmolekül. Q-10 liegt mit dem Hauptteil seiner Isoprenseitenkette zwischen den beiden Phospholipidschichten, mit der Kopfregion und den beiden ersten Isopreneinheiten jedoch senkrecht zur Membranebene, was durch einen 90°-Knick in der Seitenkette verursacht wird (Diskussion siehe Text).

möglich (siehe Abb. 5). Nach dieser Vorstellung wird der Transport von Reduktionsäquivalenten von der inneren zur äußeren Membranseite durch eine Rotation des Ubichinons um die Achse der „Schwanzregion“ ermöglicht. Diese Bewegung könnte als ein durch Verankerung erleichterter „Flip-Flop“-Mechanismus bezeichnet werden.

Ubichinone mit weniger als drei Isopren-Einheiten diffundieren wahrscheinlich frei in der Membran und vermitteln dadurch einen Transport von Redoxäquivalenten. Dieser Mechanismus benötigt weniger Aktivierungsenergie als der vorgeschlagene erleichterte Flip-Flop-Mechanismus. Die höhere Reduktionsgeschwindigkeit von Eisen(III)-cyanid durch langkettige Ubichinone könnte auf der Fixierung des Ubichinonschwanzes beruhen, da diese Fixierung eine erfolgreiche Kollision des Ubichinonkopfes mit dem entsprechenden Reaktionszentrum begünstigen könnte.

Um die Funktion von Ubichinon in der Atmungskette zu erklären, wurden mehrere Möglichkeiten vorgeschlagen. Es scheint außer Zweifel zu stehen, daß Ubichinon als Coenzym wirkt, das Redoxäquivalente von den Komplexen I und II, aber auch von anderen Dehydrogenasen, auf den Komplex III überträgt (Abb. 2 und 3). Viele experimentelle Daten führen zur Vorstellung eines einheitlichen Ubichinon-Redoxpools, der die Dehydrogenasen mit Komplex III verbindet^[70, 71]. In letzter Zeit häufen sich allerdings Befunde, die

in Widerspruch zu dieser Vorstellung sind und darauf hindeuten, daß eine weitere Ubichinonspezies, und zwar proteingebundenes Ubichinon, existiert. Neuere Ergebnisse legen es beispielsweise nahe, daß Komplex I und Komplex III eine Einheit bilden, die Elektronen von NADH auf Cytochrome c überträgt. Mit weniger als drei Ubichinonmolekülen pro Einheit wird hierbei schon nahezu maximale Aktivität erreicht^[72]. Mit Ubichinon- und Phospholipid-Überschüß kann ein „Pool“-Verhalten wiederhergestellt werden^[73], das allerdings durch eine schnelle Dissoziation-Reaggregation der Komplex-I-III-Einheit und nicht durch einen alle beteiligten Komplexe verbindenden Ubichinon-Pool erklärt wird. Aus kinetischer Sicht erscheint jedoch eine Redox-Verbindung durch einen Ubichinon-Pool wahrscheinlicher als der vorgeschlagene Aggregationsprozeß, der eine geeignete Anordnung der riesigen Komplexe erfordern würde. Eine analoge Einheit (eine Art „Superkomplex“), bestehend aus den Komplexen II und III, wurde ebenfalls beschrieben^[74].

Aus ESR-Untersuchungen wurde auf ein Ubisemichinon-Paar geschlossen, dessen durch die Sauerstoffatome führende Achse senkrecht zur Membranebene steht^[51]. Diese Orientierung, wie auch eine Funktion von Semichinonen, ist unwahrscheinlich, wenn die Radikale nicht durch ein Protein stabilisiert werden. Die Untereinheit vom Molekulargewicht 15000 des Komplexes II, das vermutlich Ubichinon-bindende Protein, könnte eine solche Rolle spielen^[48].

Die Beteiligung von Ubichinon am Protonentransport ist noch nicht endgültig geklärt. Wie ursprünglich vorgeschlagen^[2], könnte es als Wasserstoffüberträger über die Membran wirken (Abb. 6). Bei diesem Mechanismus („Redox-

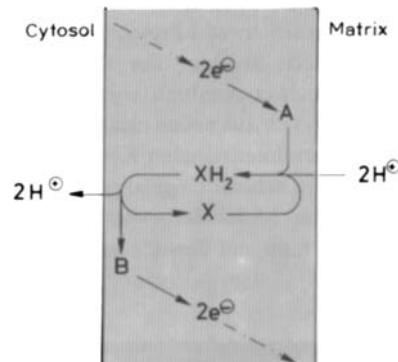


Abb. 6. Schematische Darstellung eines Redox-Loop-Prozesses mit $2\text{H}^{\oplus}/2\text{e}^{\ominus}$ -Stöchiometrie. Die bewegliche Wasserstoffübertragende Komponente X nimmt am Reaktionszentrum A (auf der Matrixseite der Membran) zwei Elektronen sowie zwei Protonen aus dem Matrixraum auf. XH_2 gibt zwei Elektronen an das Reaktionszentrum B (auf der Cytosolseite) und zwei Protonen ins Cytosol ab. Beim Ubichinon-Loop ist $\text{X} = \text{Ubichinon}$.

Loop“) wird Ubichinon (X) am aktiven Zentrum der Redoxkomponente A auf der Matrixseite der Membran zu Ubichinol (XH_2) reduziert. Die Reduktion wird von der Aufnahme von zwei Protonen begleitet. Nach der Wanderung durch die Membran wird XH_2 am Redox-Zentrum der Komponente B auf der Cytosolseite der Membran oxidiert, wobei zwei Protonen ins Cytoplasma freigesetzt werden. Die Elektronen fließen danach weiter auf den nächsten Elektronenacceptor. Nach Untersuchungen an Chloroplasten scheint dieser Mechanismus in der Natur zu existieren^[11].

3.4. Komplex III (Ubichinol: Cytochrom-c-Oxidoreduktase)

Komplex III überträgt Redoxäquivalente von Ubichinol auf Cytochrom c. Seine kleinstmögliche Einheit umfaßt acht bis neun Polypeptide (Tabelle 1)^[46, 75, 76]. Die beiden größten Polypeptide vom Molekulargewicht 49000 und 47000 werden üblicherweise „Core-Proteine“ genannt^[77]. Obwohl sie keine Redox-Zentren enthalten, haben sie außer strukturellen noch weitergehende Funktionen (s. u.). Die vier Polypeptide von mittlerem Molekulargewicht weisen alle ein Redox-Zentrum auf. Sie umfassen zwei Cytochrom-b-Moleküle (Molekulargewicht jeweils 30000)^[78, 79], das Rieske-Eisen-Schweif-Protein (Fe₂S₂-Typ, Molekulargewicht 25000)^[80, 81] und schließlich Cytochrom c₁ (Molekulargewicht 29000)^[82] (Abb. 2). Die übrigen zwei bis drei Polypeptide haben nur Molekulargewichte von etwa 12000, 11000 und 8000; sie enthalten kein Redox-Zentrum^[76]. Die Funktion der vier bis fünf Polypeptide ohne Redox-Zentren wurde bisher nicht aufgeklärt, obwohl sie die Hälfte der Masse des Komplexes bilden. Die Cytochrom-b-Moleküle sind auf der mitochondrialen DNA codiert^[83], während die Information für die anderen Polypeptide auf Kern-Genen liegt^[84]. Im Gegensatz dazu findet sich das Gen für Cytochrom b von Komplex II auf der DNA des Kerns^[85].

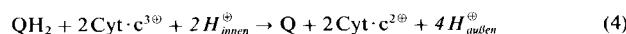
Addiert man die Molekulargewichte der Polypeptide und nimmt an, daß in einem Komplex zwei Häm-b- und ein Häm-c-Molekül enthalten sind, so errechnet man ein Molekulargewicht von 250000 für die kleinstmögliche Einheit. Wird der Komplex jedoch in Gegenwart milder Detergentien isoliert und gelchromatographisch und durch Ultrazentrifugation untersucht, so verhält er sich wie ein Molekül vom Molekulargewicht 500000^[86]. Deshalb wurde spekuliert, daß dieser 2 × 250000-Komplex (mit vier Cytochrom b, zwei Eisen-Schweif-Proteinen und zwei Cytochrom c₁) die funktionelle Struktur des Komplexes ist, wie sie in der Mitochondrienmembran vorliegt^[86]. Dieselbe Quartärstruktur ergab sich aus neuen elektronenmikroskopischen Studien von „zweidimensionalen Kristallen“ des in eine Phospholipid-Doppelschicht eingelagerten Komplexes III^[87]. Die Moleküle vom Molekulargewicht 500000 liegen in einer gegeneinander liegenden („up and down“) Anordnung im „Kristallgitter“.

Die grobe Architektur des Moleküls wurde durch Rekonstruktion aus den Ultramikrogrammen abgeleitet (Abb. 7). Ein starkes Drittel des Dimers ragt über die innere Oberfläche und etwa ein Viertel über die äußere Oberfläche der Phospholipid-Doppelschicht hinaus. Die Hälften des dimeren Komplexes berühren sich im Inneren der Phospholipid-Doppelschicht. Als Kontaktflächen fungieren möglicherweise die vier Cytochrom-b-Moleküle. So ergibt sich die Möglichkeit, daß diese vier Moleküle des Dimers kooperativ an der Energieumwandlung beteiligt sind (s. u.).

Die Sequenz der Redoxkomponenten im Elektronenfluß ist noch nicht ganz klar. Folgende Anordnung wird vorgeschlagen: Ubichinon, zwei Cytochrom-b-Moleküle, Eisen-Schweif-Protein, Cytochrom c₁, Cytochrom c^[46].

Von entscheidender Bedeutung ist die komplizierte Anordnung der zwei oder vier Cytochrom-b-Moleküle. Diese Moleküle haben zwei unterschiedliche Absorptionsspektren und Halbreduktionspotentiale sowie ein kompliziertes kinetisches Verhalten^[46, 81, 88]. Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß zwei verschiedene molekulare Formen von Cytochrom b existieren^[89]. Genetische Studien und Untersuchungen der DNA-Sequenz zeigten jedoch, daß nur ein einziges Struktur-Gen existiert, das das Cytochrom b von Komplex III codiert^[90, 92]. Darüber hinaus ergab die teilweise durchgeführte Aminosäuresequenzanalyse – einschließlich des Amino- und Carboxylen – keinen Hinweis auf ein heterogenes Monomer^[79]. In einem kürzlich publizierten Modell wurde daher ein Homodimer angenommen. Die funktionellen Unterschiede der Cytochrom-b-Moleküle wurden durch kooperative Wechselwirkungen erklärt^[37].

Komplex III übernimmt Redoxäquivalente von Ubichinol, das durch Komplex I oder II oder andere Dehydrogenasen reduziert wurde, und überträgt sie auf Cytochrom c. Zwischen den Cytochrom-b-Molekülen und dem Eisen-Schweif-Protein tritt ein großer Sprung im Halbreduktionspotential auf; dieser Teil des Komplexes wurde daher der zweiten Phosphorylierungsstelle zugeordnet (Abb. 2). Die durch Komplex III katalysierte Elektronenübertragung ist mit einer Protonentranslokation gekoppelt, wobei sich wie bei Komplex I ein Verhältnis von 4 H⁺/2 e[−] ergibt (Abb. 3)^[7, 93]. Die Gesamtreaktion an Komplex III kann daher folgendermaßen beschrieben werden:



Der Mechanismus dieser vektoriellen Protonenbewegung wird noch untersucht. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, könnte ein Ubichinon-Loop nur die Hälfte der Protonen transportieren. Alternativ wurde ein Ubichinonzyklus in Erwägung gezogen (Abb. 8)^[94, 95]. Er ist durch den Rückfluß eines Elektrons charakterisiert (gestrichelte Linie), wodurch sich die H⁺/e[−]-Stöchiometrie verdoppelt. Der Zyklus beginnt mit der Reduktion von Ubichinon durch ein Elektron von einem Cytochrom b aus Komplex III und der gleichzeitigen Aufnahme eines Protons von der Matrixseite (Reaktion 1). Anschließend wird das entstandene Semichinonradikal QH[−] durch ein Elektron reduziert, das von einem Eisen-Schweif-Zentrum in Komplex I oder II stammt, unter gleichzeitiger Aufnahme eines zweiten Protons von der Matrixseite (Reaktion 2). Nachdem das Ubichinol durch die Membran gewandert ist, wird es von Komplex III wieder oxidiert, wobei es 2 H⁺ auf die Cytosolseite abgibt. Das eine

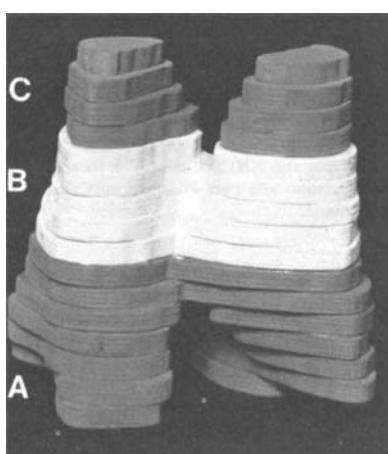


Abb. 7. Modell der Grobstruktur des Komplex-III-Dimers. Die weiße Region (B) ist der in die Membran eingebettete Teil des Komplexes. Die obere dunkle Region (C) ragt in das Cytosol, die untere dunkle Region (A) ragt in den Matrixraum. (Mit freundlicher Genehmigung von K. R. Leonard und H. Weiss, noch unveröffentlicht.)

Elektron geht auf Cytochrom b über (Reaktion 3), wo es für die Reduktion des nächsten Ubichinonmoleküls gebraucht wird, das andere wird auf das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein von Komplex III weitergeleitet und reduziert schließlich Cytochrom c (Reaktion 4). Der Mechanismus erfordert zwei

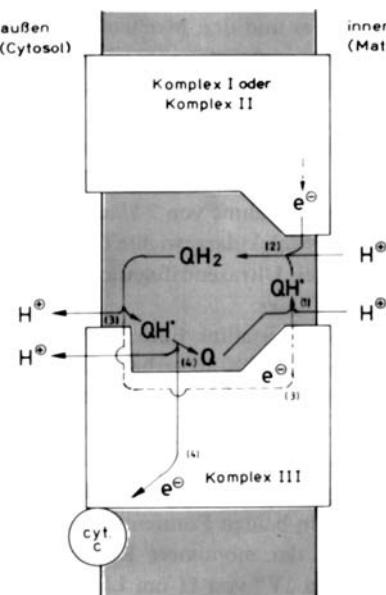


Abb. 8. Hypothetisches Schema des mit einer $4\text{H}^+/\text{e}^-$ -Stöchiometrie arbeitenden Ubichinonyzyklus (Reihenfolge der Reaktionen und Lage der Reaktionszentren siehe Text).

Ubichinonradikale QH° als Zwischenstufen. Das Auftreten eines Radikals zwischen Reaktion 3 und Reaktion 4 ist vorstellbar, da es an einem gemeinsamen Reaktionszentrum stabilisiert werden könnte. Ein Radikal jedoch, das als Produkt der Reaktion 1 entsteht, muß von Komplex III zu Komplex I oder II wandern. Wegen der geringen Stabilität dieser Spezies kann man sich diese Wanderung nur schwer vorstellen, wenn man nicht einen strukturellen Zusammenhang der beteiligten Komplexe annimmt. Deshalb sollte man in Erwägung ziehen, daß Protonen, zusätzlich oder alternativ zum Transfer über den Ubichinon-Loop durch einen Protonentranslokator durch die Membran gepumpt werden können.

Als Protonentranslokator bieten sich die Cytochrom-b-Moleküle des Komplexes III an^[37,96].

Cytochrom b reagiert in Abhängigkeit von seinem Reduktionszustand unter Protonierung/Deprotonierung (Abb. 9). Aus der Analyse veröffentlichter Redoxtitrationen^[97, 98] wurde abgeleitet, da bei physiologischem pH-Wert der Protionierung 1 der Gruppe R die Reduktion 2 des Hamzentrums folgt. Der Zyklus besteht aus einer symmetrischen Reaktionsfolge, da nach der Oxidation 4 die Deprotonierung 5 stattfindet. Die Reaktionen 3 und 6 sind Konformationsänderungen von Cytochrom b. Im Verlauf von Reaktion 3 wird der Aminosauerrest R von der Matrixposition, d. h. einer inneren Lage, zu einer Cytosolposition, d. h. einer aueren Lage, umgeklappt. Reaktion 6 umfast die Rückkehr der Gruppe R in ihre ursprüngliche Lage. Für die Gruppe R wurde ein pK-Wert von 6.9 bzw. 8.5 für das oxidierte bzw. reduzierte Häm-Zentrum berechnet^[37]. Entsprechend der symmetrischen Reaktionssequenz finden Protonierung und Deprotonierung auf beiden Seiten der Membran bei einem pK-Wert von 6.9 statt. In der inneren Lage stabilisiert die

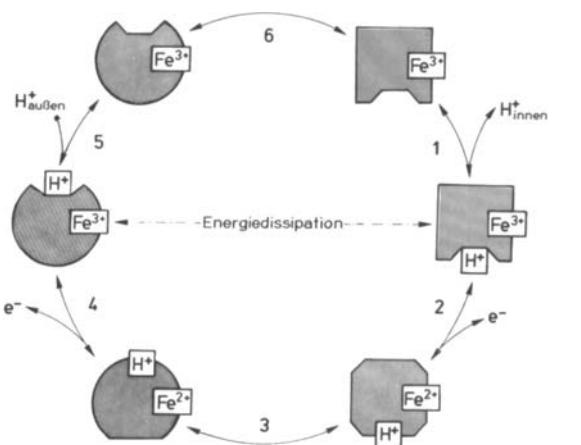


Abb. 9. Schema der Reaktionssequenz von Cytochrom b, das als Protonentranslokator mit einer $2\text{H}^+/\text{2e}^-$ -Stöchiometrie arbeitet. Die eckige Form symbolisiert Cytochrom b mit von der Matrixseite her zugänglicher protonierbarer Gruppe R. Die runde Form symbolisiert das entsprechende, von der Cytosolseite zugängliche Molekül. Die Reduktion von Cytochrom b führt zu einem Anstieg des pK-Werts der Gruppe R von 6.9 auf über 8.5, was die geschlossene Form der Protonenbindungsstelle andeutet. Der gepunktete Pfeil steht für die Möglichkeit eines unproduktiven Übergangs, der wahrscheinlich nur in geringem Ausmaß stattfindet (siehe Text).

pK-Änderung (von 6.9 auf 8.5 durch die Reduktion) den protonierten Zustand der Gruppe R während der Translokation (Reaktion 3); in der äußeren Lage erleichtert die pK-Änderung (von 8.5 auf 6.9 durch die Oxidation) die Abgabe des H⁺ auf die Cytosolseite. Eine Umkehr der Reaktionssequenz kann experimentell durch ein hohes Phosphorylierungspotential ($[ADP]/([ADP] \cdot [P_i])$) induziert werden. Die Elektronen fließen dabei die Elektronentransportkette aufwärts. Der Vorgang wird durch einen über die Rückreaktion der ATP-Synthetase, d. h. ihre ATPase-Aktivität, aufgebauten Protonengradienten getrieben (siehe Abschnitt 4).

Das vorgestellte Modell einer Cytochrom-b-Protonenpumpe setzt vor allem voraus, daß die als Protonentranslokator wirkende Redoxkomponente ihre Konformation in Abhängigkeit vom Redoxzustand des Metallzentrums andert. Bei Cytochrom b geht das Eisen des Häm-Zentrums vom zweiwertigen in den dreiwertigen Zustand über, wobei durch eine Konformationsänderung ein Aminosauererest R (z. B. Histidin) verschoben wird. In Abhängigkeit vom Redoxzustand des Häm-Zentrums andert sich der pK-Wert des bewegten Restes, was die Protonentranslokation erleichtert. Ein analoges Modell wurde auch für die Cytochrom-Oxidase, die als Protonenpumpe arbeitet, vorgeschlagen^[99]. Wahrscheinlich würde eine Verschiebung des Aminosauererestes R um einige Zehntel Nanometer ausreichen, um den Abstand zwischen zwei Protonenkanalen zu überbrücken und so die Verbindung zwischen der Matrix- und der Cytosolseite der Membran herzustellen^[100]. Diese Protonenkanale könnten von einer α -helicalen Struktur des Protonentranslokators (Cytochrom b) gebildet werden^[101], die sich senkrecht zur Membranebene befindet, aber auch zusätzlich von α -helicalen Strukturen benachbarter Polypeptid-Untereinheiten, z. B. den Core-Proteinen. Im Gegensatz zu einer denkbaren Verschiebung einer Gruppe R infolge des Rückflusses von Protonen bei der protonengetriebenen ATPase^[102] bewegt sich die Gruppe RH⁺ des Protonentranslokators gegen einen Protonengradienten und gegen das Membranpotential; treibende Kraft ist die bei der Substratoxidation freiwerdende Energie.

Es fragt sich nun, ob ein nichtproduktiver Übergang von (Cyt. b³⁺ H⁺)_{außen} zu (Cyt. b³⁺ H⁺)_{innen}, angedeutet durch die gestrichelte Linie in Abbildung 9, stattfindet und bewirkt, daß weniger als 2H⁺/2e[−] transportiert werden.

Man könnte spekulieren, daß in Analogie zur Situation bei anderen enzymkatalysierten Systemen^[103] immer eine gewisse Unspezifität vorhanden ist, welche eine ausreichend hohe Geschwindigkeit der Translokation sicherstellt. Eine Abnahme des cytosolischen pH-Wertes unter experimentellen Bedingungen könnte weiterhin das Ausmaß dieser Energiedissipation vergrößern, da sich (Cyt. b³⁺ H⁺)_{außen} anhäuft. Unter physiologischen Bedingungen würde der Protonentranslokator mit einer durchschnittlichen Ausbeute von etwas weniger als 2H⁺/2e[−] arbeiten. Für diesen Fall müßten wir unsere frühere Feststellung korrigieren, daß die H⁺/e[−]-Stöchiometrie eines solchen Systems immer ganzzahlig ist^[37]. Die geringfügige Energiedissipation bei der Protonentranslokation muß von der Energiedissipation großen Ausmaßes unterschieden werden, die von einem Hydroxidionen-Translokator des braunen Fettgewebes bewirkt wird und speziell der Erzeugung von Wärme dient (siehe Abschnitt 8).

Zusammenfassend sei festgestellt, daß an Komplex III, d. h. an der zweiten Phosphorylierungsstelle, zwei Redoxprotonenpumpen beteiligt sein müssen, sofern kein Protonentransport über Ubichinon stattfindet, da für ein Cytochrom-b-Molekül eine 2H⁺/2e[−]-Stöchiometrie gilt. Diese Arbeit könnten die beiden Cytochrom-b-Moleküle verrichten, wenn sie in Serie geschaltet wären. Dies würde jedoch dem von uns vorgeschlagenen Modell^[37] widersprechen.

3.5. Komplex IV (Ferrocyanochrom c: Sauerstoff-Reduktase)

Komplex IV, der letzte Abschnitt der Atmungskette, ist auch als Cytochrom-Oxidase bekannt. Im Vergleich zu den anderen Atmungskettenkomplexen wurde er nach Struktur und Funktion schon sehr intensiv untersucht^[99, 104, 105]. Das Enzym, das aus mehreren Untereinheiten besteht, übernimmt Elektronen von Ferrocyanochrom c und überträgt sie schließlich auf Sauerstoff, wobei ein Sauerstoffmolekül zu zwei Wassermolekülen reduziert wird (Abb. 2). Einzelheiten über den Mechanismus der Sauerstoffaktivierung sollen hier nicht beschrieben werden (Übersichten siehe^[106, 107]). Dieser Abschnitt soll hauptsächlich strukturelle Aspekte und den wahrscheinlichen Mechanismus der Protonenübertragung in diesem Teil der Atmungskette behandeln. Die Energieumwandlungsstelle an Komplex IV wird traditionsgemäß dritte Phosphorylierungsstelle genannt.

Die kleinstmögliche Einheit des Komplexes besteht aus zwölf Polypeptiden^[108] (Tabelle 1). Sie enthält vier elektronenübertragende Zentren: zwei Kupferzentren – das eine mit niedrigem, das andere mit hohem Potential^[109] (Abb. 2) –, und zwei Hämgruppen, die als Cytochrom a und Cytochrom a₃ bezeichnet werden^[110]. Es war bisher nicht möglich, die vier Redox-Zentren wie bei Komplex III (siehe Abschnitt 3.4) einzelnen Polypeptiden zuzuordnen, da Komplex IV noch nicht unter milden Bedingungen in seine funktionellen Polypeptide zerlegt werden konnte. Die Verwendung hoher Salz- und Detergenskonzentrationen führt zur Ablösung der Redox-Zentren von den Apoproteinen.

Die drei größten und am stärksten hydrophoben Polypeptide werden auf der mitochondrialen DNA codiert^[111, 112].

und an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert; die verbleibenden Polypeptide sind Produkte der cytosolischen Proteinsynthese.

Es gibt wahrscheinlich mehr Analogien zwischen Komplex IV und III als man bisher annahm. Dies gilt nicht nur für den unterschiedlichen Ort der Proteinsynthese für die einzelnen Untereinheiten, den Mechanismus des Zusammensetzens des Gesamtkomplexes und den Mechanismus der Protonentranslokation, sondern auch für die Quartärstruktur der Moleküle und die mögliche kooperative Funktion der Häm-Zentren.

Das Molekulargewicht der kleinstmöglichen Einheit von Komplex IV beträgt 166000, berechnet aus dem Hämgehalt von 12 μmol/g Protein, unter Annahme von 2 Häm a/minimale Einheit. Die Summe der Molekulargewichte der Untereinheiten beträgt 178000. Bei Ultrazentrifugationsstudien verhält sich das Molekül als Dimer.

Komplex IV wurde in zwei kristalline Formen gebracht. Durch Negativextraktion mit Triton X-100 erhaltenes Protein zeigt einen höheren Phospholipidgehalt^[113] als Präparationen in Desoxycholat^[114]. Die Tritonpräparation bildet Vesikel, die den Komplex als Dimer enthalten^[115], während die Cholatpräparation Schichten bildet, in denen der Komplex monomer angeordnet ist^[116]. In beiden Formen der „zweidimensionalen Kristalle“ zeigt der monomere Komplex die groben Umrisse eines schiefen „Y“ von 11 nm Länge (Abb. 10). Die Arme des „Y“ sind 5.5 nm lang. Sie zeigen zur Matrixseite der Membran, und man glaubt, daß sie in der Phospholipid-Doppelschicht eingebettet sind. Der Stamm des „Y“, der ebenfalls 5.5 nm lang ist, befindet sich auf der Cytoplasmaseite der Membran und ragt wahrscheinlich aus deren Oberfläche heraus.

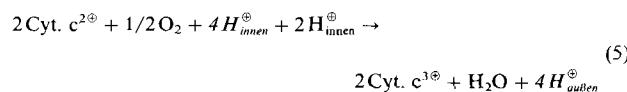
Diese Studien führten zur Annahme, daß das Dimer (nicht gezeigt), das vier Cytochrom-a-Moleküle und vier Kupferzentren enthält, der funktionelle Zustand von Komplex IV in der inneren Mitochondrienmembran ist^[115]. Neben der Kenntnis der Grobstruktur und der Abgrenzung des



Abb. 10. Modell der Grobstruktur des monomeren Komplexes IV. M1 und M2 sind die Domänen auf der Matrixseite, C die Domäne auf der Cytoplasmaseite (mit freundlicher Genehmigung von R. Henderson).

Moleküls gibt es jedoch bisher keine genauen Daten über die geometrische Anordnung der Untereinheiten in diesem Komplex. Die Reihenfolge und Funktion der vier Metallzentren im Elektronenfluß sind nur teilweise geklärt. Die Halbreduktionspotentiale von Cytochrom a und a_3 unterscheiden sich um etwa 200 mV (Abb. 2)^[117]; ein wesentlich größerer Potentialsprung – etwa 400 mV – tritt jedoch zwischen Cytochrom a₃ und Sauerstoff auf.

Während der letzten drei Jahre wurde bewiesen, daß der Elektronenfluß von Ferrocyanochrom c zu Sauerstoff mit einem vektoriellen Protonentransport gekoppelt ist (Abb. 3)^[118]. Die Daten ergaben sich aus zahlreichen Studien mit Komplex IV, der in Phospholipid-Vesikel eingebaut war, sowie aus Studien an dem in der Mitochondrienmembran eingebetteten Komplex^[119, 120]. Für das isolierte und in Phospholipid-Vesikel eingebaute Enzym ergab sich eine $2\text{H}^{\oplus}/2\text{e}^{\ominus}$ -Stöchiometrie^[99]; die Stöchiometrie des Prozesses in der biologischen Membran beträgt $4\text{H}^{\oplus}/2\text{e}^{\ominus}$ ^[121]. Die $2\text{H}^{\oplus}/2\text{e}^{\ominus}$ -Stöchiometrie, die in Vesikelpräparationen gefunden wird, könnte durch eine nur teilweise Wiederherstellung der Pumpfähigkeit in diesem künstlichen System bedingt sein. Der Gesamtprozeß, der von Cytochrome-c-Oxidase katalysiert wird, kann folgendermaßen zusammengefaßt werden:



Die transportierten Protonen sind kursiv geschrieben (siehe Abb. 3).

Komplex IV ist ein Segment der Atmungskette, das kein Chinon oder andere bewegliche Wasserstoffüberträger enthält. Diese Ergebnisse zwingen daher fast zu dem Schluß, daß der Protonentransport durch Komplex IV von zwei in Sequenz verbundenen Protonenpumpen bewirkt wird. Die Cytochrom-a- und -a₃-Moleküle können wie die Cytochrom-b-Moleküle von Komplex III hierfür als mögliche Kandidaten betrachtet werden, da ihre Halb reduktionspotentiale pH-abhängig sind^[122].

3.6. Cytochrom c

Im Gegensatz zu den meisten anderen Komponenten der Atmungskette ist Cytochrom c ein Protein, das strukturell und funktionell auf molekularer Ebene charakterisiert ist, und anders als die anderen Komponenten ist es ein hydrophiles Molekùl. Bei Cytochrom c handelt es sich um ein peripheres Membranprotein, das ohne Detergentien extrahiert werden kann. Es kann schon durch hohe Ionenstärke von seiner Bindungsstelle auf der Außenseite der inneren Mitochondriemembran abgelöst werden. Man kann es sehr leicht reinigen, wenn man seinen hohen isoelektrischen Punkt ausnutzt^[123]. Das Molekulargewicht von Cytochrom c beträgt etwa 12000^[124]. Charakteristisch für die meisten Cytochrome vom Typ c ist die kovalente Bindung von Protoporphyrin IX an das Apoprotein über zwei Thioetherbrücken, die von den Vinylgruppen des Protoporphyrins IX und zwei Cystein-Thiolgruppen des Proteins gebildet werden^[125]. Die Aminosäuresequenz von Cytochrom c ist für mehr als 50 Spezies bekannt^[126]. Aus diesen Daten wurde ein phylogenetischer Stammbaum konstruiert^[127]. Darüber hinaus konnte

die dreidimensionale Struktur von Cytochrom c aus Thunfischherz mit einer Auflösung von 0.2 nm ermittelt werden^[128]. Das Häm wird durch die beiden Thioetherbrücken zu Cys-14 und Cys-17 in einer hydrophoben Tasche gehalten (Abb. 11). Auf der rechten und der linken Seite (Abb. 11) des mit einer Ecke dem Medium zugänglichen Hämsystems kann man den fünften und sechsten Eisenliganden, His-18 und Met-80, erkennen. Die meisten basischen Aminosäuren (Lys-5, Lys-7, Lys-8, Lys-13, Lys-27, Lys-73, Lys-86, Lys-87) umgeben die Öffnung der Tasche. Dies ist ein allgemeines Merkmal von Cytochrom c aus verschiedenen Quellen.

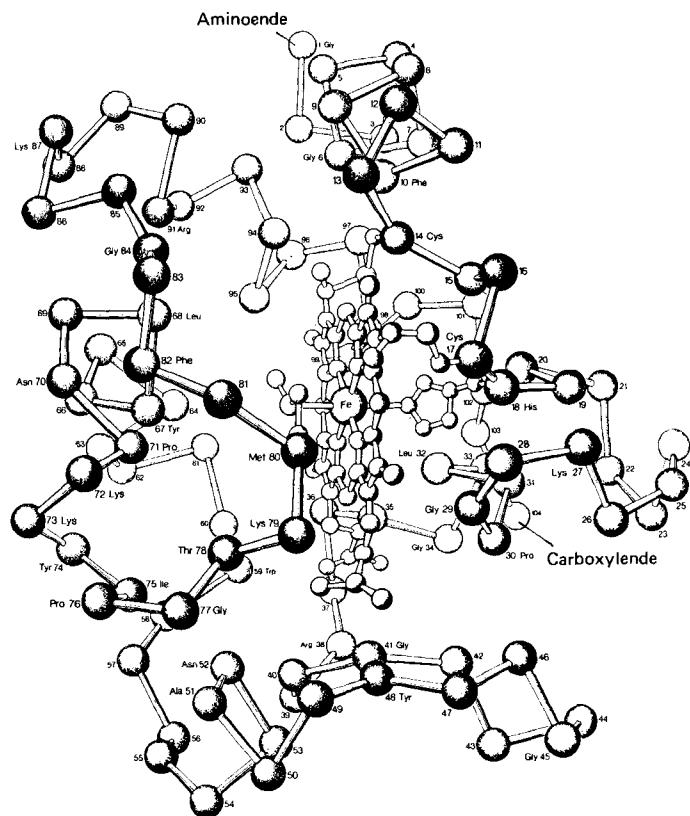


Abb. 11. Gerüst der Aminosäure- α -C-Atome von Cytochrom c aus Pferdeherz (mit freundlicher Genehmigung von R. E. Dickerson).

Für Cytochrom c wurde ein Halb reduktionspotential von etwa +250 mV bestimmt, das im Bereich physiologischer pH-Werte pH-unabhängig ist und auf eine Lage in der Atmungskette zwischen Cytochromen vom Typ a und b hinweist. Cytochrom c wird tatsächlich von Komplex III, der Cytochrom b enthält, reduziert, und von Komplex IV, der Cytochrom a enthält, oxidiert (Abb. 2).

Aus Acetylierungsversuchen mit freiem Cytochrom c und mit an Cytochrom c₁ oder an Komplex III gebundenem Cytochrom c schloß man, daß Cytochrom c an die Cytochrom-c₁-Untereinheit von Komplex III bindet^[129, 130]. Die Bindungsdomäne befindet sich in der Nähe der Lysinreste 13, 72, 73, 83, 87 und 88 auf der linken oberen Seite des Moleküls in Abbildung 11, was dadurch gezeigt wurde, daß diese Reste abgeschirmt und deshalb für das Acetylierungsreagens weniger zugänglich waren. Dieselbe Bindungsdomäne ergab sich für die Cytochrom-Oxidase^[131, 132], dies weist darauf hin, daß Cytochrom c kein festes Bindeglied zwischen den Komplexen III und IV in der Atmungskette ist, sondern

daß es sich bewegt oder die Öffnung der Hämtasche zu den Reaktionszentren der Komplexe III und IV dreht.

Nach der Ermittlung der dreidimensionalen Struktur von Cytochrom c wurde eine Beteiligung der aromatischen Aminosäuren Tyr-74, Trp-59 und Tyr-67 bei der Elektronenübertragung über den vierten Pyrrolring auf das Eisen vermutet^[133]. Der vorgeschlagene Mechanismus einer radikalischen Elektronenübertragung mußte jedoch zurückgenommen werden, als die dreidimensionale Struktur von Cytochrom c₅₅₀ aus *P. denitrificans* bekannt wurde^[134]. Dieses Cytochrom c enthält einen Leu-Rest anstelle von Tyr-74, reagiert aber immer noch mit Komplex III^[135]. Ein weiteres Argument gegen den Mechanismus der Radikalübertragung – eine Art „Elektronen hüpfen“ – besteht darin, daß eine hohe Energieschwelle besteht, die eine Aktivierungsenergie von etwa 250 kJ/mol erfordert^[136].

Zur Zeit finden zwei andere Möglichkeiten der Elektronenübertragung Beachtung: 1) ein Mechanismus, der über die äußere Elektronenhülle abläuft^[137], und 2) ein Tunnelmechanismus^[138, 139]. Der erste Mechanismus setzt eine Überlappung des π -Orbitalsystems des Cytochrom-c-Häms an seiner äußersten Ecke mit einer prosthetischen Gruppe der Reduktase oder Oxidase voraus. Dabei kann maximal eine Entfernung von 0.3 nm überbrückt werden. Beim Tunneln bewegen sich Elektronen durch Energieschwellen, die sie nach der klassischen Mechanik nicht überschreiten können; dieses Verhalten wird aber durch die Quantentheorie vorausgesagt, wenn man die Elektronen als Materiewellen betrachtet. Nach einer einfachen Beschreibung des Prozesses ist es möglich, durch Tunneln eine Maximalentfernung von 3 nm zu überbrücken^[138, 139]. Diese Entfernung liegt in derselben Größenordnung wie der Abstand zwischen den Hämgruppen von Cytochrom-Oxidase und Cytochrom c^[140, 141]. Ein ausschließlicher Tunnelprozeß dürfte keine Temperaturabhängigkeit zeigen, die aber für das meistuntersuchte System, die Photooxidation von Cytochrom c in der Purpurremembran des Schwefelbakteriums *Chromatium*, oberhalb von 100 K gefunden wurde. Eine weiterentwickelte Beschreibung des Tunnelmechanismus, die „thermisch aktiviertes Elektronentunneln“ genannt wird, sagt eine Temperaturabhängigkeit voraus^[142]. Der überbrückbare Abstand verringert sich nach dieser Berechnung aber auf ca. 1 nm. Diese kleinere Distanz ist nicht unbedingt ein Nachteil, da ein Abstand von 3 nm die Beteiligung von mehreren Redoxzentren ermöglichen würde, während bei 1 nm Abstand eine scharfe Unterscheidung der Reaktionszentren möglich wäre.

4. ATP-Synthetase (Komplex V)

Man findet protonengetriebene ATP-Synthetasen nicht nur in der inneren Mitochondrienmembran, sondern auch in der Cytoplasmamembran von Bakterien und in der Thylakoidmembran von Chloroplasten. Die ATP-Synthetasen dieser Quellen haben ähnliche Struktur und Funktion^[143-145]. Das Enzym aus Mitochondrien läßt sich sehr leicht in zwei Multiprotein-Untereinheiten und mindestens zwei zusätzliche Polypeptid-Bestandteile trennen (Abb. 12). Eine dieser Multiprotein-Untereinheiten, der Kopplungsfaktor F₁, ist eine wasserlösliche Komponente, die kürzlich kristallisiert werden konnte^[146, 147]. Sie besteht aus fünf verschiedenen Polypeptiduntereinheiten (α , β , γ , δ , ϵ). Die stöchiometrische Zusammensetzung beträgt möglicherweise $\alpha_2, \beta_2, \gamma_2, \delta_2, \epsilon_2$ (Ta-

belle 1); hierüber gibt es aber noch widersprüchliche Ansichten^[148-150].

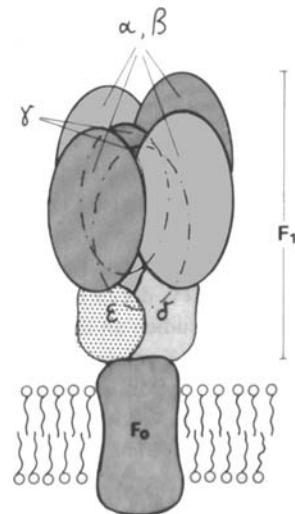


Abb. 12. Untereinheiten der ATP-Synthetase. Die Untereinheiten von F₀ sowie das „oligomycin-sensitivity-conferring protein“ (OSCP) und der Kopplungsfaktor F₆ sind nicht dargestellt.

F₁ zeigt die seltene Eigenschaft einer Kälteleabilität, die auf einen Zerfall in die Untereinheiten bei tieferen Temperaturen zurückzuführen ist^[151]. Im Gegensatz zu F₁ ist die zweite Multiprotein-Untereinheit (F₀) ein integraler Membranbestandteil aus wahrscheinlich vier Polypeptidketten (siehe Tabelle 1)^[152, 153].

Außer den Multiprotein-Untereinheiten F₁ und F₀ enthält die mitochondriale ATP-Synthetase noch zwei weitere Proteine: das „oligomycin-sensitivity-conferring protein“ (OSCP) mit einem Molekulargewicht von 19000^[154, 155], das sich direkt an F₁ mit einer 1:1-Stöchiometrie bindet^[156], und den Kopplungsfaktor F₆ mit einem Molekulargewicht von 8000^[157]. Man nimmt an, daß der Kopplungsfaktor F₆ an der Bindung von OSCP-F₁ an F₀ beteiligt ist^[158, 159].

Aus Rinderherz-Mitochondrien wurde ein weiteres Protein – das F₁-Inhibitor-Protein – isoliert^[160]. Es kann sich bei einem geringen ATP/ADP-Verhältnis an F₁ binden und hemmt so scheinbar die ATPase, nicht aber die ATP-Synthetase-Reaktion^[161, 162].

Auf elektronenmikroskopischen Bildern ist die ATP-Synthetase als Kugel, die über einen Stiel mit der Membran verbunden ist, zu erkennen. Diese Kugeln, die zum Matrixraum hin zeigen, werden dem F₁-Teil zugeschrieben. Die Stiele könnten von OSCP und F₆ gebildet werden, während der Membranteil aus der F₀-Einheit besteht^[163, 164]. Man sollte jedoch erwähnen, daß das elektronenmikroskopische Aussehen auch auf Fixierungsartefakte zurückgeführt wurde.

Den Untereinheiten der ATP-Synthetase können bestimmte katalytische Aktivitäten zugeordnet werden^[144]. Der isolierte F₁-Teil zeigt sogar noch ohne die γ - und δ -Untereinheit eine ATP-Hydrolyse-Aktivität, hat aber die Fähigkeit zur ATP-Synthese verloren^[165]. Dieser Befund ist mit der Forderung in Einklang, daß die Energieübertragung an einen elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt ist. Der Gradient kann von einem löslichen Enzym in einer einheitlichen Phase aber nicht aufgebaut werden. Der F₀-Teil bildet einen Protonenkanal^[166]. Wird F₁ von der Mitochondrienmembran abge-

löst, kann sie den Protonengradienten nicht mehr aufrechterhalten, sondern zeigt eine Dicyclohexylcarbodiimid-sensitive Protonendurchlässigkeit^[167, 168]. Diese Hemmung beruht auf der kovalenten Bindung des Dicyclohexylcarbodiimids an einen Glutamat-Rest der kleinsten Untereinheit von F_0 ^[169].

Der Kopplungsfaktor F_1 trägt mehrere Bindungsstellen für Adeninnucleotide^[143], die wahrscheinlich verschiedene Funktionen für ATP-Synthese und -Regulation haben. Die folgende Beschreibung beschränkt sich auf sogenannte feste Bindungsstellen, von denen ADP oder ATP, obwohl nicht kovalent gebunden, auch durch Dialyse oder Gelfiltration nicht entfernt werden können. Wie durch Photoaffinitätsmarkierung gezeigt werden konnte, befinden sich diese Bindungsstellen auf den β -Untereinheiten^[170-172].

In künstlichen Systemen konnte gezeigt werden, daß ein pH-Gradient oder ein elektrisches Feld den Protonenfluß antreiben kann, der mit der ATP-Synthese gekoppelt ist^[173, 174]. Bis jetzt ist noch unbekannt, wie dieser Protonenfluß die ATP-Synthese antreibt; es werden Vorschläge diskutiert^[175-177]. Ein hypothetisches Reaktionsschema für die ATP-Synthese soll hier beschrieben werden^[178] (Abb. 13). Es basiert auf der Annahme, daß es zwei gleiche Bindungsstellen für ATP oder ADP und P_i auf den beiden β -Untereinheiten eines F_1 -Moleküls gibt, die beide abwechselnd aktiv sein können. Ist ein ATP-Molekül fest an die erste Bindungsstelle geheftet, so binden sich ADP und P_i schwach an die zweite Bindungsstelle (Reaktion 1). In einer energieabhängigen Reaktion werden dann ADP und P_i fest gebunden, während die Bindung zu ATP an der inneren Bindungsstelle gelockert wird (Reaktion 2). Man nimmt an, daß die Lockerung der Bindung von ATP der energieverbrauchende Schritt ist, und nicht die Bildung der Anhydridbindung. Im nächsten Schritt wird ATP freigesetzt (Reaktion 3). Zum Schluß wird ATP aus ADP und P_i gebildet (Reaktion 4). Die zweite Hälfte des Zyklus läuft in derselben Reihenfolge ab, wobei aber die anderen Bindungsstellen benutzt werden (Reaktionen 5-8). Ergebnisse, deren Deutung mehr als zwei Bindungsstellen für die ATP-Synthese erfordert^[143], könnten darauf zurückgeführt werden, daß eine Reihe von Zwischenstufen „eingefro-

ren“ und als verschiedene Bindungsstellen interpretiert wurden.

Auch bei der Na,K-ATPase^[178], der Ca^{2+} -ATPase^[179] und der Myosin-ATPase^[180] nimmt man an, daß die Freisetzung von fest gebundenem ATP und nicht die Bildung der Anhydridbindung von ATP der energieverbrauchende Schritt ist.

Die ATP-Synthetase kann auch in der umgekehrten Richtung als elektrogene Protonenpumpe arbeiten (ATP-getriebene Protonenpumpe)^[181-183]. Eine $3 H^+$ /ATP-Stöchiometrie scheint nun für die eigentliche ATP-Synthetase-Reaktion festzustehen (Abb. 3) (siehe Abschnitt 9)^[17].

5. Adeninnucleotid-Translokase

Die Adeninnucleotide ADP und ATP brauchen für den Durchtritt durch die innere Mitochondrienmembran ein Transportsystem (Carrier), da diese Membran für die hoch geladenen und sperrigen Moleküle (ADP^{3-} und ATP^{4-}) un-durchlässig ist^[184-186]. Das transportierende Enzym, die Adeninnucleotid-Translokase, hat nach der SDS-Gelelektrophorese ein minimales Molekulargewicht von 30 000^[187]. In milden Detergentien, wie man sie für Studien mit der analytischen Ultrazentrifuge benutzt, beträgt das Molekulargewicht dieses Carriers 60 000^[188]. In diesem Fall liegt er als Dimer vor. Da nur eine Bindungsstelle pro Dimer für die Adeninnucleotide ADP und ATP sowie für die spezifischen Inhibitoren gefunden wurde, die sowohl für ADP und ATP zugänglich ist^[185], stellt man sich vor, daß das Dimer den funktionellen Zustand des Proteins in der inneren Mitochondrienmembran repräsentiert. Eine teilweise durchgeführte Aminosäuresequenzanalyse erbrachte keine Hinweise auf irgendwelche Heterologien. Man betrachtet das Enzym deshalb als Dimer mit zwei gleichen Untereinheiten. Der Carrier ist ein ziemlich hydrophobes, integrales Membranprotein. Er ist in dieser Hinsicht mit dem Cytochrom-b-Dimer von Komplex III vergleichbar. Aufgrund seiner Funktion wird eine durch die Membran hindurchreichende Anordnung angenommen^[189, 190].

Die Adeninnucleotide ADP und ATP werden in einer strengen 1:1-Stöchiometrie über die Membran ausgetauscht (Abb. 3)^[185, 190]. Die Translokase ist hochspezifisch für diese beiden Nucleotide. AMP wird nicht transportiert. Es gibt für den Carrier spezifische Inhibitoren, z. B. das pflanzliche Gift Atraktylat (ein Diterpenoid-Derivat)^[191] und das bakterielle Toxin Bongrekat (ein Polyisoprenoid-Derivat)^[192]. In einem Modell wurde der Transportmechanismus als „gated pore“-Mechanismus dargestellt^[193]. Der Carrier ist ein hochaktives Membrantransportsystem, das 14% des gesamten Proteins der inneren Mitochondrienmembran ausmacht. Die Transportgeschwindigkeit ist mit der der Phosphat-Translokase vergleichbar (siehe Abschnitt 6). Der Transport der Adeninnucleotide scheint die Versorgung des Cytosols mit mitochondrial synthetisiertem ATP nicht zu limitieren, d. h. der Adeninnucleotid-Carrier reagiert schneller als die protonengetriebene ATP-Synthetase (siehe Abb. 3).

Der Adeninnucleotid-Transport ist ein sekundär aktiver Transport, der Energie verbraucht, die in Form des Membranpotentials zur Verfügung gestellt wird^[194]. Der Transport findet gegen das Phosphorylierungspotential ($[ATP]/([ADP] \cdot [P_i])$) statt, das im Cytosol höher liegt (etwa 66 kJ) als im Matrixraum (etwa 55 kJ)^[195]. Im energetisierten Zustand wirkt das Adeninnucleotid-Transportsystem asymme-

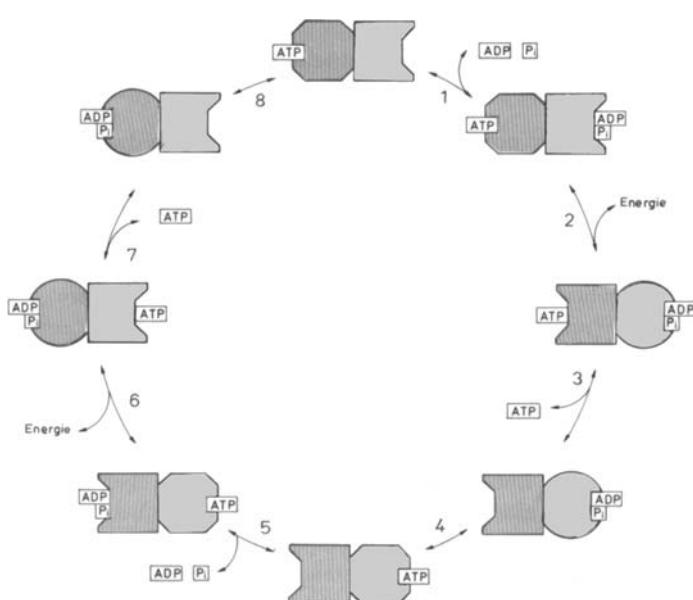


Abb. 13. Modifiziertes Schema der Reaktionsschritte der an zwei alternierenden Bindungsstellen der ATP-Synthetase stattfindenden ATP-Synthese (nach P. D. Boyer et al. [177]). Die beiden Bindungsstellen sind durch unterschiedliche Schraffierung gekennzeichnet.

trisch, d. h. die ADP-Aufnahme ist gegenüber der ATP-Aufnahme begünstigt, und umgekehrt wird ATP bevorzugt gegenüber ADP abgegeben^[194]. Wird das Membranpotential durch Entkoppler wie Dinitrophenol zerstört, so wird auch die Asymmetrie des Transports aufgehoben, d. h. ATP wird mit derselben Geschwindigkeit aufgenommen wie ADP, und ADP wird mit derselben Geschwindigkeit wie ATP freigesetzt. Theoretisch kann also ein reiner ADP/ADP- oder ATP/ATP-Gegentausch stattfinden.

Der Einfluß des Membranpotentials auf die Austauschaktivität und auf die Asymmetrie des Transports, bedingt durch seine elektrogene Natur, wurde kürzlich an einem rekonstituierten System demonstriert, bei dem gereinigtes Carrier-Protein in Phospholipid-Vesikel eingebaut war^[196, 197]. Die Beziehungen zwischen dem Elektronentransport, der das elektrochemische Membranpotential aufbaut, und den drei das Potential verbrauchenden Vorgängen (ATP-Synthese, Adeninnucleotidaustausch und Phosphattransport) werden in Abschnitt 7 diskutiert.

6. Phosphat-Transportsystem

Mitochondrien enthalten zwei Carrier-Systeme, die anorganisches Phosphat durch die innere Membran transportieren können: den Dicarboxylat- und den Phosphat-Carrier^[20, 198, 199]. Der Dicarboxylat-Carrier tauscht HPO_4^{2-} gegen Dicarbonsäure-Anionen aus, z. B. Succinat oder Malat. Dieses Transportsystem unterscheidet sich vom Phosphat-Carrier dadurch, daß es durch einige nichthistologische Dicarboxylate wie *n*-Butylmalonat^[198] gehemmt wird. Der Phosphat-Carrier spricht dagegen sehr empfindlich auf SH-blockierende Reagentien an^[199, 200]. Der Dicarboxylat-Carrier scheint nicht für die Bereitstellung von anorganischem Phosphat zur ATP-Synthese, die ja im Matrixraum stattfindet, benötigt zu werden, sondern ist vielmehr für die Dicarboxylat-Aufnahme im Gegentausch gegen HPO_4^{2-} zuständig.

Phosphat wird hauptsächlich von einem spezifischen Phosphat-Carrier bereitgestellt, einem Protein, dessen durch *N*-Ethylmaleimid markierte Form ein Molekulargewicht von etwa 30 000 hat (SDS-Gelelektrophorese)^[201-203]. Dieses Transportsystem ist wahrscheinlich das aktivste in der inneren Mitochondrienmembran^[199]. Die Phosphataufnahme verläuft elektroneutral^[204], entweder über einen $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{OH}^-$ -Gegentausch oder einen $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}^+$ -Cotransport. Der Einfachheit halber wird im folgenden die zweite Möglichkeit angenommen. Auf jeden Fall hängt die Aufnahme vom Protonengradienten an der Membran ab (Abb. 3).

Da der Phosphat-Carrier unter physiologischen Bedingungen nur H_2PO_4^- vom Cytosol- in den Matrixraum transportiert, könnte man annehmen, daß die pH-Differenz über die Mitochondrienmembran in größerem Ausmaß als man es aufgrund des Cotransports eines Protons erwartet beeinflußt wird, weil dem Dissoziationsgleichgewicht der Phosphorsäure in der Cytosolphase H_2PO_4^- entzogen wird, das sich im Matrixraum anreichert. Dieser sekundäre Einfluß auf den pH-Gradienten ist aber zu vernachlässigen, da das Phosphat formal während der Phosphorylierung im Matrixraum als H_2PO_4^- in ADP eingebaut und als solches auch wieder während des ATP-Verbrauchs im Cytosol freigesetzt wird. Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, wird dadurch das Gleichgewicht wieder hergestellt.

7. Protonen- und Ladungsbilanz des gesamten Systems, das Energie aus der Oxidation in chemische Energie umwandelt

Die Übertragung von Elektronen von NADH auf Sauerstoff durch die Atmungskettenkomplexe I, III und IV ist an einen elektrogenen Transport von 12H^+ über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt^[11, 12, 93, 205-208] (Abb. 3a). Bei der Succinat-Oxidation wurden 8H^+ gemessen (nicht gezeigt). Da man schon lange weiß, daß die NADH-Oxidation maximal 3 ATP und die Succinat-Oxidation maximal 2 ATP liefert, liegt es auf der Hand, daß die mitochondriale ATP-Bildung 4H^+ pro ATP-Molekül erfordert (Abb. 3b).

Ein elektrogener Protonentransport ohne den Cotransport von Anionen erzeugt einen Protonengradienten (ΔpH) und zusätzlich ein Membranpotential ($\Delta\Psi$). Da die Phosphataufnahme elektroneutral verläuft, wird nur die pH-Differenz beeinflußt, d. h. die positive Ladung des Protons, das ursprünglich während des Elektronenflusses elektrogen über die Membran transportiert wurde, verbleibt auf der Außenseite der Membran. Diese positive Ladung wird durch den elektrogenen ADP-ATP-Gegentausch ausgeglichen (Abb. 3b). Es bleiben also für die ATP-Synthesereaktion drei elektrogene Protonen übrig. Diese Stöchiometrie ist mit thermodynamischen Gesichtspunkten in Einklang (siehe Abschnitt 9).

Die ATP-Bildung in submitochondrialen Partikeln ist sehr informativ, da hier die Energieausbeute nach Vertauschen der Seiten, auf der die Vorgänge ablaufen, betrachtet wird. In submitochondrialen Partikeln, die man durch Behandlung von Mitochondrien mit Ultraschall erhält, ist die innere Membran umgedreht („inside out“), und der Transport von Adeninnucleotiden und Phosphat für die ATP-Synthese entfällt. In Einklang mit dieser Überlegung wurde für submitochondriale Partikel eine Stöchiometrie von 3H^+ pro gebildetem ATP-Molekül mitgeteilt^[209, 210]. Aus diesen Werten leitet sich eine Stöchiometrie von 4 ATP pro oxidiertem NADH ab. Dieser Wert berechnet sich aus den zwölf pro oxidiertem NADH transportierten Protonen und drei pro synthetisiertem ATP zurückgeflossenen Protonen.

8. Wärmeerzeugung in Mitochondrien des braunen Fettgewebes

Säugetiere produzieren Wärme im allgemeinen durch feine, ungerichtete Muskelkontraktion, die man Muskelzittern nennt^[211]. Es gibt jedoch noch eine weitere Möglichkeit zur Wärmeerzeugung, die in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes auftritt^[212-214]. Dieser Vorgang kommt nur bei neugeborenen Säugetieren (einschließlich des Menschen), bei Winterschläfern und bei kälteadaptierten Kleinsäugern vor. Das braune unterscheidet sich vom weißen Fettgewebe darin, daß es viele Triglyceridtröpfchen enthält und eine extrem hohe Mitochondrienzahl aufweist^[215].

Die Mitochondrien des braunen Fettgewebes haben ein System zur Energiedissipation, das anderen Geweben fehlt. Es betreibt eine Reaktion, die mit der ATP-Synthetase um das elektrochemische Membranpotential konkurriert, das durch den protonentransportierenden Elektronenfluß aufgebaut wurde^[212]. Diese Mitochondrien veratmen mit großer Geschwindigkeit freie Fettsäuren, produzieren hierbei aber kaum ATP. Sie enthalten ein Protein, das durch die Membran hindurch reicht (Molekulargewicht 32 000)^[216] und eine

Pore für H^+ - oder OH^- -Ionen bildet. Seine Permeabilität wird durch die spezifische Bindung von Purinnucleotiden reguliert. Die Bindung von GDP oder GTP oder – weniger effektiv – von ADP oder ATP verhindert den OH^- -Ionenfluss^[213, 217, 218], der durch das Membranpotential getrieben wird.

9. Behandlung der Energiekopplung in Mitochondrien mit der irreversiblen Thermodynamik

Die Analyse des Vorgangs der oxidativen Phosphorylierung hat in den letzten Jahren durch Anwendung der irreversiblen Thermodynamik einen neuen Aufschwung erfahren^[9, 10, 219]. Da eine exakte Behandlung zu kompliziert ist, entwickelte man eine lineare erste Näherung für das nichtlineare Problem. Die Näherung, auch lineare Nichtgleichgewichts-Thermodynamik genannt, erwies sich als brauchbar für die zu untersuchenden Prozesse. Begriffe wie „P/O-Quotient“ (Anzahl ATP-Moleküle, die pro reduziertem Sauerstoffatom aus ADP und Phosphat synthetisiert wurden), oder „Atmungskontrollquotient“ erhielten eine neue Bedeutung und wurden auf neue Weise interpretiert. Der Atmungskontrollquotient r ist definiert als Verhältnis der Atmungsgeschwindigkeiten bei Substratsättigung in Gegenwart und in Abwesenheit von ADP (Zustand 3 bzw. 4). Sogar bei kleinem r kann ein hoher Kopplungsgrad q bestehen. Der Kopplungsgrad, der Werte von 0 (ungekoppelt) bis 1 annehmen kann, hängt von der Atmungskontrolle r nach folgender Gleichung ab:

$$q = \lfloor \frac{1}{1 - 1/r} \rfloor \quad (6)$$

Der Kopplungsgrad q ist ein besserer Indikator für die Kopplung der Atmung mit der Phosphorylierung als der At-

mungskontrollquotient r , der früher benutzt wurde, um die Qualität einer Mitochondrienpräparation zu beurteilen.

Wichtig ist ebenfalls der Befund, daß die gemessenen P/O-Quotienten, obwohl sie nicht gleichwertig mit der mechanistischen Stöchiometrie sind, gute Näherungen dieser Stöchiometrie sein können, wenn sie bei hohem Kopplungsgrad q gemessen werden. Die Anwendung der irreversiblen Thermodynamik ermöglicht jedoch eine Berechnung phänomenologischer Stöchiometrien, und zwar nicht über den Flußquotienten (Geschwindigkeitsverhältnis von ATP-Synthase und Oxidation) im Zustand 3, sondern aus dem „Kraftquotienten“ („force ratio“) (Verhältnis der freien Energie der ATP-Hydrolyse und der Substratoxidation) im Zustand 4 sowie dem dazugehörigen Kopplungsgrad. Auf diese Weise wurden P/O-Quotienten von 3.0 für die NADH-Oxidation und von 2.1 für die Succinat-Oxidation berechnet. Von besonderem Interesse sind die H^+/O - und die H^+/ATP -Stöchiometrien bei Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln, die aus dem Verhältnis der freien Energie im Zustand 4 und dem Kopplungsgrad berechnet wurden. Bei Mitochondrien erhielt man Stöchiometrien von 11.8 H^+/O für die NADH-Oxidation, 8.1 H^+/O für die Succinat-Oxidation und 3.9 H^+/ATP für die protonengetriebene ATP-Synthase^[6]. Aufgrund der Tatsache, daß für den Adeninnucleotidaustausch und für den Phosphattransport in submitochondrialen Partikeln keine „protonenbewegende Kraft“ aufgewendet werden muß, erhielt man P/O-Stöchiometrien von 3.9 für die NADH-Oxidation und 2.7 für die Succinat-Oxidation sowie 2.8 H^+/ATP für die ATP-Bildung.

Alle diese Daten, die aus dem „Kraftquotienten“ und dem Kopplungsgrad q berechnet wurden, stimmen gut mit den an Mitochondrien oder submitochondrialen Partikeln hohen Kopplungsgrades im Zustand 3 gemessenen Stöchiometrien überein.

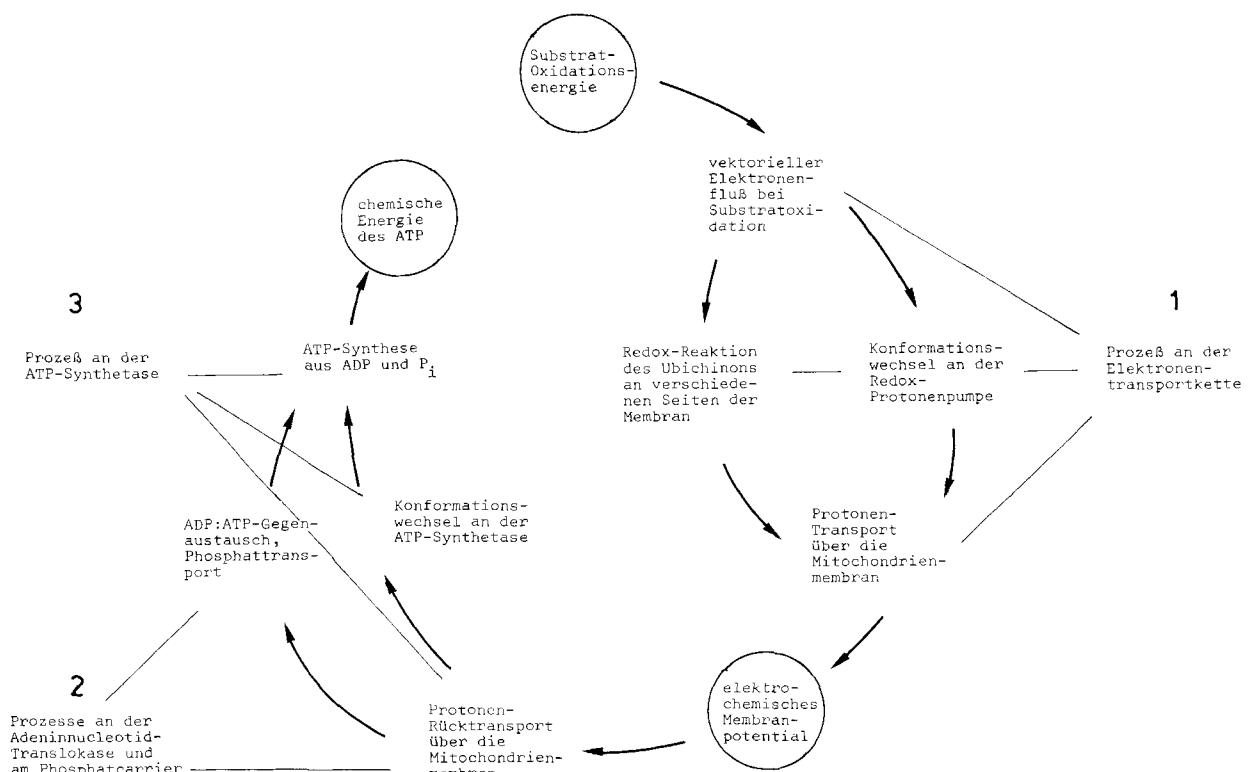


Abb. 14. Sequenz der bei der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung stattfindenden Vorgänge, schematisch. Die drei vorkommenden Energieformen sind eingekreist. Die Spirale der Ereignisse schließt die beiden möglichen Protonentransportmechanismen ein: 1) einen Protonenpumpmechanismus und 2) einen Redoxcarrier-vermittelten Loopmechanismus. Der zweite Vorgang könnte an der 2. Phosphorylierungsstelle stattfinden.

Die irreversible Thermodynamik liefert die zunächst erstaunliche Vorhersage, daß ein Kopplungsgrad q sehr nahe an 1 von Mitochondrien in vivo nicht erreicht wird, obwohl der Wirkungsgrad der oxidativen Phosphorylierung, der definiert ist als

$$\eta = \frac{\text{Phosphorylierungsfluß} \times \text{Phosphorylierungspotential}}{\text{Oxidationsfluß} \times \text{Redoxpotential}}$$

mit wachsendem q zunimmt. Bei q nahe 1 verschwindet jedoch der Phosphorylierungsfluß immer mehr, was zu einer kleinen Leistung (Phosphorylierungsfluß \times Phosphorylierungspotential) führt. Eine Optimierung der Leistung in bezug auf q ergibt einen idealen Kopplungsgrad von ungefähr 0.9^[9].

10. Zusammenfassung und Ausblick

Um die kausalen Zusammenhänge der mitochondrialen Energieumwandlung zusammenzufassen, ist der gesamte Prozeß in einem einfachen Schema in Form einer Spirale von Ereignissen dargestellt (Abb. 14). Die Sequenz der Reaktionen zeigt, daß der von Redox-Protonenpumpen getriebene Protonentransport einerseits (1), und die von der ATP-Synthetase katalysierte ATP-Bildung andererseits (3), von Konformationsänderungen der Enzyme abhängen. Diese Konformationsänderungen können innerhalb einzelner Polypeptide, aber auch durch Wechselwirkungen zwischen den Polypeptiden in Multiprotein-Komplexen stattfinden. Abbildung 14 zieht jedoch direkte Konformations-Wechselwirkungen zwischen den elektronenübertragenden Komplexen und dem ATP-Synthetase-Komplex, wie sie in früheren Modellen detailliert vorgeschlagen wurden^[220], nicht in Betracht. Ein Ubichinon-Loop-Protonentransportmechanismus wird berücksichtigt, denn er findet wahrscheinlich an der Phosphorylierungsstelle 2 statt (siehe Abschnitt 3.4)^[3]. Es ist dagegen kaum notwendig, einen verwickelten Reaktionsmechanismus wie den Ubichinonzyklus zu postulieren, da sehr wahrscheinlich zusätzlich zum Ubichinon-Loop eine Protonenpumpe an der zweiten Phosphorylierungsstelle wirkt. Von den mitochondrialen Komplexen III und IV^[115, 116], wie auch von Bakteriorhodopsin^[221, 222], wurden zweidimensionale Kristalle erhalten. Die Grobstruktur dieser Membranproteine ist bekannt; zur Zeit wird versucht, ihre Feinstruktur zu ermitteln. Die Isolierung der restlichen an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Proteine und die Bestimmung von deren Primärstruktur wird zur Aufklärung der Reaktionsmechanismen auf molekularer Ebene beitragen.

Wir sind Prof. Dr. M. Klingenber, Dr. R. Krämer und Dr. W. Wintermeyer für ihre wertvollen Diskussionsbeiträge zu Dank verpflichtet. Dr. R. E. Dickerson, Dr. R. Henderson und Dr. K. R. Leonard danken wir für die Erlaubnis, die Abbildungen 7, 10 und 11 aufzunehmen. Einige der zitierten eigenen Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (G. v. J.) und der Studienstiftung des Deutschen Volkes (W. D. E.) unterstützt.

Ein eingegangen am 29. Mai 1980 [A 333]

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

[2] P. Mitchell, *Biol. Rev.* **41**, 445 (1966).

[2a] G. Schäfer, M. Klingenber: *Energy Conservation in Biological Membranes*. Springer, Berlin 1978.

- [3] A. Trebst in [2a], S. 84.
- [4] W. A. Cramer, J. Whitmarsh, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 133 (1977).
- [5] H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 355 (1979).
- [6] R. E. Blankenship, W. W. Parson, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 635 (1978).
- [7] P. Mitchell, *Angew. Chem.* **91**, 718 (1979).
- [8] R. J. P. Williams, *FEBS Lett.* **85**, 9 (1978).
- [9] J. W. Stucki in [2a], S. 264.
- [10] H. Rottenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 225 (1979).
- [11] A. Alexandre, B. Reynafarje, A. L. Lehninger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5296 (1978).
- [11a] K. van Dam, B. F. van Gelder: *Structure and Function of Energy-Transducing Membranes*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1977.
- [12] A. L. Lehninger, B. Reynafarje, A. Alexandre in [11a], S. 95.
- [13] L. Ernster, B. Kyuljenstierna in E. Racker: *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts*. Van Nostrand-Reinhold, New York 1970, S. 172.
- [14] F. J. Ruzicka, H. Beinert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 622 (1975).
- [15] M. Klingenber, M. Buchholz, *Eur. J. Biochem.* **13**, 247 (1970).
- [16] B. Fleischer, A. Casu, S. Fleischer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**, 189 (1966).
- [16a] P. D. Boyer: *The Enzymes*. Vol. 13. Academic Press, New York 1976.
- [17] J. Rydström, J. B. Hoek, L. Ernster in [16a], S. 51.
- [18] J. Rydström, *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 155 (1977).
- [19] R. S. Earle, R. R. Fischer, *Biochemistry* **19**, 561 (1980).
- [20] K. F. La Noue, A. C. Schoolwarth, *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 871 (1979).
- [21] H. W. Heldt, *Angew. Chem.* **84**, 792 (1972); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **11**, 792 (1972).
- [22] J. W. De Pierre, L. Ernster, *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 201 (1977).
- [22a] A. Martonosi: *The Enzymes of Biological Membranes*. Wiley, London 1976.
- [23] Y. Hatefi in [22a], Vol. 4, S. 3.
- [24] Y. Hatefi, *Methods Enzymol.* **53**, 3 (1978).
- [25] Y. Hatefi, Y. M. Galante in [2a], S. 19.
- [26] A. Kröger, M. Klingenber, *Vitam. Horm.* **28**, 533 (1970).
- [27] J. Vanderkooi, M. Erecinska in [22a], Vol. 4, S. 43.
- [28] Y. Hatefi, D. L. Stigall in [16a], S. 175.
- [29] I. C. Ragan, *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 249 (1976).
- [30] I. C. Ragan, *Biochem. J.* **154**, 295 (1976).
- [31] J. Rydström, *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 155 (1977).
- [32] T. Ohnishi, *Biochim. Biophys. Acta* **387**, 475 (1975).
- [33] H. Beinert in W. Lovenberg: *Iron Sulfur Proteins*. Academic Press, New York 1977, S. 61.
- [34] H. G. Lawford, P. B. Garland, *Biochem. J.* **130**, 8029 (1972).
- [35] P. C. Hinkle, L. L. Horstman, *J. Biol. Chem.* **246**, 6024 (1971).
- [36] C. I. Ragan, P. C. Hinkle, *J. Biol. Chem.* **250**, 8472 (1975).
- [37] G. von Jagow, W. D. Engel, *FEBS Lett.* **111**, 1 (1980).
- [38] R. A. Capaldi, J. Sweetland, A. Merli, *Biochemistry* **16**, 5707 (1977).
- [39] Y. Hatefi, D. L. Stigall, *Methods Enzymol.* **53**, 21 (1978).
- [40] P. Hemmerich, A. Ehrenberg, W. H. Walker, L. E. G. Erikson, P. Salach, P. Bader, T. P. Singer, *FEBS Lett.* **3**, 37 (1969).
- [41] T. P. Singer, E. B. Kearney, W. C. Kenney, *Adv. Enzymol.* **37**, 189 (1973).
- [42] T. Ohnishi, J. C. Salerno, D. B. Winter, J. Lim, C. A. Yu, L. Yu, T. E. King, *J. Biol. Chem.* **251**, 2094 (1976).
- [43] T. Ohnishi, J. Lin, D. B. Winter, T. E. King, *J. Biol. Chem.* **251**, 2105 (1976).
- [44] Y. Hatefi, *Methods Enzymol.* **53**, 27 (1978).
- [45] G. von Jagow, unveröffentlicht (1980).
- [46] G. von Jagow, W. Sebald, *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 284 (1980).
- [47] K. A. Davis, Y. Hatefi, *Biochemistry* **10**, 2509 (1971).
- [48] C. A. Yu, L. Yu, T. E. King, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 259 (1977).
- [49] C. A. Yu, L. Yu, T. E. King, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 939 (1978).
- [50] C. A. Yu, L. Najaoka, L. Yu, T. E. King, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**, 1070 (1978).
- [51] J. C. Salerno, H. J. Harmon, H. Blum, J. S. Leigh, T. Ohnishi, *FEBS Lett.* **82**, 179 (1977).
- [52] M. Gutman, *Mol. Cell. Biochem.* **20**, 41 (1978).
- [53] B. A. C. Ackrell, E. B. Kearney, M. Mayr, *J. Biol. Chem.* **249**, 2021 (1974).
- [54] M. Gutman, *Biochemistry* **15**, 1342 (1976).
- [55] L. Wojtczak, A. B. Wojtczak, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Acta* **191**, 10 (1969).
- [56] E. B. Kearney, B. A. C. Ackrell, M. Mayer, T. P. Singer, *J. Biol. Chem.* **249**, 2016 (1974).
- [57] R. Gilles, P. Hogue, E. B. Kearney, *Life Sci.* **10**, 1421 (1971).
- [58] M. Gutman, E. B. Kearney, T. P. Singer, *Biochemistry* **10**, 4763 (1971).
- [59] M. Gutman, E. B. Kearney, T. P. Singer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 1016 (1971).
- [60] E. B. Kearney, M. Mayr, T. P. Singer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 531 (1972).
- [61] F. G. Hopkins, E. Morgan, C. Lutwak-Mann, *Biochem. J.* **32**, 1829 (1938).

- [62] D. E. Wolf, C. H. Hoffman, N. R. Trenner, B. H. Arison, C. H. Shunk, B. O. Linn, J. F. McPherson, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 4752 (1958).
- [63] A. Castelli, G. Lenaz, K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 200 (1969).
- [64] M. Klingenberg, A. Kröger in E. C. Slater et al.: *The Biochemistry of Mitochondria*. Academic Press, London 1966, S. 11.
- [65] D. E. Green, D. C. Wharton, *Biochem. Z.* 338, 335 (1963).
- [66] F. L. Crane, *Annu. Rev. Biochem.* 46, 439 (1977).
- [67] J. W. Pierre, L. Ernster, *Annu. Rev. Biochem.* 46, 201 (1977).
- [68] A. Futami, E. Hurt, G. Hauska, *Biochim. Biophys. Acta* 547, 583 (1979).
- [69] B. Chance in G. F. Azzone et al.: *Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes*. Academic Press, New York 1972, S. 85.
- [70] A. Kröger, M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 34, 358 (1973).
- [71] A. Kröger, M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 39, 313 (1973).
- [72] C. I. Ragan, C. Heron, *Biochem. J.* 174, 783 (1978).
- [73] C. Heron, C. I. Ragan, B. L. Trumper, *Biochem. J.* 174, 791 (1978).
- [74] T. E. King, C. A. Yu, L. Yu, Y. L. Chiang in E. Quagliariello et al.: *Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation*. Elsevier-North Holland, Amsterdam 1975, S. 105.
- [75] B. D. Nelson, P. Gellerfors, *Methods Enzymol.* 53, 80 (1978).
- [76] W. D. Engel, H. Schägger, G. von Jagow, *Biochim. Biophys. Acta*, im Druck.
- [77] P. Gellerfors, M. Lunden, B. D. Nelson, *Eur. J. Biochem.* 67, 463 (1976).
- [78] H. Weiss, B. Ziganke, *Methods Enzymol.* 53, 212 (1978).
- [79] G. von Jagow, H. Schägger, W. D. Engel, W. Machleidt, J. Machleidt, *FEBS Lett.* 91, 121 (1978).
- [80] J. S. Rieske, D. H. MacLennan, R. Coleman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 338 (1964).
- [81] J. S. Rieske, *Biochim. Biophys. Acta* 456, 195 (1976).
- [82] G. von Jagow, H. Schägger, W. D. Engel, P. Riccio, H. J. Kolb, M. Klingenberg, *Methods Enzymol.* 53, 92 (1978).
- [83] H. Weiss, B. Ziganke, *Eur. J. Biochem.* 41, 63 (1974).
- [84] H. Weiss, *Biochim. Biophys. Acta* 456, 291 (1976).
- [85] H. Weiss, H. J. Kolb, *Eur. J. Biochem.* 99, 139 (1979).
- [86] G. von Jagow, H. Schägger, P. Riccio, M. Klingenberg, H. J. Kolb, *Biochim. Biophys. Acta* 462, 549 (1977).
- [87] P. Wingfield, T. Arud, K. Leonard, H. Weiss, *Nature* 280, 696 (1979).
- [88] B. Chance, D. F. Wilson, P. L. Dutton, M. Erecinska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 1175 (1970).
- [89] B. Chance, *FEBS Lett.* 23, 3 (1972).
- [90] A. Tzagalloff, G. Macino, W. Sebald, *Annu. Rev. Biochem.* 48, 419 (1979).
- [90a] Th. Bücher et al.: *Biological Chemistry of Organelle Formation*. Springer, Berlin, im Druck.
- [91] A. Tzagalloff in [90a].
- [92] B. G. Barrell, persönliche Mitteilung.
- [93] T. Pozzan, F. Di Virgilio, M. Bragadin, V. Miconi, G. F. Azzone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2123 (1979).
- [94] P. Mitchell, *FEBS Lett.* 56, 1 (1975).
- [95] P. Mitchell, *FEBS Lett.* 59, 137 (1975).
- [96] G. von Jagow, H. Schägger, W. D. Engel, H. Hackenberg, H. J. Kolb in [2a], S. 43.
- [97] P. F. Urban, M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 9, 519 (1969).
- [98] D. F. Wilson, M. Erecinska, J. S. Leigh, M. Koppelman, *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 112 (1972).
- [99] M. Wikström, K. Krab, *Biochim. Biophys. Acta* 549, 177 (1979).
- [100] W. Stoeckenius, R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, *Biochim. Biophys. Acta* 505, 215 (1979).
- [101] J. F. Nagle, H. J. Morowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 298 (1978).
- [102] P. D. Boyer, *FEBS Lett.* 58, 1 (1975).
- [103] A. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*. Freeman, Reading 1977, S. 274.
- [104] B. Chance, A. Waring, C. Saronio in [2a], S. 56.
- [105] B. G. Malmström, *Biochim. Biophys. Acta* 549, 177 (1979).
- [106] P. Nicholss, B. Chance in O. Hayaishi: *Mechanisms of Oxygen Activation*. Academic Press, New York 1974, S. 479.
- [107] W. S. Caughey, W. I. Wallace, I. A. Volpe, S. Yoshikawa in [16a], S. 299.
- [108] G. Buse in [90a].
- [109] L. S. Powers, W. Blumberg, B. Chance, C. Barlow, J. S. Leigh, J. Smith, T. Yonetani, S. Vik, J. Peisach, *Biochim. Biophys. Acta* 546, 520 (1979).
- [110] M. Wikström, H. J. Harmon, W. J. Ingledew, B. Chance, *FEBS Lett.* 65, 259 (1976).
- [111] W. Sebald, W. Machleidt, J. Otto, (1973) *Eur. J. Biochem.* 38, 311 (1973).
- [112] G. D. Eytan, G. Schatz, *J. Biol. Chem.* 250, 767 (1975).
- [113] S. Seki, H. Hayashi, T. Oda, *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 110 (1970).
- [114] G. Vanderkooi, A. E. Senior, R. A. Capaldi, H. Hayashi, *Biochim. Biophys. Acta* 274, 38 (1972).
- [115] R. Henderson, R. A. Capaldi, J. S. Leigh, *J. Mol. Biol.* 112, 631 (1977).
- [116] S. D. Fuller, R. A. Capaldi, R. Henderson, *J. Mol. Biol.* 134, 305 (1979).
- [117] D. F. Wilson, J. G. Lindsay, E. S. Brocklehurst, *Biochim. Biophys. Acta* 256, 277 (1972).
- [118] M. Wikström, *Nature* 266, 271 (1977).
- [119] M. Wikström, *Biochim. Biophys. Acta* 462, 347 (1977).
- [120] M. Wikström in G. F. Azzone et al.: *The Proton and Calcium Pumps*. Elsevier/North Holland, Amsterdam 1978, S. 215.
- [121] R. P. Casey, J. B. Chappell, A. Azzi, *Biochem. J.* 182, 149 (1979).
- [122] B. F. van Gelder, J. Rign, G. Schilder, J. Wilms in [11a], S. 61.
- [123] D. L. Bräutigam, S. Ferguson-Miller, E. Margoliash, *Methods Enzymol.* 53, 128 (1978).
- [124] F. R. Salemme, *Annu. Rev. Biochem.* 46, 299 (1977).
- [125] E. Margoliash, A. Schejter, *Adv. Protein Chem.* 21, 113 (1966).
- [126] M. D. Dayhoff in: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Vol. 5 (1972), Suppl. 1 (1973), 2 (1976) and 3 (1978). National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.
- [127] W. M. Fitch, E. Markowitz, *Biochem. Genet.* 4, 579 (1970).
- [128] R. Swanson, B. L. Trus, N. Mandel, G. Mandel, O. B. Kallai, R. E. Dickerson, *J. Biol. Chem.* 252, 759 (1977).
- [129] H. R. Bosshard, M. Zurrer, H. Schägger, G. von Jagow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 250 (1979).
- [130] S. H. Speck, S. Ferguson-Miller, N. Osterhoff, E. Margoliash, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 155 (1979).
- [131] R. Rieder, H. R. Bosshard, *J. Biol. Chem.* 253, 6045 (1978).
- [132] R. Rieder, H. R. Bosshard, *FEBS Lett.* 92, 223 (1978).
- [133] T. Takeno, O. B. Kallai, R. Swanson, R. E. Dickerson, *J. Biol. Chem.* 248, 5234 (1973).
- [134] R. Timkovich, R. E. Dickerson, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* 251, 2197 (1975).
- [135] R. Timkovich, R. E. Dickerson, *J. Biol. Chem.* 251, 4033 (1976).
- [136] F. R. Salemme, J. Kraut, M. D. Kamen, *J. Biol. Chem.* 248, 7701 (1973).
- [137] H. L. Hodges, R. A. Holwerda, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 3132 (1974).
- [138] D. De Vault, B. Chance, *Biophys. J.* 6, 825 (1966).
- [139] J. D. McElroy, D. C. Mauzerall, G. Fehder, *Biochim. Biophys. Acta* 333, 261 (1974).
- [140] M. E. Dockter, A. Steinemann, G. Schatz in [11a], S. 169.
- [141] J. M. Vanderkooi, R. Landesberg, G. W. Hayden, C. S. Owen, *Eur. J. Biochem.* 81, 339 (1977).
- [142] J. I. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3640 (1974).
- [143] D. A. Harris, *Biochim. Biophys. Acta* 463, 245 (1978).
- [144] Y. Kagawa, *Biochim. Biophys. Acta* 505, 45 (1978).
- [145] B. A. Baird, G. G. Hammes, *Biochim. Biophys. Acta* 549, 31 (1979).
- [146] L. M. Amzel, P. L. Pedersen, *J. Biol. Chem.* 253, 2067 (1978).
- [147] J. M. Amzel, P. L. Pedersen, *Methods Enzymol.* 55, 333 (1979).
- [148] A. E. Senior, *Biochemistry* 14, 660 (1975).
- [149] B. A. Baird, G. G. Hammes, *J. Biol. Chem.* 252, 4743 (1977).
- [150] H. S. Penefsky, *Methods Enzymol.* 55, 297 (1979).
- [151] M. E. Pullman, H. S. Penefsky, A. Datta, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 232, 3322 (1960).
- [152] W. Sebald, *Biochim. Biophys. Acta* 463, 1 (1977).
- [153] R. Serrano, B. I. Kanner, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 251, 2453 (1976).
- [154] D. H. MacLennan, A. Tzagalloff, *Biochemistry* 7, 1603 (1968).
- [155] A. E. Senior, *Methods Enzymol.* 55, 391 (1979).
- [156] R. J. Van De Stadt, R. J. Kraipoel, K. van Dam, *Biochim. Biophys. Acta* 267, 25 (1972).
- [157] B. I. Kanner, R. Serrano, M. A. Kandach, E. Racker, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 69, 1050 (1976).
- [158] A. F. Knowles, R. J. Guillory, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 246, 2672 (1971).
- [159] A. Vadineann, J. A. Berden, E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* 449, 468 (1976).
- [160] M. E. Pullman, G. C. Monroy, *J. Biol. Chem.* 238, 3762 (1963).
- [161] L. L. Horstmann, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 245, 1336 (1970).
- [162] E. I. Mileykovskaja, G. V. Tikhanova, A. A. Kondraskin, I. A. Kozlov, *Eur. J. Biochem.* 62, 613 (1976).
- [163] D. H. MacLennan, J. Asai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 441 (1968).
- [164] A. E. Senior, *Biochim. Biophys. Acta* 301, 249 (1973).
- [165] I. A. Kozlov, H. N. Mikelsaar, *FEBS Lett.* 43, 212 (1974).
- [166] E. Racker, *J. Membr. Biol.* 10, 221 (1972).
- [167] E. Racker, L. L. Horstmann, *J. Biol. Chem.* 242, 2547 (1967).
- [168] K. J. Catell, C. R. Lindop, I. G. Knight, R. B. Beechey, *Biochem. J.* 125, 169 (1971).
- [169] W. Sebald, W. Machleidt, E. Wachter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 785 (1980).
- [170] R. J. Wagenvoord, I. van Der Kraan, A. Kemp, *Biochim. Biophys. Acta* 460, 17 (1977).
- [171] I. Lunardi, G. L. M. Lauquin, P. V. Vignais, *FEBS Lett.* 80, 317 (1977).
- [172] F. S. Esch, W. S. Allison, *J. Biol. Chem.* 253, 6100 (1978).
- [173] A. T. Jagendorf, E. Uribe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 170 (1966).
- [174] H. T. Witt, E. Schloesser, P. Gräber, *FEBS Lett.* 69, 272 (1976).
- [175] I. A. Kozlov, V. P. Skulachev, *Biochim. Biophys. Acta* 463, 29 (1977).
- [176] P. D. Boyer, B. Chance, L. Ernster, P. Mitchell, E. Racker, E. C. Slater, *Annu. Rev. Biochem.* 46, 955 (1977).
- [177] D. A. Hackney, P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.* 253, 3164 (1978).
- [178] Y. Fukushima, Y. Tonomura, *J. Biochem.* 77, 533 (1975).
- [179] A. F. Knowles, E. Racker, *J. Biol. Chem.* 250, 1949 (1975).
- [180] D. R. Trenthan, J. F. Eccles, C. R. Bagshaw, *Quart. Rev. Biophys.* 9, 217 (1976).
- [181] P. Mitchell, J. Moyle, *Nature* 208, 1205 (1965).
- [182] J. Moyle, P. Mitchell, *FEBS Lett.* 30, 317 (1973).
- [183] W. S. Thayer, P. C. Hinkle, *J. Biol. Chem.* 248, 5395 (1973).

- [184] *M. Klingenberg* in *P. N. Campbell, F. Dickens: Essays in Biochemistry*, Vol. 6. Academic Press, New York 1970, S. 119.
- [185] *M. Klingenberg* in [22a], Vol. 3, S. 383.
- [186] *P. V. Vignais*, *Biochim. Biophys. Acta* 456, 1 (1976).
- [187] *P. Riccio, H. Aquila, M. Klingenberg*, *FEBS Lett.* 56, 129 (1975).
- [188] *H. Hackenberg, M. Klingenberg*, *Biochemistry* 19, 548 (1980).
- [189] *M. Klingenberg, M. Buchholz*, *Eur. J. Biochem.* 38, 346 (1973).
- [190] *E. Pfaff, M. Klingenberg, H. W. Heldt*, *Biochim. Biophys. Acta* 104, 312 (1965).
- [191] *M. J. Weidemann, H. Erdelt, M. Klingenberg*, *Eur. J. Biochem.* 16, 313 (1970).
- [192] *M. Klingenberg, M. Buchholz*, *Eur. J. Biochem.* 38, 346 (1973).
- [193] *M. Klingenberg* in *L. Ernster et al.: Dynamics of Energy Transducing Membranes*. Elsevier, Amsterdam 1974, S. 511.
- [194] *E. Pfaff, M. Klingenberg*, *Eur. J. Biochem.* 6, 66 (1968).
- [195] *M. Klingenberg*, *Trends in Biochem. Sci.*, Nov. 1979, S. 1.
- [196] *R. Krämer, M. Klingenberg*, *FEBS Lett.* 82, 363 (1977).
- [197] *R. Krämer, M. Klingenberg*, *Biochemistry* 19, 556 (1980).
- [198] *R. N. Johnson, J. B. Chappell*, *Biochem. J.* 134, 769 (1973).
- [199] *W. A. Coty, P. L. Pedersen*, *J. Biol. Chem.* 249, 2593 (1974).
- [200] *A. Fonyo, E. Ligeti, F. Palmieri, E. Quagliariello* in: *Biomembranes, Structure and Function*. Elsevier – North-Holland, Amsterdam 1975, S. 287.
- [201] *W. A. Coty, P. L. Pedersen*, *J. Biol. Chem.* 250, 3515 (1975).
- [202] *P. Hadvary, B. Kadenbach*, *Eur. J. Biochem.* 67, 573 (1976).
- [203] *S. Touraille, Y. Briand, R. Durand*, *FEBS Lett.* 84, 119 (1977).
- [204] *J. D. McGivan, M. Klingenberg*, *Eur. J. Biochem.* 20, 392 (1971).
- [205] *A. Alexandre, A. L. Lehninger*, *J. Biol. Chem.* 254, 11555 (1979).
- [206] *T. Pozzan, V. Miconi, F. Di Virgilio, G. F. Azzone*, *J. Biol. Chem.* 254, 10200 (1979).
- [207] *G. F. Azzone, T. Pozzan, F. Di Virgilio*, *J. Biol. Chem.* 254, 10206 (1979).
- [208] *G. F. Azzone, T. Pozzan, M. Bragadin, V. Miconi*, *J. Biol. Chem.* 254, 10213 (1979).
- [209] *H. Rottenberg, M. Gutman*, *Biochemistry* 16, 3220 (1977).
- [210] *C. M. Sorgato, S. L. Ferguson, D. B. Kell, P. John*, *Biochem. J.* 174, 237 (1978).
- [211] *J. Himmis-Hagen*, *Annu. Rev. Physiol.* 38, 315 (1976).
- [212] *D. G. Nicholls*, *Biochim. Biophys. Acta* 549, 1 (1979).
- [213] *D. G. Nicholls*, *Eur. J. Biochem.* 50, 305 (1974).
- [214] *J. Rafael* in *L. Girardier, J. Seydoux: Effectors of Thermogenesis*. Birkhäuser, Basel 1978, S. 25.
- [215] *B. A. Afzelius* in *O. Lindberg: Brown Adipose Tissue*. Elsevier, Amsterdam 1970, S. 1.
- [216] *C. S. Lin, M. Klingenberg*, *FEBS Lett.* 113, 299 (1980); *C. S. Lin, H. Hakenberg, M. Klingenberg*, *FEBS Lett.* 113, 304 (1980).
- [217] *H. J. Hohorst, J. Rafael*, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 268 (1968).
- [218] *J. Rafael, H. J. Ludolph, H. J. Hohorst*, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1121 (1969).
- [219] *G. M. Heaton, D. G. Nicholls*, *Biochem. Soc. Trans.* 5, 210 (1977).
- [220] *L. Ernster*, *Annu. Rev. Biochem.* 46, 955 (1977); *P. P. Slonimski* in [90a].
- [221] *P. N. T. Unwin, R. Henderson*, *J. Mol. Biol.* 94, 425 (1975).
- [222] *R. Henderson, J. S. Judds, S. Whytock*, *J. Mol. Biol.* 123, 259 (1978).

Struktur einfacher molekularer Flüssigkeiten

Von Manfred D. Zeidler^[*]

Professor Ernst Ulrich Franck zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Struktur einer Flüssigkeit wird durch die Paarkorrelationsfunktion beschrieben. Falls die Flüssigkeitsteilchen Moleküle sind, hängt die entsprechende Korrelationsfunktion von Abstands- und mehreren Winkelvariablen ab, so daß man der Übersichtlichkeit wegen zu einer symmetrieargpaßten Darstellung übergehen muß. Die wichtigsten Strukturparameter dieser Molekülpaarkorrelationsfunktion können durch Kombination mehrerer Streuexperimente, wie Neutronen- (unter Verwendung verschiedener Isotope), Röntgen- und Elektronenstreuung näherungsweise bestimmt werden. Auch Lichtstreuung, dielektrische und kernmagnetische Relaxation ermöglichen, allerdings weniger direkt, einen Zugang. Ergebnisse solcher Messungen werden für Chloroform mitgeteilt. Möglichkeiten zur theoretischen Berechnung dieser Strukturparameter werden ebenfalls behandelt.

1. Einleitung

Es ist kaum nötig hervorzuheben, welch eine wichtige Rolle Flüssigkeiten bei chemischen Experimenten spielen, denn die meisten chemischen Umsetzungen werden in der flüssigen Phase durchgeführt. Dabei denkt man neben Wasser wohl zuerst an organische Flüssigkeiten, die als Lösungsmittel verwendet werden. Offenbar interessieren in der Chemie in erster Linie molekulare Flüssigkeiten, die man gegenüber atomaren Flüssigkeiten (flüssige Edelgase) abgrenzen kann.

Leider bietet der Flüssigkeitsbereich, der zwischen dem wohlgeordneten festen Zustand und dem ungeordneten Gaszustand liegt, dem theoretischen Verständnis besonders große Schwierigkeiten. In den letzten drei Jahrzehnten konnten

bei den atomaren Flüssigkeiten bemerkenswerte Fortschritte erzielt werden, während die molekularen Flüssigkeiten im gegenwärtigen Zeitpunkt noch viele Schwierigkeiten bereiten.

Aus diesem Grund ist verständlich, daß man sich zunächst auf möglichst einfache molekulare Flüssigkeiten beschränken muß, d. h. auf Moleküle mit weniger als ca. zehn Atomen, mit hoher Symmetrie und ohne interne Flexibilität, welche die klassische statistische Mechanik befolgen.

Das Ziel einer Flüssigkeitstheorie ist die Berechnung von thermodynamischen Daten sowie von Transportgrößen aus vorgegebenen zwischenmolekularen Potentialen. Der erste Punkt ist dabei noch der einfachere, denn hier beschränkt man sich auf Gleichgewichtseigenschaften (Statistische Thermodynamik), während die Transportgrößen mit der Nichtgleichgewichts-Statistischen-Mechanik berechnet werden müssen.

Die Bedeutung von Strukturuntersuchungen im Zusammenhang mit statistisch-mechanischen Theorien besteht darin, daß man auf dem Weg zwischen Eingabe des Potentials

[*] Prof. Dr. M. Zeidler
Institut für Physikalische Chemie der Universität
Schloßplatz 4, D-4400 Münster
beurlaubt vom Institut für Physikalische Chemie
und Elektrochemie der Universität
D-7500 Karlsruhe