

Energiestoffwechsel in Mitochondrien

Von Hans Walter Heldt^[*]

Mitochondrien sind separate Stoffwechsel-Räume innerhalb der Zelle. Funktionelle Grenze des mitochondrialen Kompartiments ist die Innenmembran. In ihr befindet sich der Enzymapparat für den Elektronentransport und die oxidative Phosphorylierung. Die Substraterlegungs-cyclen sind im mitochondrialen Matrix-Raum lokalisiert. Spezifische Träger besorgen den Austausch von ADP, ATP, Phosphat und von Zwischenprodukten des Citratcyclus zwischen dem Matrix-Raum und dem extramitochondrialen Raum. Auf die besondere Bedeutung des Adeninnucleotid-Transportes für die Regulation des Energiestoffwechsels der Zelle wird näher eingegangen.

Mitochondrien kommen im Cytoplasma aller aeroben eukariotischen Zellen vor. Sie sind der Ort der Zellatmung, man hat sie daher „Kraftwerke der Zelle“ genannt. Die bei der Oxidation des Substratwasserstoffes freiwerdende Energie treibt die endergonische Synthese von Adenosin-triphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und Orthophosphat (P). Dieser Vorgang wird als oxidative Phosphorylierung^[**] bezeichnet. Die bei der Hydrolyse des ATP zu ADP und Phosphat freiwerdende Energie bestreitet die energieverbrauchenden Prozesse der Zelle (z. B. mechanische, chemische, osmotische und elektrische Arbeit).

In der tierischen Zelle gibt es zwei wichtige Stoffwechsel-räume: das extramitochondriale Kompartiment, welches das Grundcytoplasma und den Kernraum umfaßt, und das mitochondriale Kompartiment. Eine Koordination der Stoffwechselabläufe erfordert den gezielten Transport von Substraten und Produkten durch die Membranen, welche die beiden Räume voneinander trennen. Dieser Bericht beschäftigt sich mit dem Aufbau des mitochondrialen Kompartiments. Einzelheiten über spezifische Transportvorgänge zwischen den zwei Stoffwechselräumen sollen einen Einblick in die Regulation des oxidativen Stoffwechsels geben.

1. Morphologischer Aufbau der Mitochondrien

Lichtmikroskopisch wurden Mitochondrien bereits in der Mitte des vorigen Jahrhunderts beobachtet^[2-5], eine genauere Aufklärung ihrer Struktur (Abb. 1) wurde jedoch erst durch die Elektronenmikroskopie ermöglicht^[6-8]. Besonders auffällig ist der hohe Membrananteil der Mitochondrien. Sie besitzen zwei Arten von Membranen (Abb. 2), die sich in der Feinstruktur, der Lipidzusammensetzung und im Proteingehalt unterscheiden. Die *Außenmembran* umgibt das Mitochondrion. Die *Innenmembran* erstreckt

sich in mehr oder minder dichter Packung endlos gefaltet oder in röhrenförmiger Anordnung im Innern der Mitochondrien. Sie weist eine sehr große Oberfläche auf. Die von ihr umschlossene mitochondriale Matrix besteht aus einem dichten Proteingel. Abgesehen von den Membran-



Abb. 1. Mitochondrion aus dem Nebenhodencpithel der Maus. 61 000-fache Vergrößerung [9].

phasen gibt es somit zwei Räume in den Mitochondrien: den *Intermembran-Raum* zwischen Außen- und Innenmembran und den *Matrix-Raum*.

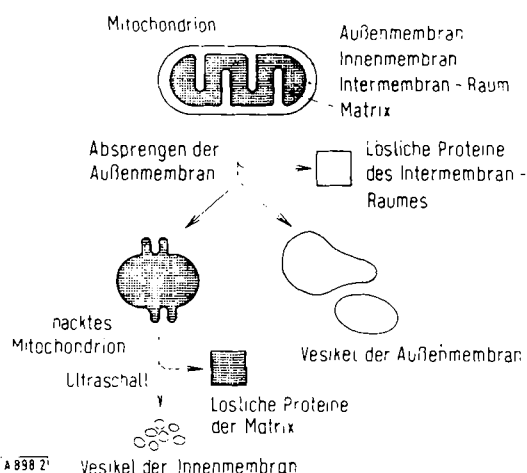


Abb. 2. Schema der Struktur und der Fraktionierung von Mitochondrien.

[*] Priv.-Doz. Dr. H. W. Heldt
Institut für Physiologische Chemie und
Physikalische Biochemie der Universität
8 München 2, Pettenkoferstraße 12-14a

Die hier besprochenen eigenen Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

[**] Eine umfassende Darstellung über den Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung hat Schatz [1] in dieser Zeitschrift gegeben.

Mit Hilfe der Technik des „negative staining“^[***] wurden an der zur Matrix gerichteten Seite der Innenmembran elektronenmikroskopisch charakteristische runde „Knöpfe“ von etwa 90 Å Durchmesser beobachtet^[10]. Die Außenmembran zeigt diese Knöpfe nicht. Inzwischen liegen Beweise vor, daß diese knopfförmigen Untereinheiten mit der kälte-labilen ATPase identisch sind, einem Enzym, das einen Teilschritt der oxidativen Phosphorylierung katalysiert^[11]. Es ist allerdings fraglich, ob diese im elektronenoptischen Bild sichtbaren Untereinheiten auch in der intakten Membran exponiert vorliegen. Möglicherweise wurden sie aus einer präexistierenden Struktur erst durch Behandlung mit dem Reagens gebildet. Die Tatsache, daß diese Strukturen nur an der Innenseite der Innenmembran beobachtet werden, weist auf den asymmetrischen Aufbau dieser Membran hin.

Charakteristische Unterschiede zwischen beiden Membranen zeigen sich auch in der Lipidzusammensetzung (Tabelle 1). So findet man Cholesterin vorwiegend in der

Tabelle 1. Zusammensetzung der Außen- und Innenmembranen von Mitochondrien aus Meerschweinchen-Leber [12, 13].

	Außenmembran	Innenmembran
Dichte	1.13	1.21
Protein:Lipid	1:0.829	1:0.275
Protein:Cholesterin	1:0.030	1:0.0051
Prozentualer Anteil der einzelnen Phospholipide am Gesamtphospholipid:		
Cardiolipin	3.2%	21.5%
Phosphatidylinosit	13.5%	4.2%
Phosphatidyläthanolamin	25.3%	27.7%
Lecithin	55.2%	44.5%

Außenmembran, während Cardiolipin fast nur in der Innenmembran auftritt^[12-14]. Zudem enthält die Innenmembran mehr Protein als die Außenmembran. In der Lipidzusammensetzung ähnelt die Innenmembran einer Bakterienmembran und die Außenmembran der Plasmamembran.

Mitochondrien vermehren sich durch Teilung^[15-17]. Dadurch stammen alle Mitochondrien eines Organismus von den Mitochondrien der Eizelle ab. Die in den Mitochondrien vorhandene Desoxyribonucleinsäure (DNS)^[18-21] unterscheidet sich von der DNS im Zellkern, sie hat wie die bakterielle DNS eine cyclische Struktur. Die mitochondriale DNS determiniert jedoch nur einige, für die Mitochondriengese-essentielle Proteine^[22]. Die Synthese der meisten mitochondrialen Proteine wird vom Zellkern gesteuert. Man spekuliert, daß die aeroben Zellen aus einer Symbiose zwischen anaeroben Zellen und von diesen phagocytierten aeroben Bakterien hervorgegangen sind^[23]. Nach dieser Hypothese ist die mitochondriale Außenmembran auf die durch Phagocytose nach innen gestülpte Zellmembran und die mitochondriale Innenmembran auf eine Bakterienmembran zurückzuführen.

[***] Beim „negativ staining“ wird die zu untersuchende Probe auf einem Flüssigkeitsfilm durch Oberflächenspannung ausgebreitet. Man bringt dann Phosphowolframat auf die Schicht. Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung geben Zellstrukturen einen negativen Kontrast.

2. Permeationsverhalten der Mitochondrien

Untersuchungen mit isolierten Mitochondrien ergaben, daß ein Teil des Mitochondrienraumes für niedermolekulare Substanzen, z. B. anorganische Ionen, Nucleotide, Aminosäuren und Saccharose, frei permeabel ist. Für große Moleküle, wie polymere Zucker oder Proteine, ist dieser Raum dagegen nicht zugänglich. Die Größe dieses für Saccharose permeablen Raumes läßt sich durch die Tonizität des Mediums beeinflussen. Unter isotonischen Bedingungen entspricht der für Saccharose permeable Raum etwa einem Drittel des gesamten mitochondrialen Lösungsraumes. Beim Übergang vom isotonischen zum hypotonischen Medium vergrößert sich der für Saccharose impermeable Raum auf Kosten des für Saccharose permeablen Raumes. In parallel dazu durchgeführten elektronenoptischen Untersuchungen wurde ein Schwellen des Matrix-Raumes (siehe Abb. 2) bei gleichzeitiger Verringerung des Intermembran-Raumes beobachtet. Ein Größenvergleich zwischen den funktionell gemessenen und morphologisch beobachteten Räumen zeigte, daß der für Saccharose permeable Raum mit dem Intermembran-Raum und der für Saccharose impermeable Raum mit dem Matrix-Raum identisch ist^[24, 25]. Aus dem Ergebnis ist ersichtlich, daß die Außenmembran für niedermolekulare Substanzen durchlässig ist, während die Innenmembran die osmotisch aktive Membran darstellt.

3. Lokalisation mitochondrialer Enzyme

In den Mitochondrien enthaltene Enzyme können im Matrix-Raum oder im Intermembran-Raum vorliegen. Sie können auch strukturgebunden Bestandteil der Innen- oder Außenmembran sein. Ein Enzym der Innenmembran kann zum Matrix-Raum oder zum Intermembran-Raum gerichtet sein.

Um ein mitochondriales Enzym einem dieser Orte zuzuordnen, wurden zwei Wege beschritten: funktionelle Untersuchungen an intakten und aufgebrochenen Mitochondrien sowie Fraktionierung der Mitochondrien mit anschließender Messung der Enzymaktivitäten in den Fraktionen.

Die funktionellen Untersuchungen gehen von der Tatsache aus, daß der Intermembran-Raum für Substrate und Nucleotide frei permeabel ist. Der nicht frei permeable Matrix-Raum enthält u. a. die mitochondrialen Nucleotide und Mg^{2+} -Ionen. Die Innenmembran ist für Nucleotide undurchlässig, lediglich für Adeninnucleotide besteht ein spezifischer Transport, auf den noch näher eingegangen wird. Dieser Transport wird durch Atractylosid (Abschnitt 7) gehemmt. Die Lokalisation eines Enzyms innerhalb der Mitochondrien läßt sich u. a. dadurch bestimmen, daß man die Reaktivität mit intra- oder extramitochondrialen Nucleotiden, Empfindlichkeit gegen Atractylosid sowie die Abhängigkeit von zugesetzten Mg^{2+} -Ionen mißt.

Die Fraktionierung der Mitochondrien beruht auf einer gezielten Öffnung der Außenmembran. Die löslichen Enzyme des Intermembran-Raumes werden freigesetzt und erscheinen im Überstand. Abbildung 2 zeigt ein Schema dieses Vorgehens. Eine Möglichkeit, die Außenmembran

gezielt zu öffnen, ist die Behandlung von Mitochondrien mit hypotonen Medien^[12, 24]. Da die Innenmembran osmotisch aktiv ist, schwillt im hypotonen Medium der Matrix-Raum, die Innenmembran drückt gegen die Außenmembran und sprengt diese auf.

Eine andere Methode, selektiv die Außenmembran zu öffnen, macht sich die Tatsache zu Nutzen, daß Cholesterin vorwiegend in der Außenmembran vorkommt. Bekanntlich geht Cholesterin mit Digitonin eine Verbindung ein. Die Zugabe von Digitonin zu Mitochondrien bindet das Cholesterin der Außenmembran und führt zum Aufbrechen^[26-28] der Membran. Durch Zentrifugieren im Dichtegradienten lassen sich die Fragmente der Außenmembran, die zumeist als Vesikel vorliegen, abtrennen. Übrig bleiben die nackten Mitochondrien, die aus der Innenmembran und der von ihr umschlossenen Matrix bestehen. Bei diesen nackten Mitochondrien stülpen sich die Faltungen der Membran nach außen. Eine Behandlung mit Ultraschall führt zur Zerstörung der Innenmembran. Aus den Membranfragmenten bilden sich kleine Vesikel, die sich durch Zentrifugieren von den löslichen Proteinen des Matrix-Raumes abtrennen lassen.

Aus der Lokalisation einiger wichtiger mitochondrialer Enzyme, zusammengestellt in Tabelle 2, erkennt man Grundzüge der Organisation des mitochondrialen Stoff-

Tabelle 2. Lokalisation mitochondrialer Enzyme [24, 26-41].

Ort	Enzym
Innenmembran	Atmungskette NADH-Oxidase Succinat-Dehydrogenase Fettsäure-CoA-Dehydrogenase Glycerophosphat-Oxidase Pyridinnucleotid-Transhydrogenase ATP-Synthetase
Matrix	Dehydrogenasen des Citratcyclus β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase Succinat-Thiokinase GTP-abhängige Fettsäureaktivierung ATP-abhängige Fettsäureaktivierung (für kurzkettige Fettsäuren) GTP-AMP-Phosphat-Transferase Transaminasen Citruillin-Synthetase Pyruvat-Carboxylase
Intermembran-Raum	Adenylat-Kinase Kreatin-Kinase Nucleosiddiphosphat-Kinase
Außenmembran	ATP-abhängige Aktivierung langkettiger Fettsäuren Phospholipase Enzyme der Lecithinsynthese Monoamin-Oxidase

wechsels: Die Oxidation der Substrate und die damit verbundene ATP-Synthese finden an oder in der Innenmembran statt. Die Prozesse der Substraterlegung (Citratcyclus, Fettsäureabbau) sind im Matrix-Raum lokalisiert. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente (in Form von NADH, Succinat oder Acyl-Coenzym A) diffundieren an die Innenseite der Innenmembran und werden dort oxidiert. Die mit der Atmungskette gekoppelte ATP-Synthese findet an der Innenseite der Innenmembran statt, das gebildete

ATP gelangt in den Matrix-Raum. Sorgfältig bereitete nackte Mitochondrien zeigen dementsprechend alle wesentlichen Eigenschaften von ganzen Mitochondrien^[26]. Dagegen scheinen die Enzymaktivitäten im Intermembran-Raum (die übrigens teilweise auch außerhalb der Mitochondrien vorkommen) und die Enzyme der Außenmembran eine mehr akzessorische Bedeutung zu haben.

4. Eigenschaften der Innenmembran

Aus funktioneller Sicht läßt sich der Intermembran-Raum dem extramitochondrialen Raum zurechnen. Trennwand zwischen dem mitochondrialen und dem extramitochondrialen Stoffwechselkompartiment ist die Innenmembran. Durch diese Membran müssen die Substrate der mitochondrialen Oxidation, vor allem Brenztraubensäure und Fettsäuren, sowie Orthophosphat und ADP in den Matrix-Raum gelangen und das Produkt ATP aus den Mitochondrien ausgeschleust werden.

Geschlossene Membranen sind grundsätzlich sowohl für Kationen als auch für Anionen undurchlässig. Für undissoziierte Säuren oder Basen sind Membranen ein wesentlich geringeres Permeationshindernis, da sie sich in gewissem Maße in der Lipidschicht der Membran lösen können. Damit besteht die Möglichkeit, daß Anionen und Kationen über die mit ihnen im Gleichgewicht stehenden undissoziierten Moleküle die Membran passieren. Wahrscheinlich trifft dies für einige Monocarbonsäuren zu. Bei Di- und Tricarbonsäuren sowie bei der Phosphorsäure liegen die Dissoziationsgleichgewichte im Neutralbereich dagegen soweit auf Seiten der Anionen, daß Membranen für diese Substanzen praktisch undurchlässig sind^[42].

Im Zusammenhang mit den Permeationseigenschaften von Membranen fällt es auf, daß die wichtigsten Substrate der Mitochondrien, die Brenztraubensäure und die Fettsäuren, Monocarbonsäuren sind. Andererseits liegen die Zwischenprodukte der mitochondrialen Substraterlegungscyclen (Citratcyclus und Oxidation der Fettsäuren) als Di- oder Tricarbonsäuren oder als Derivate des Coenzym A (einer phosphathaltigen Verbindung) vor, die nicht frei durch die Innenmembran diffundieren können. Gleiches gilt für die an der Substraterlegung beteiligten Pyridinnucleotide und für die an der Energiekonservierung beteiligten Adenin- und Guaninnucleotide.

5. Transport von Substraten

Sowohl die Brenztraubensäure als auch die kurzkettigen Fettsäuren können wahrscheinlich ohne spezielle Träger (carrier) die Innenmembran passieren^[42]. Neuere Befunde über das Vorkommen eines speziellen Trägers für das Brenztraubensäure-Anion in der Innenmembran^[43] bedürfen weiterer Untersuchungen.

Während die kurzkettigen Fettsäuren im Matrix-Raum aktiviert (d. h. mit Coenzym A verknüpft) werden, erfolgt die Aktivierung der langkettigen Fettsäuren, z. B. Palmitinsäure, bereits an der Außenmembran oder am endoplasmatischen Retikulum^[36-39]. Damit ergibt sich für die Mito-

chondrien das Problem, die aktivierten Fettsäuren durch die für Coenzym A und dessen Derivate undurchlässige Innenmembran in den Matrix-Raum zu bringen. Dazu dient ein spezieller Transportmechanismus, der jedoch noch nicht in allen Einzelheiten geklärt ist. Für Diskussionen über einen möglichen Reaktionsverlauf (Abb. 3) sind drei experimentelle Befunde wichtig: a) Für die Oxidation

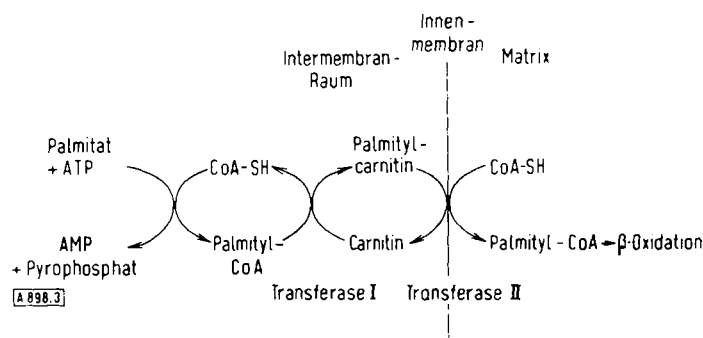


Abb. 3. Schema der Aktivierung langkettiger Fettsäuren und des Transportes der aktivierten Fettsäuren in den Matrixraum [45].

von Palmitat ist Carnitin [3-Hydroxy-4-(trimethylammonio)butyrat] erforderlich^[44]. b) Weder Carnitin noch Coenzym A oder dessen Ester können die Innenmembran passieren^[45, 46]. c) Man hat zwei verschiedene Acyl-Coenzym-A-Carnitin-Transferasen entdeckt, von denen eine in der Innenmembran gebunden ist^[47]. Vermutlich wird durch die äußere Transferase (I) das außerhalb der Innenmembran befindliche Acyl-Coenzym A in Acylcarnitin übergeführt und dabei Coenzym A freigesetzt. Man stellt sich vor, daß die Transferase in der Innenmembran (II) vektoriell angeordnet ist^[45], d. h. daß die Bindungsstellen für Carnitin und Acylcarnitin nach außen, die Bindungsstellen für Coenzym A und Acylcoenzym A zur Matrix gerichtet sind. Nach diesem Schema gelangt Acylcarnitin von außen an die Innenmembran, der Acylrest wird „hindurchgereicht“ und reagiert mit dem mitochondrialen Coenzym A an der Innenseite der Membran. Es läge hier eine Funktionseinheit zwischen chemischer Reaktion und gerichtetem Membran-Transport vor.

Für die Zwischenprodukte des Citratcyclus ist die Innenmembran undurchlässig. Diese Undurchlässigkeit wird durch spezifische Träger überbrückt^[48–53]. Der Dicarbonsäure-Träger transportiert Malat und Succinat im Austausch mit diesen Dicarbonsäuren oder mit Phosphat. Der Transport von Citrat und Isocitrat durch den Citrat-Träger und der Transport von α -Ketoglutarat durch den α -Ketoglutarat-Träger erfolgt im Austausch mit Dicarbonsäuren. Darüber hinaus gibt es Hinweise für einen spezifischen Transport von Glutamat.

Der Transport von Malat ist für die Gluconeogenese wichtig. Der Anfangsschritt dieser Stoffwechselkette, die Carboxylierung von Pyruvat, erfolgt im Matrix-Raum^[40]. Das dabei gebildete Oxalacetat kann nach Reduktion als Malat aus den Mitochondrien heraustransportiert werden. Die weiteren Syntheseschritte bei der Gluconeogenese laufen dann außerhalb der Mitochondrien ab.

Der Transport von Citrat spielt bei der Lipogenese eine Rolle^[54]. Ausgangssubstanz für die Synthesekette der

Lipogenese ist Acetyl-Coenzym A, welches in den Mitochondrien z. B. aus Pyruvat gebildet wird. Da die Fettsynthese außerhalb der Mitochondrien stattfindet, ergibt sich die Notwendigkeit, das Acetyl-Coenzym A aus den Mitochondrien auszuschleusen. Da die Innenmembran für Coenzym A und dessen Thioester impermeabel ist, findet ein indirekter Transport statt. In den Mitochondrien kondensiert Acetyl-Coenzym A mit Oxalacetat zu Citrat, dieses wird über den Citrat-Träger in den extramitochondrialen Raum transportiert und dort in Acetyl-Coenzym A und Oxalacetat zurückverwandelt.

6. Transport von Phosphat

Der Transport von Phosphat durch den Phosphat-Träger erfolgt im Austausch mit Hydroxid-Ionen oder als Cotransport mit Protonen^[42, 49, 55]. Diese Möglichkeiten lassen sich experimentell nicht unterscheiden. Der Transport wird durch sehr geringe Konzentrationen von Verbindungen gehemmt, die SH-Gruppen blockieren^[56–58]. Demnach enthält der Phosphat-Träger freie SH-Gruppen. Durch den Phosphat-Transport kann das für die oxidative Phosphorylierung erforderliche Phosphat in den Matrix-Raum gelangen. Da der Transport von Phosphat mit Ausnahme von Hydroxid-Ionen ohne Austausch mit Anionen stattfindet, hingegen der Transport von Dicarbonsäuren im Austausch mit Phosphat, und der Transport von Tricarbonsäuren im Austausch mit Dicarbonsäuren, kommt dem Phosphat-Transport eine Schlüsselfunktion für die Aufnahme von Di- und Tricarbonsäuren in die Mitochondrien zu.

7. Transport von Adeninnucleotiden

Durch einen Träger wird das ADP in das Mitochondrion hinein- und das gebildete ATP aus den Mitochondrien hinausbefördert (Abbildung 4). Dieser Träger ist für ADP

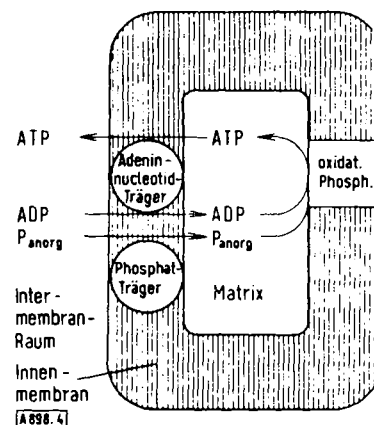


Abb. 4. Funktionsschema des Adeninnucleotid-Transportes.

und ATP spezifisch. AMP, Guanin, Uracil-, Cytidin- und Pyridinnucleotide werden nicht befördert^[59]. Der Transport ist ein obligater Austausch: für jedes hineintransportierte Adeninnucleotid-Molekül wird ein anderes hinaus-

transportiert. Wahrscheinlich kann der Träger in unbelastetem Zustand die Membran nicht passieren^[60]. Auf diese Weise bleibt die Summe der mitochondrialen Adeninnucleotide konstant. Die Affinität des Trägers ist sehr hoch. Bei einer ADP-Konzentration außerhalb des Mitochondrions von $12 \cdot 10^{-6}$ M wird bereits die halbmaximale Geschwindigkeit des Transportes erreicht^[42]. Atractylosid, ein pflanzliches Glykosid aus der Mastix-Distel, und Bonkreksäure, ein Antibiotikum, sind spezifische Hemmer des Adeninnucleotid-Transportes^[61-63]. Beide Substanzen sind daher sehr starke Gifte.

Die Spezifität des Adeninnucleotid-Trägers ist für beide Transportrichtungen verschieden. Für den Transport von innen nach außen bestehen für ADP und ATP keine meßbaren Unterschiede. Hingegen wird beim Hineintransport das ADP gegenüber dem ATP stark bevorzugt. Dies gilt jedoch nur für intakte Mitochondrien, bei denen eine Koppelung zwischen dem Elektronentransport durch die Atmungskette und der ATP-Synthese vorliegt. Bei Aufhebung dieser Koppelung durch „Entkoppeler“ (z. B. Dinitrophenol) verschwindet die Bevorzugung von ADP beim Hineintransport; ATP wird dann ebensogut transportiert wie ADP^[59, 64]. Man kann aus diesen Befunden schließen, daß die Bevorzugung des ADP-Transportes einen Aufwand an Energie erfordert. Diese Energie wird von der Atmungskette bereitgestellt. Wie die energetische Beeinflussung des Transportes erfolgt, ist im Einzelnen noch nicht geklärt. Man nimmt an, daß durch den Elektronentransport der Atmungskette ein Potential über die Innenmembran aufgebaut wird. Da das ATP eine negative Ladung mehr als das ADP trägt, könnte ein Membranpotential eine Diskriminierung des ATP-Transportes durch die Innenmembran bewirken^[42].

Die Asymmetrie in der Spezifität des Adeninnucleotid-Transportes führt zu einer asymmetrischen Verteilung von ADP und ATP zu beiden Seiten der Membran: Das Verhältnis ATP/ADP ist außerhalb der Mitochondrien größer als innerhalb^[65]. Um dies nachzuweisen, wurde zu einer aeroben Mitochondrien-Suspension in Gegenwart von Substrat ADP gegeben. Nachdem dieses phosphoryliert, und damit der Zustand der kontrollierten Atmung erreicht worden war, wurden die Mitochondrien aus dem Medium durch eine Siliconschicht in Perchlorsäure zentrifugiert^[66]. So konnten die Nucleotidspiegel im Matrix-Raum und im umgebenden Medium im gleichen Experiment gemessen werden (Tabelle 3). Das Verhältnis ATP/ADP ergab sich

Tabelle 3. Phosphorylierungspotential $\Delta G'$ des ATP in Mitochondrien und im Medium im Zustand der Atmungskontrolle (20°C) [65].
 $\Delta G' = \Delta G'_0 - RT \cdot \ln ([ATP]/[ADP] \cdot [Phosphat])$
 $\Delta G'_0 = -8.8 \text{ kcal/mol}$ [70].

	ATP ADP	Phosphat (mmol/Liter)	$\Delta G'$ (kcal/mol)
mitochondrial	3.9	3.5	-12.9
extramitochondrial	29	0.48	-15.2

im Medium etwa 7-mal höher als im Matrix-Raum. Unter Berücksichtigung der gemessenen Phosphat-Konzentrationen läßt sich für beide Räume die freie Energie der ATP-Hydrolyse, auch als Phosphorylierungspotential bezeichnet, berechnen. Man findet für das ATP im Medium ein um

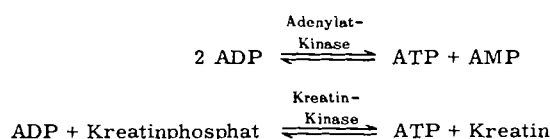
2.3 kcal/mol negativeres Phosphorylierungspotential als für das ATP im Matrix-Raum.

Wenngleich eine exakte Berechnung des Phosphorylierungspotentials in den Mitochondrien auf diese Weise sicher nicht möglich ist, so erkennt man doch, daß der erforderliche Energieaufwand zur Ausschleusung des ATP aus den Mitochondrien beträchtlich sein kann. Dies hat wichtige Konsequenzen für das Verhältnis aus gebildetem ATP und verbrauchtem Sauerstoff (P/O-Verhältnis) in der Zelle. Bekanntlich findet man in Säugetier-Mitochondrien für Substrate, die auf der Stufe des NADH in die Atmungskette einmünden, ein P/O-Verhältnis von 3, und für die Substrate, die beim Flavoprotein angreifen, z. B. Succinat, ein P/O-Verhältnis von 2. Diese Zahlen erhält man jedoch nur, wenn das ATP/ADP-Verhältnis außerhalb der Mitochondrien künstlich niedrig gehalten wird. Man kann dies durch Zugabe von Glucose und Hexokinase zum Medium erzielen; der endständige Phosphatrest des extramitochondrialen ATP wird dann auf Glucose übertragen. Ohne diese „ATP-Falle“ beobachtet man niedrigere P/O-Werte, da ein Teil der bei der Atmungskette gewonnenen Energie aufgewendet werden muß, um das ATP aus den Mitochondrien auszuschleusen^[67].

Es stellte sich die Frage, ob die im Reagensglas beobachteten Unterschiede zwischen den ATP/ADP-Verhältnissen innerhalb und außerhalb der Mitochondrien auch in der lebenden Zelle auftreten. Um diese Frage zu beantworten, wurden die in einer perfundierten Leber ablaufenden Reaktionen durch plötzliches Abkühlen auf -195°C gestoppt, die gefrorene Leber gefriergetrocknet und in Heptan homogenisiert. Durch Zentrifugieren des Homogenats in einem Dichtegradienten aus Heptan-Tetrachlorkohlenstoff wurden Mitochondrien und nicht-mitochondriales Zellmaterial angereichert, und in den so erhaltenen Fraktionen die Adeninnucleotide enzymatisch bestimmt. Dieses Experiment zeigte, daß das ATP/ADP-Verhältnis in der ganzen Zelle außerhalb der Mitochondrien mehr als 5-mal größer war als in den Mitochondrien^[68]. Es besteht somit eine gute Übereinstimmung mit den an isolierten Mitochondrien erhaltenen Ergebnissen.

8. Die Bedeutung des Adeninnucleotid-Transportes für den Energiestoffwechsel der Zelle

Die lebende Zelle hat die Tendenz, ihren ATP-Spiegel auf konstanter Höhe zu halten. Ein Absinken des ATP-Spiegels bei ATP-Verbrauch kann kurzfristig durch ATP-Reserven ausgeglichen werden. Derartige ATP-Reserven sind das ADP, welches durch die Adenylat-Kinase mit ATP und AMP im Gleichgewicht steht, sowie das Kreatinphosphat:



Man kann diese Systeme als ATP-Puffer betrachten. Letztlich wird der ATP-Verbrauch durch ATP-Synthese kom-

pensiert. Beim aeroben Stoffwechsel der Glucose werden 95% des anfallenden ATP in den Mitochondrien synthetisiert. Die oxidative Phosphorylierung ist somit Hauptlieferant für das ATP in der Zelle.

Der ADP-Spiegel im Matrix-Raum kontrolliert die Atmung. Je höher der Spiegel ist, desto höher ist die Atmungsgeschwindigkeit und damit auch die Geschwindigkeit der ATP-Synthese. Die halbmaximale Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung wird jedoch erst erreicht, wenn etwa die Hälfte der Adeninnucleotide im Matrix-Raum als ADP vorliegen^[69].

Wenn die Adeninnucleotid-Spiegel innerhalb und außerhalb der Mitochondrien gleich wären, müßte der zelluläre ATP-Spiegel relativ stark absinken, um eine größere Steigerung der Atmung zu bewirken. In diesem Falle wären die „ATP-Puffer“ erschöpft, ehe eine verstärkte ATP-Synthese stattfinden könnte. Tatsächlich hat man jedoch beim Muskel beobachtet, daß nach Reizung eine starke Atmungssteigerung eintritt, ehe das Kreatinphosphat erschöpft ist^[71]. Offenbar spielt hier der Adeninnucleotid-Transport eine wichtige Rolle. Durch die energieabhängige Bevorzugung des ADP-Hineintransportes resultiert aus einer geringen Erhöhung des ADP-Spiegels im extramitochondrialen Raum eine starke Erhöhung des ADP-Spiegels im Matrix-Raum, wodurch die ATP-Synthese in den Mitochondrien stimuliert wird. Der für den Adeninnucleotid-Transport erforderliche Energieaufwand wäre so als ein Beitrag zur Konstanthaltung des zellulären ATP-Spiegels zu verstehen.

Eingegangen am 21. Mai 1971, ergänzt am 26. Juni 1972 [A 898]

- [1] G. Schatz, *Angew. Chem.* 79, 1088 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* 6, 1035 (1967).
- [2] J. Henle: *Allgemeine Anatomie*. Leipzig 1841.
- [3] A. Kölliker, *Z. wiss. Zool.* 8, 311 (1857).
- [4] W. Fleming: *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. Verlag F. C. W. Vogel, Leipzig 1882.
- [5] R. Altmann: *Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen*. Veit, Leipzig 1890, S. 145.
- [6] G. E. Pallade in O. H. Gaebler: *Enzymes, Units of Biological Structure and Function*. Academic Press, New York 1956, S. 185.
- [7] F. Sjostrand, *Radiation Research, Suppl.* 2, 375 (1960).
- [8] W. Stoeckenius in E. Racker: *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts*. Van Nostrand Reinhold, New York 1970, S. 53.
- [9] D. W. Fawcett: *Die Zelle. Ein Atlas der Ultrastruktur*. Urban und Schwarzenberg, München 1969, S. 67.
- [10] H. Ferrandez-Moran, T. Oda, P. V. Blair u. D. E. Green, *J. Cell Biol.* 22, 63 (1964).
- [11] E. Racker in E. Racker: *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts*. Van Nostrand Reinhold, New York 1970, S. 127.
- [12] D. F. Parsons, G. R. Williams, D. Thompson, D. Wilson u. B. Chance in E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater u. J. M. Tager: *Mitochondrial Structure and Compartmentation*. Adriatica Editrice, Bari 1967, S. 29.
- [13] D. F. Parsons u. Y. Yano, *Biochim. Biophys. Acta* 135, 362 (1967).
- [14] W. Stoffel u. H. G. Schiefer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 349, 1017 (1968).
- [15] G. F. Bahr u. E. Zeitler, *J. Cell Biol.* 15, 489 (1962).
- [16] R. W. Brosemer, W. Vogell u. Th. Bücher, *Biochem. Z.* 338, 854 (1963).
- [17] D. J. L. Luck, *J. Cell Biol.* 16, 483 (1963).
- [18] M. M. K. Nass u. S. Nass, *J. Cell Biol.* 19, 593 (1963).
- [19] G. Schatz in E. Racker: *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts*. Van Nostrand Reinhold, New York 1970, S. 251.
- [20] E. Wintersberger in J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello u. E. C. Slater: *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*. Elsevier, Amsterdam 1966, S. 439.

- [21] P. Borst, E. F. J. Van Brüggem u. G. J. C. M. Rüttenberg in E. C. Slater, J. M. Tager, S. Papa u. E. Quagliariello: *Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria*. Adriatica Editrice, Bari 1968, S. 51.
- [22] W. Seebald, A. Schwab u. Th. Bücher in Th. Bücher u. H. Sies: 20. Mosbacher Colloquium. Springer-Verlag, Heidelberg 1969, S. 140.
- [23] E. Schnepf in P. Sitte: *Probleme der biologischen Reduplikation*. Springer-Verlag, Heidelberg 1966, S. 372.
- [24] M. Klingenberg u. E. Pfaff in J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello u. E. C. Slater: *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*. Elsevier, Amsterdam 1966, S. 180.
- [25] E. Pfaff, M. Klingenberg, E. Ritt u. W. Vogell, *Eur. J. Biochem.* 6, 222 (1968).
- [26] C. A. Schnaitman u. J. W. Greenawalt, *J. Cell Biol.* 38, 158 (1968).
- [27] C. Hoppel u. C. Cooper, *Biochem. J.* 107, 367 (1968).
- [28] D. Brdiczka, D. Pette, G. Brunner u. F. Miller, *Eur. J. Biochem.* 5, 294 (1968).
- [29] M. Klingenberg, *Ergebnisse der Physiologie* 55, 131 (1964).
- [30] D. Pette in J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello u. E. C. Slater: *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*. Elsevier, Amsterdam 1966, S. 28.
- [31] G. L. Sottocasa, L. Ernster, B. Kuylenstierna u. A. Bergstrand in E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater u. J. M. Tager: *Mitochondrial Structure and Compartmentation*. Adriatica Editrice, Bari 1967, S. 74.
- [32] H. W. Heldt u. K. Schwalbach, *Eur. J. Biochem.* 1, 199 (1967).
- [33] H. Jacobs, H. W. Heldt u. M. Klingenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 516 (1964).
- [34] R. Charles, J. M. Tager u. E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* 131, 29 (1967).
- [35] L. Ernster u. B. Kuylenstierna in E. Racker: *Membranes of Mitochondria and Chloroplasts*. Van Nostrand Reinhold, New York 1970, S. 172.
- [36] M. Aas, *Biochim. Biophys. Acta* 231, 32 (1971).
- [37] P. B. Garland u. D. W. Yates, *Biochim. Biophys. Acta* 231, 385 (1971).
- [38] S. G. van den Bergh, *Biochim. Biophys. Acta* 231, 400 (1971).
- [39] C. R. Rossi u. N. Siliprandi, *Biochim. Biophys. Acta* 231, 411 (1971).
- [40] J. Böttger, O. Wieland, D. Brdiczka u. D. Pette, *Eur. J. Biochem.* 8, 113 (1969).
- [41] E. M. Wit-Peters, H. R. Scholte, F. van den Akker u. J. de Nie, *Biochim. Biophys. Acta* 231, 23 (1971).
- [42] M. Klingenberg, *Essays in Biochemistry* 6, 119 (1970).
- [43] S. Papa, A. Francavilla, G. Paradies u. B. Meduri, *FEBS Lett.* 12, 285 (1971).
- [44] J. B. Fritz, *Amer. J. Physiol.* 197, 297 (1959).
- [45] B. A. Haddock, D. W. Yates u. P. B. Garland, *Biochem. J.* 119, 565 (1970).
- [46] J. T. Brosnan u. J. B. Fritz, *Biochem. J.* 125, 94p (1971).
- [47] D. W. West, J. F. A. Chase u. P. K. Tubbs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 912 (1971).
- [48] M. Klingenberg, *FEBS Lett.* 6, 145 (1970).
- [49] J. B. Chappel in Th. Bücher u. H. Sies: 20. Mosbacher Colloquium. Springer-Verlag, Heidelberg 1969, S. 335.
- [50] F. Palmieri, G. Prezioso, E. Quagliariello u. M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 22, 66 (1971).
- [51] F. Palmieri, J. Stipani, E. Quagliariello u. M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 26, 587 (1972).
- [52] S. Papa, N. E. Lofrumento, G. Paradies u. E. Quagliariello, *Eur. J. Biochem.* 22, 134 (1971).
- [53] Mc. Givan, J. D. Chappel u. J. B. Chappel, *Biochem. J.* 116, 37p (1969).
- [54] J. M. Lowenstein in T. W. Goodwin: *The Metabolic Roles of Citrate*. Academic Press, New York 1968, S. 61.
- [55] S. Papa, N. E. Lofrumento, M. Loggisci u. E. Quagliariello, *Biochim. Biophys. Acta* 189, 311 (1969).
- [56] A. Fonyo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 624 (1968).
- [57] D. D. Tyler, *Biochem. J.* 107, 121 (1968).
- [58] B. Guerin, M. Guerin u. M. Klingenberg, *FEBS Lett.* 10, 265 (1970).
- [59] E. Pfaff u. M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 6, 66 (1968).
- [60] M. Klingenberg in: *Symposium on Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes*. Academic Press, New York 1972, S. 465.
- [61] H. W. Heldt in: 20. Mosbacher Colloquium. Springer-Verlag, Heidelberg 1969, S. 301.
- [62] P. J. F. Henderson u. H. A. Lardy, *J. Biol. Chem.* 245, 1319 (1970).

- [63] M. Klingenberg, K. Grebe u. H. W. Heldt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 344 (1970).
 [64] E. Pfaff, H. W. Heldt u. M. Klingenberg, *Eur. J. Biochem.* 10, 484 (1970).
 [65] H. W. Heldt, M. Klingenberg u. M. Milovancev, unveröffentlicht.
 [66] M. Klingenberg u. E. Pfaff in R. W. Estabrook u. M. E. Pullman: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1967, Bd. 10, S. 680.

- [67] A. Kaltstein u. M. Klingenberg zitiert in M. Klingenberg, *Essays in Biochemistry* 6, 150 (1970).
 [68] R. Elbers, H. W. Heldt, P. Schmucker u. H. Wiese, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 353, 702 (1972).
 [69] H. W. Heldt u. E. Pfaff, *Eur. J. Biochem.* 10, 494 (1969).
 [70] R. A. Alberti, *J. Biol. Chem.* 243, 1337 (1968).
 [71] P. E. Di Prampero u. R. Margaria, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 304, 11 (1968).

Kathodische Dimerisierung

Von Fritz Beck^[*]

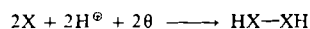
Die technischen, elektrochemischen und präparativen Aspekte der kathodischen Dimerisierung, die zu bifunktionellen Verbindungen führt, werden zusammenfassend dargestellt. Am Beispiel der Hydrodimerisierung des Acrylnitrils werden der Einfluß der Reaktionsparameter und der Mechanismus eingehend diskutiert. Neben der Hydrodimerisierung aktivierter Verbindungen kann die Verknüpfung auch über eine Halogenidabsplattung oder über die Entladung von Kationen laufen. Von besonderem präparativem Interesse sind Kupplungen zweier verschiedener Moleküle, die z. B. Ester, Alkohole oder Ketone mit Cyangruppen sowie asymmetrische Dirole ergeben können. Technische Anwendung hat bisher die reduktive Dimerisierung von Acrylnitril, β -Chlorpropionitril, Aceton, Acetylpyridin, Nitrobenzol (\rightarrow Benzidin) und von Pyridiniumsalzen gefunden.

1. Einleitung

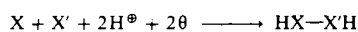
Das Gebiet der kathodischen Dimerisierung hat sich in den letzten Jahren besonders schnell entwickelt. Dies ist gewiß kein Zufall, birgt doch gerade dieser Teil der organischen Elektrosynthese sehr interessante Aspekte präparativer, technischer und mechanistischer Art. Das Ziel dieses Fortschrittsberichtes ist ein umfassender Überblick unter besonderer Berücksichtigung der technischen und elektrochemischen Möglichkeiten. Erst vor kurzem hat Baizer (zusammen mit Petrowitsch), der sich um die Entwicklung des Gebietes außerordentliche Verdienste erworben hat, eine brillante Gesamtschau über die synthetischen und mechanistischen Aspekte gegeben^[1]. Außerdem wird dieses Thema in einer neuen Übersicht über die organische Elektrosynthese ausführlich behandelt^[2]. Überschneidungen mit diesen Publikationen ließen sich nicht ganz vermeiden, wurden aber auf ein Minimum beschränkt.

Bei der kathodischen Dimerisierung nimmt das organische Molekül direkt ein Elektron an der Elektrode auf. Es durchläuft also die Zwischenstufe eines Radikations. Die negative Ladung wird nach Schema 1 kompensiert durch Aufnahme von Protonen („Hydrodimerisierung“), durch Abspaltung von Halogenid-Ionen oder durch die positive Ladung des Substrats, wenn dieses als Kation vorliegt. Jeden

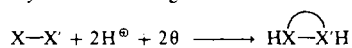
dieser Fälle kann man im Prinzip noch unterteilen in die Dimerisierung zweier gleicher Moleküle, wobei man ein symmetrisches Produkt erhält, in die Kupplung zweier verschiedener Moleküle und in die zu cyclischen Produkten führende intramolekulare Reaktion.



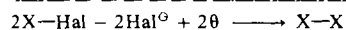
Hydrodimerisierung zweier gleicher Moleküle



Hydrodimerisierung zweier verschiedener Moleküle



cyclisierende Hydrodimerisierung



Dimerisierung unter Halogenidabsplattung



Dimerisierung von Kationen

Schema 1. Übersicht über die kathodische Dimerisierung. (Streng genommen sind die zweite und die dritte Variante keine Dimerisierungen.)

Wenn das Monomere eine oder mehrere funktionelle Gruppen trägt, entstehen bi- bzw. polyfunktionelle Dimere. Die kathodische Dimerisierung ist daher eine wertvolle präparative Methode zur Synthese solcher Verbindungen. Da in allen Fällen pro Monomeres nur ein Elektron aufgenommen wird, ist der Energiebedarf vergleichsweise gering. Dies kommt einer technischen Anwendung außerordentlich entgegen.

Die Bildung eines symmetrischen Dimeren ist nur eine von mehreren Reaktionsmöglichkeiten. Das Molekül kann im

[*] Dr. F. Beck

Badische Anilin- & Soda-Fabrik AG
 Hauptlaboratorium
 67 Ludwigshafen

Auszugsweise vorgetragen auf der 1. EUCHEM-Konferenz über Organische Elektrochemie am 9. Juni 1971 in Ronneby Brunn (Schweden).