

ZUR BIOGENESE VON MITOCHONDRIEN

Über den Einbau von Aminosäuren in isolierte Mitochondrien des Flugmuskels der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) und der Rattenleber

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von

Walter Neupert

aus Germering

München 1967

Gd/68/1501

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Plan	5
3. Ergebnisse	7
3.1. Versuche zur Charakterisierung des Einbausystems	7
3.1.1. Osmolarität des Mediums	7
3.1.2. pH-Abhängigkeit des Einbaus	9
3.1.3. Bedarf an Aminosäuren	11
3.1.4. Zeitabhängigkeit des Einbaus	18
3.1.5. Abhängigkeit des Einbaus von der $Mg^{++}$ Konzentration	19
3.1.6. Abhängigkeit des Einbaus von der Phosphationenkonzentration	20
3.1.7. Bereitstellung der Energie für den Einbau	21
3.2. Einfluß von Hemmsubstanzen der cytoplasmatisch-ribosomalen Proteinsynthese auf den Einbau	27
3.3. Abhängigkeit des Einbaus von der strukturellen Intaktheit der Mitochondrien	29
3.4. Untersuchungen zur Regulation des Einbaus	32
3.4.1. Abhängigkeit der Einbauaktivität vom Entwicklungszustand der Mitochondrien	32
3.4.2. Einbau in Mitochondrien aus hyperthyreoten Ratten	34
3.5. Ausschluß von Fehlerquellen	36
3.5.1. Nachweis des Einbaus in Peptidketten	36
3.5.2. Ausschluß mikrosomaler Beteiligung am Einbau	37
3.5.3. Ausschluß bakterieller Beteiligung am Einbau	40
3.6. Quantitative Betrachtung des Einbaus	44
3.7. Lokalisierung des Einbauproduktes	45

	Seite
3.7.1. Fraktionierte Extraktion	45
3.7.2. Trennung der Mitochondrien in äußere und innere Membran	47
3.7.2.1. "Swelling-shrinking" Verfahren	48
3.7.2.2. Digitonin Methode	56
3.7.2.3. Polyacrylamidgelelektrophorese von innerer und äußerer Membran	57
3.7.3. Incubation der verschiedenen Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens	60
4. Experimenteller Teil	63
4.1. Isolierung von Mitochondrien und Mikrosomen	63
4.2. Funktionszustand der Mitochondrien	64
4.3. Incubations- und Waschprozeduren	64
4.4. <u>In vivo</u> Markierung von Locusten	70
4.5. Fraktionierungsmethoden	70
4.6. Bestimmungsmethoden	73
4.7. Verwendete Materialien und Apparate	76
5. Diskussion	78
6. Zusammenfassung	87
7. Literaturverzeichnis	89
8. Verzeichnis der Abkürzungen	94

## 1. Einleitung

Das Studium der Biogenese von Mitochondrien - zellulärer Unter-einheiten von funktionell und morphologisch spezifischer Orga-nisation - kann sich an zwei Gruppen von Fragestellungen orien-tieren:

- 1) Auf welchem Wege werden neue Mitochondrien in den Zellen ge-bildet und wachsen heran?
- 2) Wie wird dieser Prozeß gesteuert, dergestalt, daß der Anteil des Chondrioms an der zellulären Substanz ein spezifischer biologischer Parameter ist?

Im Hinblick auf beide genannten Problemkreise ist wahrschein-lich, daß autonome Mechanismen der Mitochondrien mit extra-mitochondrialen Systemen der Zelle kooperieren.

Bis etwa 1960 interessierten sich fast ausschließlich morpho-logisch ausgerichtete Biologen für diese Fragen. Mikroskopische und elektronenmikroskopische Beobachtungen führten zu einer Vielzahl von Theorien, so etwa einer Entstehung von Mitochon-drien durch Umbildung der Kernmembran, des endoplasmatischen Retikulums, des Golgiapparates oder der Plasmamembran [1]. Erst als aus biochemischen Untersuchungen klar wurde, daß äußere Membran, innere Membran und Matrix der Mitochondrien spezifische Struktur und Funktion haben, wurde begonnen, mit biochemischen Methoden das Problem der Entstehung von Mitochondrien zu verfolgen. In der folgenden Aufstellung sind die wichtigen Schritte der seitdem einsetzenden Entwicklung auf-gezählt:

- 1958 SIMPSON [2] berichtet über einen geringen aber signifikanten Einbau radioaktiver Aminosäuren in isolierte Leber-, Herz- und Skelettmuskelmitochon-drien. Dieser Prozeß ist im Gegensatz zum micro-somalen Einbau unempfindlich gegen Ribonuclease.
- 1961 Es erscheinen die ersten detaillierten Unter-suchungen über die Bedingungen des Einbaus radio-aktiver Aminosäuren in das Protein von Ratten-lebermitochondrien (ROODYN [3], TRUMAN [4]).

Die in vitro Syntheserate ist jedoch, verglichen mit der in vivo zu beobachtenden, minimal.

ROODYN [5] weist nach, daß sich in der löslichen Proteinfraction nach in vitro Einbau von markierten Aminosäuren nur eine geringe spezifische Radioaktivität findet. Cytochrom c, Malatdehydrogenase und Katalase werden nicht im in vitro System synthetisiert. Eine besonders hohe spezifische Radioaktivität findet sich in einer mit Detergens präparierten Lipoproteinfraction der mitochondrialen Membranen [6].

1963 LUCK [7] beobachtet bei der Verfolgung von Mitochondrien in einer Cholinmangelmutante von *Neurospora crassa*, die mit radioaktivem Cholin markiert wurde, über mehrere Generationszyklen, daß sich die Radioaktivität statistisch über sämtliche Mitochondrien verteilt. Eine Vermehrung der Mitochondrien durch Teilung gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit.

BROSEMER et al. [8] weisen Wachstum von Mitochondrien nach. Bei der Entwicklung des Flugmuskels der Wanderheuschrecke beobachten sie Konstanz des Musters mitochondrialer Enzyme trotz großer quantitativer Unterschiede in der morphologischen Erscheinungsform der Mitochondrien.

NASS et al. [9] finden mit Hilfe histochemischer Methoden DNA-Fasern in Mitochondrien.

1964 Eine Reihe detaillierter Untersuchungen über den Einbau von Aminosäuren in isolierte Mitochondrien weisen auf Analogien im Mechanismus von mitochondrialer und mikrosomaler Proteinsynthese hin KROON [10].

LUCK et al. [11] finden RNA-Synthese in isolierten *Neurospora* Mitochondrien.

1965 Das Vorkommen einer RNA-Polymerase in Mitochondrien wird durch WINTERSBERGER [12] und NEUBERT [13] bestätigt. Das Vorkommen von transfer-RNA und Aminoacyl-RNA-Synthetasen in Hefe-

mitochondrien erscheint wahrscheinlich [14]. Mitochondriale DNA mit von der Kern-DNA unterschiedlichem Sedimentationsverhalten wird isoliert (LUCK et al. [11], BORST et al. [16]).

1966 Die Existenz einer mitochondrialen DNA-Polymerase wird nachgewiesen (WINTERSBERGER [17], SIMPSON et al. [18]).

Die mitochondriale DNA wird charakterisiert: Sie besitzt in sämtlichen untersuchten Organismen ein Molekulargewicht von ca.  $10 \cdot 10^6$ , ist doppelsträngig ringförmig und hat eine Länge von  $5.4 \mu$  (KROON et al. [19], NASS [20]).

LUCK wiederholt den klassischen MESELSON-STAHN-Versuch für mitochondriale DNA und findet grundsätzlich ähnliches Verhalten wie für Kern-DNA, ein Hinweis auf die mögliche Fähigkeit mitochondrialer DNA zur Übertragung genetischer Information [15].

Der Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte Mitochondrien erfolgt in vier bis fünf Banden der elektrophoretisch aufgetrennten unlöslichen Membranproteine (HALDAR et al. [21], SEBALD [22]). Experimente mit HeLa-Zellen sprechen dafür, daß Cytochrom c an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird [21].

1967 Mutierte mitochondriale DNA wird in den cytoplasmatischen "petite colonies" Mutanten von *Sacharomyces cerevisiae* gefunden (SLONIMSKI et al. [23]). Unabhängigkeit im zeitlichen Replikationsverhalten von mitochondrialer und Kern-DNA wird nachgewiesen (NEUBERT [24]).

SWIFT [25] identifiziert in Mitochondrien ribosomenartige Partikel mit einem Durchmesser von  $120-150 \text{ \AA}$ . Mitochondriale Ribosomen dieser Größe mit einem von den cytoplasmatischen Ribosomen abweichendem Sedimentationsverhalten (55S)

werden aus Lebermitochondrien isoliert (O'BRIEN et al. [26,27]). Es folgt die Gewinnung mitochondrialer Ribosomen aus *Neurospora crassa* [28,29]. RNA vom bakteriell-ribosomalen Typ (16 S und 23 S) wird aus Lebermitochondrien dargestellt (KROON [30]). Hybridisierungsversuche sprechen dafür, daß wenigstens ein Teil der mitochondrialen RNA durch Transskription mitochondrialer DNA entsteht (FUKUHARA [31,32]). In *Neurospora crassa* und in Rattenleber wird die Existenz mitochondrialer transfer-RNAs nachgewiesen (BARNETT et al. [33], SIMPSON et al [34]), weiterhin das Vorkommen spezifischer mitochondrialer Aminoacyl-RNA-Synthetasen [35].

Der Beginn dieser Arbeit fällt in diejenige Phase der beschriebenen Entwicklung, in der sich die biologische Signifikanz der in vitro Synthese mitochondrialer Proteine abzeichnete.

## 2. Plan

Wie eingangs gesagt, kooperieren autonome Mechanismen der Mitochondrien mit extramitochondrialen Systemen. Daher darf sich das Studium der Biogenese von Mitochondrien nicht nur auf die Abläufe in der intakten Zelle erstrecken, sondern es muß auch der Versuch unternommen werden, den biogenetischen Prozeß an isolierten Mitochondrien in vitro zu untersuchen. In diesem Sinne wurde in der vorliegenden Arbeit der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in mitochondriale Proteine verfolgt.

Zunächst wurde untersucht, durch welche Bedingungen des Incubationsmediums sich das zelluläre Milieu substituieren läßt. Das Inhaltsverzeichnis gibt Auskunft über die verschiedenartigen Parameter. Neben den Konzentrationen der Ionen und Metabolite wurde der Bedarf an Aminosäuren und deren gegenseitige Beeinflussung einer eingehenderen Betrachtung unterzogen. An Hand einer optimalen oder zumindest standardisierten Versuchsanordnung wurde daraufhin der Einfluß von Hemmstoffen und die Abhängigkeit des Einbaus von der strukturellen Intaktheit der Mitochondrien untersucht, und der Ausschluß von wesentlichen Fehlerquellen durchgeführt. Die Klärung des Systems im derzeitigen Stand der Erforschung wird durch Experimente zur Regulation des Einbaus und zur quantitativen Betrachtung der Einbaurrate abgeschlossen.

Diese Untersuchungen wurden an zwei verschiedenen Typen von Mitochondrien durchgeführt, welche Extreme mitochondrialer Organisation repräsentieren. Sie betrachten das Mitochondrium als eine Einheit.

In einem zweiten Teil wird nach der Biogenese einzelner Elemente des Mitochondriums gefragt. Wir bestätigten, daß im in vitro System radioaktive Aminosäuren nur in die Fraktion der unlöslichen Membranproteine eingebaut werden. Diese Fraktion beinhaltet jedoch die strukturgebundenen Proteine sowohl der Innen- als auch der Außenmembran. Deshalb wurde in den darauffolgenden Experimenten das Verhalten der beiden Membranen getrennt untersucht, mit dem Ergebnis, daß in vitro Aminosäuren



nur in einzelne Fraktionen der inneren Membran inkorporiert werden. Es ist klar, daß das in vitro System nur einen sehr eingeschränkten Teil der Biogenese von Mitochondrien erfaßt.

### 3. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit verwendeten Arten von Mitochondrien von extrem verschiedenem Typ sind: die Mitochondrien des Flugmuskels der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) und der Rattenleber.

Sie unterscheiden sich in zweierlei Hinsicht:

- 1) Wie bereits erwähnt, repräsentieren die Flugmuskelmitochondrien (Sarkosomen) den "Crista-Typ", die Lebermitochondrien den "Matrix-Typ".
- 2) Das Mitochondrium des Flugmuskels wird im Verlauf des Lebens des Insektes einmal gebildet. Diese Entwicklung erfolgt in zeitlicher Koordination mit der Entwicklung des Flugmuskels. Sämtliche Mitochondrien des Organs befinden sich jeweils im gleichen Entwicklungszustand. Die Mitochondrien der Rattenleber hingegen haben einen Turnover (ca. 10 Tage Halblebenszeit [36]). Im Organ gehen laufend Mitochondrien zu Grunde und werden durch neue ersetzt.

Ein weiterer Vorteil in der gleichzeitigen Benutzung dieser verschiedenen Objekte liegt darin, daß sich das Locustensystem besonders für vergleichende in vivo - in vitro Untersuchungen eignet, das Rattenlebersystem hingegen wegen der leichten Verfügbarkeit großer Mengen von Mitochondrien z.B. Vorteile bei der Verfolgung des Einbauproduktes bietet.

#### 3.1. Versuche zur Charakterisierung der Einbausysteme

##### 3.1.1. Osmolarität des Incubationsmediums

Das Mitochondrium stellt ein osmotisches System dar. Nach den gegenwärtigen Kenntnissen steht die innere Membran im Vordergrund, die den "Matrixraum" umschließt. Intaktheit von Mitochondrien ist nur gewährleistet, wenn sie sich in einem - zumindest annähernd - isosmotischen Medium befinden. Zur Erzeugung von Osmolarität wurde entweder KCl oder Sucrose verwendet. KCl erscheint deshalb günstig, da das die Mitochondrien umgebende Ionenmilieu der Zelle vor allem durch hohe  $K^+$  Konzentration gekennzeichnet ist (ca. 100 mM), und weiterhin frisch isolierte Mitochondrien an Metallionen

vornehmlich  $K^+$  in einer Konzentration von 130  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein enthalten [37]. Abb. 1 und Abb. 2 zeigen die Abhängigkeit des Einbaus von radioaktivem Leucin bzw. Isoleucin von der Kaliumchloridkonzentration im Incubationsmedium.

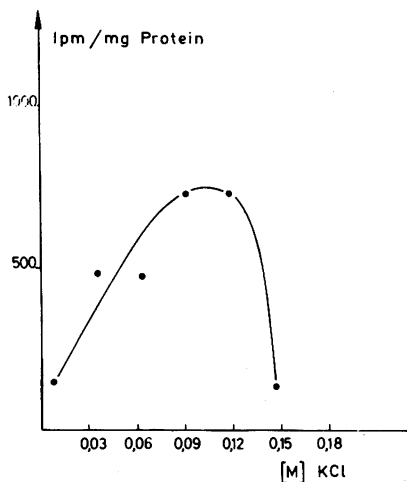


Abb. 1. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in isolierte Locustenmitochondrien von der KCl Konzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

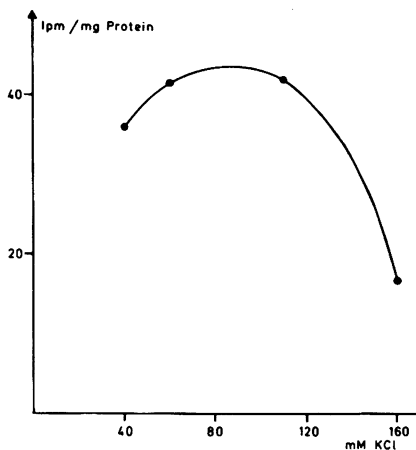


Abb.2. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in isolierte Rattenlebermitochondrien von der KCl Konzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Für beide Typen findet sich ein ausgeprägtes Optimum. Wenn man zu diesen Ionen die im Incubationsmedium weiter vorhandenen Ionen dazurechnet, erhält man im Falle der Locustenmitochondrien eine Osmolarität von 277 mosmolar, im Falle der Rattenlebermitochondrien eine solche von 235 mosmolar. Abb. 3 zeigt das Verhalten, wenn - wie hier bei Locustenmitochondrien - Sucrose zur Erzeugung von Isotonie verwendet wurde.

In beiden Fällen erweist sich, daß eher ein hypotones Medium für den Einbau günstig ist. Dafür scheint die mit leichter Schwellung verbundene höhere Permeabilität der Membranen verantwortlich zu sein. Wesentlicher Grund für den starken

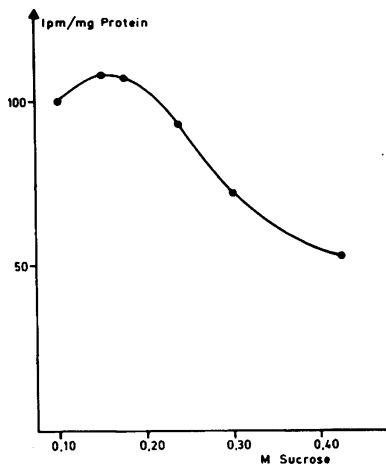


Abb. 3. Abhängigkeit der Einbaurate von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in isolierte Locustenmitochondrien von der Sucrosekonzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

---

Abfall der Einbauaktivität nach höheren Konzentrationen im Falle des Kaliumchlorids, der bei Verwendung von Sucrose nicht zu beobachten ist, dürfte sein, daß durch die erhöhte Ionenstärke des Mediums eine Zerstörung der Struktur der mitochondrialen Membranen stattfindet, die eine Eröffnung des Matrixraums zur Folge hat. Ein Vergleich der Einbauraten bei jeweils optimaler KCl- bzw. Sucrosekonzentration und gleichen Einbaubedingungen zeigt nur geringe Unterschiede.

### 3.1.2. pH-Abhängigkeit des Einbaus

Als wesentlich für die Erzielung optimalen Einbaus erwies sich das pH des Incubationsmediums (Abb. 4 und Abb. 5). Sowohl bei Locusten- als auch bei Rattenlebermitochondrien fand sich eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Die Lage der

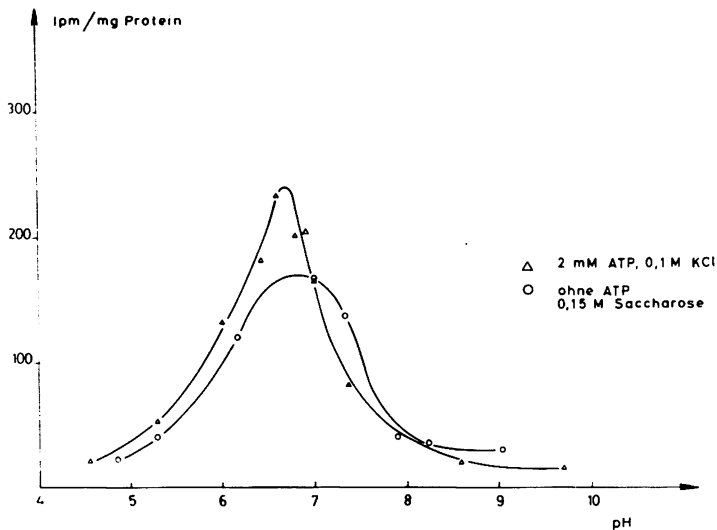


Abb. 4. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in Locustenmitochondrien vom pH des Incubationsmediums. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

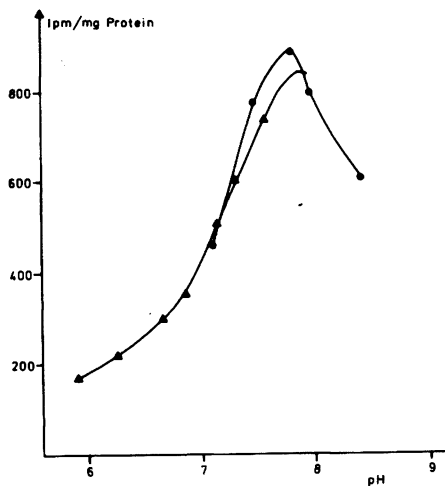


Abb. 5. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in Rattenlebermitochondrien vom pH des Incubationsmediums. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Optima ist jedoch in den beiden Fällen um eine pH-Einheit verschieden.

### 3.1.3. Bedarf an Aminosäuren

Wenn der gemessene Einbau einer einzigen Aminosäure tatsächlich die Neusynthese von Peptidketten repräsentiert, sollte dieser Einbau von der Anwesenheit der anderen benötigten Aminosäuren abhängig sein. Frisch isolierte Rattenlebermitochondrien enthalten freie Aminosäuren. Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren sind in Tab. 1 aufgezeichnet (siehe auch [38]). Werden diese Mitochondrien bei 32°C incubiert, so erfolgt eine Freisetzung von Aminosäuren (Tab. 1), die in ihrem Ausmaß von einer Aminosäure zur anderen variiert.

Incub. Zeit [min]	0	30	60
ala	0.44	0.38	0.52
arg	0.0	0.0	0.0
asp	0.43	0.93	1.63
cys-SH	0.0	0.0	0.0
glu	0.72	2.04	1.48
gly	0.79	2.24	3.06
his	0.69	0.41	1.06
ileu	0.0	0.71	0.78
leu	0.49	1.17	1.41
lys	0.44	0.95	1.49
met	0.0	0.0	0.0
pro	0.0	0.0	0.0
ser	0.45	0.51	0.40
threo	0.24	0.71	0.84
try	0.0	0.05	0.12
val	0.44	0.94	1.24

Tab. 1. Gehalt an freien Aminosäuren von frisch isolierten Rattenlebermitochondrien und nach Incubationszeiten von 30 und 60 min. bei 32°C. ( $\mu\text{Mol}$  Aminosäure/mg Protein) (Versuchsbedingungen siehe 4.6.4.)

Wie jedoch Abb. 6 und Abb. 7 veranschaulichen, reichen diese Mengen bei weitem nicht aus, um den Einbau der zugesetzten radioaktiven Aminosäure mit optimaler Geschwindigkeit zu erlauben.

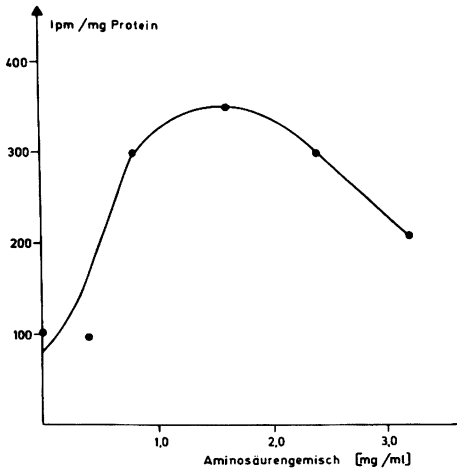


Abb. 6. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in Locustenmitochondrien von der Aminosäurenkonzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

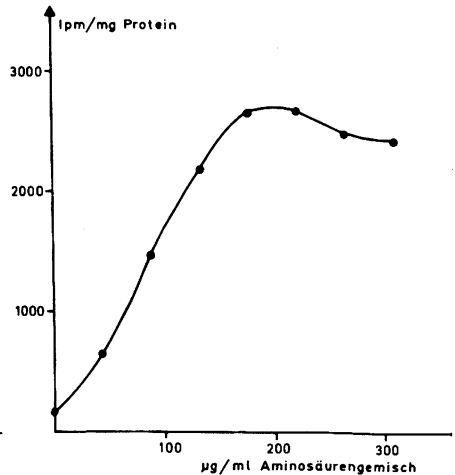


Abb. 7. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in Rattenlebermitochondrien von der Aminosäurenkonzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

---

Durch Zugabe von Aminosäurengemischen, deren Zusammensetzung in Tab. 2 wiedergegeben ist, konnte sowohl für Locusten- als auch für Rattenlebermitochondrien eine beträchtliche Steigerung des Einbaus erzielt werden. Bei einer relativ hohen Konzentration liegt dabei das Optimum für Locustenmitochondrien. Dies mag einen physiologischen Sachverhalt widerspiegeln, da sich im Flugmuskel von *Locusta* eine ungewöhnlich hohe Konzentration von freien Aminosäuren findet [39], die nahe bei der Optimalkonzentration des in vitro Einbaus liegt (1.6 mg/ml). Die Konzentrationen der freien Aminosäuren in der Rattenleber liegen ähnlich wie in dem gezeigten in vitro Versuch wesentlich niedriger [40].

	ASG <sub>L</sub>	ASG <sub>R</sub>		ASG <sub>L</sub>	ASG <sub>R</sub>
ala	1.0	1.0	lys	0.5	0.75
arg	0.125	0.5	met	0.5	0.25
asp	0.5	0.75	phe	0.125	0.5
asp NH <sub>2</sub>	0.25	0.35	pro	0.25	0.25
cys	0.25	0.25	opro	0.0	0.05
glu	1.0	0.75	ser	0.75	0.5
glu NH <sub>2</sub>	0.75	0.35	threo	0.5	0.5
gly	1.0	0.75	try	0.125	0.25
his	0.25	0.25	tyr	0.25	0.25
leu	0.375	0.5	val	0.5	0.5
ileu	0.375	0.5			

Tab. 2. Zusammensetzung der Aminosäurengemische zur Incubation von Locustenmitochondrien (ASG<sub>L</sub>) und Rattenlebermitochondrien (ASG<sub>R</sub>). Die Zahlen geben die molaren Verhältnisse an. Die Zusammenstellung der Gemische erfolgte in Anlehnung an [41].

Genaueren Einblick in die Bedürfnisse des Systems sollte eine Untersuchung der Wirkungen der einzelnen Aminosäuren auf den Einbau radioaktiver Aminosäuren in isolierte Rattenlebermitochondrien gewähren. Diese Versuche wurden jeweils für zwei verschiedene radioaktive Aminosäuren - <sup>14</sup>C-Leucin und -Prolin - durchgeführt (Tab. 3 und Tab. 4). Dabei wurde diejenige Einbaurrate, die erzielt wurde, wenn jeweils die angezeigte Aminosäure aus dem Gemisch weggelassen wurde, in % derjenigen ausgedrückt, die bei Anwesenheit des vollständigen Aminosäurengemisches erhalten wurde. Die radioaktive Aminosäure, deren Einbau gemessen wurde, war nicht im Aminosäurengemisch vertreten

Es stellte sich heraus, daß nur bei Weglassen einiger Aminosäuren (Alanin, Prolin bzw. Leucin, Methionin, Serin Valin) ein beträchtliches Absinken der Einbaurrate zu beobachten ist, während das Weglassen der Mehrzahl der Aminosäuren keine Wirkung verursachte, und zwar sowohl wenn der Einbau von markiertem Leucin als auch von markiertem Prolin verfolgt wurde. Die Effekte waren größer, wenn Leucin radioaktiv eingesetzt wurde.



	30 min	60 min		30 min	60 min
ala	24.2	27.3	lys	125.8	91.6
arg	90.9	87.8	met	47.6	28.6
asp	103.6	97.5	phe	111.3	100.1
asp NH <sub>2</sub>	91.8	95.2	pro	13.9	17.4
cys	97.2	96.4	opro	110.9	86.4
glu	111.8	122.8	ser	36.3	19.7
glu NH <sub>2</sub>	107.4	100.0	threo	111.7	95.7
gly	113.9	92.2	try	90.0	95.4
his	104.3	100.1	tyr	130.4	100.6
leu	----	----	val	51.5	64.4
ileu	83.7	81.7			

Tab. 3. Abhängigkeit des Einbaus von 14-C-Leucin in isolierte Rattenlebermitochondrien von der Anwesenheit der einzelnen Aminosäuren im Incubationsmedium. Diejenige Einbaurrate, die nach 30 bzw. 60 min mit dem vollständigen Aminosäurengemisch erzielt wurde, wurde zu 100% gesetzt. Die Zahlen in der Tabelle geben in % diejenige Einbaurrate an, die sich bei Weglassen der jeweiligen angezeigten Aminosäure ergab. Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.

	30 min	60 min		30 min	60 min
ala	56	52	lys	110	117
arg	110	113	met	73	85
asp	106	120	phe	102	120
asp NH <sub>2</sub>	81	101	pro	---	---
cys	110	99	opro	105	104
glu	104	117	ser	56	46
glu NH <sub>2</sub>	108	129	threo	119	96
gly	102	111	try	102	110
his	107	101	tyr	105	103
leu	57	66	val	58	64
ileu	102	112			

Tab.4. Abhängigkeit des Einbaus von 14-C-Prolin in isolierte Rattenlebermitochondrien von der Anwesenheit der einzelnen Aminosäuren im Incubationsmedium. Darstellung der Werte wie in Tab. 3. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Wie Abb. 8 und Abb. 9 zeigen, beobachtet man Sättigungskurven, wenn man die für den Einbau von  $^{14}\text{-C}$ -Leucin "essentiellen" Aminosäuren in steigenden Konzentrationen substituiert.

Abb. 8 stellt die Abhängigkeit der Einbaurrate des Leucins von der Alaninkonzentration dar. Ein analoges Experiment, bei dem Prolin aus dem Aminosäuregemisch fortgelassen bzw. in steigenden Konzentrationen zugesetzt wurde, zeigt Kurve 1 in Abb. 9. Auf dieser Grundlage vermittelt Kurve 2 in Abb. 9 eine recht interessante Information. Hier ist nämlich der Einbau von Prolin in Gegenwart von Leucin in seiner Abhängigkeit von der Konzentration des Prolins dargestellt worden.

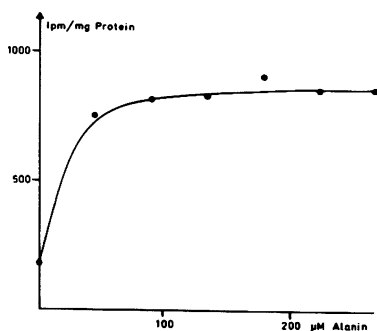


Abb. 8. Abhängigkeit der Einbaurrate von  $^{14}\text{-C}$ -Leucin von der Alaninkonzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

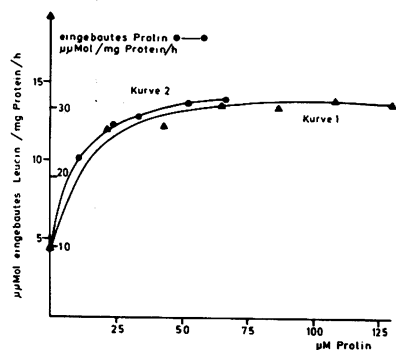


Abb. 9. Kurve 1: Abhängigkeit der Einbaurrate von  $^{14}\text{-C}$ -Leucin von der Prolinkonzentration. Kurve 2: Abhängigkeit der Menge des eingebauten Prolins von der Prolinkonzentration. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Abb. 10 erläutert das Verfahren: Bei gleichbleibender Dosis von  $^{14}\text{-C}$ -Prolin wurde steigend inaktives Prolin zugesetzt, so daß die Gesamtkonzentration an Prolin variierte. Aus den in Abb. 10 dargestellten Meßwerten und der jeweiligen spezifischen

Aktivität der Aminosäure im Incubationsmedium errechnen sich die in Kurve 2 Abb. 9 dargestellten Werte.

Man erkennt, daß die Abhängigkeit des Leucineinbaus (Kurve 1) und die Abhängigkeit des Prolineinbaus (Kurve 2) von der Konzentration des Prolins durch Kurven ähnlicher Gestalt dargestellt werden. Man kann daraus schließen, daß Leucin und Prolin in einem bestimmten Verhältnis zueinander eingebaut werden, das bei verschiedenen Prolinkonzentrationen im Medium konstant ist.

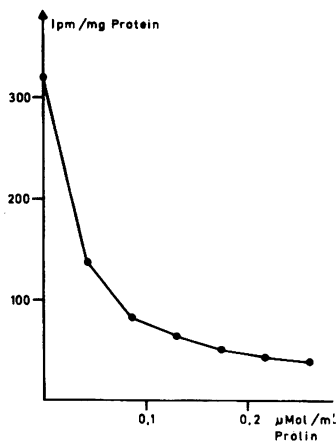


Abb. 10 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von Rattenlebermitochondrien von der spezifischen Aktivität des zugesetzten Prolins. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

---

Eine quantitative Angabe hinsichtlich dieses Verhältnisses kann allerdings auf Grund dieser Experimente nicht gemacht werden. Erstens liegt im Experiment zur Kurve 1 Abb. 9 die Leucinkonzentration nicht im Sättigungsbereich ( $1.3 \mu\text{M}$  zugegebenes Leucin) im Gegensatz zur Kurve 2 Abb. 9 ( $70 \mu\text{M}$  zugegebenes Leucin). Zweitens muß angenommen werden, daß die zugegebenen Prolinkonzentrationen in Abb. 10 bzw. Abb. 9 Kurve nicht die aktuellen Prolinkonzentrationen im Medium im Verlauf der Incubation repräsentieren. Rattenlebermitochondrien

enthalten eine genügend hohe Aktivität an Prolinoxidase um Konzentrationen von Prolin im Sättigungsbereich der Kurven in Abb. 9 im Verlauf der Incubation erniedrigen zu können [42].

Quantitative Angaben über den Einbau einiger weiterer verschiedener Aminosäuren enthält Tab. 5, und zwar sowohl für Rattenleber- als auch für Locustenmitochondrien. Es fällt auf, daß besonders die Incubation mit den Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure verglichen mit Leucin und Isoleucin eine sehr niedrige spezifische Radioaktivität des Mitochondrienproteins zur Folge hat. Möglicherweise werden diese Aminosäuren viel schneller metabolisiert als in Protein eingebaut. Zur Berechnung der Mengen der eingebauten Aminosäuren wurden deshalb nur die Aminosäuren Leucin und Isoleucin herangezogen, die dieser starken Metabolisierung nicht unterliegen.

	$\mu\text{c}$ eingebaute Radioaktivität/mg Protein/h bei $1\mu\text{c/ml}$ Incub. Med.		$\mu\text{Mol}$ eingebaute Aminosäure/mg Protein/h im Sättigungsbereich der betreffenden Aminosäure.
	Rattenlebermitochondrien	Locustenmitochondrien	Rattenlebermitochondrien Locustenmitochondrien
leu	9.7	3.1	29.1
ileu	8.2	8.9	31.8 160
phe	9.3		
pro	2.3	0.2	
ser	2.2		
arg	1.4		
asp	0.2	0.5	
glu	0.08		

Tab. 5. Einbau von verschiedenen  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in isolierte Rattenleber- und Locustenmitochondrien. Die angegebenen Zahlen stellen Mittelwerte dar. Zugrunde gelegt wurden Messungen im optimalen Incubationsmedium und unter Berücksichtigung der initialen Synthesegeschwindigkeit. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Die Tab. 5 gibt die unter Sättigungsbedingungen und unter Berücksichtigung der initialen Synthesegeschwindigkeit ermittelten Werte wieder. Die Werte für den Leucin- und Isoleucineinbau in Rattenlebermitochondrien wurden unter identischen Bedingungen ermittelt, so daß man schließen darf, daß Leucin und Isoleucin etwa in gleichem Verhältnis eingebaut werden. Bemerkenswert ist ferner die beträchtlich höhere Synthesegeschwindigkeit in den Locustenmitochondrien, die, wie später gezeigt wird (Abschnitt 3.4.1.), vom Entwicklungszustand der Mitochondrien abhängt.

Laut Tab. 5 werden auch solche Aminosäuren eingebaut, deren Anwesenheit im Incubationsmedium den Einbau nicht stimuliert. Die Klärung dieser Effekte in dem außerordentlich komplexen System ganzer Mitochondrien, hat zumindest die folgenden, sich möglicherweise überschneidenden, größtenteils unbekannt Parameter zu berücksichtigen: Die Nutzung der zugegebenen Aminosäuren als Substrate der Atmungskette, verschiedene Permeabilitäten der verschiedenen Aminosäuren für die mitochondrialen Membranen und verschiedene Michaeliskonstanten für die einzelnen mitochondrialen Aminoacyl-RNA-Synthetasen.

#### 3.1.4. Zeitabhängigkeit des Einbaus

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung des physiologischen Charakters des Einbauprozesses stellt die Einbaukinetik dar. Unspezifische Adsorption sollte keine Zeitabhängigkeit zeigen. In Abb. 11 und Abb. 12 sind typische Einbaukurven für Locusten- und Rattenlebermitochondrien dargestellt.

Der Einbau in Locustenmitochondrien ist dadurch gekennzeichnet, daß seine Geschwindigkeit innerhalb einer Stunde auf etwa  $\frac{1}{3}$  absinkt. Bei Rattenlebermitochondrien beobachtet man ein anderes Verhalten: Die Einbaukinetik durchläuft ein Maximum, das je nach Präparation bei 60 bis 120 min liegen kann. Offensichtlich findet gleichzeitig mit der Synthese ein Abbau des radioaktiv markierten Proteins statt, der ab den genannten Zeiten überwiegt. Verantwortlich dafür dürften die in der Leber vorhandenen Lysosomen sein, die unter den üblichen Präparationsbedingungen in die Mitochondrienfraktion gelangen. Auch das Vorkommen von proteolytischen Enzymen in Mitochon-

drien wird diskutiert [43]. Deren Nachweis ist jedoch sehr schwierig zu erbringen, da eine saubere Abtrennung der Lysosomen aus einer Mitochondrienpräparation der Rattenleber gegenwärtig nicht möglich erscheint. Außerdem muß man eine unspezifische Adsorption von proteolytischen Enzymen an den mitochondrialen Membranen in Betracht ziehen. Dieser in gleicher Weise von WHEELDON et al. [44] beobachtete Zerfall des markierten mitochondrialen Proteins ist von diesen Autoren näher untersucht worden und das Auftreten von radioaktiven sauren Peptiden nachgewiesen worden.

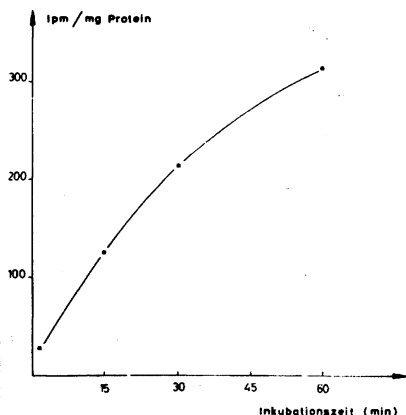


Abb. 11. Zeitabhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in Locustenmitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

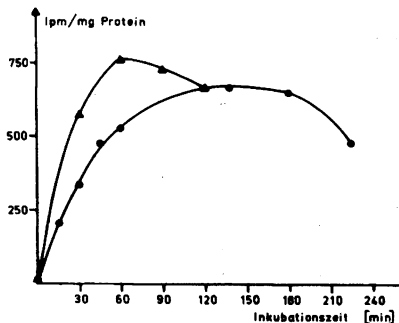


Abb. 12. Zeitabhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in Rattenlebermitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

### 3.1.5. Abhängigkeit des Einbaus von der $\text{Mg}^{++}$ Konzentration

Von den bereits gut untersuchten Einzelreaktionen der Proteinbiosynthese in cytoplasmatischen Systemen ist bekannt, daß  $\text{Mg}^{++}$  zur Aktivierung der DNA abhängigen RNA-Polymerase, der Aminoacyl-RNA-Synthetasen sowie für die Intakthaltung der Ribosomenstruktur notwendig ist. Weiterhin kann  $\text{Mg}^{++}$  indirekt

über die Energieversorgung den Einbau beeinflussen, da es eine wichtige Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung spielt. Insbesondere wird bei hohen  $Mg^{++}$  Konzentrationen eine ATPase induziert (siehe auch Abschnitt 3.1.7.). Sowohl im Falle der Locustenmitochondrien als auch bei den Rattenlebermitochondrien ergab sich eine starke Stimulierung des Einbaus durch Zusatz von  $Mg^{++}$  zum Incubationsmedium (Abb. 13 und Abb. 14).

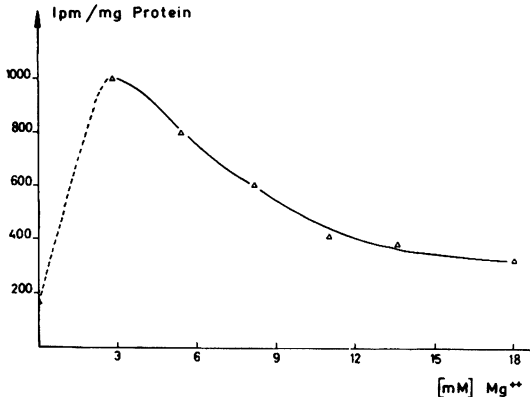


Abb. 13. Abhängigkeit des Einbaus von 14-C-Isoleucin in isolierte Locustenmitochondrien von der  $Mg^{++}$  Konzentration im Incubationsmedium. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

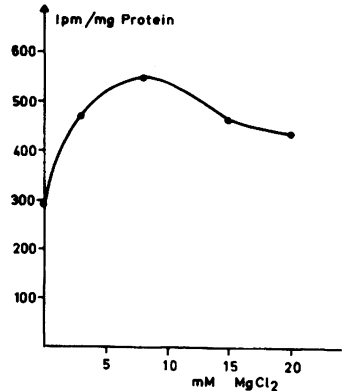


Abb. 14. Abhängigkeit Einbaus von 14-C-Leuci in isolierte Rattenlebermitochondrien von der  $Mg^{++}$  Konzentration im Incubationsmedium. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

### 3.1.6. Abhängigkeit des Einbaus von der Phosphationenkonzentration

Auch Phosphationen vermögen den Einbau zu stimulieren. Dabei beobachtet man eine wesentlich stärkere Erhöhung des Einbaus bei Rattenlebermitochondrien als bei Locustenmitochondrien (Abb. 15 und Abb. 16). Einerseits mag die Bedeutung der zugegebenen Phosphationen in der Unterstützung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien liegen. Andererseits deutet der starke Effekt und die relativ hohe Konzentration für das Optimum bei Rattenlebermitochondrien (15 mM) darauf hin, daß die Phosphationen, die bekanntlich Schwellung von Mitochon-

drien verursachen [45], über eine Änderung der Permeabilität der mitochondrialen Membranen Einfluß auf die Einbaurrate ausüben.

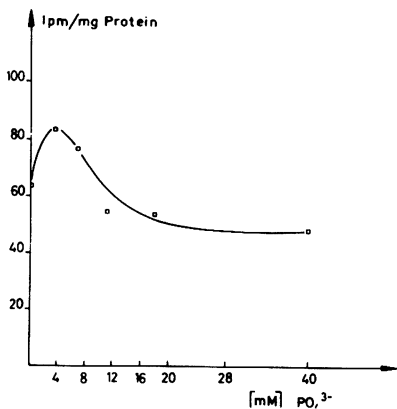


Abb. 15. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in isolierte Locustenmitochondrien von der Phosphatkonzentration im Incubationsmedium. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

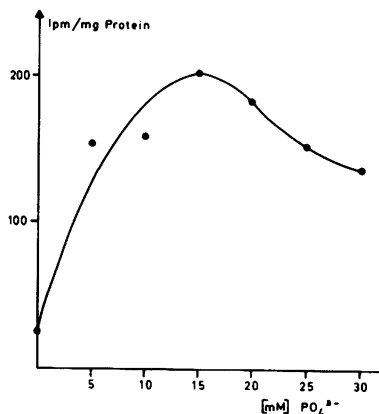


Abb. 16. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in isolierte Rattenlebermitochondrien von der Phosphatkonzentration im Incubationsmedium. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

### 3.1.7. Bereitstellung der Energie für den Einbau

In welcher Form und auf welchem Wege wird die Energie für den Einbauprozess bereitgestellt?

Am übersichtlichsten erschien es zunächst, diese Energie durch Zugabe von ATP zum Incubationsmedium von außen zur Verfügung zu stellen. Abb. 17 und Abb. 18 zeigen das Resultat dieses Versuches für Locusten- und Rattenlebermitochondrien. In beiden Fällen haben geeignete Konzentrationen von ATP eine Steigerung zur Folge, die in den gezeigten Experimenten bei Locustenmitochondrien einen Faktor von 5 und bei Rattenlebermitochondrien einen Faktor von 3.5 ausmacht.

Ist nun diese Wirkung des zugesetzten ATP eine direkte? Das heißt, wird dieses zugegebene ATP für die verschiedenen energieverbrauchenden Reaktionen, die die Proteinsynthese einschließt, benützt?



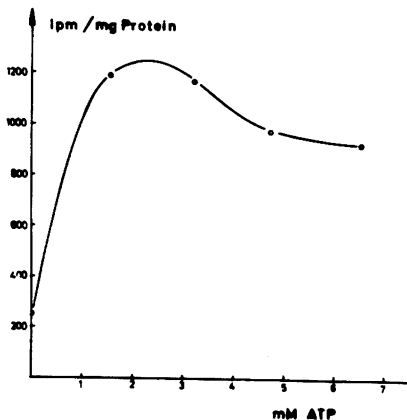


Abb. 17. Wirkung von ATP auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in Locustenmitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

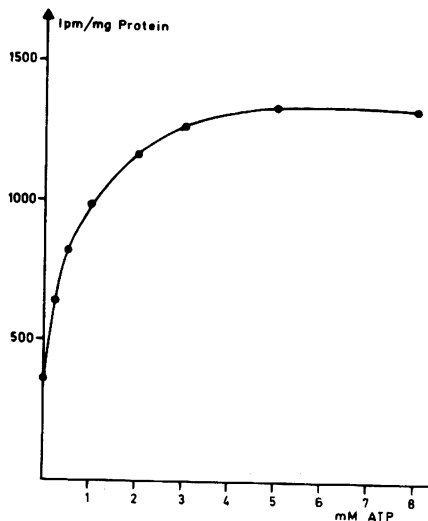


Abb. 18. Wirkung von ATP auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin in Rattenlebermitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Einerseits ist bekannt, daß exogenes ATP in Mitochondrien eindringen kann [46], andererseits hat man damit zu rechnen, daß exogenes ATP nicht als solches in die Mitochondrien gelangt, sondern nach Hydrolyse, etwa durch mitochondriale ATPase und durch die mitochondriale Adenylatkinase als ADP in die Mitochondrien aufgenommen wird und erst dort wieder phosphoryliert wird. Bei Gültigkeit dieser Annahme sollte zugesetztes ADP zugesetztes ATP ersetzen können. Abb. 19 und Abb. 20 zeigen nun für Locusten- und Rattenlebermitochondrien, daß ADP etwa die gleiche stimulierende Wirkung auf den Einbau hat, wie zugefügtes ATP.

Die in den Abb. 17-20 gezeigten Daten werfen die Frage auf, ob nur endogen erzeugtes ATP den Einbau antreiben kann, oder auch ATP exogener Natur.

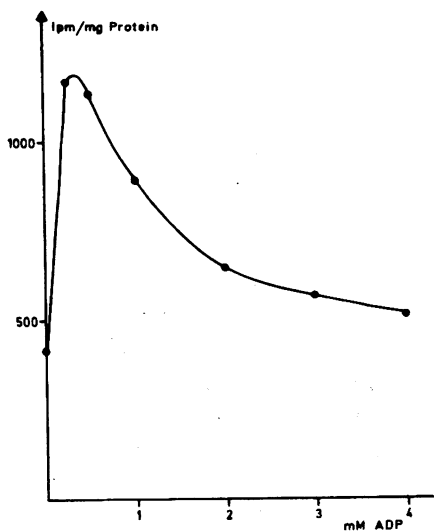


Abb. 19. Wirkung von ADP auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in isolierte Locustenmitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

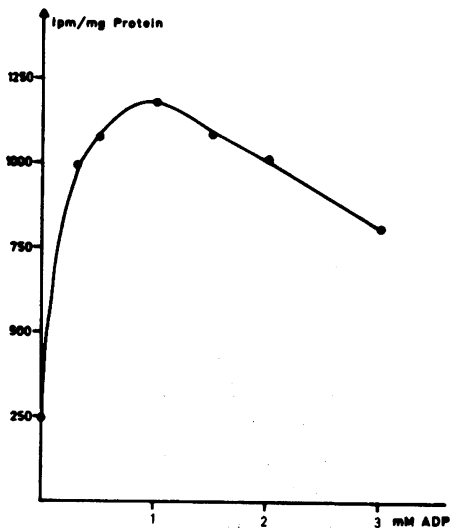


Abb. 20. Wirkung von ADP auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in isolierte Rattenlebermitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Experimente mit Hemmern der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung erlauben eine Differenzierung dieses Problems (Tab. 6). Eine Gegenüberstellung des Verhaltens der durch Atmung und der durch exogenes ATP angetriebenen Systeme ergibt folgendes Bild:

- 1) In Übereinstimmung mit der Annahme, daß endogenes ATP in der Lage ist, den Einbau anzutreiben, beobachtet man eine Hemmung des von ADP stimulierten Einbaus durch die Blocker der Atmungskette KCN und Amytal, den Entkoppler DNP und den Inhibitor der phosphorylierenden Atmung Oligomycin. Die Wirkung dieser Substanzen ist sowohl für Rattenleber- als auch für Locustenmitochondrien - wenn auch in verschiedenem Ausmaß - in gleicher Weise festzustellen (Tab. 6/2).

2) Betrachtet man den Einfluß dieser Hemmer auf den ATP getriebenen Einbau, so ergibt sich ein komplizierteres Bild, wobei sich auch noch Rattenleber- und Locustenmitochondrien unterscheiden (Tab. 6/3).

- a) Rattenlebermitochondrien: Auch der ATP getriebene Einbau kann durch KCN, Amytal und Oligomycin gehemmt werden, allerdings zu einem geringeren Ausmaß als der ADP stimulierte Einbau. Daraus läßt sich schließen, daß zumindest ein Teil der ATP-Stimulierung nicht auf einer direkten Verwendung des exogenen ATP beruht, sondern daß dieses durch ATPasen und durch die in den Rattenlebermitochondrien vorhandene Adenylat-Kinase zu ADP hydrolysiert wird, das in die Mitochondrien gelangt, und das, wie in Abb. 19 gezeigt, bei einer wesentlich niedrigeren Konzentration als ATP optimal den Einbau stimuliert. Die Wirkung von DNP ist in diesem Fall nicht eindeutig, da es nicht nur entkoppelt, sondern auch die mitochondriale ATPase stimuliert. Die weniger als halb so große Wirksamkeit der drei übrigen Hemmer im ATP-unterstützten System verglichen mit dem ADP-unterstützten System legt die Vermutung nahe, daß ein Teil des exogenen ATP in die Mitochondrien eindringt und als solches bei den verschiedenen ATP erfordernden Reaktionen der Proteinbiosynthese Verwendung findet.
- b) Locustenmitochondrien: Auch in diesen Mitochondrien wird der ATP-unterstützte Einbau von KCN, Amytal und Oligomycin gehemmt. Aber in diesem Fall geschieht dies zum innerhalb der Meßfehlergrenzen gleichen Ausmaß wie bei dem ADP-unterstützten Einbau. Dadurch wird die Vermutung nahe gelegt, daß die ATP-Stimulierung bei den Locustenmitochondrien tatsächlich auf einer ADP-Stimulierung beruht. Diese Vermutung wird durch folgende Beobachtungen stark unterstützt: Insektenflugmuskelmitochondrien besitzen eine sehr hohe ATPase Aktivität, die durch  $Mg^{++}$  Ionen drastisch erhöht wird [47]. Es läßt sich abschätzen, daß diese  $Mg^{++}$  stimulierte ATPase bei weitem ausreicht, um soviel ADP zu erzeugen, daß dieses den Einbau in seiner optimalen Konzentration antreiben kann. Genügend  $Mg^{++}$  Ionen sind zu dieser Stimulierung der ATPase im Incubationsmedium anwesend. Die vergleichs-

weise viel höhere Stimulierung des Einbaus durch  $Mg^{++}$  Ionen im Falle der Locustenmitochondrien gegenüber den Rattenlebermitochondrien mag auf dem gleichen Effekt beruhen.

- 3) Von Interesse sind weiterhin die Wirkungen einerseits eines ATP regenerierenden Systems und andererseits eines ATP beseitigenden Systems (Tab. 6/4). In Rattenlebermitochondrien verändert der Zusatz von Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase zum ATP getriebenen System die Einbaurrate nicht, während bei Locustenmitochondrien eine empfindliche Hemmung zu beobachten ist. Nach den vorausgehenden Daten wäre dies so zu interpretieren, daß das ATP regenerierende System bei den Rattenlebermitochondrien Bedingungen schafft, bei denen mehr ATP zur Verfügung steht und in die Mitochondrien eindringt, um den Einbau direkt anzutreiben. Bei den Locustenmitochondrien, in denen der Einbau nach den oben beschriebenen Experimenten allein über die Atmungskette getrieben wird, beseitigt offensichtlich das ATP regenerierende System das durch die ATPase entstandene ADP und hemmt den Einbau beträchtlich.

Die Glucose/Hexokinase Falle hemmt, wie man nach den vorausgegangenen Befunden erwarten sollte, sehr stark den Einbau in Rattenlebermitochondrien. Der ebenfalls sehr stark hemmende Einfluß auf Locustenmitochondrien ist nicht einfach zu deuten. Nach Abb. 19 ist zu vermuten, daß die entstehenden hohen ADP Konzentrationen einen stark hemmenden Effekt auf den Einbau ausüben.

- 4) Wie aus Tab. 6/4 ersichtlich ist, vermag auch AMP den Einbau zu stimulieren. Dieser Effekt ist bei den Rattenlebermitochondrien stärker als bei den Locustenmitochondrien. Dies läßt sich damit erklären, daß die Rattenlebermitochondrien eine höhere Adenylatkinaseaktivität besitzen, als die Locustenmitochondrien [48].
- 5) Weiterhin hat der Zusatz der anderen drei Nucleosidtriphosphate GTP, UTP und CTP auf Rattenleber- und Locustenmitochondrien einen unterschiedlichen Einfluß (Tab. 6/4). Während die ersten beiden Nucleosidtriphosphate in Ratten-

Zugabe	Rattenleber- mitochondrien (Ipm/mg Protein)		Locusten- mitochondrien (Ipm/mg Protein)	
		% Hemmung		% Hemmung
1) -----	756		389	
2) +ADP (2mM)	1740	-----	696	----
+KCN (4mM)	321	81.6	235	66.2
+DNP (0.2mM)	836	52.0	205	70.6
+Amytal (5mM)	417	76.0	510	26.8
+Oligomycin (4µg/ml)	569	67.3	441	36.6
3) +ATP (2mM)	1482	----	1074	----
+KCN (4mM)	885	40.4	306	71.6
+DNP (0.2mM)	615	68.5	111	89.7
+Amytal (5mM)	1269	14.5	765	28.8
+Oligomycin (4µg/ml)	1000	32.5	629	41.5
4) +ATP (2mM)				
+PEP (12.5mM)	1472		278	
+PK (0.1mg/ml)				
+ATP (2mM)				
+Glukose (20mM)	340		133	
+HK (0.2mg/ml)				
+AMP (2mM)	1463		588	
+GTP (1mM)	834		256	
+CTP (1mM)	787		396	
+UTP (1mM)	960		152	
5) +ADP (2mM)				
+αGP (5mM)	1088	37.5	505	27.5
+Pyruvat/Malat (5/2.5mM)	1122	35.4	268	61.5
+αKG	1145	34.1	676	3.0

Tab. 6. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{-C}$ -Isoleucin in Locustenmitochondrien und  $^{14}\text{-C}$ -Leucin in Rattenlebermitochondrien von endogener und exogener Energieversorgung.

(Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

lebermitochondrien den Einbau leicht stimulieren, möglicherweise durch die Wirkung der Nucleosiddiphosphatkinase, üben sie bei den Locustenmitochondrien eine Hemmung auf den Einbau aus. Eine Erklärung dieses Effektes erscheint auf der Basis der vorliegenden Experimente nicht möglich.

- 6) Welche Rolle spielt die Versorgung mit Substraten der Atmungskette auf den ADP stimulierten Einbau? Aus Tab. 6/5 kann man entnehmen, daß bei den Rattenlebermitochondrien der Zusatz von  $\alpha$ -Glycerophosphat, Pyruvat/Malat und  $\alpha$ -Ketoglutarat den Einbau durchschnittlich um  $1/3$  hemmt, bei den Locustenmitochondrien nur die beiden ersten Substrate.  $\alpha$ -Ketoglutarat, das bekanntlich nicht in Insektenflugmuskelmithochondrien eindringen kann, zeigt keinen Effekt. Anscheinend besitzen die Mitochondrien noch genügend endogenes Substrat, um die Energieversorgung zu gewährleisten. Zu einer Interpretation des Hemmeffektes siehe [49].

### 3.2. Einfluß von Hemmsubstanzen der cytoplasmatisch-ribosomalen Proteinsynthese auf den Einbau

Bereits wiederholt wurde der Einbau von Aminosäuren in isolierte Mitochondrien mit dem cytoplasmatisch-ribosomalen System verglichen. Eine weitere Möglichkeit, nach Parallelen im Mechanismus beider Systeme zu suchen, ist die Anwendung von Hemmsubstanzen der cytoplasmatischen Proteinsynthese auf das mitochondriale System.

DNA abhängige cytoplasmatische Proteinsynthese wird durch Actinomycin gehemmt. Dies blockiert die Transskription der messenger-RNA und wegen deren kurzen Halbwertszeit stoppt die Proteinsynthese. In diesen Experimenten wurden zwei verschiedene Actinomycine verwendet: Actinomycin C und Actinomycin D. Dabei zeigte sich, daß das zweite unwirksam ist, das erste jedoch einen wirksamen Hemmer des Einbaus darstellt (Tab.7). Actinomycin C besteht aus mehreren Substanzen [50]. Die reine Komponente Actinomycin D kann offensichtlich nicht in die Mitochondrien eindringen, da es, wie von NEUBERT [51] gezeigt wurde, sehr wohl den Einbau in Digitoninsubpartikel aus Rattenlebermitochondrien hemmen kann.

	Locusten- mitochondrien	Rattenleber- mitochondrien
ohne Zusatz	100%	100%
+Actinomycin C (20µg/ml)	105%	6%
+Actinomycin D (20µg/ml)	95%	98%
+Puromycin (50µg/ml)	15%	9%
+Chloramphenicol (100µg/ml)		14%
	(500µg/ml)	45.5%

Tab. 7. Wirkung verschiedener Hemmer der cytoplasmatisch-ribosomalen Proteinsynthese auf den Einbau von <sup>14</sup>C-Aminosäuren in isolierte Locusten- und Rattenlebermitochondrien.

Ein weiterer interessanter Hemmer der cytoplasmatischen Proteinsynthese ist das Chloramphenicol, das allerdings nur in Bakterien die Proteinsynthese hemmt, während es in cytoplasmatischen Proteinsynthesystemen von höheren Organismen keinen Effekt zeigt [52]. Chloramphenicol wirkt auf der Basis der Ribosomen, blockiert also den Translationsschritt. Wie von MAGER [53] zum erstenmal gezeigt wurde, wird auch der mitochondriale Einbau von Aminosäuren durch Chloramphenicol gehemmt. Die Daten in Tab. 7 für Locusten- und Rattenlebermitochondrien stimmen damit überein. Dieses Verhalten des mitochondrialen Einbausystems legt eine Ähnlichkeit des Baus von mitochondrialen und bakteriellen Ribosomen nahe.

Ein Hemmer, dessen molekularer Wirkungsmechanismus recht genau bekannt ist, ist das Puromycin. Puromycin ist ein Aminoacyl-s-RNA Analoges, das im cytoplasmatisch-ribosomalen System die Folge der an den Ribosomen stattfindenden Peptidverknüpfung stoppt. Wie aus Tab. 7 zu ersehen ist, inhibiert Puromycin ganz drastisch den Einbau von Aminosäuren sowohl in Rattenleber- als auch in Locustenmitochondrien.

### 3.3. Abhängigkeit des Einbaus von der strukturellen Intaktheit der Mitochondrien

Voraussetzung für einen weiteren Einblick in den Mechanismus der mitochondrialen Proteinsynthese und weitere Versuche zum Vergleich mit dem cytoplasmatisch-ribosomalen Proteinbiosynthesystem ist die Zerlegung des außerordentlich komplexen Systems intakter Mitochondrien. Eine der gebräuchlichsten Methoden zur Erzeugung von Subpartikeln ist die Behandlung der Mitochondrien mit Ultraschall ("Sonifier"). Auf prinzipiell gleicher Wirkungsweise beruht der "Ultraturrax". Wie Abb. 21 zeigt, hat eine kurze Behandlung der Mitochondrien im Incubationsmedium nach beiden Methoden zur Folge, daß nahezu sämtliche Einbauaktivität in diesen zerstörten Mitochondrien verlorenght.

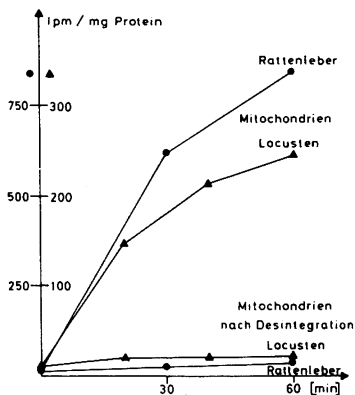


Abb. 21. Effekt der Behandlung von Rattenleber- und Locustenmitochondrien mit "Ultraturrax" bzw. "Sonifier" auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin bzw.  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Werden nun die resultierenden Fraktionen weiteruntersucht, incubiert man also den Überstand der 100,000xg Zentrifugation von derart behandelten Mitochondrien und andererseits das Sediment dieser Zentrifugation unter den üblichen Bedingungen, so findet man folgendes: Im Überstand läßt sich keinerlei Einbauaktivität feststellen. Dies ist angesichts der zähl-



reichen angedeuteten Analogien zum cytoplasmatisch-ribosomalen System, das ja partikelgebunden ist, auch zu erwarten. Bei der Incubation des Sedimentes beobachtet man einen im Ausmaß von Präparation zu Präparation variierenden exponentiellen Verlauf der Einbaukurve (Abb. 22). Offensichtlich entfalten unter diesen Bedingungen die in der Mitochondrienpräparation vorhandenen Bakterien eine hohe Syntheseaktivität. Dies wird durch die Hemmung des Einbaus in diesem besonderen Fall durch Antibiotika bestätigt. In der löslichen Fraktion der Mitochondrien befindet sich also ein Faktor, der das bakterielle Wachstum hemmt. Zu dem gleichen Ergebnis kam SIMPSON [54], der bei der Züchtung von Bakterien aus Rattenlebermitochondrien-suspensionen feststellte, daß das Wachstum der Kolonien durch einen in der Suspension befindlichen Faktor behindert wurde. Die Vermutung liegt nahe, daß die in den Mitochondrienpräparationen vorhandenen lysosomalen Enzyme den Vermehrungsprozess der Bakterien hemmen.

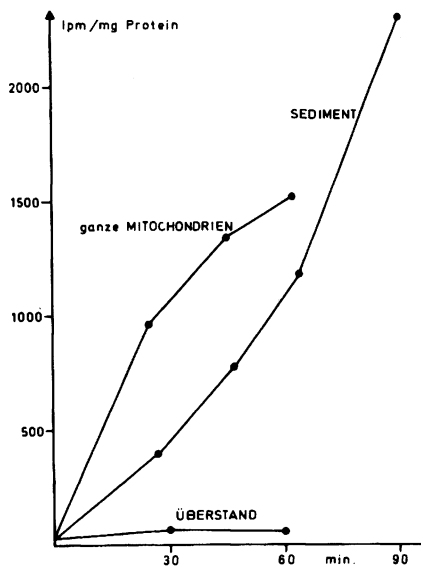


Abb. 22. Einbauaktivität von ganzen Rattenlebermitochondrien, Überstand und Sediment nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation für 20 min bei 100,000xg. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Der Verlust der Einbauaktivität in den zerstörten Mitochondrien kann auf die Eröffnung des inneren mitochondrialen Kompartiments und auf das folgende Ausfließen und die sich daraus ergebende Verdünnung von löslichen, in die Proteinsynthese involvierten Substanzen zurückgeführt werden. Diese kann mitochondriale s-RNA, etwaige m-RNA und die mitochondrialen Aminoacyl-s-RNA Synthetasen betreffen. Weiterhin ist zu vermuten, daß in der Mitochondriensuspension vorhandene RNAsen - wahrscheinlich lysosomalen Ursprungs - mitochondriale m-RNA und s-RNA zerstören.

Den gleichen Effekt wie mit Ultraschallbehandlung kann man bereits durch Einfrieren und Auftauen von Mitochondrien erreichen (Tab. 8). Die besonders empfindlichen Locustenmitochondrien reagieren in der gleichen Weise, wenn sie in einem hochkonzentrierten Sucrosegradienten zentrifugiert werden. Auch Enzyme, die die Membranstruktur zerstören, wie Phospholipase A, und Detergentien, wie Triton X 100, reduzieren drastisch die Fähigkeit zum Aminosäureeinbau (Tab. 8).

	Rattenleber- mitochondrien	Locusten- mitochondrien
	% Hemmung	
+ Phospholipase A (100µg/ml)	97	--
+Triton X 100 (0.1mg/ml)	82	96
Einfrieren	--	92
Dichtegradient	--	98

Tab. 8. Einfluß der Intaktheit der mitochondrialen Membranen auf den Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Aminosäuren in isolierte Locusten- und Rattenlebermitochondrien.

### 3.4. Untersuchungen zur Regulation des Einbaus

#### 3.4.1. Abhängigkeit der Einbauaktivität vom Entwicklungs- zustand der Mitochondrien

Zur Stützung der Annahme, daß es sich bei dem gemessenen in vitro Prozess um einen physiologischen Vorgang handelt, können Experimente dienen, die eine Korrelation zwischen der Einbauaktivität in vivo und in vitro aufzeigen. Ein besonders günstiger Modellfall sind dafür die Mitochondrien des Heuschreckenflugmuskels. Die Entwicklung dieses Muskels mit besonderer Hinsicht auf die Mitochondrien unter enzymatischem und morphologischem Aspekt wurde von BROSEMER et al. [8] studiert. Im Stadium der Imaginalhäutung der Heuschrecken beobachtet man eine außerordentlich starke Zunahme des Wachstums des Flugmuskels: Innerhalb von etwa 8 Tagen nimmt dessen Gewicht um etwa den Faktor 10 zu. Da sich gleichzeitig der Anteil der Mitochondrien am Flugmuskel vergrößert, vermehrt sich die gesamte mitochondriale Masse in diesem Zeitraum um etwa den Faktor 50.

Um das in vivo Verhalten der Proteinsyntheseaktivität zu untersuchen, wurde Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Imaginalhäutung radioaktives Isoleucin injiziert. Aus diesen Tieren wurden 24 h später die Mitochondrien isoliert und die spezifische Aktivität der mitochondrialen Proteine, die in "lösliches mitochondriales Protein" und "unlösliches mitochondriales Protein" aufgetrennt wurden, und des extramitochondrialen löslichen Proteins bestimmt. Wie man Abb. 23 entnehmen kann, sind alle drei Fraktionen etwa in gleichem Ausmaß markiert. Die spezifische Aktivität des löslichen und unlöslichen mitochondrialen Proteins fällt vom zweiten bis zum sechsten Tag nach der Imaginalhäutung um den Faktor 4-5.

Zur Untersuchung des in vitro Verhaltens wurde folgendermaßen vorgegangen: Von 100 Tieren, die sich alle in einem Zeitraum von 6 h gehäutet hatten, wurden an aufeinanderfolgenden Tagen aus jeweils 20 die Flugmuskelmitochondrien isoliert und in dem optimalen und standardisierten Einbausystem mit radioaktivem Isoleucin incubiert. Abb. 24 zeigt einen Abfall

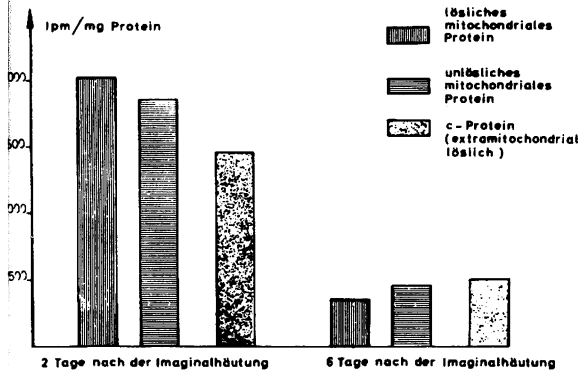


Abb. 23. Spezifische Aktivität von löslichem und unlöslichem mitochondrialem und löslichem extramitochondrialem Protein 24 h nach Injektion von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in Locusten. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

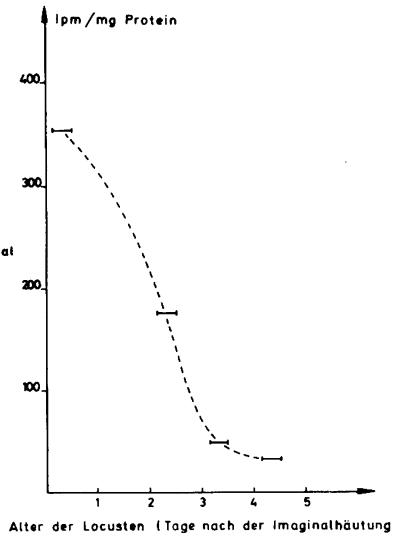


Abb. 24. Abhängigkeit der Einbaurrate von  $^{14}\text{C}$ -Isoleucin in isolierte Locustenmitochondrien aus Tieren verschiedenen Alters nach der Imaginalhäutung. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

der Einbauaktivität, der durchaus vergleichbar ist mit dem in vivo registrierten. Die Einbauaktivität von isolierten Mitochondrien ist offensichtlich keine zufällige Größe, sondern spiegelt das Verhalten der Mitochondrien in der Zelle wieder.

Folgende Beobachtung mag mit diesem Befund in Zusammenhang stehen: Der RNA-Gehalt isolierter Flugmuskelmitochondrien zeigt einen ähnlichen Abfall in dem betrachteten Zeitraum wie die Einbauaktivität für zugesetzte Aminosäuren, jedoch nicht in diesem Ausmaß (Abb. 25).

Für Rattenlebermitochondrien konnte keine Abhängigkeit der Einbauaktivität in vitro vom Alter, und zwar bei Tieren von 2 bis 12 Wochen, gefunden werden. Offensichtlich sind nicht

nur die Änderungen in der Proteinsyntheseaktivität, die auf Wachstum zurückzuführen sind, in diesem Zeitraum gering, sondern es ist auch wahrscheinlich, daß sich diese Änderungen in der Proteinsyntheseaktivität in der in vitro Einbauaktivität nicht ausdrücken, da sie sich im Vergleich zu dem schnellen Turnover der Mitochondrien nicht bemerkbar machen. ROODYN fand einen Faktor 2 beim Vergleich der in vitro Einbauraten in Lebermitochondrien von neugeborenen und erwachsenen Ratten [55].

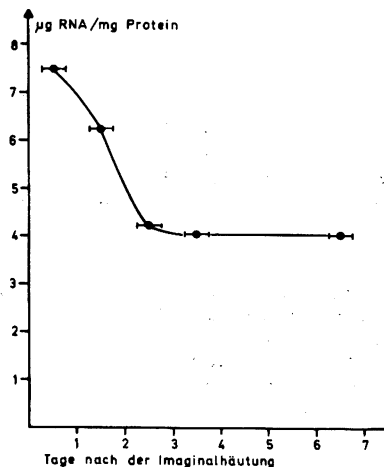


Abb. 25. RNA-Gehalt isolierter Flugmuskelmitochondrien aus Locusten an verschiedenen Tagen nach der Imaginalhäutung. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

### 3.4.2. Einbau in Mitochondrien aus hyperthyreoten Ratten

Eine andere Möglichkeit zur Auffindung von Korrelationen zwischen in vivo und in vitro Verfahren ist auch Vergleich von Mitochondrien aus Tieren verschiedenen endokrinen Status möglich. Dazu wurden Mitochondrien aus hyperthyreoten Ratten untersucht, da bekannt ist, daß in vivo unter diesen Bedingungen eine beträchtliche Zunahme mitochondrialer Enzymaktivitäten, insbesondere der Glycerophosphatoxidase, stattfindet [56]. Abb. 26 zeigt ein typisches in vitro Experiment, einen

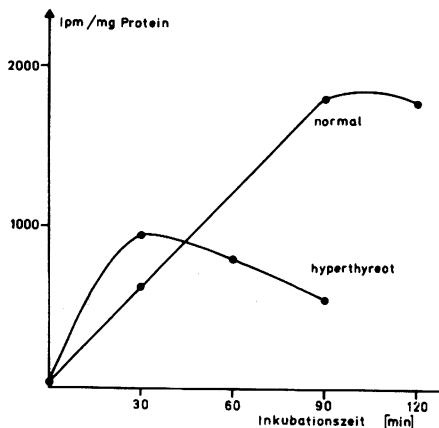


Abb. 26. Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in Rattenlebermitochondrien aus normalen und hyperthyreoten Tieren. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Vergleich des Einbaus von radioaktivem Leucin in Lebermitochondrien aus normalen und hyperthyreoten Tieren.

Durch zwei abweichende Eigenschaften vom Verhalten von Mitochondrien aus normalen Tieren sind die Mitochondrien aus hyperthyreoten Ratten gekennzeichnet. Die Anfangsgeschwindigkeit des Einbaus ist tatsächlich bei diesen Mitochondrien höher. Viel schneller und zu einem größeren Ausmaß macht sich aber dann der Zerfallsprozess des neusynthetisierten Proteins bemerkbar. Dieses Ergebnis ist recht gut in Übereinstimmung mit Befunden, die an Hand verschiedenster Parameter eine erhöhte Labilität der mitochondrialen Membranen aus hyperthyreoten Ratten deutlich machten [57]. Bei der hier beobachteten Reaktion kann sich dies dahingehend auswirken, daß die veränderten Membranen ein stärkeres Eindringen von proteolytischen Enzymen erlauben. Ob die anfänglich höhere Synthesegeschwindigkeit in den Mitochondrien aus hyperthyreoten Tieren tatsächlich der Ausdruck einer höheren in vivo Synthese ist, muß mit Vorsicht beurteilt werden. Sicherlich spielen auch hier die veränderten Permeabilitätsverhältnisse eine Rolle. Die gleichen Einschränkungen mögen

für die von ROODYN [58] veröffentlichten Experimente gelten, in denen er erhöhten Einbau von Aminosäuren in isolierte Lebermitochondrien aus hyperthyreoten Ratten fand.

### 3.5. Ausschluß von Fehlerquellen

#### 3.5.1. Nachweis des Einbaus in Peptidketten

Die zahlreichen hier aufgezeigten spezifischen Bedingungen des untersuchten Prozesses deuten mit großer Wahrscheinlichkeit darauf hin, daß es sich beim Einbau der Aminosäuren nicht um einen unspezifischen Vorgang handelt. Einerseits kann man aus den Unterschieden zum cytoplasmatisch-ribosomalen in vitro System schließen, daß wir ein eigenständiges System vor uns haben. Andererseits liefern die Ähnlichkeiten, und hier insbesondere das Verhalten gegenüber Hemmsubstanzen der cytoplasmatischen Proteinsynthese eine Menge indirekter Argumente, daß auch im mitochondrialen Einbausystem eine spezifische Verknüpfung von Aminosäuren zu Peptidketten stattfindet.

Zum direkten Nachweis, daß Leucin, und zwar als solches, in Protein eingebaut wird, wurde nach sorgfältiger Entfernung nichteingebauten Leucins, nach Hydrolyse etwaiger Leucyls-RNA-Ester durch heiße Trichloressigsäure und nach Extraktion der Phospholipide mit Aceton und Äthanol-Äther eine Hydrolyse der zurückbleibenden Proteine mit conc. HCl vorgenommen. In der zweidimensionalen Papierchromatographie des Hydrolysates fand sich die Radioaktivität an der Stelle, die dem Leucin entspricht.

Die Möglichkeit, daß es sich bei dem gemessenen Einbau um eine Anhängung der zugegebenen radioaktiven Aminosäure an das Ende von bereits existierenden Peptidketten handelt, kann durch eine Endgruppenbestimmung nach SANGER ausgeschlossen werden. Es zeigte sich, daß bei Rattenlebermitochondrien 0.25% und bei Locustenmitochondrien 0.2% der eingebauten Radioaktivität als Dinitrophenyl-Aminosäure extrahiert werden kann.

Der direkte Nachweis des Einbaus von Phenylalanin in das Innere von Peptidketten wurde von WINTERSBERGER [59] geführt. Er behandelte nach Einbau dieser Aminosäure in isolierte Hefe-

mitochondrien das resultierende Protein mit Chymotrypsin, daraufhin das Peptidgemisch mit Carboxypeptidase A und isolierte die freigesetzten Aminosäuren als Dinitrophenyl-Derivate, die 48% der gesamten eingebauten Radioaktivität enthielten.

Neben diesem unspezifischen Einbau haften der Beobachtung der mitochondrialen Proteinbiosynthese folgende zwei wesentliche Fehlerquellen an: Die Verunreinigung der Mitochondrienpräparationen durch Mikrosomen und durch Bakterien kann zum Einbau beitragen oder sogar mitochondrialen Einbau vortäuschen.

### 3.5.2. Ausschluß mikrosomaler Beteiligung am Einbau

Standardpräparationen von Mitochondrien, mit Hilfe differentieller Zentrifugation hergestellt, enthalten stets mikrosomale Verunreinigungen. Diese Kontamination kann dadurch niedrig gehalten werden, indem man das nach der ersten Abzentrifugation der Mitochondrien auf dem Sediment liegende "fluffy layer" durch vorsichtiges Suspendieren entfernt. Weiterhin kann bewirkt werden, daß nur ein geringer Teil der Ribosomen, die den mikrosomalen Membranen anhaften und so das "rauhe Retikulum" bilden, in die Mitochondrienfraktion gelangen. Man setzt dazu dem Isolierungsmedium Chelatbildner zu, wie EDTA, die das  $Mg^{++}$  komplexieren, das notwendig ist, um die Untereinheiten der Ribosomen zusammenzuhalten. Der RNA-Gehalt gereinigter Mitochondrien wird für Rattenleber in der Literatur zu 12-14  $\mu g/mg$  Protein angegeben [60]. Die in den vorliegenden Präparationen gemessenen Werte bewegen sich zwischen 13-18  $\mu g$  RNA/mg Protein. Der RNA-Gehalt einer mikrosomalen Fraktion aus dem Überstand der Mitochondrienpräparation betrug 192  $\mu g$  RNA/mg Protein. Eine entsprechend geringe Verunreinigung ergab sich bei der Kontrolle durch ein mikrosomales Markerenzym, die NADPH spezifische Cytochrom c Reduktase (siehe auch Tab. 14). Die Mikrosomenfraktion hatte eine spezifische Aktivität von 122  $\mu Mol$  reduziertes Cytochrom c/h/mg Protein, die der Mitochondrienfraktion von 4.6  $\mu Mol$  reduziertes Cytochrom c pro Stunde/mg Protein. Das heißt, die mitochondriale Fraktion ist zu 3.8% mit Mikrosomen verunreinigt.



Um die Möglichkeit auszuschließen, daß diese geringen Mengen von Mikrosomen in den Mitochondrienpräparationen zu einer Verfälschung der Einbauergebnisse führen, wurde der in Tab. 9 wiedergegebene Versuch durchgeführt. Darin wurde das Verhalten des Einbaus von radioaktivem Isoleucin in Rattenlebermitochondrien dem Einbau in Rattenlebermikrosomen, die aus der Überstandsfraction der Mitochondrienpräparation gewonnen wurden, gegenübergestellt.

In dem für Mitochondrien optimalen Medium zeigen die Mikrosomen, wenn kein ATP oder ADP zugefügt wurde, einen vergleichsweise vernachlässigbaren Einbau. Ganz drastisch wird der Einbau in die Mikrosomen erhöht, wenn ATP dem Incubationsmedium zugesetzt wird. Er erreicht 58% der Einbaurrate des ATP stimulierten Einbaus in Mitochondrien. Auch ADP stimuliert den Einbau in die mikrosomale Fraction, vermutlich wegen Verunreinigungen des käuflichen ADP mit ATP, jedoch bei weitem nicht so stark wie ATP. Der ADP-getriebene Einbau in Mikrosomen beträgt 9% des ADP getriebenen Einbaus in Mitochondrien. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Systeme in der Reaktion auf die Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems. Während der mitochondriale Einbau nicht erhöht wird, steigt der Einbau in die Mikrosomen um 72%. Unter Berücksichtigung der enzymatisch bestimmten Verunreinigung der Mitochondrienpräparationen durch Mikrosomen zu ca. 3.8%, kann man schließen, daß man beim ATP-getriebenen Einbau in Rattenlebermitochondrien mit einem Beitrag von ca. 2% durch begleitende Mikrosomen zu rechnen hätte. Für das ADP-getriebene System läßt sich kein entsprechender Wert angeben, da nicht bekannt ist, zu welchem Ausmaß die phosphorylierenden Mitochondrien den Mikrosomen ATP zur Verfügung stellen können.

Weit unter dem so errechneten Wert liegt derjenige, der sich aus einem Vergleich der Reaktion von mitochondrialem und mikrosomalem ATP-getriebenen Einbau auf Zusatz von Ribonuclease ergibt. Der mikrosomale Einbau wird bis auf einen minimalen Wert an der Meßfehlergrenze gehemmt, der mitochondriale Einbau bleibt unbeeinflusst. Dieses Kriterium wurde bereits in den ersten Versuchen zur mitochondrialen Proteinbiosynthese von SIMPSON [2] eingeführt. Es beruht auf der Undurchlässigkeit

der mitochondrialen Innenmembran für Ribonuclease (siehe auch Tab. 17).

Mit dem Locustensystem wurde folgender Kontrollversuch durchgeführt: Mikrosomale und mitochondriale Fraktionen wurden nach Trennung wieder zusammengefügt, in dem für die Mitochondrien entwickelten Medium (mit ATP) 14-C-Isoleucin eingebaut, anschließend die Fraktionen durch differentielle Zentrifugation wieder getrennt und die spezifischen Radioaktivitäten der einzelnen Fraktionen bestimmt. Nur 5% der spezifischen Radioaktivität der Mitochondrien fand sich in der Mikrosomenfraktion. Dieser Wert gibt mit Sicherheit einen zu hohen Beitrag der Mikrosomen an, da Mitochondrienfragmente in die mikrosomale Fraktion gelangen (siehe auch Tab. 14).

Nach den hier aufgeführten Daten scheint eine signifikante Beteiligung von Mikrosomen am Einbau im mitochondrialen System ausgeschlossen zu sein.

Zusatz	Mitochondrien	Mikrosomen
	Ipm/mg Protein	
-----	392	5
+ATP (2mM)	1385	800
+ATP (2mM) +PEP (10mM) +PK (0.1mg/ml)	1360	1375
+ATP (2mM) +RNASE (40µg/ml)	1420	8
+ADP (2mM)	1350	116

Tab. 9. Gegenüberstellung des Einbaus von 14-C-Leucin in isolierte Mitochondrien und Mikrosomen aus Rattenleber. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

### 3.5.3. Ausschluß bakterieller Beteiligung am Einbau

Eine größere Gefahr für die Produktion von Artefakten stellt die Beteiligung von Bakterien am Einbau dar. Bei nicht-sterilem Arbeiten gelangen nicht unbeträchtliche Mengen von Bakterien - sowohl bei *Locusta* als auch bei Rattenleber - in die Mitochondrienpräparationen. Man kann sogar erwarten, daß Bakterien bei der Isolierung von Mitochondrien angereichert werden, da sie ein ähnliches Sedimentationsverhalten zeigen wie die Mitochondrien selbst. Tatsächlich fanden sich, wenn eine Mitochondrienpräparation von Rattenleber auf Standardagar aufgetragen wurde, bis zu  $10^4$  Kolonien pro mg Protein.

Um den Beweis zu erbringen, daß in den hier beschriebenen Experimenten der Einbau von Aminosäuren durch die die Präparation begleitenden Bakterien zu vernachlässigen ist, seien folgende, sich aus den geschilderten Versuchen ergebende Argumente und einige zusätzliche Experimente aufgeführt:

- 1) Die Steigung der Einbaukinetik nimmt mit zunehmender Incubationsdauer ab. Im Falle der Rattenlebermitochondrien durchläuft die Einbaukurve sogar ein Maximum. Wachstumskinetiken von Bakterien weisen im allgemeinen einen exponentiell steigenden Verlauf auf, dem ein linearer vorausgehen kann.
- 2) Die ausgeprägte Abhängigkeit des Einbaus von den Bedingungen des Mediums, insbesondere die Wirkung der Adeninucleotide und der drastische Einfluß der Tonizität des Mediums, sprechen gegen eine signifikante Beteiligung von Bakterien am Einbau.
- 3) Wie gezeigt worden ist, wird die Einbauaktivität von isolierten Locustenmitochondrien kontrolliert vom Entwicklungszustand des Flugmuskels, aus dem die Mitochondrien isoliert wurden. Bei Rattenlebermitochondrien fand sich eine Abhängigkeit vom endokrinen Status der Tiere. Diese Befunde sind wiederum nicht mit bakterieller Kontamination zu vereinbaren.
- 4) Bakterien bauen zugesetzte Aminosäuren sowohl in lösliche als auch in unlösliche Proteine ein. Wie weiter unten berichtet wird (siehe Abschnitt 3.7.1.), enthalten die

löslichen Proteine, die nach Incubation von Mitochondrien mit radioaktiven Aminosäuren in vitro extrahiert werden können, nur eine geringe spezifische Aktivität. Wurden Bakterien nach Incubation unter den gleichen Bedingungen einer Extraktion der löslichen Proteine unterworfen, so konnte noch nach 5 Extraktionsschritten radioaktives Protein in Lösung gebracht werden, im Gegensatz zu in vitro markierten Mitochondrien, aus denen auf dieser Stufe keine Radioaktivität mehr extrahiert werden konnte.

Um mit noch größerer Sicherheit die Möglichkeit einer Beteiligung von Bakterien am Einbau auszuschalten, wurden folgende Experimente angestellt:

Abb. 27 zeigt einen Versuch, in dem Mitochondrien einer verschieden langen Präincubation ohne Radioaktivität bei Einbaubedingungen ausgesetzt wurden. Die Einbaukinetiken bei 30 bis 60 minütiger Präincubation zeigen, daß das System unter diesen Bedingungen die Fähigkeit zum Einbau verliert. Dieses Verhalten sollte, wenn Bakterien unter diesen Bedingungen im Incubationsmedium wachsen, nicht zu beobachten sein.

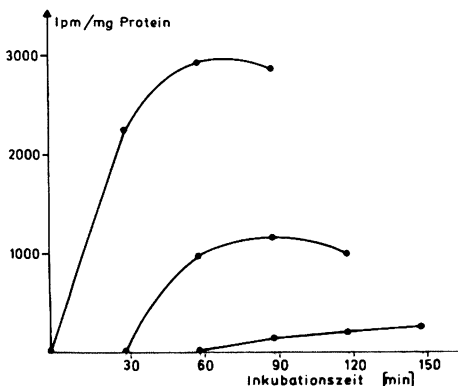


Abb. 27. Abhängigkeit des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in isolierte Rattenlebermitochondrien von der Präincubation. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

In einer weiteren Reihe von Versuchen wurden Bakterien aus einer Suspension von Rattenlebermitochondrien auf Standardagar gezüchtet, den Mitochondrien zugesetzt und das Verhalten dieses Systems untersucht. Tab. 10 beschreibt die Wirkungen verschiedener Hemmsubstanzen auf dieses System im Vergleich mit dem Mitochondriensystem: Das zusammengesetzte System reagiert empfindlich auf den Zusatz von Antibiotika, die auf das mitochondriale System keinen Einfluß ausüben. Die hemmende Wirkung von KCN und DNP auf die Mitochondrien ist stärker als auf das mitochondrial-bakterielle System. Zerkleinerung der Mitochondrien durch Ultraschall hemmt den Einbau in die Mitochondrien fast vollständig (siehe auch Abschnitt 3.3.), hat jedoch auf den bakteriellen Einbau keine Wirkung.

	Mitochondrien		Mitochondrien + Bakterien	
	Ipm	% Hemmung	Ipm	% Hemmung
ohne Zusatz	133	0	629	0
+Streptomycin (60µg/ml)	132	0	268	57
+Neomycin (30µg/ml)	116	13	312	50
+Actinomycin D (20µg/ml)	133	0	170	73
+DNP (1.0mM)	37	72	648	0
+KCN (1.0mM)	27	80	327	48
Ultraschall (3 x 10 sec)	10	92	661	0

Tab. 10. Gegenüberstellung von Hemmeffekten auf den Einbau von <sup>14</sup>C-Leucin in isolierte Rattenlebermitochondrien und in ein Gemisch von Rattenlebermitochondrien und aus einer Rattenlebermitochondriensuspension gezüchteten Bakterien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Dies ist ausführlicher in Abb. 28 gezeigt. Nach Behandlung des zusammengesetzten Systems mit Ultraschall verliert es nur denjenigen Teil der Einbauaktivität, der den Mitochondrien zuzuschreiben ist.

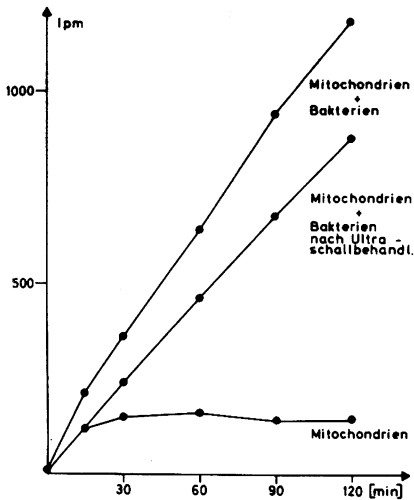


Abb. 28. Verhalten des Systems von Mitochondrien +Bakterien gegen Behandlung mit Ultraschall. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

Diese Daten stimmen mit vor kurzer Zeit veröffentlichten Ergebnissen aus Experimenten überein, in denen unter Zuhilfenahme steriler Präparationsbedingungen nachgewiesen werden konnte, daß die Einbaurrate unverändert ist, gleichgültig ob 80 oder  $10^5$  Bakterien im ml Incubationsmedium anwesend sind [54]. Vor kurzer Zeit erschienene Berichte, die den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in isolierte Mitochondrien begleitenden Bakterien zuschreiben [61,62], weisen darauf hin, daß man unter nicht-optimalen Bedingungen, wie sie in den dort beschriebenen Untersuchungen vorgelegen haben, mit einem Beitrag von Bakterien zum Einbau rechnen muß.

### 3.6. Quantitative Betrachtung des Einbaus

Als letztes Kriterium zur Beurteilung der biologischen Signifikanz des untersuchten Einbaus sei der quantitative Vergleich der Syntheseraten in vivo und in vitro herangezogen. Es muß gefordert werden, daß diese beiden Größen in etwa vergleichbar sind. Anderenfalls besteht die Gefahr, eine minimale Reaktion zu verfolgen, die mit dem zu messenden Vorgang nichts zu tun hat. Tatsächlich ist man, zumindest bei Rattenlebermitochondrien, darauf angewiesen, mit einer sehr hohen spezifischen Radioaktivität der einzubauenden Aminosäure im Incubationsmedium zu arbeiten, weil ansonsten die spezifische Radioaktivität im Protein für die Ausmessung zu niedrig wird. Man kann jedoch unter den optimalen Bedingungen Sättigungskurven für die betreffende radioaktive Aminosäure aufnehmen und an Hand dieser Werte die in vitro Syntheseraten berechnen (siehe Abschnitt 3.1.3.). Auf diese Weise erhält man für Rattenleber eine Syntheserate von 0.078 bzw. 0.084 µg Protein pro Stunde/mg Mitochondrienprotein, wenn man jeweils den Einbau von radioaktivem Leucin bzw. Isoleucin zugrunde legt. Zur Berechnung wurden die initialen Einbaugeschwindigkeiten herangezogen und ein gleichmäßiges Vorkommen aller Aminosäuren im Syntheseprodukt angenommen. Aus der Halbwertszeit von Lebermitochondrien von 10 Tagen [36] kann man eine in vivo Syntheserate von 2.9 µg Protein/h/mg Protein errechnen. Das heißt also, auf das ganze Mitochondrium bezogen würde die in vitro Syntheserate ca. 2.8% der theoretischen ausmachen. Nun besteht aber, wie in den folgenden Kapiteln gezeigt wird, hinreichend Grund zu der Annahme, daß die löslichen Proteine der Mitochondrien, die bei der Rattenleber etwa 60% betragen, nicht von dem Mitochondriensystem synthetisiert werden. Darüberhinaus wird von den verbleibenden 40% nur ein Teil, der wiederum ca 40% nicht übersteigen dürfte [63], in vitro markiert. Wenn man sich auf diese Angaben bezieht, kann man, grob gerechnet, eine in vitro Syntheserate finden, die etwa 15% der theoretisch zu erwartenden Syntheserate beträgt.

Für Locusten kann man den Angaben von BROSEMER et al. [8] in der untersuchten Entwicklungsphase eine Verdopplungszeit von ca. 4 Tagen entnehmen. Dem entspricht eine theoretisch zu erwartende Syntheserate von  $7.2 \mu\text{g Protein/h/mg Mitochondrienprotein}$ . Wieder mit einer Leucin-Sättigungskurve und wieder mit den gleichen Voraussetzungen erhält man, auf das ganze Locustenflugmuskelmitochondrium bezogen, eine Syntheserate von  $0.42 \mu\text{g Protein/h/mg Mitochondrienprotein}$ . Wiederum darf man, wie bei den Rattenlebermitochondrien, das neusynthetisierte Produkt nur auf einen Teil des unlöslichen Proteins beziehen [22] und kommt somit auf ca. 20% der theoretisch zu erwartenden Syntheserate.

Obwohl diese Kalkulationen mit einem sehr großen Fehler behaftet sind, kann man doch daraus schließen, daß der hier verfolgte Einbau durchaus nicht in einem Bereich liegt, der einer unbedeutenden Nebenreaktion entspricht.

### 3.7. Lokalisierung des Einbauproduktes

Nachdem nun die Eigenschaften des Aminosäureeinbaus in isolierte Mitochondrien charakterisiert und zahlreiche Argumente für die biologische Signifikanz dieses in vitro Prozesses erbracht waren, konnte nun eine Lokalisierung des radioaktiven Produktes vorgenommen werden.

#### 3.7.1. Fraktionierte Extraktion

Zu einer orientierenden Fraktionierung wurden die Proteine der Mitochondrien in drei Anteile aufgetrennt: In einen während der Incubation ins Medium übergehenden Anteil, in einen Anteil, der durch Desintegration und Extraktion der Mitochondrien mit 0.1 M Phosphatpuffer gewonnen werden kann und in den Anteil des unter diesen Bedingungen unlöslich zurückbleibenden Proteins. Die ersten beiden Anteile setzen sich aus den mitochondrialen Matrixproteinen zusammen, der unlösliche Anteil wird von den mitochondrialen Membranen mit ihren strukturgebundenen Enzymen gebildet.

Abb. 29 und Abb. 30 zeigen in einer Gegenüberstellung für Locusten- und Rattenlebermitochondrien die relativen Anteile der jeweiligen Fraktionen am Gesamtprotein und an der ge-



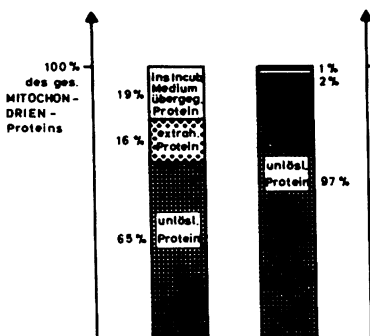


Abb. 29. Verteilung des eingebauten 14-C-Isoleucins auf die verschiedenen Fraktionen der fraktionierten Extraktion bei Locustenmitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

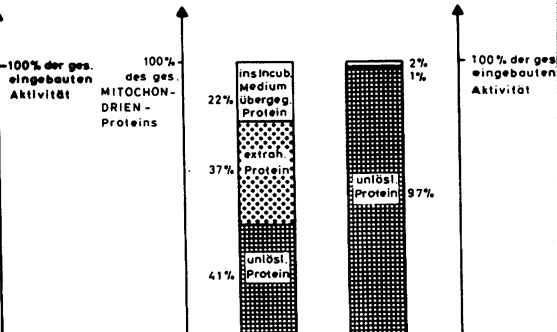


Abb. 30. Verteilung des eingebauten 14-C-Leucins auf die verschiedenen Fraktionen der fraktionierten Extraktion bei Rattenlebermitochondrien. (Versuchsbedingungen siehe 4.3.1.)

samtens eingebauten Radioaktivität. Beide Experimente machen klar, daß innerhalb der Fehlergrenzen eine Markierung der löslichen Proteine in vitro nicht stattfindet, im Gegensatz zu den Beobachtungen bei in vivo Markierungen (Abb. 23). Diese Fehlerquellen sind dadurch relativ groß, daß sehr kleine phospholipidhaltige Partikel nach der Behandlung mit Ultraschall in die Fraktion des extrahierbaren Proteins gelangen, nachgewiesen durch Succinatdehydrogenaseaktivität in dieser Fraktion. Fast alle eingebaute Radioaktivität findet sich sowohl bei den Mitochondrien der Rattenleber als auch des Locustenflugmuskels in der unlöslichen Fraktion. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von ROODYN [5], daß Cytochrom c und Malatdehydrogenase von isolierten Rattenlebermitochondrien nicht synthetisiert werden, und sich die eingebaute Radioaktivität in einer überdurchschnittlichen spezifischen Aktivität einer mit Detergensfraktionierung gewonnenen Lipoproteinfraktion ausdrückt. WINTERSBERGER [59] fand bei Anwendung der gleichen Methode auf Hefemitochondrien gleiche Verhältnisse.

Die weitere proteinchemische Fraktionierung der unlöslichen mitochondrialen Membranpräparationen bereitet nun erhebliche Schwierigkeiten. Wesentliche Hilfsmittel für solche Auftrennungen sind Detergentien wie Cholat, Desoxycholat, Triton, Emasol, Na-Dodecylsulfat u.a. Auf diese Weise wurden zahlreiche mitochondriale strukturgebundene Enzyme in aktivem Zustand isoliert, wie die  $\alpha$ -Glycerophosphatoxidase [64], die Succinatdehydrogenase [65] und die Cytochromoxidase [66]. Eine besondere Stellung unter diesen mit Detergensfraktionierung gewonnenen Proteinen nimmt das vom Arbeitskreis um GREEN [67,68] isolierte sogenannte "Strukturprotein" ein. Einige Befunde deuten jedoch darauf hin, daß es sich hierbei nicht um ein einheitliches Protein handelt [21,69]. Erst die von HALDAR et al. [21] und SEBALD [22] auf Mitochondrien angewandte Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichte die Auftrennung der mitochondrialen Membranfraktion in zahlreiche (mehr als 20) diskrete Banden, von denen sich 4-6 nach in vitro Markierung von Locusten- und Rattenlebermitochondrien als radioaktiv identifizieren ließen. Da jedoch diese Methode eine Solubilisierung der Membranproteine in Na-Dodecylsulfat oder einem Gemisch von Phenol/Eisessig/Wasser zur Voraussetzung hat, also stark denaturierenden Medien, ist die Identifizierung der einzelnen Banden auf enzymatischer Basis nicht möglich.

### 3.7.2. Trennung der Mitochondrien in äußere und innere Membran

In dieser Arbeit wurde nun versucht, angesichts dieser Schwierigkeiten einer Charakterisierung des oder der neu-synthetisierten Proteine dadurch näherzukommen, daß eine weitere Lokalisierung der eingebauten Radioaktivität innerhalb der Mitochondrien vorgenommen wurde. Dazu wurden die vor kurzer Zeit beschriebenen Verfahren angewandt, die es ermöglichen, innere und äußere Membran von Rattenlebermitochondrien zu trennen.

Intakte Rattenlebermitochondrien wurden in dem folgenden Medium incubiert: 0.25 M Sucrose, 20 mM KCl, 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ADP, 0.188 mg/ml Aminosäurengemisch,

2 mM EDTA, 0.06 mg/ml Streptomycin, 0.02% Rinder-Serum-Albumin (RSA), 4-5 mg/ml Mitochondrienprotein, 0.3  $\mu$ c/ml 14-C-1-Leucin (325 mc/mMol). Etwa 30 Proben zu je 1 ml wurden 40 min bei 32°C unter Schütteln incubiert. Das pH war 7.6. Der Zusatz von RSA wurde deshalb angewandt, um die Membranen vor der zerstörenden Wirkung freier Fettsäuren zu bewahren, die während der Incubation durch die Wirkung lysosomaler Enzyme freigesetzt werden und an RSA adsorbiert werden können. Streptomycin diente dazu, mit Sicherheit einen bakteriellen Beitrag zum Einbau zu vermeiden. Nach der Incubation wurde durch Waschen der Mitochondrien in isotonem Medium und durch Zugabe von Träger-Aminosäure die nichteingebaute Radioaktivität entfernt.

Dann wurden die Mitochondrien einer Trennung in äußere und innere Membran nach einem der beiden folgenden Verfahren unterworfen:

- 1) Eine leicht abgeänderte "Swelling-shrinking" Methode, die die Verfahren von PARSONS et al. [70] und SOTTOCASA et al. [71] verband.
- 2) Die "Digitonin" Methode nach den Angaben von SCHNAITMAN et al. [72].

### 3.7.2.1. "Swelling-shrinking" Verfahren

In dem "Swelling-shrinking" Verfahren wurden die Mitochondrien zuerst einem hypotonen Medium ausgesetzt, um sie schwellen zu lassen. Dann wurden sie durch Zugabe von konzentrierter Sucrose und von ATP in isotone Umgebung gebracht und Schrumpfung bewirkt. Hierbei schrumpft nur die innere Membran mit Matrixinhalt. Eine darauffolgende Zentrifugation mit hoher Geschwindigkeit bewirkt das Abscheren der äußeren Membranen. Dann wurde durch eine niedrige Zentrifugation ein großer Teil der von den äußeren Membranen befreiten Mitochondrien und etwaige Mitochondrien, die den Swelling-shrinking Zyklus nicht mitgemacht hatten, sedimentiert (Fraktion S, "low speed pellet"). Die dabei im Überstand verbleibenden Partikel (Fraktion Lm) wurden auf einen diskontinuierlichen Sucrose-Dichte-Gradienten geschichtet, von dem nach Zentrifugation

drei Fraktionen entnommen wurden: LI, LII und LIII (Versuchsbedingungen siehe 4.5.3.). LI ist diejenige Fraktion, in der die äußere Membran angereichert ist, LII und LIII sind diejenigen Fraktionen, in denen die innere Membran angereichert ist. Die Präparationen wurden mit Hilfe enzymatischer Marker kontrolliert, wobei routinemäßig für die äußere Membran die Monoaminoxidase (MAO) und für die innere Membran die Succinat-Cytochrom c Reduktase (SDH) verwendet wurde (Tab. 11). Als Marker für die äußere Membran kann auch die Kynurenin-3'-Hydroxylase verwendet werden [73], und für die innere Membran die Cytochromoxidase [71] (Tab. 12). Bei einer Lokalisierung der Prolinoxidase mit dem "Swelling-shrinking" Verfahren stellte sich heraus, daß dieses Enzym ebenso als Marker für die innere Membran brauchbar ist (Tab. 12). Dieses Ergebnis hat Bedeutung für die Regulation der Prolinkonzentration in der Zelle und wird am Schluß ausführlich diskutiert.

Tab. 11 zeigt die Verteilung von MAO und SDH in den verschiedenen Fraktionen von fünf "Swelling-shrinking" Präparationen. Die von PARSONS et al. [70] und SOTTOCASA et al. [71] angegebenen Reinheiten wurden in diesen Präparationen nicht erreicht. Einerseits schadet die 40 minütige Exposition bei 32°C den Mitochondrien, und eine Rezentrifugation der einzelnen Banden, wie von PARSONS et al. angegeben, wurde aus Materialmangel nicht vorgenommen. Andererseits ergibt der hier verwandte SDH Test, bei dem Phenazinmethosulfat anwesend ist, um auch noch kleine Membranbruchstücke anzuzeigen, eine doppelt so hohe Verunreinigung der äußeren Membranpräparation mit innerer Membran, als sie durch die SDH Aktivitäten in den Außenmembranfraktionen in den Experimenten von SOTTOCASA et al. [71] nachgewiesen wird, die diesen Elektronenmediator im Test nicht verwendeten.

Die in Tab. 11 wiedergegebenen spezifischen Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen machen es offensichtlich, daß die einzelnen Fraktionen nicht rein sind. In der Fraktion LI ist die äußere Membran mit innerer Membran kontaminiert, in LII und LIII innere Membran mit äußerer Membran. Daher mußte mit Hilfe der beiden Markerenzyme der Anteil von innerer und äußerer Membran in den einzelnen Fraktionen und damit die

Experiment Nr.		1	2	3	4	5
MS	SDH	----	9.8	14.5	----	7.7
	MAO	----	803	224	----	595
	SR	----	112	44	----	117
LM	SDH	21.2	38.0	28.4	27.6	25.2
	MAO	1800	2240	1480	785	1570
	SR	81	238	126	248	180
LI	SDH	7.8	7.0	11.0	2.1	12.5
	MAO	3340	2960	3180	4310	3855
	SR	26	83	66	50	122
LII	SDH	29.6	18.3	40.4	24.8	23.0
	MAO	1320	1035	962	803	1210
	SR	102	240	238	361	244
LIII	SDH	40.2	25.4	24.7	18.8	27.1
	MAO	698	562	328	206	1050
	SR	104	168	85	88	192
SR der "reinen" äußeren Mem- bran		0.3	14	2	21	-18
SR der "reinen" inneren Mem- bran		151	325	314	439	294
SR der äußeren Membran in % der der inneren Membran		0.2	4.2	0.6	4.8	-6.0

Tab. 11. Spezifische Aktivitäten von Succinat-Cytochrom *c* Reduktase (SDH) und Monoaminoxidase (MAO) und spezifische Radioaktivitäten in verschiedenen Fraktionen von Mitochondrien, die nach Inkubation mit <sup>14</sup>C-Leucin nach dem "Swelling-shrinking" Verfahren isoliert wurden. Abkürzungen: SR, spezifische Radioaktivität des Proteins; MS, unbehandelte Mitochondrienfraktion; LM, auf den Dichtegradienten aufgetragene Mitochondrienfraktion; LI, obere Schicht im Gradienten; LII, mittlere Schicht im Gradienten; LIII, Pellet der Gradientenzentrifugation. Die Enzymaktivitäten sind ausgedrückt in  $\mu\text{mol/h/mg}$  Protein (für SDH bezogen auf Cytochrom *c*, für MAO auf gebildeten Benzaldehyd), die spezifischen Radioaktivitäten in  $\text{Ipm/mg}$  Protein.

spezifischen Radioaktivitäten dieser "reinen" äußeren und inneren Membranen berechnet werden.

Dies wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

$$P_{oLI} + P_{iLI} = 1;$$

$$P_{oLII} + P_{iLII} = 1;$$

Dabei stellen  $p_{oLI}$  und  $p_{oLII}$  jeweils den Anteil der "reinen" Außenmembran in den Fraktionen LI und LII dar, und  $p_{iLI}$  und  $p_{iLII}$  stellen jeweils den Anteil der "reinen" Innenmembran in den Fraktionen LI und LII dar. Nun gilt:

$$P_{oLI} = \frac{E_{MAO LI}}{E_{MAO po}} ; \quad P_{oLII} = \frac{E_{MAO LII}}{E_{MAO po}} ;$$

$$P_{iLI} = \frac{E_{SDH LI}}{E_{SDH pi}} ; \quad P_{iLII} = \frac{E_{SDH LII}}{E_{SDH pi}} ;$$

wobei  $E_{MAO LI}$ ,  $E_{MAO LII}$ ,  $E_{SDH LI}$ ,  $E_{SDH LII}$  die spezifischen Enzymaktivitäten von MAO und SDH jeweils in den Fraktionen LI und LII darstellen.  $E_{MAO po}$  bezeichnet die spezifische Aktivität von MAO in der "reinen" Außenmembran,  $E_{SDH pi}$  die spezifische Aktivität der SDH in der "reinen" Innenmembran.

Die spezifischen Radioaktivitäten der "reinen" äußeren und der "reinen" inneren Membran können nun mit beiden folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$P_{oLI} \cdot SR_{po} + P_{iLI} \cdot SR_{pi} = SR_{LI} ;$$

$$P_{oLII} \cdot SR_{po} + P_{iLII} \cdot SR_{pi} = SR_{LII} ;$$

Hierbei stellen  $SR_{po}$ ,  $SR_{pi}$ ,  $SR_{LI}$  und  $SR_{LII}$  die spezifischen Radioaktivitäten jeweils der "reinen" äußeren Membran, der "reinen" inneren Membran, der Fraktion LI und der Fraktion LII dar. Die für die Berechnung wichtigen Voraussetzungen werden weiter unten diskutiert.

	SDH	Cytochrom-oxidase	Prolin-oxidase	MAO	Kynurenin-3'-Hydroxy-lase
LI	3.8	2.0	0.66	4430	0.75
LII	36.7	14.2	3.0	1680	0.26
LIII	21.6	12.4	2.8	301	0.077
S	25.0	---	3.7	598	0.13

Tab. 12. Verteilung von Markerenzymaktivitäten der mitochondrialen Innenmembran (SDH, Cytochromoxidase, Prolinoxidase) und der mitochondrialen Außenmembran (MAO, Kynurenin-3'-Hydroxylase) in verschiedenen Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens. Abkürzungen und Dimensionen wie in Tab. 11.

Die spezifischen Radioaktivitäten der "reinen" äußeren und inneren Membranen, die auf diese Weise errechnet wurden, sind in Tab. 11 aufgezeichnet. Die spezifische Radioaktivität der "reinen" Außenmembran ist in allen fünf Fällen geringer als 5% derjenigen der "reinen" Innenmembran.

Offensichtlich besitzt dieses Rechenverfahren nur Gültigkeit, wenn die mitochondrialen Membranproteine in den einzelnen Fraktionen nicht durch nicht-membrangebundene, also durch "lösliche" Proteine und nicht durch nicht-mitochondriale Proteine, also vor allem mikrosomale Proteine, verunreinigt sind. Wie Tab. 13 zeigt, enthalten alle Membranfraktionen lösliche Proteine, angezeigt durch die Enzymaktivitäten von Malatdehydrogenase (MAO) und Glutamatdehydrogenase (GluDH). Sie sind besonders hoch in der Fraktion LIII, die offensichtlich aus Mitochondrienfragmenten mit noch erhaltener Matrix besteht: Im Vergleich mit den ganzen Mitochondrien (MS) finden sich in der LIII Fraktion sogar noch höhere spezifische Aktivitäten dieser Matrixenzyme. Der Gehalt der Fraktionen LI und LII an diesen Enzymen ist niedrig und etwa gleich groß. Aus diesem Grunde wurde die LIII Fraktion nicht zu Berechnung der spezifischen Radioaktivitäten der reinen Membranen herangezogen.

	SDH	MAO	MDH	GluDH
MS	8.0	549	220	201
LM	11.2	1260	41	61
LI	3.4	4460	37	46
LII	12.0	597	69	69
LIII	20.8	302	265	286

Tab. 13. Spezifische Aktivitäten einiger "löslicher" und "unlöslicher" Enzyme in verschiedenen Fraktionen von Mitochondrien, die nach dem "Swelling-shrinking" Verfahren hergestellt wurden. Abkürzungen: MDH, Malatdehydrogenase; GluDH, Glutamatdehydrogenase. Andere Abkürzungen und Dimensionen wie in Tab. 11.

Gegen eine wesentliche mikrosomale Kontamination der mitochondrialen Membranfraktionen sprechen folgende Beobachtungen:

- 1) In elektronenmikroskopischen Kontrolleexperimenten haben PARSONS et al. [70] nachgewiesen, daß unter den Standardpräparationsbedingungen, wie sie auch in diesen Experimenten vorgelegen haben, die Verunreinigung der Außenmembranfraktion durch glattes und rauhes Retikulum bei etwa 6% liegt.
- 2) Die Tab. 14 zeigt einen Kontrollversuch mit dem mikrosomalen Markerenzym NADPH-Cytochrom c Reduktase [71]. Den höchsten Grad der Verunreinigung weist die LI Fraktion auf, der aber auch nach diesen Daten sehr niedrig ist (4.9%).

Die Auftrennung der Mitochondrien in Außen- und Innenmembran ist für die Frage relevant, welche Beziehung zwischen mikrosomaler Verunreinigung und RNA Gehalt von Mitochondrien besteht. Tab. 15 zeigt die Verteilung des RNA Gehaltes in den einzelnen Fraktionen von vier "Swelling-shrinking" Präparationen und in mikrosomalen Fraktionen. Diese wurden in der Art bereitet, daß der zwischen 30 min bei 15,000xg und 60 min bei 100,000xg sedimentierende Anteil des Überstandes der Mitochondrienpräparation auf dem gleichen Dichtegradienten zentrifugiert wurde, wie die Mitochondrien nach der "Swelling-shrinking" Behandlung. Dabei ergaben sich zwei Banden



	SDH	MAO	NADPH-cyt $\frac{c}{c}$ Reduktase
LM	30.3	835	2.0
LI	7.5	5960	6.7
LIIo	18.4	513	3.0
LIIu	36.0	402	1.2
LIII	51.0	388	0.9
Mc	0.7	133	122

Tab. 14. Verteilung von Markerenzymen der mitochondrialen Innenmembran (SDH), der mitochondrialen Außenmembran (MAO) und der mikrosomalen Fraktion (NADPH-Cytochrom  $\frac{c}{c}$  Reduktase) in verschiedenen Fraktionen von Rattenlebermitochondrien, die nach dem "Swelling-shrinking" Verfahren präpariert wurden. Abkürzungen: LIIo und LIIu, obere und untere Schicht der mittleren Gradientenfraktion; Mc, mikrosomale Fraktion. Andere Abkürzungen und Dimensionen wie in Tab. 11.

McI und McII, die in ihrer Position den mitochondrialen LI und LII Banden entsprachen. Der RNA Gehalt der unbehandelten Mitochondrien liegt in dem Bereich, der in der Literatur für nicht besonders gereinigte Mitochondrien angegeben ist [3].

Es fällt auf, daß die Fraktion LI einen bis zu doppelt so hohen RNA Gehalt besitzt, wie die unbehandelten Mitochondrien. Die Fraktionen LII und besonders LIII hingegen liegen mit ihrem RNA Gehalt weit unter dem, der für sehr saubere Lebermitochondrien berichtet wird [60]. Auch die Fraktion S, die im wesentlichen Mitochondrien ohne Außenmembran darstellt, hat einen ungewöhnlich niedrigen RNA Gehalt. Offensichtlich ist ein großer Teil der in ganzen Mitochondrien gefundenen RNA an die äußere Membran gebunden. Der spezifische RNA Gehalt der Innenmembran beträgt weniger als ein Drittel des für reine Mitochondrien berichteten RNA Gehaltes, wenn man berücksichtigt, daß die die Innenmembran repräsentierenden Fraktionen noch mit Außenmembran verunreinigt sind.

µg RNA/mg Protein

---

MS	16.9	12.8	14.2	
LM	16.2	7.9	10.5	13.4
LI	34.5	15.2	18.2	28.6
LII	8.2	5.2	9.8	7.7
LIII	5.0	3.7	4.7	4.4
S	7.6	4.8	4.5	
McI				30.3
McII				43.6

Tab. 15. RNA Gehalt der verschiedenen Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens. Abkürzungen: S, "Low speed pellet"; McI und McII sind die mikrosomalen Fraktionen, die LI und LII in der Verteilung entsprechen, wenn die Mikrosomenpräparation auf dem gleichen Dichtegradienten zentrifugiert wurden, wie die L Fraktionen. Andere Abkürzungen wie in Tab. 11.

---

Es gibt nun die folgenden beiden Erklärungen für diesen Sachverhalt:

- 1) Die in LI gefundene RNA ist Bestandteil der äußeren Membran, d.h. die RNA ist derart verteilt, daß auf die äußere Membran ein höherer, auf die innere Membran ein niedrigerer als der durchschnittliche spezifische RNA Gehalt entfällt.
- 2) Die in LI bestimmte RNA ist durch mikrosomale Verunreinigung in diese Fraktion gelangt.

Gemessen am RNA Gehalt der Fraktion McI müßte die Fraktion LI, sollte ihr RNA Gehalt bei dem für ganze Mitochondrien oder darunter liegen, zu mehr als zur Hälfte mit Mikrosomen verunreinigt sein. Die bereits aufgeführten Daten sind damit vollkommen im Widerspruch, ferner auch elektronenmikroskopische Aufnahmen der LI Fraktion, in denen nur minimale Mengen von Ribosomen ausgemacht werden können [70]. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß die in LI gefundene RNA Bestandteil der äußeren Membran ist. Die Innenmembran ist demnach mit einem unerwartet niedrigen RNA Gehalt ausgestattet.

Vor kurzem berichteten O'BRIEN et al. [26,27] über RNA Gehalte von exzessiv gewaschenen Lebermitochondrien von ca. 6-8  $\mu\text{g}$  pro mg Protein. Man muß angesichts der hier beobachteten Verteilung durchaus in Betracht ziehen, daß diese Erniedrigung des RNA Gehaltes nicht auf einer Entfernung anhängender Ribosomen, sondern vielmehr auf einer sukzessiven Entfernung der mitochondrialen Außenmembranen durch nicht-schonende Waschprozeduren beruht.

### 3.7.2.2. Digitonin Methode

Dem zweiten hier verwendeten Verfahren zur Trennung von äußerer und innerer mitochondrialer Membran mit Digitonin nach SCHNAITMAN et al. [72] liegt folgendes Prinzip zu Grunde: Digitoninkonzentrationen von 1.0-1.1 mg/10 mg Protein lösen vornehmlich die Außenmembran ab. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in dem höheren Cholesteringehalt der Außenmembran [74]. Die abgelöste Außenmembran bildet Bläschen, die im Gegensatz zu unveränderten Mitochondrien und Mitochondrien ohne Außenmembran erst bei hohen g-Zahlen sedimentieren. Die Experimente von SCHNAITMAN et al. zeigen, daß die Digitoninkonzentration sehr kritisch ist, d.h. der Konzentrationsbereich, in dem bereits genügend äußere Membran abgelöst wird und andererseits die Innenmembran noch nicht angegriffen wird, ist sehr eng. Weiterhin ist den Angaben von SCHNAITMAN et al. zu entnehmen, daß das Pellet der niedrigsten Zentrifugation (9,500xg) beträchtliche Mengen an löslichen, nicht-membrangebundenen Enzymen enthält und somit, wie oben dargelegt, nicht für das angegebene Rechenverfahren geeignet ist. Die SDH und MAO Aktivitäten der verwendeten 35,000xg und 144,000xg Pellets differieren nicht stark (Tab. 16). Demzufolge ist die Fehlergrenze dieser Methode größer, als die des "Swelling-shrinking" Verfahrens. Wiederum aber ist die spezifische Radioaktivität der "reinen" äußeren Membran gering, verglichen mit derjenigen der Innenmembran.

Experiment Nr.		1	2
MS	SDH	---	7.2
	MAO	---	644
	SR	79	65
9,500xg Pellet	SDH	31.6	26.2
	MAO	548	711
	SR	194	70
35,000xg Pellet	SDH	5.5	18.7
	MAO	568	1190
	SR	97	96
144,000xg Pellet	SDH	2.0	12.6
	MAO	855	1750
	SR	41	41
SR der "reinen" äußeren Membran		8	-70
SR der "reinen" inneren Membran		209	270
SR der äußeren Membran in % der SR der inneren Membran		3.8	-26

Tab. 16. Spezifische Aktivitäten von Succinat-Cytochrom c Reduktase (SDH) und Monoaminooxidase (MAO) und spezifische Radioaktivitäten in den verschiedenen Fraktionen von Mitochondrien, die nach Einbau von  $^{14}\text{-C}$ -Leucin nach der Digitonin Methode hergestellt wurden. Abkürzungen und Aktivitäten sind wie in Tab. 11 ausgedrückt.

### 3.7.2.3. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von innerer und äußerer Membran

Die unlöslichen Proteine von Rattenlebermitochondrien wurden, wie bereits erwähnt, von SEBALD [63] durch Polyacrylamid-Gel-

Elektrophorese in etwa 20-25 Banden aufgetrennt.

Werden nun die einzelnen Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens dieser Auftrennung unterworfen, so beobachtet man die in Abb. 31 dargestellte Verteilung.



Abb. 31. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von verschiedenen Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens. Abkürzungen wie in Tab. 11. Versuchsbedingungen siehe 4.5.4

---

Das mittlere Elektropherogramm stellt die Fraktion LM dar, also ein Gemisch von innerer und äußerer Membran vor Auftrennung auf dem Sucrose-Dichtegradienten. Diejenigen Banden, die von SEBALD [63] nach in vitro Markierung der intakten Rattenlebermitochondrien mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin, -Isoleucin und -Phenylalanin als Radioaktivität enthaltende Banden identifiziert wurden, sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Das Elektropherogramm auf der linken Seite repräsentiert die Außenmembranpräparation (LI), dasjenige auf der rechten Seite die Innenmembranpräparation (LIII). Man sieht, daß diejenigen Banden, die in der Außenmembranpräparation angereichert sind, solche Banden sind, die keine Radioaktivität enthalten. In der Innenmembranpräparation hingegen sind diejenigen Banden angereichert, die Radioaktivität enthalten, aber auch solche, die keine Radioaktivität enthalten.

Der Grad der Anreicherung der verschiedenen Banden in der Innenmembranpräparation ist unterschiedlich. Es ist deshalb möglich, daß der Aussagewert der verwendeten enzymatischen Marker der Innenmembran begrenzt ist. Die Stellen des Einbaus und die Markerenzyme können in verschiedenen Teilen der inneren Membran lokalisiert sein.

Die einzelnen Banden der Elektrophoreseexperimente können aus mehreren Proteinen bestehen. Deshalb zeigen diese Befunde nicht endgültig die Lokalisation der neusynthetisierten Proteine innerhalb der inneren Membran. Sie bekräftigen jedoch die Ergebnisse des im Anschluß an die "Swelling-shrinking"- und die Digitonin-Methode durchgeführten Rechenverfahrens.

Die Aussagekraft der drei beschriebenen Methoden zur Lokalisierung der eingebauten Radioaktivität in innerer und äußerer Membran hängt davon ab, ob die folgenden Voraussetzungen erfüllt sind:

- 1) Die Aktivitäten der SDH und der MAO sind spezifisch für innere bzw. äußere Membran. Nach den Experimenten von PARSONS et al., SOTOCASA et al. und SCHNAITMAN et al. scheint dies auf der Basis von biochemischen und elektronenmikroskopischen Daten gesichert zu sein.
- 2) Die Turnover-Zeiten der inneren und der äußeren Membran müssen gleich groß sein. Dazu gibt es wenig Information. Als unterstützend für diese Annahme kann man Ergebnisse werten, die SEBALD [22] bei der Auftrennung der unlöslichen Proteine von in vivo und von in vitro markierten Locustenmitochondrien erzielte. Er fand bei in vivo

Markierung der Mitochondrien, daß sämtliche Banden innerhalb der Fehlergrenze die gleiche spezifische Aktivität besitzen. Das heißt, die Banden die der äußeren Membran zuzuordnen sind, haben den gleichen Turnover wie die Banden, die der inneren Membran angehören. Allerdings ist diese Zuordnung noch nicht erfolgt, da eine Trennung von Außen- und Innenmembran von Locustenmitochondrien bis jetzt noch nicht möglich ist.

- 3) Die Annahme, daß die zur Berechnung herangezogenen Fraktionen frei von nicht-mitochondrialen und nicht-membrangebundenen Proteinen sind, wurde bereits diskutiert.

### 3.7.3. Incubation der verschiedenen Fraktionen des "Swelling-shrinking"Verfahrens mit 14-C-1-Leucin

Bis jetzt wurde gezeigt, daß das Einbauprodukt in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist. Damit ist noch nicht aufgeklärt, wo der Einbau der radioaktiven Aminosäure erfolgt. Es mußte also ausgeschlossen werden, daß etwa der Einbau in der äußeren Membran erfolgt und darauf ein Transfer des Produktes stattfindet.

Um diese Frage zu klären, wurden die bei dem "Swelling-shrinking" Verfahren erhaltenen Fraktionen mit radioaktivem Leucin incubiert. Das Incubationsmedium hatte die gleiche Zusammensetzung wie in den in Tab. 11 dargestellten Experimenten. Tab. 17 zeigt die Ergebnisse zweier solcher Versuche. Die Fraktion LI besitzt eine niedrige spezifische Radioaktivität verglichen mit LII. Auf Grund der Berechnung der spezifischen Radioaktivitäten der "reinen" Membranen, die wiederum nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt wurde, erweist sich die Einbauaktivität der Außenmembran vernachlässigbar gering gegenüber der der Innenmembran. Die Fraktion mit der höchsten Einbauaktivität ist S, das "low speed pellet". Diese Fraktion hat eine niedrige MAO Aktivität, also einen geringen Anteil an äußerer Membran. Die Fähigkeit der S Fraktion zum Einbau von radioaktivem Leucin wird entschieden verringert, wenn sie über den gleichen

Experiment Nr.	Spezifische Radioaktivität (Ipm/mg Protein)	
	1	2
MS	114	330
MS+RNASE (40µg/ml)	116	
MS+CAP (100µg/ml)	22	
LM	68	208
LM+CAP (100µg/ml)	2	
S	252	1112
S+RNASE (40µg/ml)	244	
S+CAP (100µg/ml)	12	
LI	17	44
LII	103	256
LII+CAP (100µg/ml)	0	
LIII	98	108
SII	28	
SIII	74	
SR der "reinen" äußeren Membran	6	11
SR der "reinen" inneren Membran	169	362
SR der äußeren Membran in % der SR der inneren Membran	3.5	3.0

Tab. 17. Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Leucin in verschiedene Fraktionen von Rattenlebermitochondrien, die nach dem "Swelling-shrinking" Verfahren hergestellt wurden. Abkürzungen: SII und SIII sind diejenigen Banden, die LII und LIII entsprechen, wenn die Fraktion S der gleichen Gradientenzentrifugation unterworfen wurde, wie LM. CAP, Chloramphenicol. Andere Abkürzungen wie in Tab. 11.

Einbaubedingungen wie für Tab. 11. Im Experiment Nr. 1 wurde nur  $0.1 \mu\text{C/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Leucin zugesetzt.



Gradienten geschickt wird, wie die L Fraktionen: Die resultierenden Fraktionen SII und SIII, die in ihrer Position LII und LIII entsprechen, weisen eine vergleichsweise niedrige spezifische Radioaktivität auf. Die LIII Fraktion enthält eine, verglichen mit der LII Fraktion niedrigere spezifische Aktivität. Es ist also hier das gleiche Verhalten zu beobachten, wie wenn der Einbau vor Trennung der Membranen erfolgt. Auch der Einbau in die Mitochondrien ohne Außenmembran ist unempfindlich gegen Ribonuclease. Die innere Membran ist offensichtlich undurchlässig für dieses Enzym. Chloramphenicol hemmt auch in den Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens den Einbau.

#### 4. Experimenteller Teil

##### 4.1. Isolierung von Mitochondrien und Mikrosomen

###### 4.1.1. Locustenflugmuskelmitochondrien

Die Tiere wurden auf 4°C abgekühlt, sodaß sie erstarren, dann dekapitiert, mit der Schere der Brustpanzer eröffnet, der Darm entfernt und der Fettkörper herausgewischt. Die Flugmuskeln wurden mit einem Spatel herausgekratzt und in Isolierungsmedium gesammelt (0.3 M Sucrose, 10 mM TRA, 2 mM EDTA, pH 7.2). In einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonstempel wurde ein ca. 10%iges Homogenat (bezogen auf Flugmuskelfrischgewicht) hergestellt, das durch ein Perlontuch gepreßt wurde. Anschließend wurde es zu einem 5%igen Homogenat verdünnt und nach dem von KLINGENBERG et al. angegebenen Verfahren [75] in der Kühlzentrifuge 8 min bei 600xg zentrifugiert, um unzerstörte Zellen, Muskelfibrillen und Kerne zu entfernen. Der Überstand wurde 10 min bei 6,000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde mit der Hand im Potter-Elvehjem Homogenisator vorsichtig resuspendiert und wiederum 10 min bei 6,000xg zentrifugiert. Die im Niederschlag befindlichen Mitochondrien wurden sofort verwendet.

###### 4.1.2. Locustenflugmuskelmikrosomen

Der Überstand der Mitochondrienpräparation wurde zur Entfernung von Mitochondrienfragmenten 15 min bei 20,000xg zentrifugiert, das Sediment verworfen und durch Zentrifugation des Überstandes für 60 min bei 100,000xg die Mikrosomenfraktion gewonnen.

###### 4.1.3. Rattenlebermitochondrien

Die Lebern von über Nacht gehungerten Ratten wurden nach der Entnahme in eiskaltem Isolierungsmedium (0.25 M Sucrose, 10 mM TRA, 2 mM EDTA, pH 7.2) dreimal gewaschen. Dann wurden sie mit der Schere in kleine Teile zerschnitten und durch Behandlung im Potter-Elvehjem Homogenisator (7 maliges Auf- und Abbewegen des Teflonstempels) ein 20%iges Homogenat hergestellt. Dieses wurde anschließend zu einem 10%igen Homogenat verdünnt. Zuerst wurde durch 10 minütige Zentrifugation bei 900xg Zelltrümmer und Kerne entfernt. Aus dem

Überstand wurden in 10 min bei 9,000xg die Mitochondrien sedimentiert. Die oberste Schicht dieses Pellets, das "fluffy layer", wurde durch Abspülen mit ca. 5 ml Isolierungsmedium entfernt. Nach Resuspendieren des Pellets im gleichen Homogenisator mit der Hand wurde erneut 10 min bei 9,000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder sorgfältig resuspendiert und erneut 10 min bei 9,00 xg zur Abtrennung noch vorhandener Erythrozyten und Zellkerne zentrifugiert. Die überstehende Mitochondriensuspension wurde nach Abzentrifugation noch einmal unter den gleichen Bedingungen gewaschen.

#### 4.1.4. Rattenlebermikrosomen

Der Überstand der Mitochondrienpräparation wurde 20 min bei 15,000xg zentrifugiert, das Sediment verworfen und der Überstand 60 min bei 100,000xg in der Spinco zentrifugiert. Das Sediment wurde in die Versuche eingesetzt.

#### 4.2. Funktionszustand der Mitochondrien

Zur Kontrolle des Funktionszustandes der isolierten Mitochondrien wurden folgende Parameter gemessen: Differenzspektren der Cytochrome, Akzeptorkontrollquotienten und P/O-Quotienten (Sauerstoffelektrode). Ein Vergleich der gemessenen Werte (Rattenlebermitochondrien: P/O mit Pyruvat/Malat 2.4-2.6; Atmungskontrollquotient mit Pyruvat/Malat 4-6. Locustenmitochondrien: P/O mit Pyruvat/Malat 2.5-2.7; Atmungskontrollquotient mit Pyruvat/Malat ca. 5) mit den in der Literatur angegebenen Werten (z.B. [75,76,77]), zeigen in biochemischem Sinn intakte Mitochondrien.

#### 4.3. Incubations- und Waschprozeduren

##### 4.3.1. Incubationsmedien

Folgende Incubationsmedien wurden in den in Abbildungen und Tabellen dargestellten Experimenten verwendet:

Abb. 1: 10 mM TRA, 3 mM  $MgCl_2$ , 4 mM  $K_3PO_4$ , 2 mM ATP, 57  $\mu$ Mol 12-C-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.4  $\mu$ C/ml 14-C-Isoleucin (23.8 mC/mMol), pH 6.8, 60 min bei 23°C.

- Abb.2: 50 mM TRIS, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM ADP, 23 µMol/ml 12-C-Leucin, 50 µg/ml ASG/R (Leucin-frei), 0.5 µC/ml 14-C-1-Leucin (155 mC/mMol), pH 7.4, 60 min bei 37°C.
- Abb.3: 10 mM TRA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 2 mM EDTA, 57 µMol/ml 12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.5 µC/ml 14-C-1-Isoleucin (23.8 mC/mMol), pH 7.0, 60 min bei 23°C.
- Abb.4: Kurve A: 0.1 M KCl, 10 mM TRA, 2 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM ATP, 57 µMol/ml 12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.2 µC/ml 14-C-1-Isoleucin (9.1 mC/mMol), 60 min bei 35°C.
- Kurve B: 0.15 M Sucrose, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM KCl, 5 mM TRA, 1 mM EDTA, 57 µMol/ml 12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.4 µC/ml 14-C-1-Isoleucin (9.1 mC/mMol), 60 min bei 35°C.
- Abb.5: 0.1 M KCl, 50 mM TRIS, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM ADP, 50 µg/ml ASG/R (Leucin-frei), 0.5 µC/ml 14-C-1-Leucin (155 mC/mMOL), 60 min bei 32°C.
- Abb.6: 0.1 M KCl, 10 mM TRA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM ATP, 57 µMol/ml 12-C-1-Isoleucin, 0.2 µC/ml 14-C-1-Isoleucin (23.8 mC/mMol), pH 6.8, 60 min bei 23°C. Das in steigenden Mengen zugegebene ASG<sub>L</sub> war Isoleucin-frei.
- Abb.7: 0.1 M KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM ADP, 0.5 µC/ml 14-C-1-Leucin (155 mC/mMol), pH 7.6, 60 min bei 32°C. Das in steigenden Mengen zugegebene ASG<sub>R</sub> war Leucin-frei.
- Abb.8: 0.1 M KCl, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM ADP, 180 µg/ml ASG/R (Leucin- und Alanin-frei), 0.2 µC/ml 14-C-1-Leucin (150 mC/mMOL), pH 7.6, 60 min bei 32°C.
- Abb.9: Kurve 1: wie Abb.8, jedoch mit ASG/R Leucin- und Prolin-frei.

- Abb.10: 0.1 M KCl, 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM EDTA, 2 mM ADP, 180  $\mu\text{g/ml}$  ASG/R (Prolin-frei), 0.2  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Prolin (120 mC/mMol), pH 7.6, 60 min bei 32°C.
- Abb.11: 0.15 M Sucrose, 5 mM TRA, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 5 mM KCl, 2 mM EDTA, 57  $\mu\text{Mol}$  12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 1  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Isoleucin (9.1 mC/mMol), pH 7.0, 35°C.
- Abb.12: wie Abb.8, jedoch mit ASG/R Leucin-frei.
- Abb.13: 0.1 M Sucrose, 10 mM TRA, 5 mM  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 8 mM KCl, 2 mM EDTA, 3.5 mM ATP, 57  $\mu\text{Mol/ml}$  12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.4  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Isoleucin (9.1 mC/mMol), pH 7.0, 60 min bei 23°C.
- Abb.14: 0.1 M KCl, 50 mM TRIS, 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 2 mM ADP, 50  $\mu\text{g/ml}$  ASG/R (Leucin-frei), 0.5  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Leucin (155 mC/mMol), pH 7.3, 60 min bei 32°C.
- Abb.15: 0.1 M Sucrose, 10 mM TRA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8 mM KCl, 2 mM EDTA, 4.3 mM ATP, 114  $\mu\text{Mol/ml}$  12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.4  $\mu\text{C}$  14-C-1-Isoleucin (9.1 mC/mMol), pH 6.8, 60 min bei 23°C.
- Abb.16: 50 mM KCl, 50 mM TRIS, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 2 mM ADP, 50  $\mu\text{g/ml}$  ASG/R (Leucin-frei), 0.5  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Leucin (150 mC/mMol), pH 7.4, 60 min bei 32°C.
- Abb.17: 0.1 M KCl, 10 mM TRA, 9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 2 mM EDTA, 57  $\mu\text{Mol/ml}$  12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.4  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Isoleucin (9.2 mC/mMol), pH 7.0, 60 min bei 23°C.
- Abb.18: 0.1 M KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM EDTA, 180  $\mu\text{g/ml}$  ASG/R (Phhenylalanin-frei), 0.2  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Phenylalanin (368 mC/mMol), pH 7.6, 40 min bei 32°C.
- Abb.19: 0.1 M KCl, 20 mM TRA, 2 mM EDTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.2  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Isoleucin (234 mC/mMol), pH 6.8, 40 min bei 30°C.

Abb.20: 0.1 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 180 µg/ml ASG/R (Leucin-frei), 0.2 µC/ml 14-C-1-Leucin (150 mC/mMol), pH 7.6, 40 min bei 32°C.

Abb.21: 1.Locustenmitochondrien: wie Abb.19 + 2 mM ADP.  
2. Rattenlebermitochondrien: wie Abb.20 + 2 mM ADP.

Abb 22: wie Abb. 21/2.

Abb.23: siehe 4.4.

Abb.24: 0.1 M KCl, 10 mM TRA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM ATP, 57 µMol/ml 12-C-1-Isoleucin, 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.2 µC/ml 14-C-1-Isoleucin (9.2 mC/mMol), pH 6.8, 60 min bei 23°C.

Abb. 26: wie Abb.22

Abb.27: wie Abb.22

Abb.28: wie Abb.22

Abb.29: wie Abb.24

Abb.30: wie Abb.22

Die Ansätze enthielten jeweils 2.0 mg Mitochondrienprotein und, wenn angegeben, 10<sup>7</sup> Bakterien, die auf Standardagar aus einer Rattenlebermitochondriensuspension gezüchtet worden waren.

Tab.3: 0.1 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM ADP, 0.2 µC/ml 14-C-1-Leucin (155 mC/mMol), pH 7.6, 32°C.

Tab.4: 0.1 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM ADP, 0.2 µC/ml 14-C-1-Prolin (120 mC/mMol), pH 7.6, 32°C.

Tab.5: Rattenlebermitochondrien: 0.1 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM ADP, pH 7.6, 32°C, 180 µg/ml ASG/R (jeweils frei von der betreffenden Aminosäure, deren Einbau gemessen wurde). Spezifische Radioaktivitäten der eingebauten 14-C-1-Aminosäuren in mC/mMol: leu 229; ileu 234; phe 368; pro 120; ser 87.4; arg 155; asp 148.4; glu 208.5.

Zur Bestimmung der  $\mu\text{Mol}$  eingebauten Aminosäuren/mg Protein/h wurden Sättigungskurven durch Zusatz der betreffenden 14-C-Aminosäure gemessen und daraus auf die eingebauten  $\mu\text{Mol}$  umgerechnet.

- 2) Locustenmitochondrien: 0.1 M KCl, 20 mM TRA, 2 mM EDTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM ADP, 1.6 mg/ml ASG/L, pH 6.8, 30°C. Andere Bedingungen und spezifische Radioaktivitäten der 14-C-1-Aminosäuren wie unter 1).

Tab.6: 1) Rattenlebermitochondrien: 0.1 M KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM EDTA, 180  $\mu\text{g/ml}$  ASG/R (Leucin-frei), 0.2  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Leucin (229 mC/mMol), 40 min bei 32°C.

- 2) Locustenmitochondrien: 0.1 M KCl, 20 mM TRA, 2 mM EDTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.6 mg/ml ASG/L (Isoleucin-frei), 0.2  $\mu\text{C/ml}$  14-C-1-Isoleucin (234 mC/mMol), 40 min bei 30°C.

Tab.7: wie Tab.6 Rattenleber- und Locustenmitochondrien +2 mM ADP.

Tab.8: wie Tab.7

Tab.9: wie Abb.20

Tab.10: wie Abb.22

Die Ansätze enthielten jeweils 2.1 mg Mitochondrienprotein/ml und wenn angegeben, ca.  $10^6$  Bakterien, die auf Standardagar aus einer Rattenlebermitochondriensuspension gezüchtet worden waren.

In sämtlichen Einbauversuchen waren 2-4 mg Mitochondrienprotein/ml Incubationsmedium anwesend.

#### 4.3.2. Durchführung der Incubation

Das Sediment der letzten Waschung der Mitochondrien wurde sofort im jeweiligen Incubationsmedium aufgenommen und im Potter-Elvehjem-Homogenisator mit der Hand sorgfältig resuspendiert. Die Proben wurden zu je 1 ml mit jeweils 1.5-3.0 mg/ml Mitochondrienprotein in 10 ml Spinco

Zentrifugenbechern in einem Thermostaten unter Schütteln incubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Proben in 1.7 ml fassende Zentrifugenbecher (Netheler & Hinz) übergeführt, ca. 0.1 ml einer gesättigten Lösung derjenigen Aminosäure(n) zugefügt, die radioaktiv im Incubationsmedium vorhanden waren und anschließend mit 0.5 ml 16%iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt.

#### 4.3.3. Waschung der gefällten Mitochondrien

Das ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation in einer 12 Proben fassenden Tischzentrifuge innerhalb von 1 min niedergeschlagen. Dieser Niederschlag wurde durch sorgfältiges Resuspendieren in 1.3 ml 5%iger TCA und 0.1 ml gesättigter Träger-Aminosäurelösung und anschließende Zentrifugation 4 mal gewaschen. Dann wurde das Sediment in derselben Waschlösung 10 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt und nach abzentrifugation noch einmal mit kalter TCA gewaschen. Die Proben wurden 2 mal mit Äthanol/Äther 3:1 (v/v) und abschließend 1 mal mit reinem Äther gewaschen. Die Tab. 18 gibt Auskunft über die Effektivität der Waschprozedur.

	Ipm im Überstand		Ipm im Überstand
Incubations-Überstand	560 000	5. 95°C TCA Überstand	30
1. TCA Überstand	1 504	6. TCA Überstand	--
2. TCA Überstand	50	1. Äth./Äther	210
3. TCA Überstand	13	2. Äth./Äther	2
4. TCA Überstand	0	3. Äther	0

Tab.18. Wirksamkeit der Waschprozedur. Kontrolle der ausgewaschenen Radioaktivität. Im Incubationsmedium waren 0.5 µC/Ansatz 14-C-1-Isoleucin anwesend.



Zur fortlaufenden Kontrolle der Wirksamkeit der Waschprozedur wurden in allen Experimenten Null-Zeit-Proben mitbestimmt. Dazu wurde die Reaktion unmittelbar nach Zugabe der Radioaktivität gestoppt. Stets wurden zwischen 6-20 Ipm/mg Protein gezählt, wenn im Incubationsmedium  $2 \cdot 10^5$  -  $10^6$  Ipm anwesend waren.

#### 4.4. In vivo Markierung von Locusten

Den Locusten wurde zu den angegebenen Zeiten pro Tier  $0.3 \mu\text{C}$  14-C-1-Isoleucin ( $9.1 \text{mC/mMol}$ ) verabreicht. Die Radioaktivität wurde in Ringerlösung ( $0.154 \text{ M NaCl}$ ,  $2.7 \text{ mM KCl}$ ,  $1.8 \text{ mM CaCl}_2$ , pH 7.0) in einem Volumen von  $30 \mu\text{l}$  den Tieren mit einer AGLA Spritze mit Mikrometerantrieb ins Abdomen injiziert. Dann wurden die Tiere 24 Stunden bei Zuchtbedingungen [78] ohne Futter gehalten.

#### 4.5. Fraktionierungsmethoden

##### 4.5.1. Fraktionierte Extraktion [79] nach in vitro Markierung

Nach der Incubation wurden die Proben gesammelt, mit etwa dem  $10^3$  fachen Überschuß an Träger-Aminosäure versetzt und 15 min bei  $20,000\text{g}$  zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Protein ("ins Incubationsmedium übergehendes Protein") wurde durch Zugabe eines halben Volumens 16%iger TCA gefällt. Das Sediment wurde in 5 ml  $0.1 \text{ M}$  Phosphatpuffer, pH 7.2, resuspendiert und unter Eiskühlung im Falle der Locustenmitochondrien  $4 \times 30 \text{ sec}$  mit dem Ultraturrax, im Falle der Rattenlebermitochondrien  $3 \times 10 \text{ sec}$  mit dem Sonifier (Modell Branson, Stufe 7) behandelt. Danach wurde bei  $0^\circ\text{C}$  noch 30 min mit dem Magnetrührer gerührt. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei  $100,000\text{g}$  wurde das im resultierenden Überstand vorhandene Protein ("extrahierbares Protein") mit einem halben Volumen 16%iger TCA gefällt, ebenso wurde das Sediment nach Resuspendieren in 5 ml Phosphatpuffer gefällt ("unlösliches Protein"). Alle erhaltenen Fraktionen wurden wie oben beschrieben gewaschen.

#### 4.5.2. Fraktionierung nach in vivo Markierung von Locusten

Die Flugmuskeln der in vivo mit radioaktivem Isoleucin markierten Locusten wurden wie unter 4.1.1. beschrieben homogenisiert und daraus die Mitochondrien isoliert. Die weitere Fraktionierung der Mitochondrien erfolgte mit dem Ultraturax nach der unter 4.5.1. beschriebenen Methode. Der Überstand der Mitochondrienpräparation wurde einer 60 min/100,000xg Zentrifugation unterworfen und aus dem resultierenden Überstand das "c-Protein" mit Perchlorsäure von einer Endkonzentration von 5% ausgefällt. Die Waschung der Fraktionen wurde nach 4.3.3. durchgeführt.

#### 4.5.3. Trennung von innerer und äußerer Membran von Rattenlebermitochondrien

"Swelling-shrinking" Verfahren. Mitochondrien aus drei Rattenlebern (ca. 27g) wurden nach 4.1.3. isoliert. Im Unterschied zu der dort beschriebenen Methode wurde 0.02% Rinder-Serum-Albumin (SMA) dem Isolierungsmedium zugefügt. Das Sediment der letzten Waschung wurde in 30 ml Incubationsmedium resuspendiert und zu 30 Proben mit jeweils ca. 4 mg/ml Biuretprotein 40 min bei 32°C unter Schütteln incubiert. Nach der Incubation wurden die Proben gesammelt und mit 50 ml SMA, das 16 mM an der Aminosäure war, die radioaktiv im Incubationsmedium anwesend war, verdünnt. Dann wurde 20 min bei 35,000xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 60 ml 20 mM Phosphatpuffer mit 0.02% SMA, pH 7.2, resuspendiert und 10 min bei 0°C mit Magnetrührer gerührt. Danach wurden 20 ml 60%iger Sucrose mit 8 mM ATP unter Rühren zugesetzt und weitere 10 min bei 0°C gerührt. Darauf erfolgte eine Zentrifugation von 20 min bei 35,000xg. Das Sediment wurde in 80 ml SMA aufgenommen und 15 min bei 1,900xg zentrifugiert. Das Pellet stellt die Fraktion S ("low speed pellet") dar. Der Überstand wurde wiederum 20 min bei 35,000xg zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation (Fraktion LM) wurde in 10 ml SMA aufgenommen und auf einen diskontinuierlichen Gradienten geschichtet, der aus den folgenden drei Schichten von jeweils 15 ml aufgebaut war: 51.3%ige, 37.7%ige und 25.2%ige Sucrose mit 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 2 mM EDTA, pH 7.2.

Die Proben wurden 60 min bei 25,000 Upm (75,500xg) im Rotor SW 25.2 der Spinco L2 zentrifugiert. Zwei Banden wurden erhalten: eine an der Grenzfläche zwischen 25.2%iger und 37.7%iger Sucrose (Fraktion LI) und eine zwischen 37.7%iger und 51.3%iger Sucrose (Fraktion LII), des weiteren ein Pellet am Boden des Zentrifugenbeckers (Fraktion LIII). Die beiden Banden wurden geerntet, indem der Zentrifugenbecher von unten mit konzentrierter Sucrose gefüllt wurde und die Schichten oben fraktioniert abgehoben wurden. Die vom Gradienten gewonnenen Suspensionen (jeweils ca. 5 ml) wurden zur Hälfte mit Wasser verdünnt und durch Zentrifugation für 20 min bei 100,000xg sedimentiert. Sämtliche erhaltenen Fraktionen wurden in 0.1 M Phosphatpuffer aufgenommen. Die erhaltenen Suspensionen dienten als Ausgangsmaterial für Enzymaktivitäts-, Protein-, RNA- und Radioaktivitätsbestimmungen.

In denjenigen Experimenten, in denen die mitochondrialen Fraktionen nach Trennung mit radioaktivem Leucin incubiert wurden, wurde im Prinzip gleich verfahren, nur mit dem Unterschied, daß das Sediment der letzten Waschung der Mitochondrienpräparation der Trennung unterworfen wurde, und daß die resultierenden Pellets der einzelnen Fraktionen im Incubationsmedium resuspendiert wurden.

Zur Weiterfraktionierung des "low speed pellets" S wurde dieses in 10 ml SMA aufgenommen und in gleicher Weise wie LM über den beschriebenen Dichtegradienten geschickt. Dabei ergaben sich zwei Fraktionen: eine Bande am Übergang von 37.7%iger zu 51.3%iger Sucrose (Fraktion SII) und ein Pellet am Boden des Zentrifugenbeckers (Fraktion SIII).

In gleicher Weise wurden die Mikrosomenfraktionen bereitet. Die nach 4.1.4. hergestellte Mikrosomenpräparation wurde über den beschriebenen Dichtegradienten geschickt und zwei Fraktionen geerntet: Fraktion McI am Übergang von 25.2%iger zu 37.7%iger Sucrose und Fraktion McII am Übergang von 37.7%iger zu 51.3%iger Sucrose.

Digitonin Methode. Mitochondrien von 2 Rattenlebern (ca. 18g) wurden den gleichen Einbaubedingungen unterworfen, wie beim "Swelling-shrinking" Verfahren beschrieben und auch in gleicher Weise mit Träger-Aminosäure-haltigem SMA gewaschen. Das Sediment dieser waschung wurde in 1 ml SM homogenisiert und 1 ml Digitoninlösung zugesetzt. Die Konzentration dieser Digitoninlösung war so berechnet, daß auf 10 mg Mitochondrienprotein 1.0-1.1 mg Digitonin (1 mal umkristallisiert) traf. Eine 2%ige Digitonin-Stammlösung wurde durch Sonifien in ca. 60°C warmen SM hergestellt, dann gekühlt und so verdünnt, daß die benötigte Digitoninmenge in 1 ml vorhanden war. Nach Zufügen der Digitoninlösung blieb die Mitochondriensuspension 20 min bei 0°C stehen. Dann wurden 18 ml SM zugegeben. Diese Suspension wurde 10 min bei 9,500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Sediment ("9,500xg Pellet") getrennt und 20 min bei 35,000xg zentrifugiert. Das Sediment ist das "35,000xg Pellet". Der Überstand wurde 60 min bei 144,000xg im Titan-Rotor 50 in der Spinco L2 zentrifugiert: "144,000xg Pellet". Sämtliche Pellets wurden zu einer Proteinkonzentration von 2-4 mg/ml in 0.1 M Phosphatpuffer aufgenommen.

#### 4.5.4. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Elektrophorese der einzelnen Fraktionen des "Swelling-shrinking" Verfahrens wurden diese dem von SEBALD [22] beschriebenen Extraktionsverfahren zur Entfernung löslicher Proteine und der Phospholipide unterworfen und nach Auflösung in Phenol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 1:1:1 (v:v:v) in 10%igem Polyacrylamidgel nach der Methode von SEBALD elektrophoretisiert und die erhaltenen Banden mit Amidoschwarz angefärbt.

#### 4.6. Bestimmungsmethoden

##### 4.6.1. Protein

Proteinbestimmungen wurden nach der Biuretmethode in der Modifikation von BEISENHERZ et al. [80] durchgeführt.

#### 4.6.2. RNA

Die Bestimmung mitochondrialer und mikrosomaler RNA wurde mit der Orcin-Reaktion nach der Methode von VOLKIN et al. [81] ausgeführt. Eichkurven wurden mit Hefe-RNA erstellt.

#### 4.6.3. Enzymbestimmungen

Succinat-Cytochrom c Reduktase (SDH). Die Bestimmung wurde nach ARRIGONI et al. [82] in folgendem Testmedium vorgenommen: 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, 1 mM EDTA, 1 mM KCN, 0.1 mM Cytochrom c, 0.15 mM Phenazinmethosulfat, 25 mM Succinat, pH 7.6. Die Reduktion des Cytochrom c wurde bei 550 m $\mu$  in einem registrierenden Spektrophotometer verfolgt, indem gegen eine Referenzküvette gemessen wurde, die kein Substrat enthielt.

NADPH-Cytochrom c Reduktase. Die Bestimmung wurde im gleichen Medium wie der SDH Test vorgenommen. Substrat war hier 0.1 mM NADPH.

Cytochromoxidase. Photometrisch nach SOTTOCASA et al. [71], indem die Oxidation von reduziertem Cytochrom c bei 550 m $\mu$  registriert wurde. Testzusammensetzung: 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, 0.055 mM reduziertes Cytochrom c. Die Vergleichsküvette enthielt weiterhin 1 mM KCN. Die Reduktion von käuflichem Cytochrom c wurde nach den Angaben von SOTTOCASA et al. mit NaBH<sub>4</sub> vorgenommen.

Monoaminoxidase (MAO). Nach der Methode von TABOR et al. [83] wurde bei 250 m $\mu$  die Oxidation von Benzylamin zu Benzaldehyd verfolgt. Testzusammensetzung: 50 mM Kaliumphosphatpuffer, 5 mM Benzylammoniumchlorid, pH 7.6. Die Referenzküvette enthielt kein Substrat. Gemessen wurde im Extinktionsbereich 0.5-1.5.

Kynurenin-3'-Hydroxylase wurde nach der Methode von SAITO et al. [84] bestimmt.

Prolinoxidase. In einer Modifikation nach JOHNSON et al. [42] wurden aus Testansätzen von 2.0 ml (0.05 M Phosphatpuffer, 100 mM Prolin, ca. 1 mg/ml Mitochondrienprotein) zu den Zeiten 0, 10 und 20 min jeweils 0.5 ml entnommen (Incubation im offenen Gefäß, 37°C), und mit 0.5 ml Farbstoffreagens (5% TCA und 0.5% o-Aminobenzaldehyd in abs. Äthanol) in

1.7 ml Zentrifugenbechern versetzt. Die Proben wurden zur Farbentwicklung 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann abzentrifugiert und die Extinktion bei 430 m $\mu$  gegen den Nullwert gemessen.

Malatdehydrogenase (MDH) und Glutamatdehydrogenase (GluDH) wurden nach BÜCHER et al. [85] gemessen.

#### 4.6.4. Bestimmung der freien Aminosäuren

Mitochondrien wurden zu einer Konzentration von ca. 20 mg/ml Wasser (Biuretprotein) suspendiert und 3 mal 10 sec mit dem Sonifier behandelt. Dann wurde mit dem halben Volumen 15%iger Perchlorsäure gefällt, 10 min bei 5,000xg zentrifugiert und das Sediment zweimal mit 1 ml 5%iger Perchlorsäure extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 2 M KOH neutralisiert und das ausgefallene Kaliumperchlorat durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde auf einen im nanoMol-Maßstab arbeitenden Aminosäuren-Analysator zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren aufgetragen.

#### 4.6.5. Endgruppenbestimmung nach SANGER [86]

2.3 mg unter den Bedingungen von Abb. 22 mit radioaktivem Leucin markiertes mitochondriales Protein wurde nach Fällung, Waschung und Trocknung mit 0.4 ml Bicarbonatpuffer, pH 8.0, 0.2 ml abs. Äthanol und 0.04 ml Fluordinitrobenzol versetzt. Die Suspension wurde 2.5 h bei 40°C heftig geschüttelt, dann mit 1 ml Aceton versetzt, abzentrifugiert und der Niederschlag 6 mal mit Aceton gewaschen. Dann wurde 3 mal mit Wasser, nochmal mit Aceton und zweimal mit Äther gewaschen. Das trockene Pulver wurde unter N<sub>2</sub> mit 0.25 ml 6N HCl in ein Reagensglas eingeschmolzen und 12 h bei 110°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 4 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt. Dann wurde 5 mal mit 3 ml Äther extrahiert, der Äther wiederum mit 4 mal 2 ml 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> Lösung. Diese wurde mit 6 N HCl angesäuert und 5 mal mit 3 ml Äther extrahiert. Der Rückstand des Ätherextraktes wurde auf Plättchen gebracht und die Radioaktivität bestimmt.

#### 4.6.6. Hydrolyse von markiertem Mitochondrienprotein und anschließende Chromatographie

Unter den Bedingungen von Abb. 19 markiertes Locusten-Mitochondrienprotein (2.1 mg) wurde in einem zugeschmolzenen Reagensglas unter  $N_2$  24 h bei  $110^\circ C$  in 6 M HCl hydrolysiert. Nach Öffnen des Reagensglases wurde die überstehende Flüssigkeit im Vakuum abgezogen und der Rückstand durch einstündiges Überleiten von Luft getrocknet. Dieser wurde in 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen und mit 3 N NaOH neutralisiert. Von dieser Lösung wurden 20  $\mu$ l auf Whatman No.1 Papier aufgebracht und eine zweidimensionale Chromatographie vorgenommen. 1. Laufrichtung: 90%iges Phenol, 2. Laufrichtung: 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5. Das Chromatogramm wurde nach Trocknung mit Ninhydrin angefärbt und in Streifen zerschnitten, die im Papier-Radiochromatographen ausgezählt wurden.

#### 4.6.7. Radioaktivitätsmessung

Die nach der Ätherwaschung lufttrockenen Proben wurden in 0.5 ml Ameisensäure gelöst und unter Nachspülung mit weiteren 0.5 ml Ameisensäure auf Aluminiumplättchen gebracht, die Ameisensäure unter ein IR-Lampe verdunstet und die Plättchen im Methandurchflußzähler mit einer Ausbeute von ca. 50% gezählt.

#### 4.7. Verwendete Materialien und Apparate

##### 4.7.1. Materialien

Radioaktive Aminosäuren: New England Nuclear Corporation Boston und Radiochemical Centre Amersham. Sucrose p.I., Lösungsmittel und Salze p.A: Merck AG. Darmstadt. PK, HK, RNASE, Cytochrom c, Succinat, Pyruvat, PEP,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Malat, Oxalacetat,  $\alpha$ -Glycerophosphat, ATP, ADP, AMP, CTP, GTP, UTP: Boehringer, Mannheim. Phospholipase A, Puromycin, Chloramphenicol: Sigma Chem. Comp., St. Louis. Oligomycin A, Triton X 100, Standardagar: Serva GmbH., Heidelberg. 12-C-1-Aminosäuren, Benzylaminhydrochlorid, o-Aminobenzaldehyd: Fluka GmbH. Buchs. Actinomycin D: Merck, Scharp und Dohm, Lab. Rahway. Andere Antibiotika: Bayer, Leverkusen.

Rinder-Serum-Albumin: Behring Werke, Marburg.

Ratten: Stamm Wistar II beiderlei Geschlechts, Tierzuchterei Brünger, Bokel. Ratten wurden in den hyperthyreoten Status überführt, indem 8 Tage lang 200 µg/Tier/Tag Trijodthyronin intraperitoneal gespritzt wurde. Am 9. Tag wurden aus den Lebern die Mitochondrien isoliert.

Locusten (*Locusta migratoria*) wurden vom Anti-Locust-Research-Centre, London, zur Verfügung gestellt und nach den Angaben von HUNTER-JONES [78] gezüchtet.

#### 4.7.2. Apparate

Chromatographie-Papierstreifen-zähler FH 407, Methan-Durchflußzähler FH 47, Fa. Friesseke-Hoepfner. Ultrazentrifugen Spinco L50 und L2, Fa. Beckman Instr. Kühlzentrifuge RC2 Servall, Fa. I. Sorvall. Spektrophotometer DK 1A, Fa. Beckman Instr. Knick-pH-Meter. Registrierendes Photometer Eppendorf, Fa. Netheler und Hinz. Sonifier S 75, Fa. Branson. Ultraturrax TP 18/2, Fa. Jahnke & Kunkel.



## 5. Diskussion

1) Die Fähigkeit der Mitochondrien zu einer eigenständigen Proteinbiosynthese wird sowohl durch direkte Versuche über den Einbau von radioaktiven Aminosäuren in isolierte Mitochondrien, als auch durch zahlreiche indirekte Argumente, wie die Existenz mitochondrialer DNA, mitochondrialer Ribosomen, mitochondrialer transfer-RNA sowie der zugehörigen Enzyme der Proteinbiosynthese mit großer Wahrscheinlichkeit dargestellt (siehe Einleitung). Weitere Hinweise für die Fähigkeit der Mitochondrien zu dieser Syntheseleistung liefern genetische Beobachtungen über eine cytoplasmatische Vererbung, d.h. eine außerhalb des Kerns niedergelegte genetische Information, deren Expression durch eine mitochondriale Proteinbiosynthese eine annehmbare Erklärung findet. (Zu einer zusammenfassenden Darstellung siehe [87].)

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Existenz eines spezifischen Aminosäureeinbaus in isolierte Mitochondrien, die im Verlauf der letzten 5-6 Jahre in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben wurde. Sie lassen in den Details jedoch Unterschiede erkennen. Sie fügen neue Aspekte hinsichtlich der biologischen Signifikanz dieses in vitro Prozesses hinzu und liefern Ansätze zu einer in vitro Verfolgung des biogenetischen Schicksals von Untereinheiten der mitochondrialen Struktur.

2) Die Gegenüberstellung im Proteinsyntheseverhalten der beiden Extremtypen mitochondrialer Organisation, Locustenflugmuskelmitochondrien und Rattenlebermitochondrien, läßt auf prinzipielles Gleichverhalten schließen und trägt zu der Berechtigung bei, von einer mitochondrialen Proteinbiosynthese schlechthin sprechen zu dürfen.

In diesem Abschnitt sei ein kritischer Vergleich der in dieser Arbeit festgestellten Eigenschaften und Bedingungen des Einbaus mit den in der Literatur beschriebenen Systemen angestellt. Wir beschränken uns hier auf die bislang als wesentlich erscheinenden Faktoren.

Einen entscheidenden Einfluß auf das Ausmaß und die Bedingungen des Einbaus von Aminosäuren haben offensichtlich die Permeabilitätszustände der Membranen der isolierten Mitochondrien. Diese stellen einerseits eine Funktion der im Incubationsmedium vorhandenen Substanzen dar (KCl, Sucrose, Phosphationen), andererseits sind die Konzentrationen intramitochondrialer Substanzen beeinflusst durch die Permeabilitätszustände ( $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $PO_4^{3-}$ , oxidierbare Substrate, Aminosäuren). Hieraus läßt sich verstehen, daß von System zu System unterschiedliche Erfordernisse und unterschiedliche Optimalkonzentrationen der einzelnen Variablen zu beobachten sind. Die Permeabilitätsverhältnisse variieren innerhalb einer Mitochondrienspezies infolge unterschiedlicher Disposition der Mitochondrien in situ und vor allem infolge unterschiedlicher Präparationsbedingungen der Mitochondrien. Sie variieren zwischen einzelnen Mitochondrienspezies infolge unterschiedlicher Struktur und Funktion der Membranen. Von genereller Natur scheint jedoch das Erfordernis für  $Mg^{++}$  und  $PO_4^{3-}$  Ionen zu sein, deren Wirkung im experimentellen Teil bereits diskutiert wurde.

Ein widersprüchliches Kapitel bilden die Untersuchungen über die Energieversorgung des Einbaus in den verschiedenen bis jetzt erschienen Arbeiten. In den hier dargelegten Experimenten wurde gefunden, daß endogenes ATP die wirkungsvollste Energiequelle für den Einbau darstellt, daß aber auch - im Falle der Rattenlebermitochondrien - exogenes ATP, das die mitochondrialen Membranen passieren kann, in der Lage ist, den Einbau anzutreiben. Dies steht in Widerspruch zu den Ergebnissen und zu der Interpretation von WHEELDON et al. [44], die auf eine ausschließliche und direkte, im Vergleich zu endogenem ATP größere Wirksamkeit von exogenem ATP schlossen. Die von diesen Autoren gefundene Ribonuclease-Empfindlichkeit ihres Einbausystems mag einerseits zu einem sorgfältigeren Ausschluß mikrosomaler Verunreinigungen Anlaß geben (siehe auch [54]), andererseits vermag eine eventuelle erhöhte Schädigung und Permeabilität der verwendeten Mitochondrien beide Beobachtungen gleichzeitig zu erklären. Die von ROODYN [55] und von KROON [60] beobachtete Unwirksamkeit

von exogenem ATP im Rattenlebermitochondriensystem könnte durch Verschiedenheit der Mitochondrienquellen und Präparationsbedingungen verursachte Verschiedenheit der mitochondrialen ATPase Aktivität widerspiegeln. Weiterhin kann diese Arbeit, wie auch [44], die von BRONK [88] und von KROON [49] geäußerte Vermutung nicht bestätigen, daß sogenannte "high energy intermediates" den Einbau antreiben können. Ein weiterer Grund für diese beobachteten Verschiedenheiten scheinen die unterschiedlichen Syntheseraten der einzelnen beschriebenen Systeme darzustellen, die in den zu vergleichenden Arbeiten zum Teil ganz erheblich (bis zum Faktor 100) unter den in dieser Arbeit gefundenen Werten liegen.

Ganz besonders kommt dieser Effekt zum Tragen beim Studium der Aminosäurenbedürfnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Aspekt der Biogenese an Rattenlebermitochondrien systematisch ausgearbeitet. Die Resultate sind bereits im Ergebnis-Teil analysiert worden. Vergleichbare Untersuchungen liegen bislang in der Literatur noch nicht vor.

Entscheidende Widersprüche bestehen auch hinsichtlich des Einbaus in mitochondriale Subfraktionen. Während in dieser Untersuchung ein nahezu vollständiger Verlust der Einbaufähigkeit mitochondrialer Subfraktionen gefunden wurde, bzw. ein stattfindender Einbau auf begleitende Bakterien zurückgeführt werden konnte, wurde von anderen Autoren ein Einbau in solche Fraktionen beschrieben [10,89]. In diesen Arbeiten wurde jedoch nicht die Möglichkeit bakterieller Kontamination überprüft und die erhöhte Gefahr bakteriellen Einbaus in diesen Fraktionen nicht berücksichtigt. Weiterhin sind die extrem erhöhten Einbauraten [10], besonders angesichts des Vorhandenseins lysosomaler und mitochondrialer Ribonucleasen [90,91], unwahrscheinlich. Wir möchten daraus schließen, daß diese Experimente einer weiteren Prüfung bedürfen.

3) Die in der Literatur beschriebenen, verglichen mit den in vivo errechenbaren meist minimalen Syntheseraten (s.o.) zwingen zu einer kritischen Auseinandersetzung mit der biologischen Signifikanz des in vitro beobachtbaren Einbaus von Aminosäuren. Die in dieser Arbeit verwendeten Locusten boten, im Anschluß an die Untersuchungen von BROSEMER et al. [8],

die Möglichkeit zu einer Gegenüberstellung der Syntheseraten in vivo und in vitro, und zwar hinsichtlich des Verlaufs in der Entwicklung der Locusten, als auch hinsichtlich der Größe. Es mag als deutlicher Hinweis auf die Bedeutung des an isolierten Mitochondrien gemessenen Einbaus gelten, daß er die Syntheseaktivität der Mitochondrien in der Zelle widerspiegelt (Abb. 24), und daß die in vitro Syntheserate vergleichbar mit der in vivo Syntheserate gefunden wird (Abschnitt 3.6.). Auch für Rattenlebermitochondrien konnte letzterer Zusammenhang nachgewiesen werden. Wie der 2-3fach höhere Einbau in Rattenlebermitochondrien ohne Außenmembran verglichen mit ganzen Mitochondrien anzeigt, kann durch geeignete Präparationsmaßnahmen die in vitro Rate der in vivo Rate noch weiter angenähert werden.

4) In Übereinstimmung mit den auf ähnlichen Methoden beruhenden Untersuchungen von RODAN [5] (Rattenleber) und von TRUMAN [92] sowie von WINTERSBERGER [59] (Hefe) konnte innerhalb der Fehlergrenzen der Methode alle eingebaute Radioaktivität in den unlöslichen Membranproteinen lokalisiert werden (Rattenleber und Locusten). Nun muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß unter den in vitro Bedingungen eine Ablösung der Peptidketten von den mitochondrialen Ribosomen nicht stattfindet, und dadurch die Bildung ausschließlich strukturgebundener Proteine nur vorgetäuscht wird.

Dies würde jedoch einen organisatorischen Unterschied zum cytoplasmatisch- und bakteriell-ribosomalen Mechanismus implizieren, der angesichts der Ähnlichkeiten in der Wirkung von Hemmern der Proteinbiosynthese auf beide System geringe Wahrscheinlichkeit besitzt. Weiterhin kann man schließen, daß die mitochondriale DNA in Anbetracht ihres relativ bescheidenen Informationsgehaltes (15,000 Basenpaare) nicht in der Lage ist, sämtliche mitochondrialen Proteine zu codieren. Dieser Schluß gilt mit der Voraussetzung, daß die mitochondriale DNA die mitochondriale Proteinbiosynthese lenkt. Dafür wiederum gibt es Hinweise durch die Wirkung von Proteinbiosyntheseinhibitoren, ferner auch durch genetisch-biochemische Beobachtungen: In den in ihrer Struktur und Funktion gegenüber dem Wildtyp veränderten Mitochondrien von "petites

colonies" Mutanten der Bäckerhefe [23] und von "poky" Mutanten von *Neurospora crassa* [15] liegt eine veränderte DNA vor. Weiter gibt es direkte Argumente für die Lokalisation des Syntheseortes von Cytochrom c in der mikrosomalen Fraktion [21,93] und Hinweise auf die Lokalisation des Strukturgens des Cytochrom c in der Kern-DNA [94]. An Rattenlebermitochondrien wurde ferner gefunden, daß die in der mitochondrialen Struktur verankerten Enzyme Cytochrom a und Succinatdehydrogenase nach in vitro Einbau von radioaktiven Aminosäuren nicht markiert waren [93].

Alle diese Befunde legen die Hypothese nahe, daß das mitochondriale Proteinsynthesystem für ein oder mehrere mitochondriale "Strukturproteine" verantwortlich ist, welche die vom cytoplasmatisch-ribosomalen System gebildeten Enzyme binden und so die Basis für den Aufbau der Multienzymsysteme der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung darstellen. Die Enzymdefekte in den Mitochondrien cytoplasmatischer Mutanten mögen dann auf einem oder mehreren, durch eine mutierte mitochondriale DNA verursachten, defekten "Strukturproteinen" mit veränderten Bindungseigenschaften beruhen.

Allerdings muß bemerkt werden, daß eine Verwendung des Ausdruckes "Strukturprotein" im Sinne von GREEN [67,68] experimentell problematisch ist. Wie bereits erwähnt (Abschnitt 3.7.1.), erweist sich dieses GREEN'sche "Strukturprotein" in der Polyacrylamidgelelektrophorese nicht als einheitliche Substanz. Angesichts der unzulänglichen Charakterisierung der unlöslichen mitochondrialen Membranproteine soll jedoch auf die Bildung neuer Begriffe verzichtet werden.

Auf Grund der vorliegenden Kenntnisse kann allerdings die Synthese von (wenigen) löslichen oder unlöslichen Enzymen durch das mitochondriale Proteinbiosynthesystem nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise sind die Mitochondrien auch an der Ausbildung funktionsfähiger Enzyme beteiligt, da in ihnen z.B. die Ferrochelatase lokalisiert ist [95], also ein Enzym der Synthese der Häm-Gruppe, der prosthetischen Gruppe zahlreicher mitochondrialer Enzyme, und zwar in der Innenmembran der Mitochondrien [96]. Somit wäre beispiels-

weise nicht ausgeschlossen, daß eine Fertigstellung der mitochondrialen Cytochrome erst am Ort ihrer Einfügung in die mitochondriale Membran erfolgt.

5) Mitochondrien ohne Außenmembran zeigen eine höhere Einbauaktivität als ganze Mitochondrien. Die isolierte Außenmembran kann keine Aminosäuren einbauen. Ganze Mitochondrien inkorporieren radioaktive Aminosäuren nur in ihre Innenmembran. Außen- und Innenmembran der Mitochondrien scheinen demnach ein verschiedenes biogenetisches Schicksal zu haben. Im Einklang mit dieser Lokalisation der Einbauaktivität und des Einbauproduktes in der Innenmembran steht die Beobachtung von CLARK-WALKER et al. [97], daß in Glucose-reprimierten Hefezellen Chloramphenicol, das die Proteinsynthese in den isolierten Mitochondrien hemmt, nur die Ausbildung der Innenmembran unterdrückt, nicht aber die der mitochondrialen Außenmembran. Möglicherweise ist also für die Synthese der mitochondrialen Außenmembran das cytoplasmatisch-ribosomale Proteinsynthesystem verantwortlich oder die mitochondriale Außenmembran stammt sogar vom endoplasmatischen Retikulum ab. Diese Hypothese wiederum wird stark durch Experimente von PARSONS et al. [70] und SOTTOCASA et al. [71] gestützt, in denen auf Grund eines Vergleichs der enzymatischen Ausstattung von mitochondrialer Außenmembran, mitochondrialer Innenmembran und endoplasmatischem Retikulum und auf Grund eines Vergleichs des Vorkommens verschiedener Phospholipide sich eine auffallende Ähnlichkeit in der Zusammensetzung von endoplasmatischem Retikulum und mitochondrialer Außenmembran ergibt.

Ein großer Teil der in den ganzen Mitochondrien gefundenen RNA (ca. 40%) ist in der Außenmembran enthalten. Diese RNA hat nach dem voraus Gesagten nichts mit der mitochondrialen Proteinbiosynthese zu tun. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die mitochondriale ribosomale RNA vom 23 S und 16 S Typ, die cytoplasmatisch ribosomale RNA hingegen vom 28 S und 18 S Typ [30]. Eine Analyse der RNA in der Außenmembran könnte somit weitere Information hinsichtlich des biogenetischen Schicksals der Außenmembran liefern.

Die Auftrennung der Mitochondrien nach in vitro Aminosäureneinbau nach dem "Swelling-shrinking" Verfahren liefert nicht nur das Ergebnis des nahezu vollständigen Einbaus in die innere Membran. Sie erlaubt auch noch eine Aussage über die Lokalisation des Einbauproduktes in der inneren Membran: Dieses ist nicht gleichmäßig über die Cristae verteilt. Man kann auf Grund dieser Beobachtung eine nicht regelmäßige Anordnung der Syntheseorte vermuten. Eine exakte Lokalisierung der mitochondrialen Ribosomen mit histologisch-elektronenmikroskopischen Methoden steht noch aus. Die Ribosomen werden histologisch in der Matrix aufgefunden [25], nach biochemischen Befunden sind sie jedoch membrangebunden.

6) Am Beginn dieser Arbeit steht die Überlegung, daß in der Zelle mitochondriale und extramitochondriale Systeme kooperieren. Wenn wir hier den einen Teil dieser Kooperation betrachten, nämlich die Regulation des mitochondrialen Wachstums (also hier der mitochondrialen Proteinbiosynthese) durch extramitochondriale Faktoren, so liefern uns die hier beschriebenen Experimente Ansatzpunkte für Spekulationen.

Man kann sich eine derartige Regulation auf den verschiedenen Stufen des mitochondrialen Proteinbiosynthesystems vorstellen. Die mitochondriale DNA-abhängige RNA Polymerase kann ein in der Kern-DNA codiertes an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiertes Enzym sein. Das Ausmaß seiner Synthese kann durch extramitochondriale Faktoren gesteuert werden. Die Menge dieses Enzyms wiederum würde die Zahl der Ribosomen in den Mitochondrien regulieren.

Andererseits kann man sich vorstellen, daß das Ausmaß der Transcription durch Repressoren extramitochondrialen Ursprungs gelenkt wird. Tatsächlich hängt der Gehalt der Locustenmitochondrien an RNA in ähnlicher Weise vom Alter der Tiere ab wie die Proteinsyntheseaktivität. Dieser Befund gilt mit der folgenden Einschränkung: Wie beschrieben setzt sich die in ganzen Mitochondrien gefundene RNA zusammen aus Außenmembran- und Innenmembran-gebundener RNA. In den Locusten, in denen die Trennung der beiden Membranen noch nicht vorgenommen werden konnte, ist nicht entschieden, ob tatsächlich die Alters-

abhängigkeit des mitochondrialen RNA-Gehaltes die RNA der Innenmembran betrifft. Allerdings ist die Proportion innere Membran/äußerer Membran bei den Crista-Typ-Mitochondrien von Locusten wesentlich größer als bei den Lebermitochondrien.

Mannigfaltige Möglichkeiten zur Regulation auf der Stufe des Transcriptions- und Translationsschrittes kann man sich vorstellen auf der Basis der Energieversorgung, auf der Basis der Konzentrationsverhältnisse intramitochondrialer Ionen und speziell beim Translationsschritt auf der Basis der intramitochondrialen Konzentration der Substrate der Proteinbiosynthesereaktion, der freien Aminosäuren, sowie auf der Basis der Permeabilitätszustände der mitochondrialen Membranen.

Alle diese Parameter beeinflussen, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, das Ausmaß des Einbaus von Aminosäuren in vitro. Es ist jedoch in den meisten Fällen nicht möglich abzuschätzen, ob diese in vitro Abhängigkeiten den physiologischen Möglichkeiten entsprechen könnten. Hier sei gewissermaßen als hypothetisches Modell eine Regulation über den intramitochondrialen Aminosäurespiegel betrachtet. Wie gezeigt, kann durch die Prolinkonzentration im Incubationsmedium die Proteinsynthese wirkungsvoll beeinflußt werden. Die intramitochondriale Prolinkonzentration wiederum erscheint als Funktion Prolin-produzierender und Prolin-verbrauchender Reaktionen. Da in den Mitochondrien die Enzyme des Prolinabbaus lokalisiert sind (Prolinoxidase und Pyrrolin-5-carbonsäure-Dehydrogenase [42,98], und zwar wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in der Innenmembran der Mitochondrien, wäre es möglich, daß sie durch ihre Enzymaktivitäten, die ihrer Menge entsprechen, ihr Wachstum regeln. Eine quantitative Beurteilung zeigt tatsächlich, daß die Konzentration des freien Prolin in der Rattenleber in einem Bereich liegt ( $0.27 \mu\text{Mol pro g Frischgewicht}$  [40]), für deren schnelle Änderungen die Prolinoxidaseaktivitäten in der Leber bei weitem ausreichen ( $1.25 \mu\text{Mol/min/g Frischgewicht}$  [42]).

Weiterhin ist eine Regulation der Proteinsynthese in den Mitochondrien denkbar auf dem Translationsschritt durch die



Kontrolle der mitochondrialen transfer-RNA und der mitochondrialen Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen. Der Syntheseort der mitochondrialen t-RNA soll nach einer neuen Arbeit nicht in den Mitochondrien liegen [99].

Eine letzte Möglichkeit der Regulation wäre noch auf der Stufe des fertigen Proteins zu suchen. Wenn die Verhältnisse der strukturbildenden Proteine zueinander in der Innenmembran einer Mitochondrienspezies nicht konstant sind, wie es für das Phospholipid/Protein Verhältnis gezeigt worden ist [100], könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Membran auf der Basis der strukturbildenden Proteine die Permeabilitäten regulieren und damit die mitochondrialen Konzentrationen der beschriebenen Parameter.

## 6. Zusammenfassung

- 1) Isolierte Rattenleber- und Locustenflugmuskelmitochondrien besitzen die Fähigkeit, radioaktive Aminosäuren in ihr Protein einzubauen.
- 2) Die radioaktiven Aminosäuren werden in das Innere von Peptidketten eingebaut. Das Syntheseprodukt ist assoziiert mit den unlöslichen mitochondrialen Membranproteinen. Ein Einbau in die löslichen Proteine der Mitochondrien findet innerhalb der Fehlergrenzen der Methode nicht statt.
- 3) Ein signifikanter Beitrag zum Einbau durch kontaminierende Mikrosomen oder Bakterien kann ausgeschlossen werden.
- 4) Der Einbau ist abhängig von der Anwesenheit und von der Konzentration von Kofaktoren im Incubationsmedium.
- 5) Die optimalen Konzentrationen sind unterschiedlich für die beiden Mitochondrientypen. Die Unterschiede lassen sich zum größten Teil aus der verschiedenen Beschaffenheit von beiden Typen erklären.
- 6) Die Zugabe eines kompletten Aminosäurengemisches stimuliert den Einbau beträchtlich. Für Rattenlebermitochondrien läßt sich zeigen, daß für diese Steigerung nur die folgenden Aminosäuren verantwortlich sind: Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Prolin, Serin und Valin. Alle anderen können aus dem Gemisch weggelassen werden, ohne daß sich der Einbau verändert.
- 7) Die Fähigkeit der isolierten Mitochondrien zur Proteinsynthese ist abhängig von der Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran. Die physiologische Disposition der Mitochondrien - Alter und endokriner Status der Tiere, aus denen die Mitochondrien isoliert werden - spielt eine Rolle.
- 8) Die Energie für den Einbau wird in Form von ATP zur Verfügung gestellt. Dieses kann aus der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien selbst stammen, oder kann auch zum Teil von außen zur Verfügung gestellt werden (Rattenlebermitochondrien).

- 9) Die Wirkung von Hemmsubstanzen weist auf eine Ähnlichkeit im Mechanismus von mitochondrialer und cytoplasmatisch-ribosomaler Proteinbiosynthese hin. Sie wird jedoch beeinflusst durch die Permeabilitätsschranken der mitochondrialen Membranen.
- 10) Die in vitro Syntheserate erreicht die in vivo Rate nicht, liegt aber in vergleichbaren Dimensionen.
- 11) Innerhalb der Fehlergrenze findet sich sämtliche eingebaute Radioaktivität in der inneren Membran von Rattenlebermitochondrien.
- 12) Mitochondrien ohne Außenmembran sind in der Lage, radioaktive Aminosäuren einzubauen und dies zu einem höheren Ausmaß als Mitochondrien mit Außenmembran. Das mitochondriale Proteinbiosynthesystem ist für die Synthese von Innenmembranproteinen verantwortlich.
- 13) In der Innenmembran findet sich eine wesentlich geringere Konzentration an strukturgebundener RNA als in der Außenmembran. Es kann geschlossen werden, daß nur die RNA der mitochondrialen Innenmembran an der mitochondrialen Proteinbiosynthese beteiligt ist.
- 14) Im Zusammenhang mit Befunden über die Zusammensetzung von Außen- und Innenmembran, deren enzymatische Ausstattung und über die Inhibierung der mitochondrialen Proteinbiosynthese in intakten Hefezellen wird die Hypothese diskutiert, daß das mitochondriale Proteinbiosynthesystem nicht zur Synthese der Proteine der mitochondrialen Außenmembran befähigt ist, sondern daß diese vom cytoplasmatisch-ribosomalen Proteinsynthesystem gebildet wird und vom endoplasmatischen Retikulum abstammt.

7. Literaturverzeichnis

- 1 A.B. Novikoff, in J. Brachet and A.E. Mirsky (Editors), *The Cell*, Vol. II, 391, Academic Press, New York and London, (1961).
- 2 J.R. McLean, G.L. Cohn, I.K. Brandt and M.V. Simpson, *J. Biol. Chem.*, 233, 657 (1958).
- 3 D.B. Roodyn, P.J. Reis and T.S. Work, *Biochem.J.*, 80, 9 (1961).
- 4 D.E.S. Truman and A. Korner, *Biochem.J.*, 85, 154 (1962).
- 5 D.B. Roodyn, J.W. Suttie and T.S. Work, *Biochem.J.*, 82, 29 (1962).
- 6 D.B. Roodyn, *Biochem.J.*, 85, 177 (1962).
- 7 D.J.L. Luck, *J. Cell Biol.*, 16, 483 (1963).
- 8 R.W. Brosemer, W. Vogell und Th. Bücher, *Biochem.Z.*, 338, 854 (1963).
- 9 M.M. Nass and S. Nass, *J. Cell Biol.*, 19, 593 (1963).  
S. Nass and M.M. Nass, *J. Cell Biol.*, 19, 613 (1963).
- 10 A.M. Kroon, *Biochim. Biophys. Acta*, 69, 184 (1963).  
A.M. Kroon, *Biochim. Biophys. Acta*, 72, 391 (1963).
- 11 D.J.L. Luck and E. Reich, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 52, 931 (1964).
- 12 E. Wintersberger, *Z.Physiol.Chem.*, 336, 285 (1964).
- 13 D. Neubert und H. Helge, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 18, 600 (1965).  
D. Neubert und H.-J. Merker, *Biochem.Z.*, 343, 44 (1965).
- 14 E. Wintersberger und H. Tuppy, *Biochem.Z.*, 341, 399 (1965).
- 15 E. Reich and D.J.L. Luck, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 55, 1600 (1966).
- 16 P. Borst and G.J. Ruttenberg, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, BBA Library, Vol. 7, Elsevier, New York and Amsterdam (1966), Seite 454.
- 17 E. Wintersberger, *Biophys.Biochem.Res.Comm.*, 25, 1 (1966).
- 18 P. Parsons and M.V. Simpson, *Science*, 155, 91 (1967).
- 19 A.M. Kroon, P.Borst, E.F.J. van Bruggen and G.J. Ruttenberg, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 56, 1836 (1966).  
E.F.J. van Bruggen, P. Borst, G.J. Ruttenberg, M. Gruber and A.M. Kroon, *Biochim. Biophys. Acta*, 119, 437 (1966).
- 20 M.M. Nass, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 56, 1215 (1966).
- 21 D. Haldar, K.B. Freeman and T.S. Work, *Nature*, 211, 9 (1966).
- 22 W. Sebald, *Diplomarbeit* (1966)
- 23 J.C. Mounolou, H. Jakob and P.P. Slonimski, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), *Round Table Discussion on Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria*, Adriatica Editrice, Bari (1967), in press.

- 24 D. Neubert, *ibid.*
- 25 H.H. Swift, *ibid.*
- 26 T.W. O'Brien and G.F. Kalf, *J. Biol. Chem.*, 242, 2172 (1967).
- 27 T.W. O'Brien and G.F. Kalf, *J. Biol. Chem.*, 242, 2180 (1967).
- 28 H. Kuntzel and H. Noll, *Nature*, 215, 1340 (1967).
- 29 M.R. Rifkin, D.D. Wood and D.J.L. Luck, *Proc.Natl.Acad. Sci.*, 58, 1025 (1967).
- 30 A.M. Kroon, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), *Round Table Discussion on Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria*, Adriatica Editrice, Bari (1967), in press.
- 31 H. Fukuhara, *ibid.*
- 32 H. Fukuhara, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 58, 1065 (1967).
- 33 W.E. Barnett and D.H. Brown, *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 57, 452 (1967).
- 34 M. Fournier and M.V. Simpson, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), *Round Table Discussion on Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria*, Adriatica Editrice, Bari (1967), in press.
- 35 W.E. Barnett, D.H. Brown and J.L. Eppler, *Proc.Natl. Acad.Sci.*, 57, 1775 (1967).
- 36 M.J. Fletcher and D.R. Sanadi, *Biochim. Biophys. Acta.*, 51, 356 (1961).
- 37 R.E. Thiers, E.S. Reynolds and B.L. Vallee, *J. Biol. Chem.* 236, 570 (1960).
- 38 E.D.S. Truman and A. Korner, *Biochem.J.*, 83, 588 (1962).
- 39 E. Kirsten, R. Kirsten und P. Arese, *Biochem.Z.*, 337, 167 (1963).
- 40 E. Kirsten, R. Kirsten, J.H. Hohorst and Th. Bücher, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 4, 169 (1961).
- 41 D.B. Roodyn, P.J. Reis and T.S. Work, *Biochem.J.*, 80, 9 (1961).
- 42 A.B. Johnson and H.J. Strecker, *J. Biol. Chem.*, 237, 1876 (1962).
- 43 R. Umama and A.L. Dounce, *Exptl.Cell Res.*, 35, 277 (1964).
- 44 W. Wheeldon and A.L. Lehninger, *Biochemistry*, 2, 3533 (1966).
- 45 A.L. Lehninger, *The Mitochondrion*, W.A. Benjamin, Inc. New York and Amsterdam (1965), Seite 180.
- 46 M. Klingenberg and E. Pfaff, in J.M. Tager, S.Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*, BBA Library Vol. 7, Seite 180.

- 47 V. Kubista, persönliche Mitteilung.  
S.G. van den Bergh, Dissertation, Amsterdam (1962).
- 48 D. Pette, persönliche Mitteilung.
- 49 A.M. Kroon, Biochim. Biophys. Acta., 91, 145 (1964).
- 50 H. Brockmann, Fortschritte d. Chemie org. Naturstoffe,  
18, 1 (1960).
- 51 D. Neubert, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and  
E.C. Slater (Editors), Regulation of Metabolic Processes  
in Mitochondria, BBA Library, Vol. 7, Elsevier, New York  
and Amsterdam (1966), Seite 450.
- 52 C. Nathans, G. von Ehrenstein, R. Monro and F. Lipmann,  
Fed.Proc., 21, 127 (1962).
- 53 J. Mager, Biochim. Biophys. Acta, 38, 150 (1960).
- 54 M.V. Simpson, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello  
and E.C. Slater (Editors), Round Table Discussion on  
Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria,  
Adriatica Editrice, Bari (1967), in press.
- 55 D.B. Roodyn, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and  
E.C. Slater (Editors), Regulation of Metabolic Processes  
in Mitochondria, BBA Library Vol. 7 (1966), Seite 383.
- 56 B. Kadenbach, Biochem.Z., 344, 49 (1966).
- 57 A.L. Lehninger, Physiol. Reviews, 42, 467 (1962).
- 58 D.B. Roodyn, K.B. Freeman and J.R. Tata, Biochem.J.,  
94, 628 (1965).
- 59 E. Wintersberger, Biochem.Z., 341, 409 (1965).
- 60 A.M. Kroon, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and  
E.C. Slater (Editors), Regulation of Metabolic Processes  
in Mitochondria, BBA Library, Vol. 7, (1966), Seite 397.
- 61 A. von der Decken, H. Löw and S. Sandell, ibid. Seite 415.
- 62 S. Sandell, H. Löw and A. von der Decken, Biochem.J.,  
104, 575 (1967).
- 63 W. Sebald, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 64 R.L. Ringler, J. Biol. Chem., 236, 1192 (1961).
- 65 T.P. Singer, Comprehensive Biochemistry (Ed. M. Florin  
and E. Stotz, Elsevier), 14, 152 (1966).
- 66 T. Yonetani, J. Biol. Chem., 236, 1680 (1961).
- 67 R.S. Criddle, R.M. Bock, D.E. Green and H. Tisdale,  
Biochemistry, 1, 827 (1962).
- 68 S.H. Richardson, H.O. Hultin and S. Fleischer, Arch.  
Biochem. Biophys., 105, 254 (1964).
- 69 D.O. Woodward and K.D. Munkres, Proc.Natl.Acad.Sci.,  
55, 872 (1966).

- 70 D.F. Parsons, G.R. Williams and B.Chance, Ann.N.Y. Acad.Sci., 137, 643 (1966).  
D.F. Parsons, G.R. Williams, W. Thompson, D. Wilson and B. Chance, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), Round Table Discussion on Mitochondrial Structure and Function, Adriatica Editrice, Bari (1966), in press.
- 71 G. Sottocasa, B. Kylenstierna and L. Ernster, J. Cell Biol., 32, 415 (1967).
- 72 C. Schnaitman, V.G. Erwin and J.W. Greenawalt, J. Cell Biol., 32, 719 (1967).
- 73 H. Okamoto, S. Yamamoto, M. Nozaki and O. Hayaishi, Biochem. Biophys. Res. Comm., 26, 309 (1967).
- 74 D.Parsons and Y. Yano, Biochim. Biophys. Acta, 135, 362 (1967).
- 75 M. Klingenberg und Th. Bücher, Biochem.Z., 331, 312 (1959).
- 76 R.W. Estabrook and A. Holowinsky, J.Biophys.Biochem. Cytol., 9, 19 (1964).
- 77 A.L. Lehninger, The Mitochondrion, W.A. Benjamin Inc. New York and Amsterdam (1965), Seite 132.
- 78 P. Hunter-Jones, Instructions for rearing and breeding locusts in the laboratory. Anti-Locust Research Centre London, 1964.
- 79 D. Pette, in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (Editors), Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, BBA Library, Vol. 7 (1966), Seite 28.
- 80 G. Beisenherz, H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer, Z. Naturfshg., 8b, 555 (1953).
- 81 E. Volkin and W.E. Cohn, Meth.biochem.Anal., 1, 287 (1954).
- 82 O. Arrigani and Th.P. Singer, Nature, 193, 1256 (1962).
- 83 C.W. Tabor, H. Tabor and S.M. Rosenthal, J.Biol.Chem., 208, 645 (1954).
- 84 Y.Saito, O. Hayaishi and S. Rothberg, J.Biol.Chem., 229,921 (1957).
- 85 Th. Bücher, W. Luh and D. Pette, Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch d. physiol.- und path.-chem. Analyse, VIA, 292 (1964).
- 86 F. Sanger and E.O.P. Thompson, Biochem.J., 53, 353 (1953).
- 87 D. Wilkie, The Cytoplasm in Heredity, Menthuen & Co Ltd. London (1964).
- 88 J. Bronk, Proc.Natl.Acad.Sci., 50, 524 (1963).
- 89 G.F. Kalf, Arch.Biochem.Biophys., 101, 350 (1963).
- 90 S. Linn and I.R. Lehmann, J.Biol.Chem., 241, 2694 (1966).
- 91 P.J. Curtis and R.M.S. Smellie, Biochem.J., 98, 818 (1966)

- 92 D.E.S. Truman, Biochem.J., 91, 59 (1964).
- 93 B. Kadenbach, Biochim. Biophys. Acta, 134, 430 (1967).
- 94 B. Ephrussi, Naturwissenschaften, 43, 505 (1956).
- 95 G. Nishida and R.F. Labbe, Biochim. Biophys. Acta, 31, 519 (1959).
- 96 W. Neupert, unveröffentliche Ergebnisse.
- 97 G. Clark-Walker and A. Linnane, J.Cell Biol., 34, 1 (1967).
- 98 R.W. Brosemer and P.S. Veerabhadrapa, Biochim. Biophys. Acta, 110, 102 (1965).
- 99 T. Suyama and J. Eyer, Biochem.Biophys.Res.Comm., 28, 746 (1967).
- 100 D.J.L. Luck, J.Cell Biol., 24, 445 (1965).



## 8. Verzeichnis der Abkürzungen

ATP - Adenosin-5'-triphosphat  
ADP - Adenosin-5'-diphosphat  
AMP - Adenosin-5'-monophosphat  
CTP - Cytidin-5'-triphosphat  
GTP - Guanosin-5'-triphosphat  
UTP - Uridin-5'-triphosphat  
DNA - Desoxyribonucleinsäure  
RNA - Ribonucleinsäure  
m- RNA - Messenger-Ribonucleinsäure  
r- RNA - Ribosomale Ribonucleinsäure  
t- RNA - Transfer-Ribonucleinsäure

### Aminosäuren

ala	- Alanin	leu	- Leucin
arg	- Arginin	ileu	- Isoleucin
asp	- Asparaginsäure	lys	- Lysin
asp NH <sub>2</sub>	- Asparagin	met	- Methionin
cys	- Cystin	pro	- Prolin
cys SH	- Cystein	opro	- Oxyprolin
glu	- Glutaminsäure	ser	- Serin
glu NH <sub>2</sub>	- Glutamin	threo	- Threonin
gly	- Glycin	try	- Tryptophan
his	- Histidin	tyr	- Tyrosin
		val	- Valin

ASG/R - Aminosäurengemisch für  
Rattenlebermitochondrien  
ASG/L - Aminosäurengemisch für  
Locustenmitochondrien

### Substrate

$\alpha$ GP -  $\alpha$ -Glycerophosphat  
 $\alpha$ KG -  $\alpha$ -Ketoglutarat  
PEP - Phosphoenolpyruvat

Enzyme

ATPase - Adenosin-5'-triphosphatase  
GluDH - Glutamatdehydrogenase  
HK - Hexokinase  
MAO - Monoaminoxidase  
MDH - Malatdehydrogenase  
PK - Pyruvatkinase  
RNASE - Ribonuclease  
SDH - Succinat-Cytochrom-c-Reduktase

Sonstige Abkürzungen

CAP - Chloramphenicol  
DNP - Dinitrophenol  
SMA - Sucrosemedium mit Albumin  
TCA - Trichloressigsäure  
TRA - Triäthanolamin  
TRIS - Trishydroxymethylaminomethan