

J 70. 13851

**Zur Biosynthese der Proteine der mitochondrialen
Außen- und Innenmembranen in *Neurospora crassa***

WISSENSCHAFT/Med

Dr. Walter Neupert

Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Zur Biosynthese der Proteine
der mitochondrialen Außen- und Innenmembranen
in *Neurospora crassa*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von
Dr. Walter Neupert
aus
München

München 1970

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3.11.1970

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND PLAN	1
2. MATERIAL UND METHODEN	3
2.1. Züchtung von Neurospora und Präparation von Mitochondrien	3
2.2. Präparation von Außen- und Innenmembranfraktionen	4
2.3. Enzym- und Cytochrombestimmungen	5
2.4. Protein- und RNA-Bestimmungen	6
2.5. Carotinoidfarbstoffe	6
2.6. Elektronenmikroskopie	6
2.7. Proteinelektrophorese	7
2.8. Markierungsexperimente	7
2.8.1. In vitro Markierung	7
2.8.2. In vivo Markierung	8
2.9. Bestimmung der Radioaktivität	8
3. ERGEBNISSE	9
3.1. Trennung von Außen- und Innenmembranen	9
3.2. Aminosäureeinbau in mitochondriale Außen- und Innenmembranen	21
3.2.1. Aminosäureeinbau in vitro	21
3.2.2. Aminosäureeinbau in vivo	25
4. DISKUSSION	28
5. ZUSAMMENFASSUNG	32
6. LITERATURVERZEICHNIS	33

1. EINLEITUNG UND PLAN

Zwei verschiedene Systeme der Proteinsynthese tragen zur Biogenese des Mitochondriums bei. Das eine ist das mitochondriale, das "innere" System, das andere das extramitochondriale, cytosolische, auch "äußeres" System genannt. Zahlreiche Ergebnisse sprechen dafür, daß beide Systeme Proteine herstellen, die in die mitochondrialen Membranen integriert werden, daß hingegen die löslichen Matrixproteine des Mitochondriums vom äußeren System stammen (1).

Einen weiteren Schritt zum Verständnis der Biogenese der mitochondrialen Membranen stellt die Differenzierung der Biogenese der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran dar. Von Lebermitochondrien her ist bekannt, daß diese beiden Membranen einen sehr verschiedenen Bau und sehr unterschiedliche Funktionen aufweisen. Einen wesentlichen Bestandteil der inneren Membran bilden die Multienzymkomplexe der Atmungskette, der oxydativen Phosphorylierung und des Fettsäureabbaus. Die Permeabilität der Innenmembran ist hochspezifisch, sowohl für niedermolekulare Substanzen wie anorganische und organische Kationen und Anionen, aber auch für hochmolekulare Substanzen wie mitochondrienspezifische Enzyme, die außerhalb der Mitochondrien synthetisiert werden (1, 2). Die äußere Membran enthält Enzyme wie Monoaminoxidase und Kynureninhydroxylase, deren Funktion in der Zelle nur ungenügend verstanden wird. Ihre Permeabilität ist unspezifisch für Substanzen bis zum Molekulargewicht 10 000 (3).

Bereits in einem früheren Stadium des funktionalen Verständnisses der Außenmembran wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Membran vom endoplasmatischen Reticulum abstammt und ihre Proteine auch vom cytosolischen System synthetisiert werden (4). Diese Hypothese wurde dann durch Beobachtungen unterstützt, daß isolierte Rattenlebermitochondrien Aminosäuren im wesentlichen nur in die Proteine ihrer inneren Membran einbauen (5, 6, 7).

Einen Nachteil dieser Untersuchungen stellte das Zugrundeliegen eines recht unphysiologischen Systems dar, in dem eine Anzahl intramitochondrialer Vorgänge

gestört sein kann. Dazu zählen die Bildung vollständiger Peptidketten an den Ribosomen, sowie deren Ablösung, die Zusammenfügung von Proteinen mit neu synthetisierten Phospholipiden und vor allem der Ablauf von Transportmechanismen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen und um die mit isolierten Mitochondrien erhaltenen Befunde zu überprüfen, wurde eine Untersuchung mit intakten Zellen angestellt. Cycloheximid, ein spezifischer Hemmstoff der extramitochondrialen, cytosolischen Proteinsynthese, kann dazu eingesetzt werden, in ganzen Zellen zwischen mitochondrialem und extramitochondrialem Proteinsynthesystem zu differenzieren (8, 9). In den Experimenten, die hier berichtet werden, wurde die Wirkung dieses Antibiotikums auf die Proteinsynthese in ganzen *Neurospora crassa*-Zellen benützt, um zwischen der Biogenese von Außen- und Innenmembranproteinen zu unterscheiden.

Um diese Untersuchungen durchführen zu können, war es zuerst nötig, eine Methode zur Trennung der mitochondrialen Membranen von *Neurospora* zu erarbeiten, da eine solche mit befriedigender Wirksamkeit zwar für Rattenlebermitochondrien, aber nicht für *Neurosporamitochondrien* vorlag.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Züchtung von *Neurospora* und Präparation von Mitochondrien

Hyphen von *Neurospora crassa* (Wildtyp 74A) wurden unter sterilen Bedingungen in VOGEL's Minimalmedium (10) mit 2% Saccharose gezüchtet. 8-Liter-Flaschen wurden mit 2×10^6 Konidien pro ml inoculiert und 18 - 20 h bei 25°C durch ein eingesetztes Rohr heftig belüftet. Der Zuchtraum wurde ununterbrochen mit Leuchtstofflampen beleuchtet.

Der Inhalt jeder Zuchtflasche wurde durch grobmaschige Gaze auf einem Büchner-Trichter abfiltriert und die Hyphen auf dem Trichter mit 1 Liter destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Hyphen trocken gepreßt und das Feuchtgewicht (60 - 90 g) bestimmt. Sie wurden dann in 10 Volumina (bezogen auf Feuchtgewicht) eiskaltem Isolationsmedium (IM) (0,44 M Saccharose, 10 mM Tris-Puffer, pH 7,2, 2 mM EDTA) suspendiert und 30 sec in einem Braun-Mixer homogenisiert. Dann wurden die Zellen in einer Mühle, wie von WEISS et al. (11) beschrieben, aufgebrochen. Das aus der Mühle fließende Material wurde durch engmaschigen Stoff passiert und die auf dem Stoff verbleibenden Zelltrümmer verworfen. Aus dem Filtrat wurden die Mitochondrien durch fraktionierte Zentrifugation in einer Sorvall-Zentrifuge (SS 34-Rotor) bei 4°C nach dem folgenden Schema isoliert: 10 min bei 1500 x g; der resultierende Überstand 30 min bei 10 800 x g; die Pellets dieser Zentrifugation wurden in IM resuspendiert und 10 min bei 650 x g zentrifugiert; der Überstand dann 20 min bei 17 300 x g; die erhaltenen Pellets wurden in IM resuspendiert und 20 min bei 17 300 x g zentrifugiert, um das endgültige Mitochondrienpellet zu erhalten.

Zur Präparation von Zellfraktionen, die bei höheren g-Werten sedimentieren als Mitochondrien, wurde der Überstand der ersten Zentrifugation, die die Mitochondrien sedimentierte, 20 min bei 27 000 x g zentrifugiert. Der Überstand des entste-

henden Pellets wurde dann 1 h bei 78 500 x g in einer Beckmann-Spinco-Ultrazentrifuge (Rotor 30) zentrifugiert. Dieser letzte Schritt sedimentierte die Ribosomen als farbloses Pellet, auf dem sich eine orange-rote Schicht befand. Diese Schicht wurde durch Schütteln mit 4 - 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer abgetrennt und dann darin homogenisiert.

2.2. Präparation von Außen- und Innenmembranfraktionen

Die Trennung von mitochondrialen Außen- und Innenmembranen erfolgte nach einer modifizierten "Swelling-Shrinking-Sonication"-Methode, die zuerst von PARSONS et al. (4, 12) und SOTTOCASA et al. (13) für Lebermitochondrien beschrieben wurde und zum erstenmal auf Neurosporamitochondrien von CASSADY (14, 15) übertragen wurde.

Die sedimentierten Mitochondrien wurden in 60 ml Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, resuspendiert und in einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator mit Teflonstempel homogenisiert und dann 30 min lang bei 0°C stehen gelassen. Die Homogenisation wurde während der letzten 2 min wieder aufgenommen. Dann wurden 20 ml einer Schrumpflösung zugesetzt (1,8 M Saccharose, 8 mM ATP und 8 mM MgCl₂, mit KOH auf pH 7,6 eingestellt). Das Schrumpfen der Mitochondrien konnte durch die Zunahme der Trübung der Suspension beobachtet werden. Nach weiteren 5 min wurden die geschwellenen und geschrumpften Mitochondrien in 20-ml-Anteilen 3 x 5 sec mit einem Branson-Sonifier (Modell S 75) bei Stufe 3 (3 Amp) unter Kühlung in einem Eisband beschallt.

Die beschallten Suspensionen wurden 60 min bei 78 500 x g in einer Spinco-Ultrazentrifuge (Rotor 30) zentrifugiert. Die vereinigten Pellets wurden in 5 ml IM resuspendiert und auf einen linearen Saccharosedichtegradienten aufgetragen, der aus 50 ml 0,95 - 1,5 M Saccharose in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 bestand. Der Gradient

wurde 1 h bei 75 000 x g und 1°C in einer Beckmann-Spinco-L 65-Ultrazentrifuge (Rotor SW 25, 2) zentrifugiert. Dann wurde er in 11 Fraktionen von je 5 ml geschnitten, die jeweils mit 10 mM Tris pH 7, 5 auf 11 ml verdünnt wurden und dann in der Spinco Ultrazentrifuge 1 h lang bei 151 000 x g (Rotor 50 Ti) zentrifugiert wurden.

Die resultierenden Pellets wurden jeweils in 11 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7, 2, resuspendiert und 1 h bei 151 000 x g zentrifugiert. Die Pellets dieser Zentrifugation wurden in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7, 2 auf Konzentrationen von 2-5 mg Protein/ml resuspendiert.

2.3. Enzym- und Cytochrombestimmungen

Kynureninhydroxylase wurde nach der Methode von SCHOTT et al. (16) bestimmt. Das Test-Volumen wurde dabei auf 0,28 ml reduziert. Die Methode wurde mit 3-Hydroxykynurenin standardisiert, das freundlicherweise von Herrn Dr. B. LINZEN, Zoologisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt wurde.

Succinat-Cytochrom c -Reduktase wurde nach der Methode von ARRIGONI und SINGER (17) unter Zusatz von Phenazinmethosulfat gemessen. Enzymkinetiken wurden mit einem Beckmann-DK 1A-Spektrophotometer registriert. Cytochromkonzentrationen wurden aus Differenzspektren berechnet, die mit einem "Split-Beam"-Spektrophotometer aufgenommen wurden, das von Prof. Dr. M. KLINGENBERG speziell für trübe Suspensionen konstruiert worden war.

2.4. Protein- und RNA-Bestimmung

Protein wurde mit der Biuretmethode in der Modifikation von BEISENHERZ et al. (18) gemessen. Für RNA-Bestimmungen wurden Aliquoten von jeder Fraktion mit kalter HClO_4 (Endkonzentration 5%) gefällt, viermal mit kalter 5%iger HClO_4 gewaschen und mit 5%iger HClO_4 durch 15-minütiges Erhitzen auf 90°C hydrolysiert. Im Überstand der folgenden Zentrifugation wurde die Absorption bei $260\text{ m}\mu$ gemessen. Hochmolekulare RNA von Hefe (Serva) wurde als Standard verwendet.

2.5. Carotinoidfarbstoffe

Die Carotinoidfarbstoffe wurden nach der Methode von HARDING et al. (19) extrahiert. Die Farbstoffe aus jeder Fraktion wurden in 1 ml Hexan überführt und das sichtbare Spektrum aufgezeichnet.

Der Carotinoidgehalt wurde ausgedrückt als A_{477} -Einheiten/mg Protein. Eine A_{477} -Einheit stellt dabei jene Menge an Carotinoid in 1 ml einer Lösung dar, die eine Absorption von 1 bei $477\text{ m}\mu$ besitzt, wenn die Registrierung in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke erfolgt.

2.6. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von jeder Stufe der Präparation angefertigt, einschließlich aller endgültigen Fraktionen. Ein Zeiss-EM-9-Mikroskop wurde benützt. Die Proben wurden mit Chrom-Osmiumsäure fixiert und mit Bleicitrat kontrastiert.

2.7. Proteinelektrophorese

Elektrophorese der Proteine jeder Fraktion wurde in 7,5%igen Polyacrylamidgelen durchgeführt, die mit einem Medium von Phenol, Ameisensäure und Wasser (1/1/2; m/v/v) äquiliibriert worden waren (20). Die Gele wurden mit Amidoschwarz angefärbt.

2.8. Markierungsexperimente

2.8.1. In-vitro-Markierung

Isolierte Mitochondrien aus einer 8-Liter-Zuchtflasche wurden in folgendem Medium (20) suspendiert: 0,15 M Saccharose, 30 mM KCl, 30 mM TRIS-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 20 mM KH₂PO₄, 4 mM ATP, 0,3 mg/ml Aminosäurengemisch (ohne Leucin, Isoleucin und Phenylalanin), pH 7,6. Das Endvolumen betrug 60 ml. Nach Zugabe von 14-C-1-Leucin (344 mc/mMol), 14-C-1-Isoleucin (308 mc/mMol) und 14-C-1-Phenylalanin (475 mc/mMol) (Radiochemical Centre Amersham), jeweils 10 µc, wurde in 2 ml-Anteilen 20 min lang bei 32°C unter Schütteln inkubiert.

Die Inkubation wurde durch Kühlung auf 0°C gestoppt. Dann wurde die Suspension durch Zugabe von 180 ml IM verdünnt und 20 min bei 27 000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 200 ml IM resuspendiert, das 1 mM unmarkiertes l-Leucin, l-Isoleucin und l-Phenylalanin enthielt und wiederum 20 min bei 27 000 x g zentrifugiert. Dann wurden äußere und innere Membranen nach dem "Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Verfahren" getrennt, wie oben beschrieben.

2.8.2. In-vivo-Markierung

Zwei 8-Liter-Zuchtflaschen mit *Neurospora* wurden gleichzeitig 18 h wachsen gelassen. Zu einer Flasche, die als Kontrolle diente, wurden ^{14}C -l-Leucin, ^{14}C -l-Isoleucin und ^{14}C -l-Phenylalanin (spezifische Radioaktivität wie in den *in vitro*-Experimenten), jeweils $10\mu\text{C}$, zur Zeit null zugesetzt. Nach 30 min wurde ein "Chase" von 1 mM l-Leucin, l-Isoleucin und l-Phenylalanin für weitere 20 min gegeben.

Zur zweiten Flasche wurde zur Zeit null Cycloheximid (Sigma Chemical Co) in einer Endkonzentration von $100\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Nach 5 min wurden ^3H -l-Leucin (58,2 c/mMol), ^3H -l-Isoleucin (0,405 c/mMol) und ^3H -l-Phenylalanin (8,3 c/mMol) (New England Nuclear Co.), jeweils $100\mu\text{C}$, zugegeben. Nach 30 min folgte ein "Chase" von 1 mM unmarkiertem l-Leucin, l-Isoleucin und l-Phenylalanin für weitere 20 min. Am Ende der "Chase"-Periode wurden die Inhalte beider Flaschen durch Filtration auf dem gleichen Büchner-Trichter vereinigt und Mitochondrien und Außen- und Innenmembranen wie oben beschrieben isoliert.

2.9. Bestimmung der Radioaktivität

Aliquote der einzelnen Fraktionen, die jeweils 0,2 - 0,3 mg Protein enthielten, wurden auf feuchte Whatman-Glasfaserfilter aufgebracht, die anschließend getrocknet wurden. Die Glasfaserfilter wurden gewaschen in 5%iger Trichloressigsäure (2 mal), Äthanol/Äther (3:1) (2 mal) und Äther. Nach dem Trocknen wurden die Filter in einem Packard-Tricarb-Szintillationszähler in 10 ml Toluol mit PPO und POPOP gezählt. Die Zählausbeute bei alleiniger Zählung von ^{14}C betrug 40 %, bei Simultanzählung von ^{14}C und ^3H 20 % bzw. 10 %.

3. ERGEBNISSE

3.1. Trennung von Außen- und Innenmembran

Wenn Mitochondrien der Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung unterworfen werden und dann durch einen linearen Saccharosedichtegradienten zentrifugiert werden, findet sich der größte Anteil des Proteins im unteren Drittel des Zentrifugenbeckers (Fraktionen 6-9, Abb. 1 A), sichtbar als dunkelbraune Bande. An der Grenzfläche zwischen dem aufgetragenen Volumen (Fraktion 1) und dem Beginn des Gradienten ist eine orangefarbene Bande sichtbar. Diese Bande wird in Fraktion 2 gesammelt. Sie ist nicht zu beobachten, wenn Mitochondrien ohne vorausgegangene Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung auf den Gradienten aufgetragen werden.

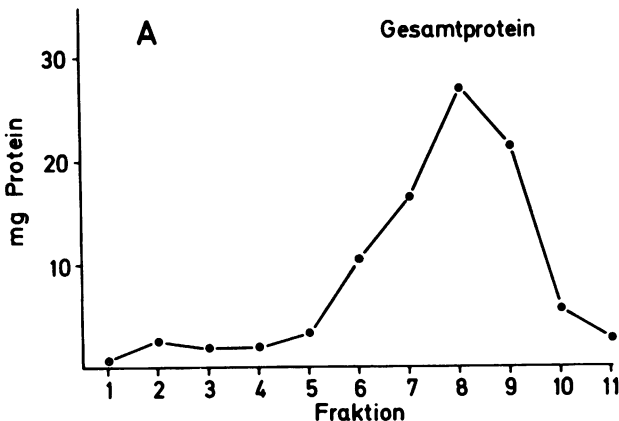


ABB. 1 A

Verteilung von Protein in den verschiedenen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten, durch den eine Mitochondrienpräparation nach Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung zentrifugiert wurde. Fraktion 1 stellt die oberste und Fraktion 11 die unterste Fraktion dar. Fraktionsvolumen 5 ml.

Die Fraktionen 1 und 2 enthalten 2-4% des gesamten Proteins. Wie Abb. 1 B zeigt, ist die Kynureninhydroxylaseaktivität, die als Marker für die Außenmembran dient (14, 15, 21), in den Fraktionen 1 und 2 angereichert. Sie ist niedrig in den anderen Fraktionen.

Im Gegensatz dazu sind die Succinat-Cytochrom-c-Reduktase und die Cytochrome, die als Marker für die Innenmembran dienen, in den Fraktionen 7-9 des Gradienten angereichert, während sie in den Fraktionen 1 und 2 niedrig sind (Abb. 1 C und 1 E).

Aus diesen Befunden läßt sich eine Verunreinigung der Außenmembran von 10-25% berechnen. Diese Verunreinigung konnte nicht verringert werden, indem ein Dichtegradientenzentrifugationsschritt in die Isolierungsprozedur der Mitochondrien eingefügt wurde.

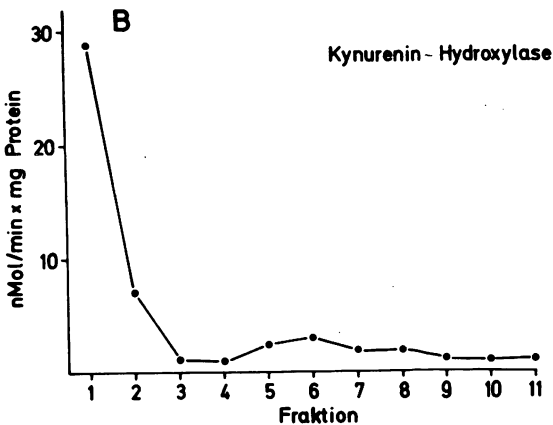


ABB. 1 B

Verteilung der Kynureninhydroxylase in den verschiedenen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten durch den eine Mitochondrienpräparation nach Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung zentrifugiert wurde. Fraktion 1 stellt die oberste und Fraktion 11 die unterste Fraktion dar. Fraktionsvolumen 5 ml.

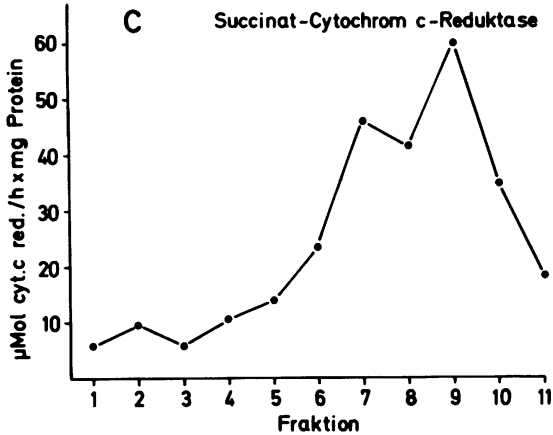


ABB. 1 C

Verteilung der Succinat-Cytochrom c-Reduktase in den verschiedenen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten durch den eine Mitochondrienpräparation nach Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung zentrifugiert wurde. Fraktion 1 ist oberste und Fraktion 11 unterste Fraktion. Fraktionsvolumen 5 ml.

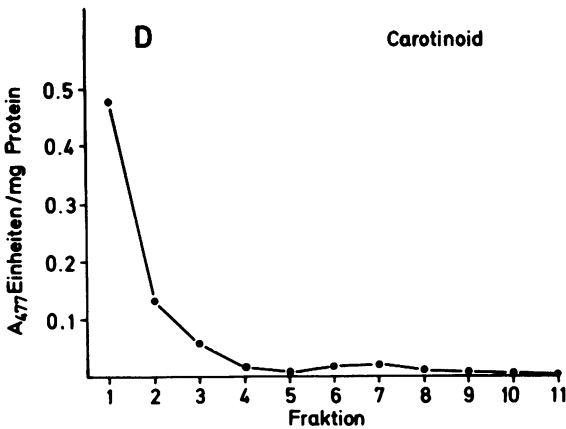


ABB. 1 D

Verteilung des Carotinoidfarbstoffs (Neurosporaxanthin) in den verschiedenen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten durch den eine Mitochondrienpräparation nach Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung zentrifugiert wurde. Fraktion 1 ist oberste und Fraktion 11 unterste Fraktion.

Die Fraktionen 6 - 7 weisen spezifische Aktivitäten der Kynureninhydroxylase auf, die vergleichbar sind mit denen von ganzen Mitochondrien. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß diese Fraktionen im wesentlichen aus ganzen Mitochondrien bestehen, in denen die Membranen nicht getrennt sind.

Um zu beweisen, daß die Fraktionen an der Spitze des Gradienten Außenmembranen darstellen und nicht aus extramitochondrialen Zellbestandteilen (z. B. extramitochondriale Vesikeln) bestehen, wurden die erwähnten Enzymaktivitäten auch in denjenigen Zellfraktionen bestimmt, die höhere g -Werte als Mitochondrien zu ihrer Sedimentation durch Zentrifugation benötigen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 1 dargestellt. Die Kynureninhydroxylaseaktivität wird offensichtlich nur in den Außenmembranfraktionen angereichert, die hier durch die Fraktion 1 vom Gradienten repräsentiert werden, und nicht in denjenigen Fraktionen, die bei $27\,000 \times g$ und $78\,000 \times g$ sedimentieren. Einen weiteren Hinweis für den mitochondrialen Ursprung der Kynureninhydroxylase-Aktivität liefert die folgende Beobachtung: Kynureninhydroxylase ist abwesend in Fraktion 1 und nur äußerst niedrig in Fraktion 2, wenn eine Mitochondriensuspension auf den Gradienten aufgetragen wird, bei der die Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung ausgelassen wurde.

Die durch Zentrifugation erhaltenen Sedimente der Fraktionen 1 und 2 sind rot. Der rote Farbstoff kann leicht mit Methanol und Aceton extrahiert werden und nach Ansäuern der vereinigten Extrakte in Hexan überführt werden. Die Hexanlösung des Farbstoffes zeigt ein für Carotinoide typisches Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei $477 \text{ m}\mu$ und Schultern bei 450 und $510 \text{ m}\mu$. Dieses Spektrum weist auf Neurosporaxanthin hin (19, 22). Die Identifizierung dieses Carotinoids als Neurosporaxanthin, ein saures Carotinoid, wird bestätigt durch sein Extraktionsverhalten. Es kann aus der Hexanlösung in alkalisches Methanol überführt und daraus nach Ansäuern wieder mit Hexan extrahiert werden.

Wie Abb. 1 D zeigt, ist dieser Farbstoff in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten in einer sehr ähnlichen Weise verteilt wie die Kynureninhydroxylase-Aktivität. Er ist lediglich in den Außenmembranfraktionen angereichert und ist in ver-

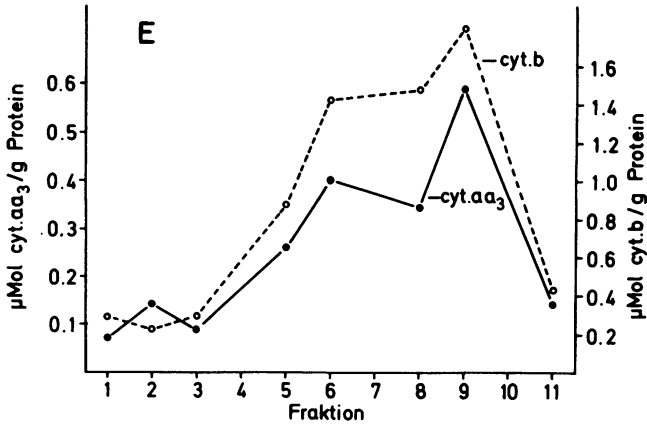


ABB. 1 E

Verteilung der Cytochrome aa₃ und b in den verschiedenen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten durch den eine Mitochondrienpräparation nach Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung zentrifugiert wurde. Fraktion 1 ist oberste und Fraktion 11 unterste Fraktion. Fraktionsvolumen 5 ml.

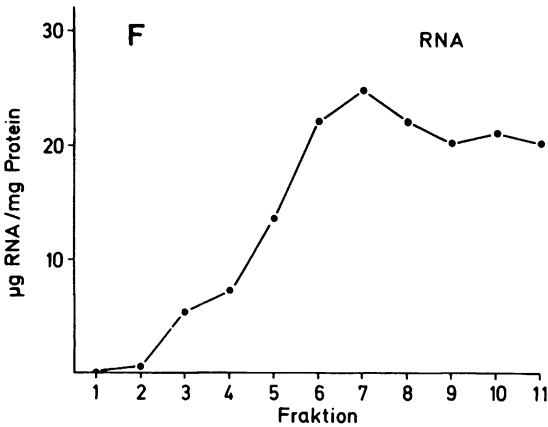


ABB. 1 F

Verteilung von RNA in den verschiedenen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten durch den eine Mitochondrienpräparation nach Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung zentrifugiert wurde. Fraktion 1 ist oberste und Fraktion 11 unterste Fraktion.

Fraktion	Succinat-Cytochrom c Reduktase	Cytochrom aa ₃	Cytochrom b	Kynureninhydroxylase	Carotinoidfarbstoff
Mitochondrien (extrahiert mit 0,1 M Phosphatpuffer)	37,1	0,48	1,25	3,0	0,014
Fraktion 1 des Gradienten (Außenmembran)	5,8	0,07	0,30	39,4	0,459
Fraktion 9 des Gradienten (Innenmembran)	59,5	0,58	1,79	1,0	0,006
20 min 27 000 x g Pellet	10,0	-	-	0,54	0,008
60 min 78 500 x g Pellet	3,5	0,09	0,24	0,35	0,018

TABELLE 1

Marker-Enzym-Aktivitäten, Cytochrom- und Carotinoidgehalte von verschiedenen Fraktionen von *Neurospora*-Zellen. Die Fraktionen 1 (Außenmembranpräparation) und 9 (Innenmembranpräparation) des Gradienten entsprechen jenen in der Abb. 1 A - F.

Dimensionen: Succinat-Cytochrom c -Reduktase: $\mu\text{Mol Cytochrom c reduziert/h x mg Protein}$,
 Cytochrome aa₃ und b: $\mu\text{Mol/g Protein}$,
 Kynureninhydroxylase: $\text{nMol Hydroxykynurenin gebildet/min x mg Protein}$,
 Carotinoidfarbstoff: A_{477} Einheiten/mg Protein ($\text{cm}^2/\text{mg Protein}$).

gleichsweise niedriger Konzentration in denjenigen Zellfraktionen enthalten, die bei 27 000 x g und 78 000 x g sedimentieren (Tab. 1). Deshalb dient diese Substanz als Marker für die äußere Mitochondrienmembran.

Untersuchungen zur quantitativen Verteilung der Carotinoide in ganzen Neurospora-zellen zeigen, daß unter den hier angewendeten Zuchtbedingungen Neurospora-xanthin etwa 50 % der gesamten Carotinoide ausmacht. Die anderen 50 % stellen neutrale Carotinoide dar. Von dem gesamten in der Zelle vorhandenem Neurospora-xanthin finden sich mindestens 70 - 80 % in der äußeren Membran der Mitochondrien.

Die Verteilung von RNA im Gradienten (ausgedrückt in μg RNA pro mg Protein) folgt weitgehend der von Succinat-Cytochrom-c-Reduktase und der Cytochrome aa₃ und b (Abb. 1 F). Mitochondriale Außenmembran, die nach der beschriebenen Methode präpariert wird, enthält demzufolge weder RNA noch Ribosomen.

Von allen Stufen der Präparation und von allen Fraktionen des Gradienten wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Repräsentative Aufnahmen zeigt die Abb. 2. Die Abb. 2 A stellt ganze Mitochondrien mit deutlich sichtbaren intakten Außen- und Innenmembranen sowie Cristae dar. Als Folge des Schwellvorgangs können die beiden Membranen nicht mehr deutlich wahrgenommen werden (Abb. 2 B). Dies ist einerseits der engen Annäherung der beiden Membranen zuzuschreiben, andererseits dem Verlust der Außenmembran bei einem Teil der Mitochondrien. Weiterhin sieht man, daß in diesen geschwollenen Mitochondrien die markanten Profile der Cristae verschwunden sind. Nach Ablauf des Schrumpfungsvorgangs (Abb. 2 C) findet man sowohl Mitochondrien, in denen die Innenmembran von der anhaftenden Außenmembran wegkontrahiert ist, als auch Innenmembranen ohne umgebende Außenmembranen. Weiterhin sind Vesikeln mit Einzelmembranen sichtbar, die wahrscheinlich abgelöste Außenmembranen darstellen. Fraktion 1 und Fraktion 2 (Abb. 2 D) bestehen im wesentlichen aus Einzelmembranvesikeln von unterschiedlichem Durchmesser. Fraktion 9 (Abb. 2 E) besteht aus größeren Einzelmembranen, die in ihrem Inneren einige Crista-Profile und Matrixreste zeigen.

ABB. 2 A

Durch Aufschluß in der "Neurospora-Zell-Mühle" und differentielle Zentrifugation
gewonnene Mitochondrien

(x 41 000)

ABB. 2 B

Mitochondrien nach Schwellen durch Resuspension in 10 mM Tris-HCl pH 7,6

(x 41 000)

2A

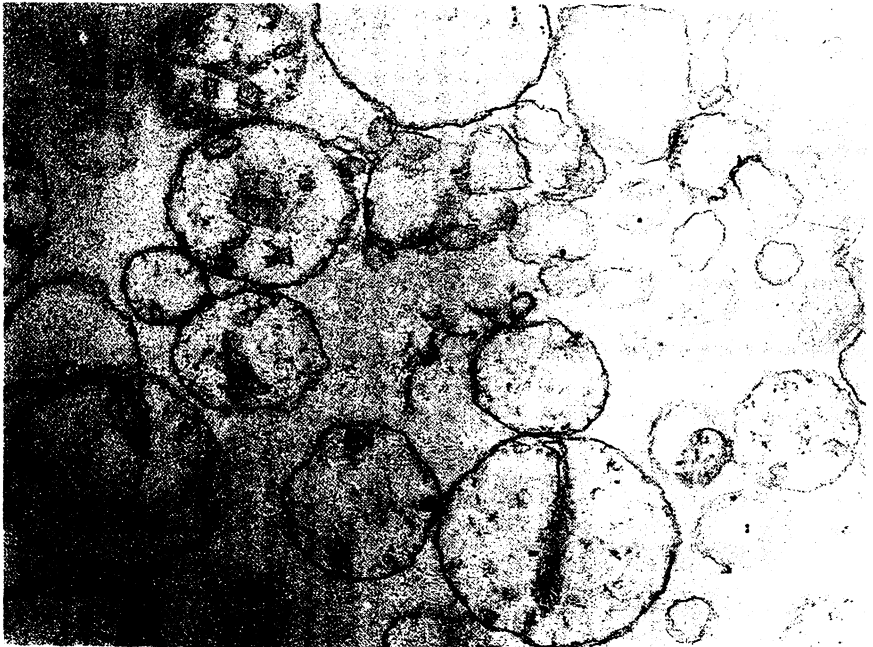
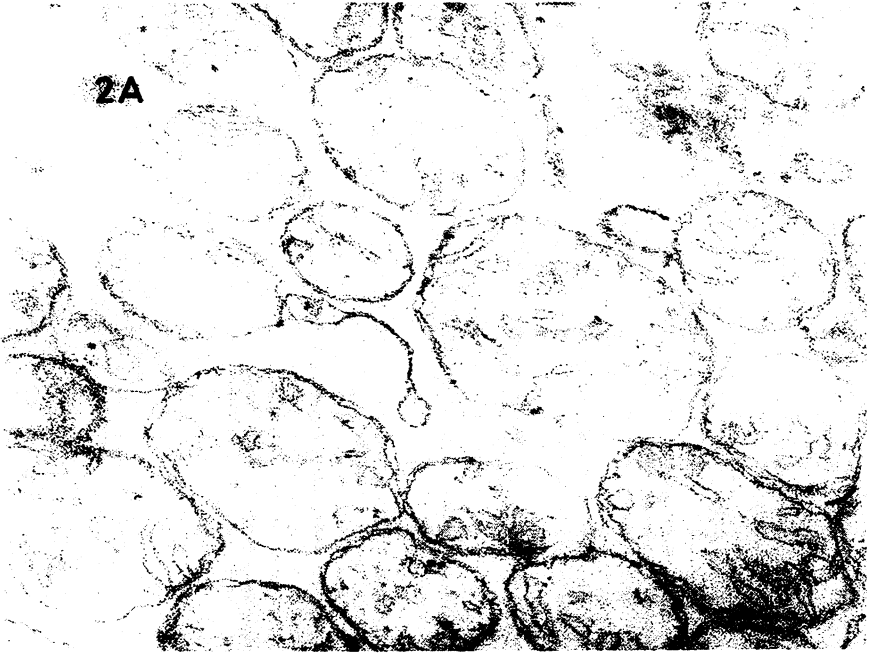
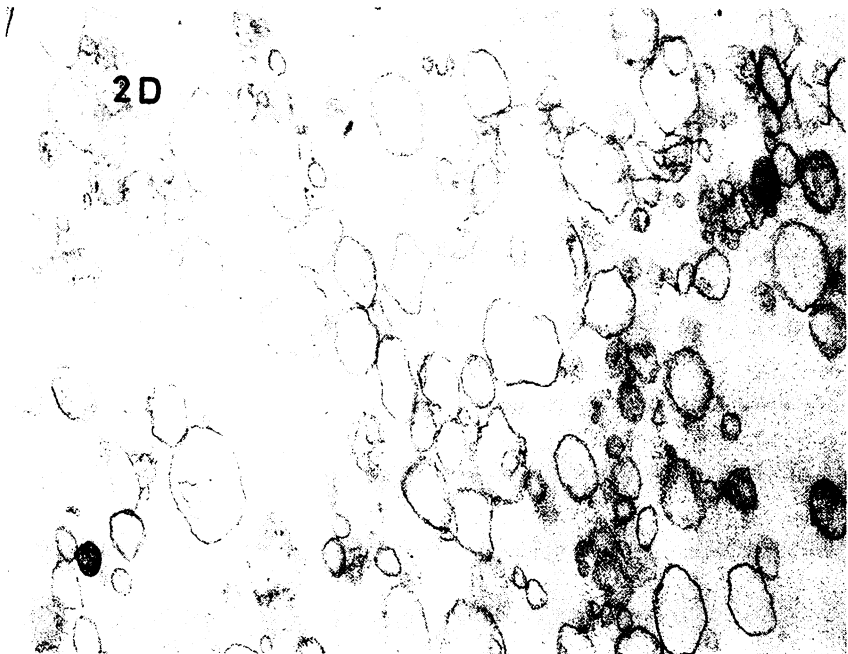


ABB. 2 C

Mitochondrien nach Schrumpfen durch Zugabe von 1/3 Volumen 1,8 M Saccharose, 8 mM ATP, 8 mM MgCl_2 pH 7,6 zur Suspension der geschwollenen Mitochondrien (x 41 000)

ABB. 2 D

Fraktion 2 vom Saccharosedichtegradienten (Außenmembranpräparation)
(x 41 000)



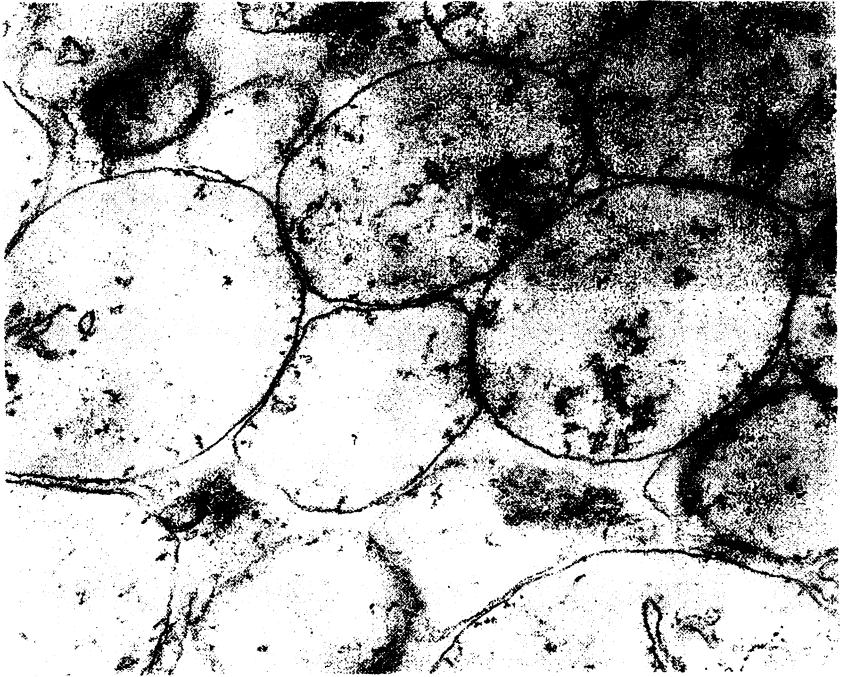


ABB. 2 E
Fraktion 9 vom Saccharosedichtegradienten (Innenmembranpräparation)
(x 41 000)

Abb. 3 zeigt die Proteinbandenmuster, die bei Polyacrylamidgelelektrophorese der phospholipidextrahierten Fraktionen 1 und 9 nach Anfärbung mit Amidoschwarz erhalten werden. Fraktion 1 ergibt im wesentlichen eine einzige Proteinbande, die als Bande 11 der gesamten Mitochondrienmembranen nach der Nomenklatur von SEBALD et al. (20) identifiziert wurde. Weiterhin sieht man Spuren der Banden 4, 5, 6 und 8. Das Elektropherogramm der Fraktion 9 weist alle Banden auf, die in Elektrophoresemustern von ganzen Mitochondrienmembranen beobachtet werden (20), mit der bemerkenswerten Ausnahme, daß die Bande 11 in der Innenmembranfraktion wesentlich schwächer ist, als bei ganzen Mitochondrienmembranen.

Die quantitativen Verhältnisse für die Außenmembranfraktion (Fraktion 1) und für die Innenmembranfraktion (Fraktion 9) sowie für ganze Mitochondrienmembranen, werden in Densitogrammen der mit Amidoschwarz gefärbten Gele sichtbar, die in Abb. 4 dargestellt sind. Der Anteil der Bande 11 in Fraktion 1 beträgt ca. 80% der gesamten Amidoschwarz-Extinktion.

3.2. Aminosäureneinbau in mitochondriale Außen- und Innenmembranen

3.2.1. Aminosäureneinbau in vitro

Isolierte Mitochondrien wurden unter zuvor als optimal bestimmten Bedingungen (20) mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mitochondrien der Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung unterworfen und auf dem Dichtegradienten wie oben beschrieben aufgetrennt. Die spezifischen Radioaktivitäten des Proteins der einzelnen Fraktionen vom Saccharosedichtegradienten sind in Abb. 5 dargestellt. Die spezifischen Radioaktivitäten der Fraktionen 1 und 2 vom oberen Teil des Gradienten, die im wesentlichen Außenmembranen enthalten, sind sehr niedrig verglichen mit denen der Innenmembranfraktionen (Fraktionen 7-10). Das weist darauf hin, daß die Polypeptidketten, die von den mitochondrialen

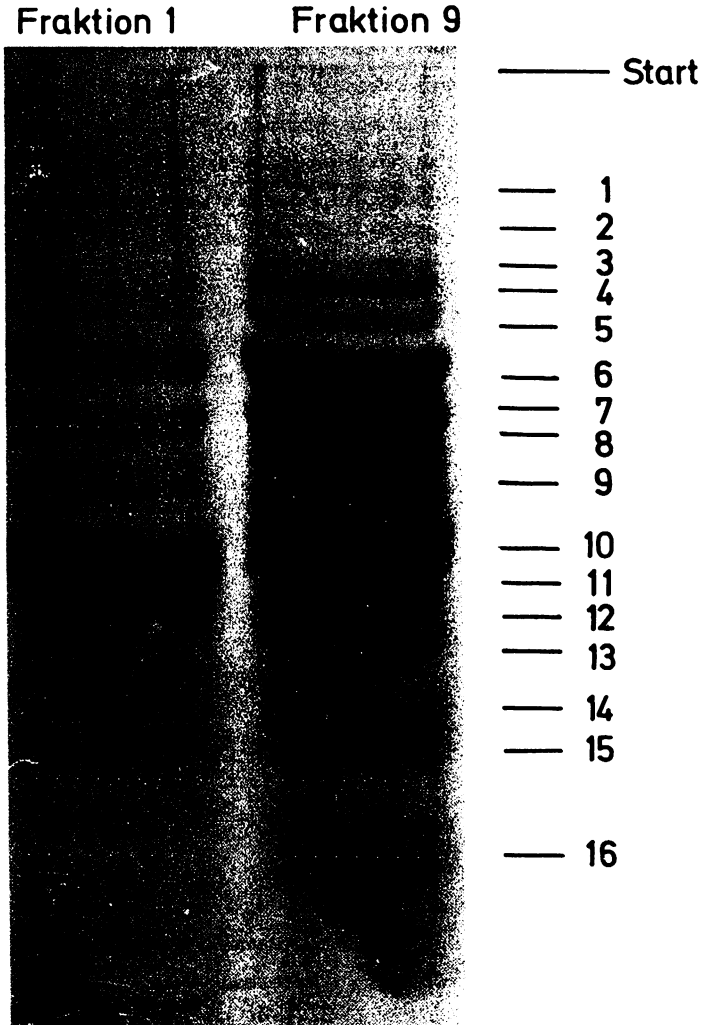


ABB. 3

Polyacrylamidgelelektrophorese des Proteins von einer Außenmembranpräparation (Fraktion 1) und von einer Innenmembranpräparation (Fraktion 9).

Die Gele wurden mit Amidoschwarz angefärbt. Die Banden wurden nach SEBALD et al. (20) numeriert.

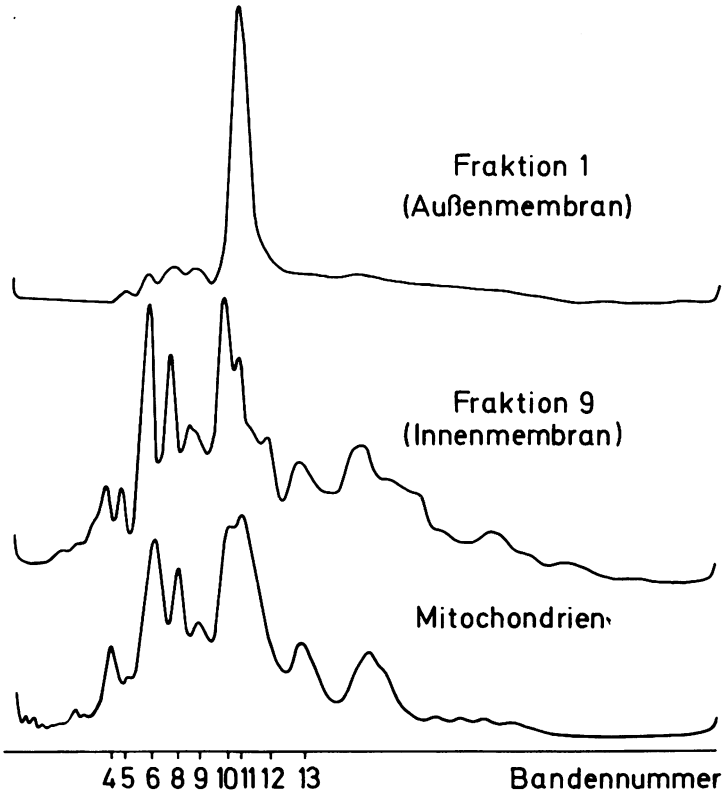


ABB. 4

Densitometrische Auswertung der Elektrophoresemuster der Proteine von einer Außenmembranpräparation (Fraktion 1), von einer Innenmembranpräparation (Fraktion 9) und von nicht getrennten mitochondrialen Membranen (Mitochondrien). Die mit Amidoschwarz gefärbten Gele wurden bei $546 \text{ m}\mu$ densitometriert. Die Banden wurden nach SEBALD et al. (20) nummeriert.

Ribosomen in den isolierten Mitochondrien synthetisiert werden (23), in die innere Membran, aber nicht in die äußere Membran integriert werden.

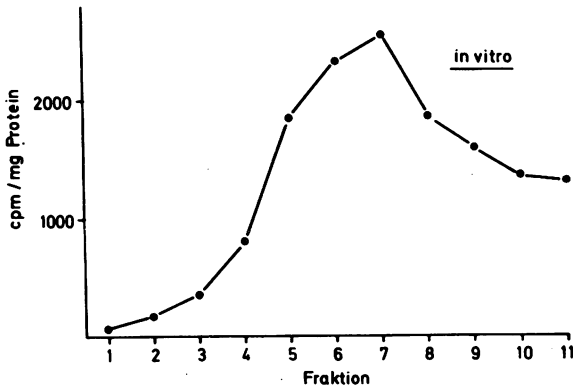


ABB. 5

Spezifische Radioaktivitäten von mitochondrialen Außen- und Innenmembranfraktionen nach Einbau von markierten Aminosäuren in isolierte Mitochondrien. Die Fraktionen wurden durch Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung einer Mitochondrienpräparation und nachfolgende Saccharosedichtegradientenzentrifugation gewonnen. Sie entsprechen denen in Abb. 1 A - F.

3. 2. 2. Aminosäureneinbau *in vivo*

Um die Biosynthese der Außenmembranproteine in ganzen Zellen zu untersuchen, wurden *Neurospora*-Hyphen in zwei getrennten Anteilen mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert, ein Anteil mit ^{14}C -Aminosäuren ohne Cycloheximid, der andere mit ^3H -Aminosäuren nach Vorinkubation mit Cycloheximid. Die Details dieses Verfahrens finden sich im methodischen Teil. Nach der Markierung wurden die beiden Anteile vereinigt und es wurden die Mitochondrien isoliert, die dann in Außen- und Innenmembran aufgetrennt wurden.

Abb. 6 A zeigt das Kontrollexperiment (ohne Cycloheximid, ^{14}C -Radioaktivität). Alle Fraktionen des Dichtegradienten weisen darin etwa gleiche spezifische Radioaktivitäten auf. Zwischen Außen- und Innenmembranfraktion kann kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Daraus kann man schließen, daß die Proteine der mitochondrialen Außen- und Innenmembranen in exponentiell wachsenden *Neurospora*-Zellen mit gleicher Geschwindigkeit gebildet und in die Membranen eingefügt werden.

Nach Vergiftung der Zellen mit $100\ \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid ist der cytosolische Proteinsyntheseapparat zu 99% gehemmt (9). Die spezifische Radioaktivität, die den restlichen 1% der Kontrolle entspricht, wurde in dem Überstand der 1 h $78\ 000 \times g$ Zentrifugation gemessen und von allen Fraktionen 1 - 11 subtrahiert. Die Abb. 6 B zeigt, daß in Anwesenheit von Cycloheximid die Hemmung des Einbaus in die Außenmembran (^3H -Radioaktivität) die Hemmung des Einbaus in die Innenmembran bei weitem überschreitet. Daß auch der Einbau in die Innenmembran partiell gehemmt wird, liegt daran, daß das mitochondriale Proteinsynthesystem nur für die Synthese eines relativ kleinen Anteils (etwa 8% nach SEBALD et al. (24)) der Proteine der Innenmembran verantwortlich ist. Bei weitem der größte Anteil wird durch das cytosolische System zur Verfügung gestellt.

Es ergibt sich weiterhin aus dem Experiment, daß die spezifische Radioaktivität nach Cycloheximidgabe und die Aktivität der Succinat-Cytochrom c-Reduktase eine sehr ähnliche Verteilung im Saccharosedichtegradienten aufweisen (mit Ausnahme

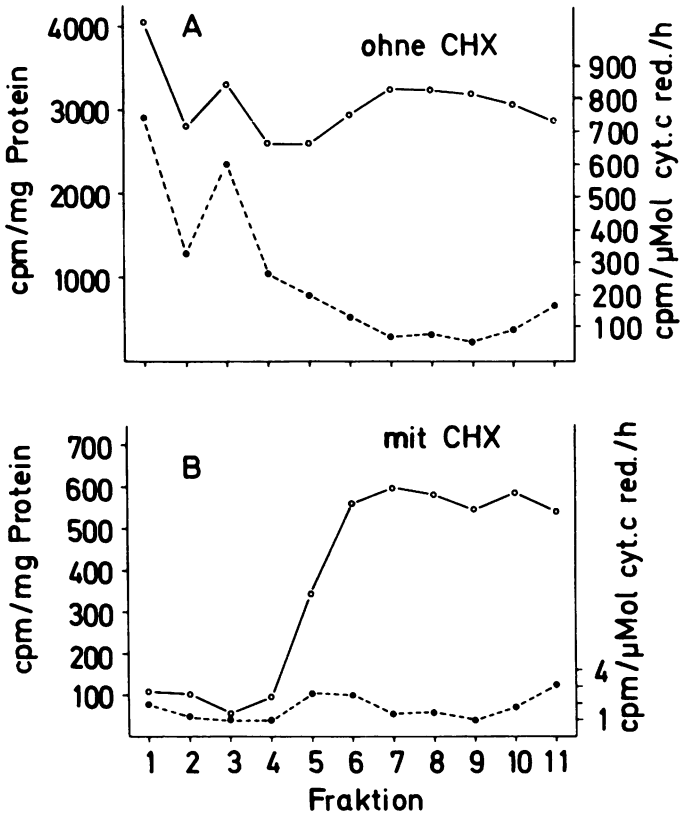


ABB. 6

In vivo-Einbau von markierten Aminosäuren in mitochondriale Außen- und Innenmembranfraktionen in Gegenwart und Abwesenheit von Cycloheximid. Neurospora-Zellen wurden in zwei getrennten Anteilen markiert, der eine mit ^{14}C -Aminosäuren in Abwesenheit von Cycloheximid, der andere mit ^3H -Aminosäuren in Gegenwart von $100\ \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid. Die zwei Anteile wurden anschließend vereinigt und Außen- und Innenmembranfraktionen wurden durch Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung und nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation hergestellt. Fraktion 1 stellt die oberste und Fraktion 11 die unterste Fraktion des Gradienten dar.

- A: Einbau ohne Cycloheximid (^{14}C -Radioaktivität)
 B: Einbau mit Cycloheximid (^3H -Radioaktivität)
 —○—○— Spezifische Radioaktivität (cpm/mg Protein)
 ---○---○--- Verhältnis Radioaktivität/Succinat-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität (cpm/μMol Cytochrom c red. x h⁻¹)

der Fraktionen 10 - 11). Dies zeigt sich auch in dem Verhältnis Radioaktivität/Succinat-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität, das ebenfalls in Abb. 6 B angegeben ist. Es ist sehr ähnlich in den Fraktionen 1 - 2 und 8 - 9, den typischen Außen- bzw. Innenmembranfraktionen.

Interessant ist diesbezüglich der Vergleich des Verhältnisses Radioaktivität/Succinat-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität in Cycloheximid-Experiment und Kontrolle. Wie Abb. 6 A zeigt, ist im Kontrollexperiment dieses Verhältnis in den Fraktionen 1 - 2 und den Fraktionen 8 - 9 sehr verschieden.

Diese Experimente lassen darauf schließen, daß in Gegenwart von Cycloheximid die Markierung des Proteins der äußeren mitochondrialen Membran weniger als 3% der der inneren Membran beträgt.

4. DISKUSSION

Die Experimente zur Trennung von Außen- und Innenmembranen von *Neurospora crassa*-Mitochondrien, die in dieser Arbeit beschrieben werden, bestätigen und erweitern die Befunde von CASSADY und WAGNER (14) und von CASSADY (15). In diesen Befunden war gezeigt worden, daß das kombinierte Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Verfahren, wie es ursprünglich von PARSONS et al. (4, 12) und von SOTTO-CASA et al. (13) für Lebermitochondrien ausgearbeitet worden war, auf *Neurospora*-Mitochondrien übertragbar ist.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die von den aufeinanderfolgenden Stufen dieses Verfahrens angefertigt wurden, tragen das außerordentlich ähnliche Verhalten dieser beiden Typen von Mitochondrien gegen Schwellen und Schrumpfen zur Schau. Weiterhin macht die Elektronenmikroskopie die Trennung in leichte Einzelmembranvesikel in den oberen Schichten des Gradienten, und in schwerere Einzelmembranvesikel nahe dem Boden des Gradienten sichtbar. Dabei entsprechen die ersteren in ihren Charakteristika der Außenmembran, wie sie in ganzen und speziell in geschrumpften Mitochondrien erscheint. Die letzteren sind insbesondere wegen der Reste an Cristae mitochondriales und wegen der gut erkennbaren Reste von Matrixinhalt als Innenmembranen zu identifizieren.

Die Trennung ist offensichtlich nicht vollständig, da einerseits in der Außenmembranfraktion Innenmembranbestandteile und in der Innenmembranfraktion Reste von Außenmembran erscheinen und andererseits zwischen Außen- und Innenmembranfraktionen Doppelmembranvesikel auftreten, die weitgehend unveränderten Mitochondrien entsprechen.

Die weitere Identifizierung dieser Vesikel wird durch Markerenzymaktivitäten bewerkstelligt. Dabei wurden Succinat-Cytochrom c-Reduktase und die Cytochrome aa_3 und b als Marker für die Innenmembran verwendet (4, 12, 13). *Neurospora*mitochondrien besitzen weder rotenoninsensitive NADH-Cytochrom c-Reduktase noch Monoaminoxidase (15), die in Lebermitochondrien gefunden werden (13,

25). Deshalb wurde Kynureninhydroxylase als verlässliches Markerenzym für die Außenmembran verwendet. Dieses Enzym wurde zuerst von CASSADY und WAGNER (14) in der Außenmembran von Neurosporamitochondrien aufgefunden.

Ein roter Farbstoff, nach den vorliegenden Daten das saure Carotinoid Neurosporananthin (22), konnte mit organischen Lösungsmitteln in relativ hoher Konzentration aus den Außenmembranfraktionen extrahiert werden. Da seine Konzentration in den Innenmembranfraktionen sehr niedrig und im Vergleich zu ganzen Mitochondrien abgereichert ist und weiterhin in denjenigen Zellfraktionen, die erst nach den Mitochondrien sedimentieren, in geringerer Konzentration als in der Außenmembran aufgefunden wird, wird er als guter Marker für die mitochondriale Außenmembran angesehen.

Die Funktion dieses Carotinoids ist unbekannt. Es mag spekuliert werden, daß es als Radikalfänger dient, der die ungesättigte Fettsäuren enthaltenden Phospholipide der Außenmembran vor durch Licht induzierter Oxidation schützt. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß bei menschlichen Porphyrien, bei denen durch Licht erzeugte Radikale schwere Dermatosen auslösen können, die therapeutische Gabe von Carotinoiden effektiv ist (26).

Eine weitere Hypothese zum funktionellen Verständnis der Lokalisation dieses Carotinoids könnte ihm die Aufgabe zuschreiben, das licht-sensitive Elektronentransportsystem der inneren Membran vor der Einwirkung hoher Lichtintensitäten zu schützen (vgl. T.W.GOODWIN (27)). Hierzu seien Untersuchungen von HARDING et al. (18) erwähnt, aus denen klar hervorgeht, daß die Bildung der Carotinoidfarbstoffe in Neurospora vom Licht abhängig ist. Neurosporahyphen, die im Dunkeln gezüchtet werden, weisen sehr geringe Carotinoidkonzentrationen auf.

Im Gegensatz zur mitochondrialen Außenmembran von Rattenleber (28) ergibt diejenige von Neurospora im wesentlichen eine einzige Proteinbande auf der Polyacrylamidgelelektrophorese. Die daneben beobachteten schwächeren Banden können der Verunreinigung durch Innenmembran zugeschrieben werden. Dies wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß diese schwachen Banden in der Außenmembranfraktion mit den stärksten Banden in der Innenmembranfraktion identisch

sind. Des weiteren entspricht der Grad der Verunreinigung der Außenmembranpräparation durch Innenmembran nach Berechnung auf der Basis von Markerenzymaktivitäten recht genau dem Anteil dieser schwächeren Banden an der Gesamtproteinmenge auf dem Gel. Dies konnte durch Densitometrie der mit Amidoschwarz gefärbten Gele bestimmt werden.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß mehr als 95% des Proteinanteils der Außenmembran von *Neurospora* entweder aus einem einzigen Protein bestehen oder aus einer größeren Anzahl von Proteinen mit gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit bzw. mit der Fähigkeit unter den Bedingungen der Elektrophorese ein Aggregat zu bilden.

Ein weiterer wichtiger Unterschied des hier beschriebenen Systems zum Rattenlebersystem ist die Abwesenheit von mikrosomaler Verunreinigung in den Außenmembranfraktionen. In der *Neurospora*-zelle existiert kein dem endoplasmatischen Reticulum von Rattenleber äquivalentes Membransystem. Dies spiegelt sich auch in der Beobachtung wider, daß RNA und damit Ribosomen in der Außenmembran von *Neurospora*-Mitochondrien nicht gefunden werden, im Gegensatz zu Außenmembranpräparationen von Rattenleber, in denen sogar wesentlich höhere RNA-Konzentrationen als in der Innenmembran festgestellt wurden (6).

Die Ergebnisse über den Einbau von markierten Aminosäuren in isolierte *Neurospora*-Mitochondrien, die in dieser Arbeit berichtet werden, stimmen mit denjenigen die mit Rattenlebermitochondrien erhalten wurden, überein (5, 6, 7). Sie weisen darauf hin, daß das Protein der Außenmembran in Abwesenheit des cytosolischen Proteinsynthesystems nicht gebildet werden kann.

Diese Schlußfolgerung wird bestätigt und gefestigt durch die Untersuchungen mit ganzen Zellen, die mit Cycloheximid behandelt wurden. Dies wurde getan, um das cytosolische Proteinsynthesystem auszuschalten, das mitochondriale System hingegen weiterarbeiten zu lassen. Die dabei erhaltenen experimentellen Daten zeigen klar, daß mindestens 97 - 98% des Außenmembranproteins von der cytosolischen Proteinsynthese gebildet werden.

Diese Schlußfolgerung wird weiterhin unterstützt durch die Ergebnisse der Gel-elektrophorese der Außen- und Innenmembranfraktionen. Diejenige Bande, die fast vollständig das Protein der Außenmembran ausmacht, wird in solchen Experimenten nicht markiert, in denen nur mitochondriale Ribosomen Polypeptidketten synthetisieren, d. h. also in Experimenten, in denen Aminosäuren entweder in isolierte Mitochondrien eingebaut werden, oder auch in ganze Zellen, in denen die cytosolischen Ribosomen mit Cycloheximid vergiftet wurden. Die Nichtmarkierung dieser Bande unter diesen Bedingungen wurde in einer früheren Untersuchung aus diesem Arbeitskreis gezeigt (20).

Von zusätzlichem Interesse in diesem Zusammenhang sind Experimente mit der cytoplasmatischen mi-1-(poky)-Mutante von *Neurospora* (29). Wenn die mitochondrialen Außen- und Innenmembranen dieser Mutante nach den hier beschriebenen Methoden getrennt werden und die dabei erhaltenen Proteinfractionen der Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen wurde, zeigt sich in der Außenmembranfraktion die gleiche Bande wie im Wildtyp.

Dies beweist, daß die Zusammensetzung der Außenmembran im wesentlichen unverändert ist, während, wie aus früheren Untersuchungen bekannt ist (20), die Zusammensetzung der gesamten Mitochondrienmembranen sehr stark verändert ist.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen deutlich, daß das extramitochondriale cytosolische Proteinsynthesesystem für mindestens 98% des Außenmembranproteins verantwortlich ist und daß das intramitochondriale System die Aufgabe hat, Proteine der inneren Membran zu bilden. Sie weisen nach, daß sich Außen- und Innenmembran von *Neurospora* ganz wesentlich hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Funktion unterscheiden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Äußere und innere Membranen von *Neurospora crassa*-Mitochondrien wurden durch eine kombinierte Methode von Schwell-Schrumpf-Ultraschall-Behandlung getrennt.
2. Die Membranen wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und von Markerenzymaktivitäten charakterisiert.
3. Der rote Carotinoidfarbstoff Neurosporaxanthin wurde in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert.
4. Die Proteine der inneren Mitochondrienmembran wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese in etwa 20 Banden aufgetrennt, während die äußere Membran im wesentlichen eine einzelne Proteinbande aufweist.
5. Wenn isolierte Mitochondrien radioaktive Aminosäuren in ihr Protein einbauen, erfolgt nur eine Markierung des Proteins der Innenmembran.
6. Die Synthese von Außenmembranprotein ist praktisch vollständig gehemmt, wenn ganze Neurosporazellen in Anwesenheit von Cycloheximid, einem Hemmer der cytosolischen Proteinsynthese, mit radioaktiven Aminosäuren versetzt werden. In die Innenmembran hingegen findet unter diesen Umständen weiterhin ein Einbau von Aminosäuren statt.
7. Diejenige elektrophoretische Proteinbande, die mehr als 95% des gesamten Außenmembranproteins vertritt, wird nicht markiert, wenn isolierte Mitochondrien mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert werden. Sie wird auch dann nicht markiert, wenn ganze Neurosporazellen in Gegenwart von Cycloheximid radioaktive Aminosäuren einbauen.
8. Es wird geschlossen, daß mindestens 98% des Außenmembranproteins vom cytosolischen System synthetisiert werden, und daß die Polypeptidketten, die in den Mitochondrien gebildet werden, in die mitochondriale Innenmembran integriert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) G. SCHATZ, in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts", E. Racker editor, Van Nostrand Reinhold Co. , New York, (1970) pg. 251.
- (2) E. RACKER, *ibid.* pg. 127.
- (3) L. ERNSTER and B. KUYLENSTIERNA, *ibid.* pg. 172.
- (4) D. F. PARSONS, G. R. WILLIAMS, W. THOMPSON, D. WILSON and B. CHANCE, in "Mitochondrial Structure and Compartmentation", E. Quagliariello et al. eds. , Adriatica Editrice, Bari, (1967) pg. 29.
- (5) W. NEUPERT, D. BRDICZKA and TH. BÜCHER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* , 27 (1967) 488.
- (6) W. NEUPERT, D. BRDICZKA and W. SEBALD, in "Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria", E. C. Slater et al. editors, Adriatica Editrice, Bari, (1968) pg. 395.
- (7) D. S. BEATTIE, R. E. BASFORD and S. B. KORITZ, *Biochemistry*, 6 (1967) 3099.
- (8) D. S. BEATTIE, *J. Biol. Chem.* , 243 (1968) 4027.
- (9) W. SEBALD, A. J. SCHWAB and TH. BÜCHER, *Febs Letters*, 4 (1969) 243
- (10) H. J. VOGEL, *Microbiol. genet. Bull.* , 13 (1956) 42
- (11) H. WEISS, G. v. JAGOW, M. KLINGENBERG and TH. BÜCHER, *Europ. J. Biochem.* , 14 (1970) 75.
- (12) D. PARSONS, G. B. WILLIAMS and B. CHANCE, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* , 137 (1966) 643.

- (13) G. SOTTOCASA, B. KUYLENSTIERNA, L. ERNSTER and A. BERGSTRAND, *J. Cell Biol.*, 32 (1967) 415.
- (14) W. E. CASSADY and R. P. WAGNER, *Genetics*, 60 (1968) 168.
- (15) W. E. CASSADY, Thesis, University of Texas, Austin (1969).
- (16) H. -H. SCHOTT, V. ULLRICH and H. -J. STAUDINGER, *Z. physiol. Chemie*, 351 (1970) 99.
- (17) O. ARRIGONI and TH. P. SINGER, *Nature*, 193 (1962) 1256.
- (18) G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE and G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 555.
- (19) R. W. HARDING, P. C. HUANG and H. K. MITCHELL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 129 (1969) 696.
- (20) W. SEBALD, TH. BÜCHER, B. OLBRICH and F. KAUDEWITZ, *Febs Letters*, 1 (1968) 235.
- (21) H. OKAMOTO, S. YAMAMOTO, M. NOZAKI and O. HAYAISHI, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 26 (1967) 309.
- (22) A. J. AASEN and S. LIAAEN JENSEN, *Acta Chem. Scand.*, 19 (1965) 1843.
- (23) W. NEUPERT, W. SEBALD, A. J. SCHWAB, A. PFALLER and TH. BÜCHER, *European J. Biochem.* 10 (1969) 585.
- (24) W. SEBALD, A. J. SCHWAB and TH. BÜCHER, in "Inhibitors Tools in Cell Research", edited by Th. Bücher and H. Sies, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1969, pg. 140.
- (25) G. SCHNAITMAN, V. G. ERWIN and J. W. GREENAWALT, *J. Cell Biol.*, 32 (1967) 719.

- (26) G.D. LUDWIG, persönliche Mitteilung
- (27) T.W. GOODWIN, *Advances of Enzymology*, 21 (1959) 360.
- (28) G. SCHNAITMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* , 63 (1969) 412.
- (29) W. NEUPERT, unveröffentlichte Ergebnisse

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c.

Th. Bücher, danke ich sehr herzlich nicht nur für die stete Unterstützung und Ermunterung während des Entstehens der vorliegenden Arbeit, sondern auch insbesondere für das Verständnis für die Freude und das Vergnügen seines biochemischen Schülers am Medizinstudium.

Ganz besonders danke ich Herrn Adolph Pfaller, dessen Können und Einsatz diese Arbeit wesentlich mitgestaltet haben.

Mein herzlicher Dank gilt ferner den Herren Dr. F. Sauer, A. J. Schwab, Dr. W. Sebald und Dr. H. Weiß, die mir bei vielen Problemen geholfen haben.

Diese Doktorarbeit sei auch eine dauernde und gute Erinnerung an die freundschaftliche Zusammenarbeit von September 1969 bis Juli 1970 mit Herrn Dr. George D. Ludwig, Professor und Chairman des Department of Medicine des Medical College of Ohio/Toledo, USA.

LEBENS LAUF

Am 24.10.1939 wurde ich als zweiter von drei Söhnen des Spenglers Heinrich Neupert und seiner Ehefrau Anna, geb. Zelter, in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Germering (1945-1949) und der Oberrealschule München-Pasing legte ich im Juli 1958 die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1958/59 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ich studierte zuerst ein Semester Rechte, dann drei Semester Biologie. Im Wintersemester 1960/61 begann ich mit dem Studium der Chemie. Sechs Semester später legte ich die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ab (15.10.1963). Von Dezember 1963 bis Dezember 1967 fertigte ich im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Th. Bücher meine biochemische Diplom- und Doktorarbeit an und promovierte im Januar 1968 zum Dr. rer. nat. Vom Wintersemester 1964/65 an studierte ich an der Universität München Medizin und bestand im August 1969 das medizinische Staatsexamen. Ich bin zur Zeit als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München tätig. Dort entstand auch unter Anleitung von Prof. Th. Bücher meine medizinische Doktorarbeit.