

**Stabilisierung der oxydativen
Phosphorylierung isolierter Mitochondrien
durch artspezifische und
artunspezifische Serumproteine**

Bei der Untersuchung der oxydativen Phosphorylierung isolierter Mitochondrien im Warburg-Versuch liegen die gemessenen P/O-Quotienten oft erheblich unter den theoretischen Erwartungswerten. Hauptgrund dafür ist die Labilität des transphosphorylierenden Systems, das schon während der Isolierung der Mitochondrien aus tierischen Geweben geschädigt und dessen volle Funktion unter den meisten Versuchsbedingungen nur kurzfristig aufrechterhalten werden kann.

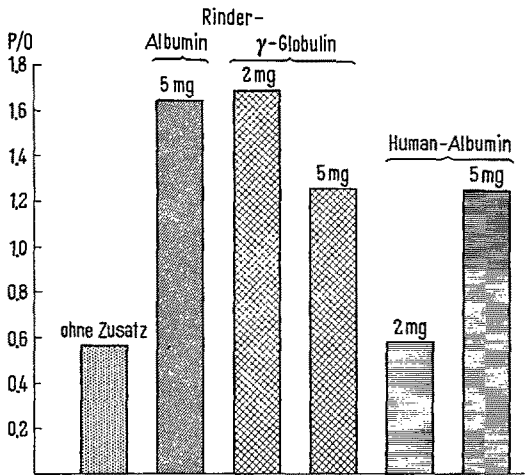
Bei der systematischen Prüfung experimenteller Faktoren, die eine Aufrechterhaltung der Phosphorylierungskapazität über grössere Zeiträume gewährleisten sollten, untersuchten wir auch den Einfluss des Zusatzes verschiedener Eiweisskörper zum Reaktionsmedium, da in der Literatur ein stabilisierender Effekt von Serumalbumin beschrieben worden war¹⁻⁴. Die genannten Untersucher verwendeten allerdings meist artfremdes Serumalbumin (Rinderalbumin) bei Ansätzen mit Mitochondrien aus Ratten- und Mäuseorganen, teilweise auch von Tauben⁵ und sogar Insekten⁶. In unseren Versuchen mit Rinderlebermitochondrien setzten wir sowohl arteigenes (Rinder-serumalbumin und - γ -Globulin) als auch artfremdes Eiweiss (Humanalbumin) den Ansätzen zu.

Methodik. Isolierung der Mitochondrien und Messtechnik wie früher beschrieben⁷. Substrat Bernsteinsäure. Endkonzentrationen im 2,4-ml-Ansatz (einschliesslich 0,4 ml Mitochondriensuspension): Phosphatpuffer 0,012 M/pH 7,2; KCl 0,0215 M; NaF 0,016 M; Natriumsuccinat 0,0053 M; ATP 0,002 M; MgSO₄ 0,006 M; Triäthanolaminhydrochloridpuffer 0,028 M/pH 7,5; Glucose 0,026 M; Hexokinase (SIGMA Typ III) 3 mg; CO₂-Absorption durch 0,2 ml 10%ige KOH im Zentralgefäss. Eiweisszusätze vgl. Abbildung und Tabelle. Die Eiweisskörper stammten von den Behring-Werken. Phosphatbestimmung nach GARBADE. Insgesamt wurden 124 Versuche durchgeführt.

Ergebnisse. Wie die Tabelle zeigt, steigert Zusatz von Rinderalbumin auch den P/O-Quotienten frisch hergestellter Mitochondrien. Diese Steigerung wird hauptsächlich durch Vergrösserung der Phosphataufnahme bewirkt und ist von der eingesetzten Albuminmenge abhängig. Bei 3–5 mg Albumin pro Ansatz liegt die Phosphataufnahme konstant um 31%, die Sauerstoffaufnahme um etwa 10% und der P/O-Quotient dadurch rund 16% gegenüber dem Ausgangswert ohne Albumin höher. Das bedeutet, dass die Mitochondrien trotz schonender Isolierungstechnik bereits während der Aufarbeitungszeit (ca. 2 h) in ihrer Phosphorylierungsfunktion geschädigt werden. Durch ausreichenden Albuminzusatz wird dann ein P/O-Quotient von im Mittel 1,95 erzielt, der den theoretischen Erwartungswert von 2,00 weitgehend erreicht.

Die Senkung der Phosphataufnahme wird noch deutlicher, wenn man die Mitochondriensuspensionen ohne Substratzusatz 3 h auf Eis stehen lässt. Sie kann 10 bis 60% des Ausgangswertes betragen, während die Sauerstoffaufnahme um höchstens 10% sinkt. Dieses unterschiedliche Verhalten hängt bei gleichbleibender Isolierungs- und Messtechnik unter anderem vom allgemeinen Gesundheits- und Ernährungszustand der Rinder, speziell vom Zustand der Lebern ab und wird auch dadurch beeinflusst, dass zwischen Entnahme der Lebern und Beginn der Aufarbeitung naturgemäss mehr Zeit vergeht als zum Beispiel der Herstellung von Mitochondrien aus Rattenlebern.

Auch bei diesen Mitochondriensuspensionen wird durch Albuminzusatz die Phosphataufnahme wieder angehoben, die P/O-Werte erreichen fast die der Frischsuspension in den Ansätzen mit Albumin und liegen sogar höher als die P/O-Quotienten der albuminfreien Frischansätze (vgl. Tabelle). Es scheint daher zweckmässig, bei Warburg-Untersuchungen von Mitochondrien routinemässig den Ansätzen Albumin zuzufügen.



Einfluss verschiedener Eiweissarten und -konzentrationen auf den P/O-Quotienten gealterter Rinderlebermitochondrien.

Wirkung von Rinderalbumin. Messwerte nach 25 min

Albumin-Zusatz	Aufnahmen in μ g-Atomen				P/O-Quotient	
	Phosphat t_0	Phosphat t_3	Sauerstoff t_0	Sauerstoff t_3	t_0	t_3
Null	9.68	8.29	5.89	5.55	1.64	1.49
1 mg	10.32	9.13	5.89	5.55	1.75	1.65
2 mg	11.65	10.29	6.21	5.90	1.88	1.74
3 mg	12.67	11.40	6.50	6.20	1.95	1.84
4 mg	12.67	11.40	6.50	6.20	1.95	1.84
5 mg	12.67	11.40	6.50	6.20	1.95	1.84

t_0 = Messung sofort anschliessend an den Isolierungsvorgang.
 t_3 = Messung nach 3stündiger Aufbewahrung der gleichen Mitochondriensuspensionen auf Eis.
Albumin wurde dem Reaktionsansatz, nicht direkt der Mitochondriensuspension zugesetzt. Mitochondrien-N im Mittel 3,7 mg/ml Suspension. Mittelwerte aus 60 Versuchen.

¹ S. E. LEWIS and E. C. SLATER, *Biochem. J.* **58**, 207 (1954).
² M. I. WATANABE and C. M. WILLIAMS, *J. gen. Physiol.* **37**, 71 (1953/54).
³ H. STERN and S. TIMONEN, *Exp. Cell Res.* **9**, 101 (1955).
⁴ M. E. PULLMAN, E. RACKER, *Science* **123**, 1105 (1956).
⁵ M. BERGER and J. W. HARMAN, *Amer. J. phys. Med.* **34**, 476 (1955).
⁶ B. SACKTOR and D. COCHRAN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3227 (1956).
⁷ G. LAUDAHN, *Z. phys. Chem.* **314**, 95 (1959).
⁸ B. D. POLIS and H. W. SHMUKLER, *J. biol. Chem.* **227**, 419 (1957).
⁹ *Humanalbumin*, Übersichtsbrochure (Behring-Werke, 1959).

Die stabilisierende Wirkung von 5 mg Rinderalbumin/Ansatz kann durch 2 mg Rinder- γ -Globulin ebenfalls erzielt werden. Bei Zusatz grösserer Mengen γ -Globulin (bis 5 mg) wird bei gleichbleibender O_2 -Aufnahme die Phosphataufnahme wieder geringer und demgemäss sinken die P/O-Quotienten (Abb.). Humanalbumin hat einen wesentlich geringeren Effekt als Rinderalbumin: 1–2 mg haben keine Wirkung, 3–5 mg steigern zwar die Phosphataufnahme, aber nicht in dem Masse wie Rinderalbumin. Die Untersuchungsergebnisse beweisen damit eine überlegene Schutzwirkung des arteigenen Albumins. Unter Berücksichtigung der pro Warburg-Ansatz eingesetzten Mitochondrienmenge (als Mitochondrien-N) ist im Querschnitt aller Versuche ein optimaler Effekt bei Zugabe von Rinderalbumin im Verhältnis 3 mg/mg Mitochondrien-N zu beobachten.

Nach heutigen Erkenntnissen beruht die Albuminwirkung auf der Bindung des Chromoproteids «Mitochrom», das von alterierten Mitochondrien freigesetzt wird und die oxydative Phosphorylierung hemmt⁸. Die molekulare Konfiguration des Albumins soll bei der Bindung des Mitochrom eine geringere Rolle spielen als spezifische Endgruppen in den Peptidketten, da partiell denaturiertes Albumin seine positive Wirkung auf die Phosphorylierung behält. Da die Artspezifität ebenfalls in den Hauptvalenzen der Peptidketten verankert ist⁹, kommt dadurch möglicherweise auch die bessere Wirkung arteigenen Albumins zustande.

G. LAUDAHN

Hauptlabor des Städtischen Krankenhauses Berlin-Wilmersdorf, 4. März 1960.

Summary

Addition of 3 mg bovine serum albumin/mg mitochondrial-N enhances and stabilizes the phosphorylation capacity of isolated beef liver mitochondria. Albumin reduces the fluctuation of the resulting P/O-rates and brings about a better reproducibility of the entire method. The same effect is produced by addition of bovine γ -globulin in half the concentration of albumin, while the effect of heterologous proteins (e. g. human albumin) is inferior.

Secretory Cycle and Disappearance of the Prothoracic Glands in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae)

Cyclic changes have been observed in the prothoracic glands of several larval instars of *Tenebrio molitor*. In each instar, the gland is much attenuated shortly after moulting, the web of cells stretching between the tracheae is inconspicuous and the layer of cells normally spread over the dorsal tracheal trunk is observed with difficulty¹. The cells have hyaline cytoplasm with very few and small vacuoles and a few minute granules at the periphery, but without secretion droplets. The nuclei are compact and filled with numerous small chromatin granules.

In the two-week old instar, the gland is considerably developed. The layer of gland cells over the dorsal tracheal trunk is prominent and uniform. The cytoplasm is uniformly granular and minute secretion droplets can be observed in fresh preparations. The nuclei become larger and block-like, elongated, and sometimes lobulated, and chromosomal substance is concentrated beneath the nuclear membrane.

In the four-week old instar, 3 or 4 days before the next moult, all the parts of the gland show maximum development and it extends somewhat onto the ventral tracheal trunk also. The cytoplasm has numerous fine granules and sometimes fibrils arranged along the axis of the gland, as reported by ARVY and GABE² in the Ephemeroptera. Secretion droplets are now observed in fresh preparations.

Two days or less before the next moult, the gland is again much reduced, and the sheath over the dorsal tracheal trunk is difficult to discern. The cytoplasm is almost free from granules and secretion droplets, and empty vacuoles are seen. The nucleus is also smaller, thin and elongated and darkly staining.

In the last instar also, similar changes occur. The gland shows maximum development about the time when the larva stops feeding, and about 24 h later, it shows great reduction. The band-like gland assumes the shape of a strand and the elongated nuclei are arranged length-wise in it, but the cells over the dorsal tracheal trunk can still be seen. In the 16 h old pupa, the gland has already lost its discrete nature and the web between the tracheal trunks is disintegrating. Soon after, the gland is represented only by a few cells attached to the dorsal tracheal trunk; and by the time the first traces of eye pigmentation appear, the gland has lost its identity completely.

Thus in each instar of *Tenebrio*, the prothoracic glands undergo maximal development about two days before moulting, when it discharges its secretion to become reduced again. Hence, the critical period occurs about two days before the next moult. In *Anisotarsus*, NÚÑEZ³ described the critical period to occur about 20 h before moulting. In *Dysdercus*, WELLS⁴ found that the volume of nuclear increase at the peak period of the development of the gland is about 5 times its original volume. Such marked increase in nuclear volume does not occur in beetles. In *Rhodnius*⁵ and *Dysdercus*, degeneration of the gland starts about two days after the completion of metamorphosis, but in *Platysamia* WILLIAMS⁶ found that the degeneration commences soon after eye pigmentation has started. Both in *Tenebrio* and *Anisotarsus*, the gland disappears long before metamorphosis is completed, and in *Tenebrio*, it is already disintegrating when eye pigmentation appears, showing that the completion of metamorphosis does not need secretory activity of the prothoracic gland throughout the process. WIGGLESWORTH⁷ suggested that the disappearance of the gland is due to some change (metamorphosis) of the gland itself during the preceding moult, and to some humoral stimulus acting during the last moult. In *Tenebrio*, occurrence of initial changes in the last larval instar, which are similar to those occurring in the earlier ones, indicates that the first factor is not a very important one, while the influences working during the last moult are strong and decisive.

The author is grateful to Prof. O. W. RICHARDS for encouragement and help.

U. S. SRIVASTAVA

Department of Zoology, University of Allahabad (India),
March 3, 1960.

¹ U. S. SRIVASTAVA, Quart. J. micr. Sci. 100, 51 (1959).

² L. ARVY and M. GABE, Bull. Soc. zool. Fr. 75, 267 (1950).

³ J. A. NÚÑEZ, Biol. Zbl. 73, 602 (1954).

⁴ M. J. WELLS, Quart. J. micr.-Sci. 25, 231 (1954).

⁵ V. B. WIGGLESWORTH, J. exp. Biol. 29, 561 (1952).

⁶ C. M. WILLIAMS, Biol. Bull. Wood's Hole 103, 120 (1952).

⁷ V. B. WIGGLESWORTH, J. exp. Biol. 32, 485 (1955).