

Die Wirkung von 4-Hydroxypentenal auf die phosphorylierende Atmung und auf verwandte Prozesse in Rattenlebermitochondrien*

Von

H. Zollner

Institut für Biochemie der Universität, A-8010 Graz, Österreich

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 20. Januar 1972)

The Action of 4-Hydroxypentenal on the Phosphorylating Respiration and on Related Processes in Rat Liver Mitochondria

The mechanism of the respiratory inhibition caused by 4-hydroxypentenal (*HPE*) was studied. Observations on rat liver mitochondria indicate that *HPE* inhibits phosphorylating respiration with glutamate as the substrate; DNP cannot cancel this effect. ADP-stimulated oxidation of succinate is also inhibited by *HPE*. The stimulating effect of DNP lasts only for about one minute, and then respiration falls to state 4 level. If *HPE* is present in a concentration which by itself causes no inhibition, addition of DNP entails an inhibition of the ADP-stimulated oxidation of succinate even with uncoupling concentrations of DNP. This *HPE* + DNP induced inhibition of succinate oxidation is similar to the inhibition caused by high DNP concentration with respect to its reversibility by increased succinate concentration or oligomycin.

The activity of the DNP-stimulated ATPase is depressed by *HPE*. It seems that the inhibition of the phosphorylating system is due to an inhibition of phosphate transport.

Der Mechanismus der durch 4-Hydroxypentenal (*HPE*) hervorgerufenen Atmungshemmung wurde untersucht. An Rattenlebermitochondrien hemmt *HPE* die phosphorylierende Atmung mit Glutamat; DNP kann diesen Effekt nicht aufheben. Die ADP-stimulierte Atmung mit Succinat wird gleichfalls durch *HPE* gehemmt; DNP ruft nur eine kurzzeitige Stimulierung hervor. Die Atmung fällt dann auf das Niveau des State 4. Ist *HPE* in einer Konzentration anwesend, in der es noch keine Hemmung hervorruft, bewirkt die Zugabe von DNP in einer Konzentration (0,1 mm), die normalerweise entkoppelt, eine Hemmung der ADP-stimulierten Succinatverarmung.

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. O. Kratky zum 70. Geburtstag gewidmet.

Diese durch *HPE* + DNP induzierte Hemmung der Succinat-oxydation verhält sich gegenüber erhöhtem Succinatangebot und Oligomycin wie die durch hohe DNP-Konzentrationen hervorgerufene Hemmung.

HPE hemmt auch die DNP-stimulierte ATPase. Die in der Hemmung der Atmung und in der Hemmung der DNP-stimulierten ATPase zum Ausdruck kommenden Effekte von *HPE* können auf die Hemmung des Phosphattransportes zurückgeführt werden.

Einleitung

4-Hydroxypentenal kann verschiedene Stoffwechselfunktionen der Zelle blockieren¹. Während wir über den Mechanismus der Hemmung der Glykose, der DNS-, RNS- und Protein-Biosynthese¹ einigermaßen informiert sind, war über den Mechanismus der Blockade der Zellatmung bisher nur bekannt, daß *HPE* Teilschritte des Citratcyclus hemmt² sowie eine Senkung des zellulären NAD-Spiegels hervorruft³. NAD-Mangel muß zwangsläufig zu einer Verminderung der Zellatmung führen, doch konnten *Schauenstein* und Mitarbeiter³ zeigen, daß exogen angebotenes NADH die Atmungshemmung nicht aufheben kann. Daher muß noch ein Angriffspunkt an der Atmungskette zu suchen sein.

Fluharti und *Sanadi*⁴ konnten eine Beteiligung von Thiolgruppen an der oxydativen Phosphorylierung nachweisen. Daher ist es verständlich, daß für verschiedene SH-Reagentien (*Elmanns*-Reagens^{5, 6}, N-Äthylmaleinimid⁶, einige organische Quecksilberverbindungen⁷, Ethacrynat⁸ u. a.) ein Angriffspunkt in der oxydativen Phosphorylierung gefunden wurde.

Diese Befunde ließen es wünschenswert erscheinen, die Wirkung von *HPE* auf die mit der Phosphorylierung gekoppelte Oxydation einiger Substrate zu untersuchen, da bisher alle bekannten Effekte von *HPE* auf die Addition des Aldehydes an funktionelle SH-Gruppen zurückgeführt werden konnten⁹.

Material und Methodik*

Für alle Versuche wurden Rattenlebermitochondrien verwendet, die nach *Johnson* und *Lardy*¹⁰ präpariert wurden.

Die Messung der Sauerstoffaufnahme erfolgte entweder nach der Standard-*Warburg*-Technik bei 30 °C während 25 Min. oder polarographisch bei 25 °C. Das Medium für die Atmungsmessung mit der *Warburg*-methode hatte folgende Zusammensetzung: EDTA 0,87 mM**, KH₂PO₄/K₂HPO₄

* Verwendete Abkürzungen: *DTT* Dithiothreit, *Pa* anorganisches Phosphat, *HPE* 4-Hydroxypentenal, ATPase ATP-Phosphohydrolase (EC. 3.6.1.5.), *Succ.* Succinat, *Glu.* Glutamat, *NAM* N-Äthylmaleinimid, *DTNB* 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure, *EDTA* Äthylendiamintetraacetat.

** mM = Millimol pro Liter.

Puffer pH = 7,4 16,6 mM an PO_4^{3-} , ATP 1 mM, Glucose 50 mM, MgCl_2 6,8 mM, Succinat oder Glutamat, wenn nicht anders angegeben, 6,8 mM, wenn anwesend DNP 0,1 mM, 5 mg Hexokinase pro Ansatz, mit Saccharose auf 250 mosm gebracht, Endvolumen 3 ml.

Für die polarographische Messung der Sauerstoffaufnahme wurden die Mitochondrien in 3 ml folgender Lösung suspendiert: EDTA 0,87 mM, MgCl_2 6,8 mM, Phosphatpuffer 6,6 mM, Glycylglycinpuffer pH 7,4 20 mM und mit KCl auf 250 mosm gebracht. Wenn zugegen: DNP 0,1 mM, ADP 0,33 mM.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde die Methode von Myers und Slater¹¹ herangezogen, nur wurde die ATP-Konzentration von 2 auf 4 μMole pro Ansatz erhöht. Pa wurde nach der von Lindberg und Ernster modifizierten Methode von Beerenblum und Chain¹² bestimmt, Protein nach Cleland und Slater¹³. Der Phosphatgehalt der Mitochondrien wurde, wie von Tyler¹⁴ beschrieben, bestimmt. Die Schwellung der Mitochondrien wurde durch Aufzeichnung der Extinktionsänderung bei 550 nm gemessen.

ATP, ADP und Succinat waren Erzeugnisse der Firma Boehringer, Hexokinase (Typ III) und Oligomycin der Firma Sigma und Hydroxyphenetal wurde nach Esterbauer und Weger¹⁵ synthetisiert. Alle übrigen verwendeten Chemikalien hatten den jeweils erhältlichen höchsten Reinheitsgrad.

Ergebnisse

Einfluß von HPE auf die State 3-Atmung

Wie Abb. 1 zeigt, hemmt HPE die ADP-stimulierte Atmung mit Glutamat als Substrat. Durch Entkoppelung der Atmung mit DNP kann die durch HPE gesetzte Hemmung nicht umgangen werden. Sowohl Inkubationszeit als auch Hemmstoffkonzentration haben einen Einfluß auf die Höhe der Atmungshemmung. Bei 8min. Vorinkubation der Mitochondrien mit HPE bringen 1,5 μMole Hemmstoff pro mg Protein halbmaximale Hemmung.

Halbmaximale Hemmung der Succinatveratmung wird durch Inkubation der Mitochondrien während 4 min mit 7 μMolen HPE/mg Protein erreicht. Wie Tab. 1 zeigt, ist die Atmungshemmung davon abhängig, ob die Mitochondrien in Gegenwart oder Abwesenheit des zu veratmenden Substrates (Succinat) inkubiert wurden. Bei Inkubation in Gegenwart von Succinat wurde 30% Hemmung beobachtet. Inkubation in Abwesenheit von Succinat bewirkt eine Hemmung von über 40%. Bei gleichzeitiger Zugabe von HPE und Succinat ist der Hemmeffekt doppelt so groß wie nach Vorinkubation der Mitochondrien mit Succinat vor der HPE-Zugabe.

Eine durch HPE bewirkte teilweise Blockade der ADP-stimulierten Succinatveratmung kann durch DNP nicht dauerhaft aufgehoben werden (s. Abb. 1, Kurve B). Im Gegenteil: Bei HPE-Konzentrationen, die als solche keine oder nur geringe Hemmung der ADP-stimulierten Atmung bewirken, trat bei DNP-Zusatz (0,1 mM), der allein noch keine

Hemmung verursacht, nach kurzzeitiger Stimulierung ein Absinken der Sauerstoffaufnahme auf das Niveau der State-4-Atmung ein (Tab. 2). Wie bei der allein durch hohe Konzentrationen von Entkopplern bewirkten Hemmung der Succinatveratmung kann die durch *HPE* + DNP

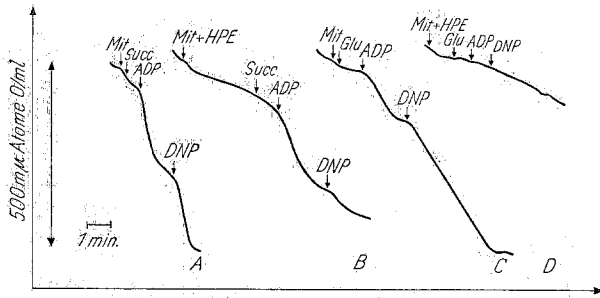


Abb. 1. Wirkung von *HPE* auf die Atmung von Rattenlebermitochondrien.

Kurve A: Atmung mit Succinat ohne *HPE*.

Kurve B: Mitochondrien (5,3 mg Prot.) wurden für 3 min im Atmungsmedium, das 40 μ Mole *HPE* enthielt, inkubiert und 1 min nach der Succinat-zugabe wurde ADP zugegeben.

Kurve C: Atmung mit Glutamat ohne *HPE*.

Kurve D: Mitochondrien (3,4 mg Prot.) wurden 7 min mit 6 μ Molen *HPE* vorinkubiert, dann wurde ein Aliquot dem Glutamat enthaltenden Medium zugegeben und 1 min danach ADP zugesetzt.

Endkonzentrationen der Zusätze: Succinat, Glutamat 3,3 mM, ADP 0,33 mM.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Hemmung der Succinatveratmung von den Inkubationsbedingungen

Succinat 3,3 mM, Mitochondrien 5,25 mg Protein. Die Sauerstoffaufnahme wurde polarographisch gemessen

Im Inkubationsmedium zugegen.	7,6 μ Mole <i>HPE</i> /mg Prot.	Inkub.-zeit min	O ₂ Aufnahme μ Atome/min	Zusätze		% Hemmung
				3 min	4 min	
<i>Pa</i> + Succ.	—	—	721	—	ADP	—
—	+	4	392	<i>Pa</i> + Succ.	ADP	45,6
Succ.	+	4	502	<i>Pa</i>	ADP	30,4
<i>Pa</i> + Succ.	+	4	488	—	ADP	31,2
Succ. 1 min vor <i>HPE</i>	+	4	612	<i>Pa</i>	ADP	15,0

gesetzte Hemmung durch Erhöhung der Substratkonzentration oder Oligomycin weitgehend aufgehoben werden. Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der durch *HPE* + DNP bewirkten Atmungshemmung in Abhängigkeit von der Succinatkonzentration oder vom Oligomycinzusatz, so ergibt sich, daß mit fortschreitender Reaktionszeit die Hemmung größer wird und durch vermehrtes Substratangebot oder Oligomycin nur mehr

auf jenen Wert herabzusetzen ist, der durch *HPE* allein bewirkt wird (Tab. 3). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang weiters, daß durch Beschädigung der Membran entkoppelte Mitochondrien keine Hemmung der Succinatveratmung bis zu *HPE*-Konzentrationen von 9 μ Molen/mg Protein zeigen.

Tabelle 2. Einfluß von *HPE* und DNP auf die Succinatveratmung. Bestimmung der Sauerstoffaufnahme nach der Standard Warburgtechnik. Endkonzentration der Zusätze: DNP 0,1 mM, Oligomyein 3,2 μ g, 2,5 μ M *HPE*/mg Protein, 6 mg Mitochondrienprotein

Mole Succ./ mg Prot.	<i>HPE</i>	Zusätze DNP	Olig.	O ₂ Auf- nahme, m μ At/mg Prot. \times h	% Hem- mung
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	—	—	—	3,46	—
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	+	—	—	3,41	1,5
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	—	+	—	3,43	0,8
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	+	+	—	2,07	40,1
0,67 \cdot 10 ⁻⁵	+	+	—	3,78	—
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	+	+	+	2,97	14,1

Tabelle 3. Zeitabhängigkeit der *HPE*-Wirkung. Die Atmungsmessung erfolgte mit der Warburgmethode. Zur Darstellung der Zeitabhängigkeit wurde die Sauerstoffaufnahme von zwei Fünf-Minuten-Intervallen angegeben. Die Konzentrationen der einzelnen Reaktanten entsprechen den in Tab. 2 angegebenen

Mole Succ./ mg Prot.	<i>HPE</i>	Zusätze DNP	Olig.	μ At O 10—15 min	% Hem- mung	μ At O 15—20 min	% Hem- mung
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	—	—	—	1,94	0	1,90	0
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	+	—	—	1,74	10	1,20	37
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	—	+	—	2,07	—	1,82	4
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	+	+	—	0,90	53	0,33	83
0,67 \cdot 10 ⁻⁵	+	+	—	2,18	0	1,15	40
0,33 \cdot 10 ⁻⁵	+	+	+	1,57	10	1,07	44

Hemmung der durch 2,4-Dinitrophenol stimulierten ATPase

In Abb. 2 zeigt Kurve A die Aktivität der DNP-stimulierten ATPase in Abhängigkeit von steigenden *HPE*-Konzentrationen. Die maximal erreichbare Hemmung liegt bei 60%.

Die Hemmung der DNP-stimulierten ATPase, die durch *HPE* hervorgerufen wird, wird durch Auswaschen des Inhibitors nicht auf-

gehoben. Werden *HPE*-behandelte und mit Saccharose gewaschene Mitochondrien Dithiothreitol ausgesetzt, so verschwindet die Hemmung der DNP-stimulierten ATPase, vorausgesetzt, daß die Hemmung vor *DTT*-Behandlung nicht größer als 30–40% war (Tab. 4). Außer der Hemmung der DNP-stimulierten ATPase kann *HPE* auch eine Stimulierung der latenten ATPase bewirken (Kurve B in Abb. 2).

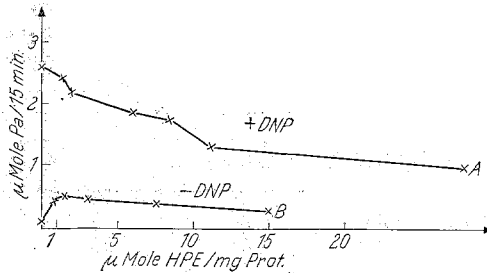


Abb. 2. Wirkung von *HPE* auf die ATPase-Aktivität. Mitochondrien (0,1 mg Prot.) wurden mit steigenden Konzentrationen von *HPE* bei 0° C 5 min inkubiert. Gesamtvolumen der Inkubationsmischung war 0,4 ml. Durch Zugabe der vorinkubierten Mitochondrien zum ATPase-Medium wurde die Reaktion gestartet

Tabelle 4. Dithiothreitol-Reversibilität der ATPase-Hemmung. Mitochondrien (2,5 mg Protein) wurden mit 15 µMolen *HPE* in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 5 min bei 0° C inkubiert, bei 7000 g vom Inkubationsmedium abzentrifugiert und 2mal mit 0,25 molarer Saccharose gewaschen. Nach Resuspension in Saccharose wurden Aliquote zur ATPase-Bestimmung eingesetzt. Dithiothreitol (*DTT*) ($1,3 \cdot 10^{-2}$ m) war dem Medium zur ATPase-Bestimmung zugegeben

µMole <i>HPE</i> / mg Prot.	Behandlung	µMole <i>Pa</i> / mg Prot.	% Hemmung
—	—	13,9	—
6,0	gewaschen	9,8	29,5
6,0	gewaschen + <i>DTT</i>	13,3	4,3
13,8	gewaschen	6,0	56,8
13,8	gewaschen + <i>DTT</i>	6,8	51,2

Einfluß von HPE auf den Phosphat-In- und -Efflux

Mitochondrien schwellen im ATPase-Medium nur in Gegenwart von *HPE*. Diese Schwellung wird durch Oligomycin gehemmt. Quantitative Untersuchungen über die *Pa*-Verteilung zwischen Mitochondrium und umgebendem Medium ergaben bei *HPE*-behandelten Mitochondrien einen gegenüber den Kontrollen erhöhten Phosphatgehalt (Tab. 5). Aus

Tab. 5 ist auch zu ersehen, daß *HPE* die Schwellung in Ammonphosphat hemmt.

Tabelle 5. Mitochondrienschwellung und Phosphatgehalt der Mitochondrien

1. Mitochondrien 5,7 mg Prot. in 0,1 ml wurden für 5 min mit 38 μ Molen *HPE* in 0,1 ml bei 0 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe der Mitochondrien gestartet. Das Medium enthielt neben dem angegebenen Ammoniumsalz 1 mM *EDTA*, 1 mM *Tris*-HCl pH = 7,4 und 2,8 μ g Rotenon/mg Prot. 2. ATPase Medium wie unter Methoden beschrieben, 4,2 mg Prot., 8,6 μ Mole *HPE*/mg Prot.

Medium	Schwellrate ohne <i>HPE</i>	ΔE /min mit <i>HPE</i>	Phosphatgehalt ohne <i>HPE</i>	μ Mole/g Prot. mit <i>HPE</i>
1. Ammonphosphat	0,39	0,20	—	—
2. ATPase	0,0	0,055	20	50

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß *HPE* ähnliche Wirkungen entfaltet, wie sie auch für andere SH-Reagentien gefunden wurden^{4-8, 14}, doch bestehen zwischen den Wirkungen etwa von *DTNB*, *NAM* und *HPE* folgende Unterschiede:

1. Bei der Veratmung von Glutamat: *DTNB* hemmt die Atmung durch einen Eingriff in den Phosphattransport^{5, 6}; DNP hebt die Hemmung auf. Die durch *NAM* oder *HPE* gesetzte Atmungshemmung wird jedoch durch DNP nicht aufgehoben, daher kann nicht sicher gesagt werden, ob der Phosphattransport und/oder ein dehydrierender oder elektronentransportierender Schritt betroffen wird.

2. Bei der Veratmung von Succinat bestehen insoferne Unterschiede, als DNP die durch *DTNB* und *NAM* bewirkte Atmungshemmung vollständig aufhebt⁶, während die durch *HPE* gehemmte phosphorylierende Atmung nur für kurze Zeit stimuliert wird und danach die Sauerstoffaufnahme auf das Niveau des State 4 zurückgeht.

3. Wirksame Hemmstoffkonzentrationen: Es läßt sich feststellen, daß bei der Veratmung von Glutamat für halbmaximale Atmungshemmung 8 nMole *DTNB*/mg Prot., dagegen 1500 nMole *HPE*/mg Prot. notwendig sind, *HPE* also in der Hemmwirksamkeit um 2 Größenordnungen unter *DTNB* steht. Einer der Gründe für die Unterschiede in der Hemmwirksamkeit von *DTNB* und *HPE* dürfte in den unterschiedlichen Gleichgewichtskonstanten für die Reaktion mit SH-Gruppen zu suchen sein.

In einer Modellreaktion mit Glutathion wurde für *HPE* K_{eq} zu $2,96 \cdot 10^{-7}$ bestimmt¹⁶. K_{eq} für *DTNB* ist so klein, daß sie nicht bestimmt

werden konnte und daher die Annahme berechtigt ist, daß sie mindestens um 2 Zehnerpotenzen kleiner sein muß.

Die sichere Lokalisierung eines Angriffspunktes für *HPE* ergibt sich aus folgenden Befunden:

1. *HPE*-behandelte Mitochondrien schwellen im ATPase-Medium.

2. Nach Inkubation im ATPase-Medium haben *HPE*-behandelte Mitochondrien einen um den Faktor 2,5 höheren Phosphatgehalt als die Kontrollen.

3. Die Schwellrate in Ammonphosphat wird durch *HPE* reduziert. Sowohl die durch *HPE* hervorgerufene Schwellung im ATPase-Medium als auch die Erniedrigung der Schwellrate in Ammonphosphat sind für eine Hemmung des Phosphat-Fluxes beweisend.

*Tyler*¹⁴ führt die durch SH-Reagentien hervorgerufenen Effekte (Hemmung der phosphorylierenden Atmung und Hemmung der DNP-stimulierten ATPase) auf die Hemmung des Phosphattransportes zurück.

Wie *DTNB*⁵ kann auch *HPE* die DNP-stimulierte ATPase nicht vollständig hemmen. Mit *DTT* kann die Hemmung der DNP-stimulierten ATPase rückgängig gemacht werden. Dies läßt den Schluß zu, daß *HPE* seine Wirkung über eine Reaktion mit SH-Gruppen entfaltet, aber nicht irreversible Denaturierungsprozesse hervorruft. Die Hemmung der ADP-stimulierten Succinatveratmung konnte durch DNP nicht dauerhaft rückgängig gemacht werden. Das hat seine Ursachen nicht etwa darin, daß *HPE* die Atmungskette nach dem Succinateintritt blockiert, sondern darin, daß geringe Mengen *HPE* die Empfindlichkeit gegenüber der Hemmwirkung von DNP erhöhen. Daß *HPE* zwischen dem Succinateintritt und Cytochrom-a tatsächlich nicht angreift, geht überzeugend daraus hervor, daß Mitochondrien, die infolge von Membranschädigungen entkoppelt waren, keine Hemmung der Succinatveratmung durch *HPE* zeigen. Auch der von *Kapfer* und *Schauenstein*² erhobene Befund, wonach die Succinatdehydrogenase aus Rattenleber durch *HPE* nicht gehemmt wird, stützt diese Schlußfolgerung.

Die durch DNP + *HPE* bewirkte Atmungshemmung verhält sich gegenüber höherem Substratangebot und gegen Oligomycin wie die durch DNP hervorrufbare Hemmung. Der Unterschied zu der durch DNP allein bewirkbaren Hemmung besteht in wesentlich geringeren Entkopplerkonzentrationen.

Der hemmende Effekt hoher DNP-Konzentrationen auf die Succinatveratmung und die Reversibilität dieser Blockade durch Erhöhung der Succinatkonzentration oder Oligomycin wurde schon mehrfach beschrieben.¹⁷⁻¹⁹

Chappell und *Haarhoff*²⁰ wiesen ein Exchange-carrier-System nach, wonach der Influx von Dicarbonsäuren, wie Malat oder Succinat, an einen Efflux von anorganischem Phosphat gebunden ist.

Da *HPE* in das Phosphattransportsystem eingreift, wäre es möglich, daß *HPE* über diesen Mechanismus den Succinattransport hindert. Diese Möglichkeit steht im Einklang mit dem Befund, daß Erhöhung der Succinatkonzentration den Effekt aufhebt. Da DNP ein kompetitiver Inhibitor der Succinatakku mulierung ist^{21, 22}, wäre auf dieser Basis die Kooperation von *HPE* und DNP verständlich. Mit anderen SH-Reagentien wurde jedoch ein derartiger Effekt nicht beobachtet.

Der Autor dankt Herrn Prof. Dr. *E. Schauenstein* für anregende Diskussion, Kritik und Unterstützung der Arbeit.

Die Arbeit wurde zum Teil vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung Wien unterstützt.

Literatur

- ¹ *I. J. Bickis, E. Schauenstein* und *M. Taufer*, Mh. Chem. **100**, 1077 (1969).
- ² *E. Kapfer* und *E. Schauenstein*, Z. Krebsforschg., im Druck.
- ³ *E. Schauenstein, M. Verdino* und *M. Taufer*, Mh. Chem. **101**, 1189 (1970).
- ⁴ *A. Fluharti* und *D. R. Sanadi*, Proc. Natl. Acad. Sci. **46**, 608 (1960).
- ⁵ *M. Miyahara*, Arch. Biochem. Biophys. **134**, 590 (1969).
- ⁶ *N. Haugaard, N. H. Lee, R. Kostrzeva, R. S. Horn* und *E. S. Haugaard*, Biochim. Biophys. Acta **172**, 198 (1969).
- ⁷ *C. K. R. Kurup* und *D. R. Sanadi*, Biochem. **7**, 4483 (1968).
- ⁸ *B. Foucher* und *Y. Gaudemer*, FEBS Letters **13**, 95 (1971).
- ⁹ *E. Schauenstein, F. Dorner* und *I. Sonnenbichler*, Z. Naturforsch. **233** 316 (1968).
- ¹⁰ *D. Johnson* und *H. Lardy*, Methods in Enzymol. (Edit. *R. W. Estabrook* und *M. E. Pullman*) **10**, 94, Academic Press N.Y. (1967).
- ¹¹ *D. K. Myers* und *E. L. Slater*, Biochem. J. **67**, 558 (1957).
- ¹² *V. Lindberg* und *L. Ernster*, Methods in Biochem. Analysis, **3**, 1 (1956).
- ¹³ *K. W. Cleland* und *E. C. Slater*, Biochem. J. **53**, 547 (1953).
- ¹⁴ *J. Tyler*, Biochem. J. **111**, 665 (1968).
- ¹⁵ *H. Esterbauer* und *W. Weger*, Mh. Chem. **98**, 1884 (1967).
- ¹⁶ *H. Esterbauer*, Mh. Chem. **101**, 782 (1970).
- ¹⁷ *S. Papa, N. E. Lofromento, G. Paradies* und *E. Quagliariello*, Biochim. Biophys. Acta **153**, 306 (1968).
- ¹⁸ *J. M. Tager* in: Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (*J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello* und *E. C. Slater*, eds.), p. 202; BBA Library Elsevi Amsterdam (1966).
- ¹⁹ *C. E. Wenner*, Federation Proc. **24**, 544 (1965).
- ²⁰ *J. B. Chappell* und *K. N. Haarhoff* in: Biochemistry of Mitochondria (eds. *E. C. Slater, Z. K. Kaniuga* und *L. Wojtczak*), pp. 75—91. Academic Press, N.Y. (1967).
- ²¹ *D. F. Wilson* und *R. D. Merz*, Arch. Biochem. Biophys. **119**, 470 (1967).
- ²² *K. van Dam* und *C. S. Tsou*, Biochim. Biophys. Acta **162**, 301 (1968).