DIE WIRKUNG VON THIOL- UND SULFENSÄUREREAGENTIEN WACHSENDER ALKYLKETTENLÄNGE AUF DIE MITOCHONDRIALE ENERGIEÜBERTRAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Plank-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Naturstoff-Chemie, Direktor Prof. Dr. Theodor Wieland, in Heidelberg ausgeführt.

Der Max-Plank-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

EINLEITUNG

Der Anstoß zu dieser Arbeit kam aus den Modellversuchen zur oxydativen Phosphorylierung von Dr.E.Bäuerlein (Habilitationsschrift), in denen er durch Oxydation von Thiol- wie Disulfid-Gruppen in Gegenwart von ADP und P_i in wasserfreiem Medium hohe Ausbeuten an ATP erzielen konnte. In der Absicht, die Erfahrungen der Modellreaktionen auf die mitochondriale ATP-Synthese zu Übertragen, erhielt ich von ihm die Aufgabe - da die Reaktion bevorzugt in lipophiler Umgebung erfolgen sollte - lipophile Sulfensäure- sowie Thiolreagentien zu synthetisieren, in denen chemische Reaktivität und lipophile Wechselwirkung vereint sind. Die Reaktivität sollte an geeigneten Modellverbindungen getestet werden, um nach entsprechender Reaktivität auch im Mitochondrien-System erprobt zu werden. Das Endziel sollte die Identifizierung funktioneller Gruppen von Proteinen sein, die an der ATP-Synthese beteiligt sind.

In meiner Diplomarbeit habe ich lipophile Sulfensäure- wie auch Thiolreagentien wachsender Lipophilie synthetisiert und erstere an einem Protein auf ihre Reaktivität getestet. Die Synthese wurde derart standardisiert, daß eine radioaktive Markierung der Verbindungen leicht analog erfolgen konnte. Es ergab sich, daß die lipophilsten Reagentien - in der gewählten Modellreaktion - die größte Reaktivität zeigten.

In der nun vorliegenden Dissertationsarbeit habe ich die synthetisierten Reagentien an Mitochondrien-Systemen erprobt. Auch hier zeigten die lipophilsten Reagentien die größte Reaktivität in den von mir getesteten oxydativen ATP-Synthese-Systemen.

Nun erfolgte der nächste Schritt, die radioaktive Markierung der Reagentien und die Isolierung der damit abgefangenen funktionellen Verbindungen aus dem Mitochondrium, wozu ich einen neuen - bisher nicht verfolgten Weg - eingeschlagen habe.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. ALLGEMEINER TEIL	1
A. Atmungskette und oxydative Phosphorylierung	1
1. Wasserstofffliefernde Reaktionen	1
2. Oxydation des Wasserstoffes über die Atmungskette	2
3. Oxydative Phosphorylierung	6
a.Energiebilanz	6
b.Kopplung	6
c.ATP-Synthase	7
d.Energie-Pool	9
e.Kopplungsmechanismus	9
B. Reaktivität lipophiler Thiol- und Sulfensäurereagentien	10
1. Modellreaktionen zur oxydativen Phosphorylierung	10
2. Lipophile Maleinimide	11
3. Lipophile Thioharnstoffe, Thiouracile	13
C. Messung der Atmungsgeschwindigkeit	15
1. Benutzte Kopplungsseiten-spezifische Substrate	15
2. Messung des ADP/O-Quotientien	16
a.Prinzip	16
b.Berechnung	17
c.Sauerstoffelektrode nach Clark	18
II. HAUPTTEIL	20
A. Wirkung der Thiol- und Sulfensäurereagentien auf die gekoppelte Atmung von Rinderherz-Mitochondrien	20
1. Wirkung der Sulfensäurereagentien	20
a.n-Alkyl-Thioharnstoffe	20
b.6-n-Alkyl-2-Thiouracile	23
2. Wirkung des Thiolreagenses Maleinimid	26
3. Diskussion der Ergebnisse	30
B. Synthese der radioaktiv markierten Abfangreagentien	33
1. ^{35}S-NTU: 6-n-Nonyl-2-[^{35}S-] Thiouracil	33
2. ^{14}C-NSPM: N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-[1,4-^{14}C-] maleinimid	34
3. ^{14}C-DCCD: Dicyclohexyl-[^{14}C-]carbodiimid	35
C. SDS-Gelelektrophorese markierter Mitochondrien	35

Seite

1. durch ^{35}S- bzw. ^{14}C-NTU markiert 35
2. durch ^{14}C-NSPM markiert 38
   a.Molekulare Organisation der Mitochondrien-Proteine 38
   b.Identifizierung der ^{14}C-NSPM-bindenden Proteine 42
3. durch ^{14}C-DCCD markiert 46

D. Isolierung der radioaktiv markierten Verbindungen 47
1. ^{14}C-NSPM markiert 48
2. ^{35}S-NTU markiert 54
3. ^{14}C-DCCD markiert 56

E. Mitochondriale Thiol-Gruppenbestimmung mit ^{14}C-NSPM 58

F. Zusammenfassung der Ergebnisse 62
1. mit DCCD 62
2. mit NTU 63
3. mit NSPM - Zusammenfassung von 1. bis 3. 65

III. EXPERIMENTELLER TEIL 68

A. Allgemeine Methoden und Hilfsmittel 68
1. Isolierung von Rinderherz-Mitochondrien 68
2. Durchführung der Messung mit der Clark-Elektrode 70
   a.Vorbereitung der Meßeinheit 70
   b.Messung 70
3. Proteinbestimmung 72
   a.Biuret, mit Desoxycholat 72
   b.Lowry 72
4. SDS-Gelelektrophorese 73
   a.Beechey-Methode 73
   b.1.Variation der Beechey-Methode 74
   c.2.Variation der Beechey-Methode 74
5. Mitochondriale Thiol-Gruppenbestimmung mit ^{14}C-NSPM 75
6. Herstellung radioaktiv markierter Mitochondrien 76
   a.zur Elektrophorese 76
   b.zur Extraktion 76
7. Extraktion der radioaktiv markierten Mitochondrien 76
   a.Äthanol-Extraktion 76
   b.Äther-Extraktion des Äthanol-Rückstandes 77
   c.Chloroform/Methanol-Extraktion der Rückstände aus b) 77
8. Säulenchromatographie 77
   a.Sephadex-LH_{20}-Trennung der $CHCl_3$/MeOH-Extrakte 77
   b.Sephadex-LH_{20}-Trennung der H_2O-Exrakte 78

Seit

9. Aminosäureanalyse
10. Dünnschichtchromatographie, Anfärbereagentien
11. Weitere Hilfsmittel

B. Synthesen

1. N-n-Alkyl-Thioharnstoffe
2. N-n-Nonyl-Harnstoff
3. N-n-Cetyl-Harnstoff
4. Acetnonylamid
5. 6-n-Alkyl-2-Thiouracile
6. 6-n-Nonyl-Uracil
7. 6-n-Nonyl-2-[^{14}C-]Thiouracil
8. 6-n-Nonyl-2-[^{35}S-]Thiouracil
9. N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid
10. N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-succinimid
11. N-n-Nonyl-maleinimid
12. N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-[1.4-^{14}C-]maleinimid
13. N,N'-Dicyclohexyl-[^{14}C-]carbodiimid

LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
P_i	anorganisches Phosphat
DNP	2,4-Dinitrophenol
NPA	2-Azido-4-nitrophenol
CCCP	m-Chlorcarbonyl-cyanidphenylhydrazone
DTT	Dithiothreitol
UQ	Ubichinon
TMPD	Tetramethyl-p-phenylendiamin
OSCP	Oligomycin sensitivity-conferring Protein
BSA	Rinderserumalbumin
GADPH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
Bp	Bromphenolblau
C/M	$CHCl_3$/MeOH, Chloroform/Methanol

I.ALLGEMEINER TEIL

A.Atmungskette und oxydative Phosphorylierung

Nährstoffe wie Kohlenhydrate, Fette und zum Teil auch Proteine, sind in Gegenwart von Sauerstoff metastabil. Wäre nicht eine so hohe Aktivierungsenergie vorhanden, würde alles organische Material mit Sauerstoff reagieren und Hitze, sowie CO_2,H_2O,N_2 und andere anorganische Verbindungen erzeugen. Lebende Organismen besitzen die Fähigkeit, die in organischem Material und Sauerstoff vorhandene Redoxenergie aufzunehmen bei einer konstanten Temperatur von etwa 37°C, als chemische Energie (meist in Form energiereicher Phosphatverbindungen wie Adenosintriphosphat) zu speichern und zum Teil als Wärme abzugeben. Der größte Teil dieser Reaktionen läuft in den Mitochondrien ab. Diese stellen die 'mikroskopischen Kraftwerke' der Zelle dar und sorgen für die Aufrechterhaltung des lebenswichtigen Energiepotentials.

Die Energie liefernde Reaktion entspricht im Endeffekt der Knallgasreaktion: $H_2 + 1/2O_2 \longrightarrow H_2O$. $-\Delta G \approx 57$ kcal/Mol H_2O.

Die Mitochondrien erreichen die Speicherung, sowie die allmähliche und stufenweise Freisetzung dieser Energie durch Reaktionssequenzen, die - obwohl funktionell verbunden - unterteilt werden können in

1.Reaktionen zur Bereitstellung des Wasserstoffes

2.Reaktionen zur Oxydation des Wasserstoffes via Atmungskette und 3.Reaktionen der Energiefixierung, das heißt der oxydativen Phosphorylierung.

1.Wasserstofffliefernde Reaktionen

a.Zitratcyklus. Er bildet den gemeinsamen Endweg beim Abbau von Fetten, Kohlenhydraten, aber auch Eiweißkörpern. Ausgangsstoff für den Endabbau ist die 'aktivierte', d.h. als Thioester an Coenzym A gebundene Essigsäure.

In der Bilanz zerfällt Acetyl-CoA unter Wasseraufnahme und liefert so Wasserstoff für die Atmungskette:

$$CH_3\text{-}CO\sim S\cdot CoA + 3\ H_2O \longrightarrow 2\ CO_2 + CoA\cdot SH + 8\,[H].$$

b.ß-Oxydation der Fettsäuren. Die Fettsäureoxydation führt ebenfalls zur Acetyl-CoA-Bildung. Ihre eigentliche Bedeutung als Reaktionsfolge für die Bereitstellung von Wasserstoff liegt jedoch in den beiden Oxydationsschritten, die der Abspaltung einer Acetyl-CoA-Einheit von der Fettsäure vorausgehen.

c.Andere wasserstoffbereitstellende Reaktionen. Dazu gehört die Oxydation von Prolin zum Pyrrolinkarboxylat, von Cholin zum Betainaldehyd und die von α-Glycerophosphat zum Dihydroacetonphosphat. Die Gemeinsamkeit der drei Reaktionen besteht darin, daß sie durch Flavinenzyme katalysiert werden.

Ebenfalls als wasserstofffliefernde Reaktion ist die Glutamat-Oxydation anzusehen. Dafür bieten sich zwei Wege an, nämlich die unmittelbare Desaminierung via Glutamatdehydrogenase und die Oxydation von Glutamat über den Transaminierungsweg. Letzterer hat die größere Bedeutung.

2.Oxydation des Wasserstoffes über die Atmungskette

Die Oxydation des Substratwasserstoffes zu Wasser erfolgt über die Atmungskette. Durch die Zerlegung der Über-Alles-Reaktion in viele reversible Teilschritte, von denen einige Regulatoreigenschaften aufweisen, wird das System steuerbar und zur Anlieferung von Oxydationsenergie für die Phosphorylierung geeignet. Die wichtigsten der in der Atmungskette hintereinander geschalteten Redoxpaare sind Pyridinnukleotide ($NADH/NAD^+$, Potentialdifferenz gegen O_2: ΔG = -52 kcal), Flavoproteide (FpH_2/Fp) und Cytochrome ($Cyt\ Fe^{++}/Cyt\ Fe^{+}$

Ein erstes detailliertes Bild über die Zusammensetzung, Reihenfolge und Dynamik der Atmungskette ergaben spektralphotometrische Untersuchungen an isolierten Mitochondrien, die zum Teil bei tiefen Temperaturen oder unter Verwendung von Hemmstoffen durchgeführt wurden.

Auf der Grundlage derartiger Untersuchungen, auf Fluoreszenzmessungen, chemischen Analysen und auf unter definierten Bedingunge gemessenen Redoxpotentialen gründen sich die noch nicht in allen Punkten gesicherten Vorstellungen über die Glieder der Atmungskette und ihre Sequenz.

Funktionell läßt sich die Atmungskette in vier Enzymkomplexe untergliedern, nämlich die NADH-Coenzym Q-Reduktase (Komplex I), die Succinat-Coenzym Q-Reduktase (Komplex II), die Coenzym Q-Cytochrom c-Reduktase (Komplex III) und die Cytochrom c-Oxydase (Komplex IV) [43].

Ubichinon kommt in allen bisher untersuchten Mitochondrienarten in relativ hoher Konzentration vor. Es dient als Sammelbecken für den durch die verschiedenartigen Flavoproteide angelieferten Substratwasserstoff. Außerdem vollzieht sich im Ubichinon ein Übergang vom Zwei- zum Einelektronenschritt des Elektronentransportes der Atmungskette.

Eine andere wichtige Einmündungsstelle für den Wasserstoff liegt in der Höhe des kompartmentierten Pyridinnukleotids.

Im Endeffekt führt der Elektronentransport zur Bildung eines O^{2-}-Ions, das sich infolge seiner Unbeständigkeit sofort mit zwei Protonen (aus NADH, NADPH, UQ) zu H_2O vereinigt.

Wie bereits erwähnt, leitet sich ein Teil der Vorstellungen über die Anordnung und das Zusammenspiel der Glieder der Atmungsket aus Beobachtungen ab, die unter Einsatz spezieller Hemmstoffe gemacht wurden. Gegenwärtig kennt man eine große Anzahl solcher Hemmstoffe mit wohldefiniertem Angriffspunkt. Einige der wichtigste sind in Fig.1 eingezeichnet.

Weiterhin gewinnen künstliche Elektronenacceptoren oder auch -donoren, oft gemeinsam mit Hemmstoffen angewendet, für die Erforschung von Einzelschritten innerhalb der intakten Reaktionskette immer mehr an Bedeutung. Verwendet wurden unter anderen die Redox-Indikatoren Phenazinmethosulfat, Methylenblau, 2,6-Dichlorphenolindophenol, Tetramethyl-p-phenylendiamin (TMPD) und Kaliumhexacyanoferrat(III).

Die Atmungskette ist ein ausgezeichnetes Beispiel dafür, daß sich im Organismus kein echtes chemisches Gleichgewicht einstellt. Sie kann ihre Funktion nur erfüllen, wenn sie laufend Wasserstoff von den Substraten aufnimmt und damit den Sauerstoff, der vom Hämoglobin angeliefert wird, reduziert. Dabei stellt sich ein stati närer Zustand ein, der ein Fließgleichgewicht ist und vom Sauerstof angebot , von Substratkonzentrationen und vor allem von der Kopplun mit dem Phosphorylierungssystem stärker beeinflußt wird als von den Redoxpotentialen. Die Nicotinamidnucleotide können dabei weitgehend

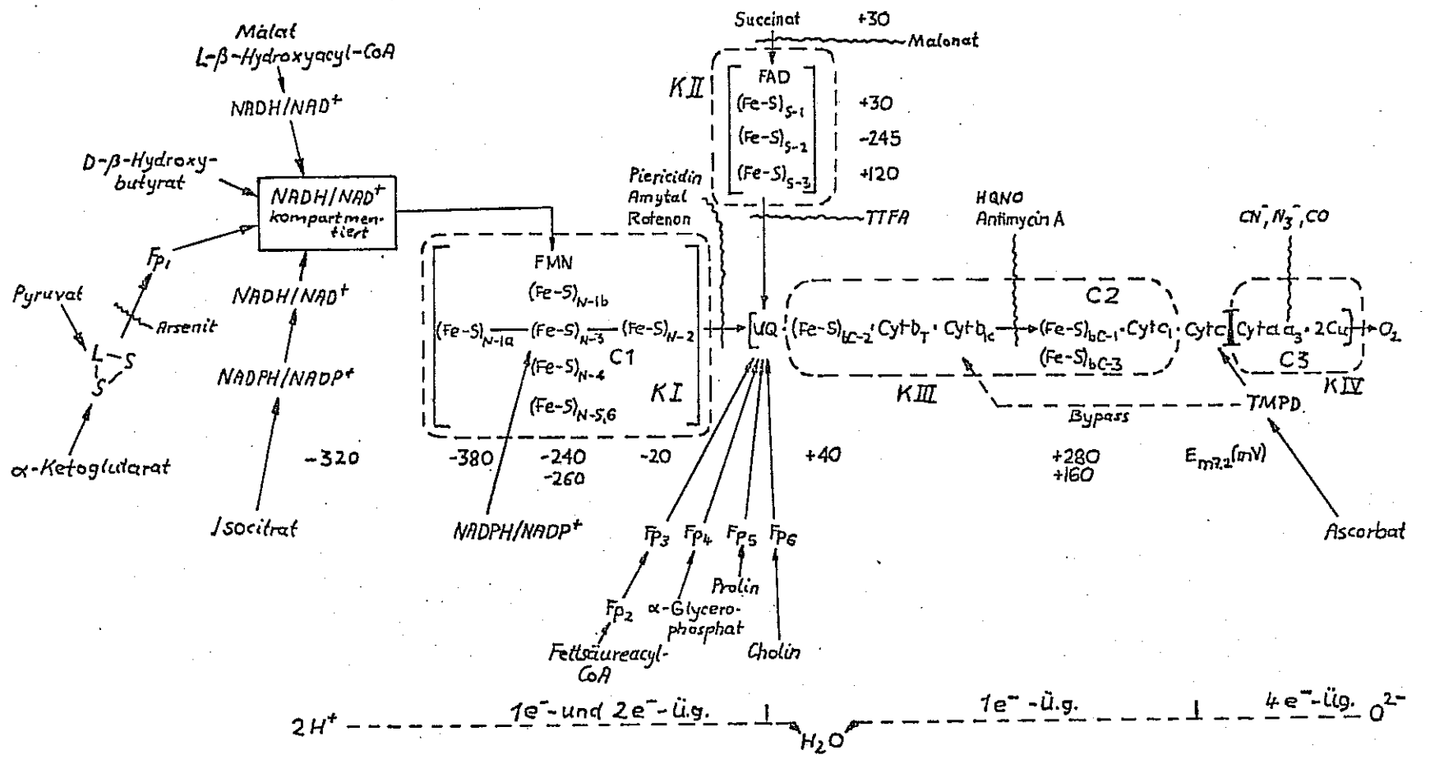


Fig.1: Schema der Atmungskette. Fe-S = Eisen-Schwefel-Center, Fp_{1-6} = Flavoproteine, UQ = Ubichinon, Cyt = Cytochrome, HQNO = 2-Heptyl-4-Hydroxyquinolin-N-oxyd, TTFA = Thenoyltrifluoraceton, C 1-3 = Kopplungsstellen, K I-IV = Komplexe, Ü.g. = Übergänge. Lit. [43,65].

in reduzierter Form vorliegen, die folgenden Coenzyme sind in zunehmendem Maße oxydiert (Tab.1):

Tab.1: Fließgleichgewichte in der Atmungskette

Versuchsbedingungen	% der Wirkgruppen in reduzierter Form					
	NAD^+	Flavo-protein	Coenzym Q	Cytochrom b	c	a
'Kontrollierte Atmung' Viel Substrat, ADP-begrenzt	78	42	36	50	3	0
'Aktiver Zustand' Maximale O_2-Aufnahme	5	15	6	20	3	2

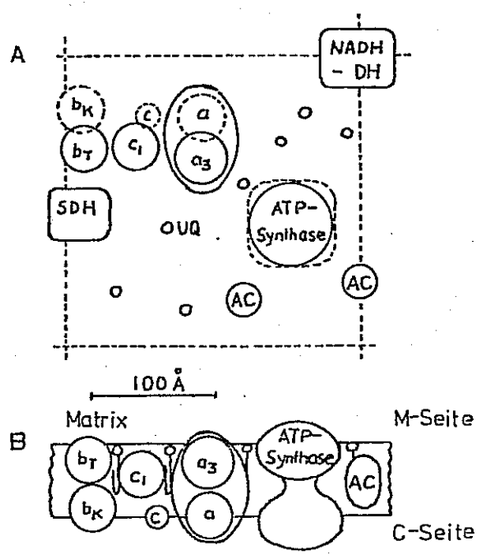


Fig.2: Mögliche Anordnung der Elektronentransport-Carrier und der ATP-synthetisierenden Komponenten in der Mitochondrien-Membran [53].

AC = ADP-und ATP-Carrier
UQ = Ubichinon

3.Oxydative Phosphorylierung

a.Energiebilanz. Aus den Differenzen der Redoxpotentiale und den entsprechenden freien Enthalpien ist zu ersehen, daß die Reaktionsfolge der Atmungskette die freie Energie der Oxydation von Substratwasserstoff zu Wasser als chemische Energie abfangen und in Form von ADP speichern kann. Man nennt diesen Prozeß 'oxydative Phosphorylierung' oder 'Atmungskettenphosphorylierung'.

Wird ein Mol NADH mit 1/2 O_2 oxydiert, so stehen 52 kcal als 'freie Energie' zur Verfügung. Zur Bildung von 3 Mol ATP aus ADP und anorganischem Phosphat sind rund 21 kcal erforderlich, energetisch ist dies also durchaus möglich. Es entspricht einem Wirkungsgrad von 40 % unter Standard-Bedingungen. Man kann jedoch berechnen daß unter State 4-Atmung bei 25°C fast die gesamte freie Energie der NADH-Oxydation durch Sauerstoff zur ATP-Bildung ausgenutzt wird (≈51 kcal/3 ATP) [67,78].

Messungen in verschiedenen Laboratorien haben immer wieder diesen Wert von 3 ATP pro 1/2 O_2 (1 Mol H_2O) ergeben; man bezeichne die Größe ATP gebildet/O verbraucht als den P/O-Quotienten. Der Wert von 3 gilt allerdings nur für Substrate, die von NAD^+ dehydrie werden. Mit Succinat, das direkt vom Flavoproteid oxydiert wird, ergibt sich ein Wert von 2, mit Ascorbat und dem Einelektronenüberträger TMPD ein Wert von 1.

b.Kopplung. Normalerweise sind Atmungskette und Atmungskettenphosphorylierung streng gekoppelt: Obwohl Substrat und O_2 verfügbar sind, läuft die Redoxreaktion nicht ab, wenn nicht gleichzeitig ADP phosphoryliert wird. ADP wird damit zum begrenzenden Faktor der Gesamtreaktion, d.h. auch der O_2-Aufnahme. Man spricht von Atmungskontrolle durch ADP.

Als Ort der Kopplung werden einzelne Komponenten der Atmungsket mit variablem Redoxpotential angesehen. Für die Kopplungsstelle I soll dies zwischen den Non-Heme-Eisen-Centern 3 (und 4) und 2 des Komplexes I [43,64] sein. Das Non-Heme-Eisen-Protein von Rieske [70] und Kupfer in der Cytochrom-Oxydase sollen analoge Funktion in Kopplungsstelle II sowie III (der Komplexe III und IV) erfüllen.

Mit Kopplung ist hier z.B. die Energieübertragung auf Kopplungs faktoren und nicht die ATP-Synthese selbst gemeint.

Als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung bezeichnet man Stoffe wie Dinitrophenol (DNP), substituierte Phenylhydrazone wie Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) u.a.m., die die Atmung der Mitochondrien stimulieren, aber die Bildung vo ATP dabei verhindern. Die Atmungskette läuft gewissermaßen im Leerlauf. Dagegen hemmen Inhibitoren wie Oligomycin die Phosphory- lierung und damit bei strenger Kopplung auch die Atmung. Fehlt di Kopplung, dann wird die Atmung nicht beeinflußt.

c.ATP-Synthase. Viele der Proteine der ATP-Synthase sind bish charakterisiert. Von dem ganzen Komplex, genannt Oligomycin-sensi ATP-ase [84], kann eine lösliche ATP-ase isoliert werden, genannt F_1 [68].

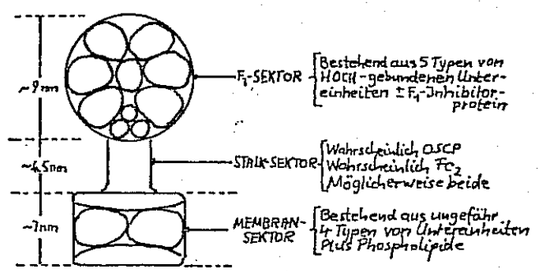


Fig.3: Die hypothetische Struktur des mito- chondrialen ATP-Synthase-Komplexes [75].

Die lösliche ATP-ase ist der einzige Kupplungsfaktor mit eine bekannten katalytischen Aktivität. An F_1 kann zwar ATP hydrolysier werden, aber das muß nicht seine wirkliche physiologische Funktio sein. Die ATP-Hydrolyse kann verhindert werden, durch ein spezi- fisches löslisches Inhibitor-Protein [69], welches auf die oxydat Phosphorylierung keinen Effekt hat. Die schnelle Wechselwirkung v F_1 mit Wasser ist ein Artefakt, teilweise hervorgerufen durch Ablösen des Enzymes von der Membran und teilweise durch Dissoziat des Inhibitor-Proteines. Die ATP-ase hat zwei charakteristische Aktivitäten: eine in Kombination mit CF_o, den hydrophoben Proteine der Membran [48], die andere in Kombination mit dem löslichen Inhibitor. Die erste Inhibierung ist reversibel mit Phospholipide

während die zweite Dissoziation des Inhibitors erfordert. Beide Phenomen haben möglicherweise Regulator Eigenschaften.

Das Schema (Fig.3) des ATP-Synthase-Komplexes ist eine hypothetische Anordnung der verschiedenen Untereinheiten. Es basiert auf Elektronen-Mikroskop definierten 'ATP-ase Knobs', welche auf der Inner-Membran der Mitochondrien zu sehen sind. Man kann heute jedoch sagen, daß diese Knobs durch die Behandlung vor der Elektronen-Mikroskop-Aufnahme entstehen und bei intakten Mitochondrien nicht vorhanden sind (Fig.5).

Einen ATP-P_i-Austausch-Komplex (Komplex V) isolierte Hatefi [42]. Dieser Komplex ist der ATP-Synthase sehr ähnlich. Er besteht aus F_1, OSCP, anderen Polypeptiden, 15 % Phospholipid, sowie sehr wenigen Verunreinigungen (wie Cytochrome b, c, c_1,Flavine). Die ATP-P_i-Austausch-Aktivität wird inhibiert durch Rutamycin, DCCD, Venturicidin, Arsenat, Azide, AMP-PNP, Valinomycin plus K^+ oder Nigericin plus K^+. Die Aktivität ist spezifisch für ATP, andere Nucleotide sind unwirksam.

Wichtig ist, daß der Komplex wahrscheinlich die Entkoppler-Bindungsstellen enthällt [40].

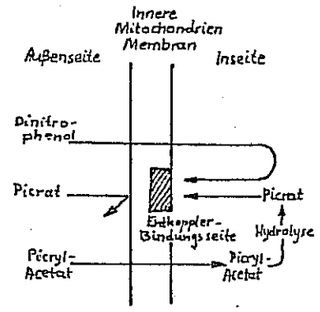


Fig.4: Vergleich zwischen Membran-Permeabilität und Fähigkeit zu entkoppeln. Es erfolgt nur Entkopplung auf der Innenseite.

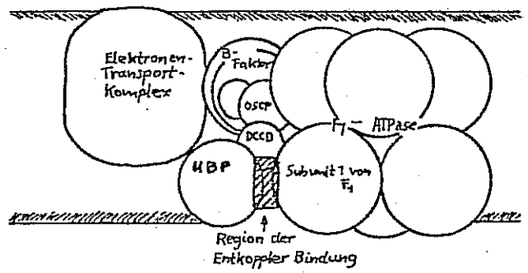


Fig.5: Hypothetische Struktur der Entkoppler-Bindungsseite. Entkoppler-bindendes-Protein (UBP) und Untereinheit 1 von F_1 sind die zwei meist durch Photoaffinity-Label mit radioaktivem NPA markierten Proteine [41].

d.Energie-Pool. Auf der Basis des Energie getiebenen reversiblen Elektronentransfers, war es möglich den Beweis für einen Energie-Pool zum Energie-Umsatz zu finden.

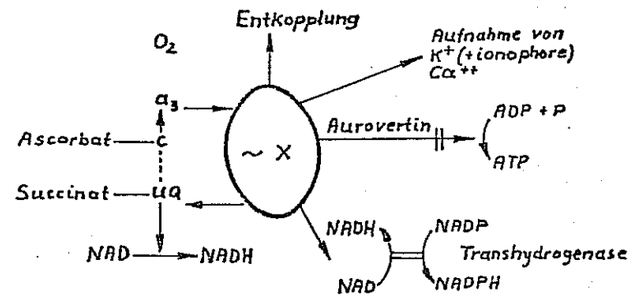


Fig.6: Die experimentelle Definition des Energie-Pools. Schematische Summe der experimentellen Beweise der Existens eines energiereichen Intermediates verbunden mit den 3 Kopplungsstellen der Atmungskette, sowie die verschiedenen benutzten Nachweiswege: Reversibler Elektronentransport, Transhydrogenierung, ATP-Synthese, Ionen-Transport [53].

Aurovertin blockiert den Energie-Transfer zur ATP-Bildung. In der Gegenwart von Aurovertin und in Abwesenheit von ATP, kann die in Kopplungsseite 3 gebildete Energie zum reversiblen Elektronentransfer der 1.Seite benutzt werden. Der andere Nachweis kommt von der Energie abhängigen Transhydrogenase-Reaktion, sowie dem aktiven Ionentransport.

Dieser Energie-Pool wurde zuerst von Ernster [57] bewiesen.

e.Kopplungsmechanismus. Zum Mechanismus der ATP-Synthese gibt es im wesentlichen zwei Vorstellungen, welche die Diskussion beherrschen:

I) Den chemiosmotischen Kopplungsmechanismus von Mitchell; hier soll das elektrochemische Konzentrationsgefälle der Atmungskette einen universellen pH-Gradienten aufbauen, welcher für die ATP-Synthese verantwortlich sein soll [62].

II)Die Konformationshypothese von Boyer; hier wird ATP synthetisiert durch die Protein-Konformationsänderung eines energiereichen Intermediates zur ATP-Bildung, wie z.B. eine Acyl-S-Verknüpfung [12].

Die Konformationshypothese bassiert auf der von Slater formulierten chemischen Kopplung über energiereiche Intermediärprodukte, die in Analogie der Substratkettenphosphorylierung ablaufen soll [77].

Man kann heute mit gutem Gewissen behaupten, daß Mitchells formulierter universeller Protonengradient zu einer ATP-Bildung nicht die richtige Beschreibungsweise des Mechanismus dieser Synthese darstellt.

Ebensowenig kann eine von Boyer formulierte Protein-Konformationsänderung als Haupttriebkraft der ATP-Bildung fungieren; sowenig wie die von Slater formulierten chemischen Intermediate allein zur Synthese ausreichen.

Eine unter Mitwirkung von Protonen (oder anderen Kationen) und der Konformationsänderung eines aktiven Zentrums - mittels chemischer Intermediate (Enzymgebunden) - verlaufende ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat ist wahrscheinlich die umfassenste Beschreibungsweise.

Es bleibt die Frage:

An welcher funktionellen Gruppe wird Phosphat zur ATP-Synthese aktiviert?

B.Reaktivität lipophiler Thiol- und Sulfensäurereagentien

1.Modellreaktionen zur oxydativen Phosphorylierung

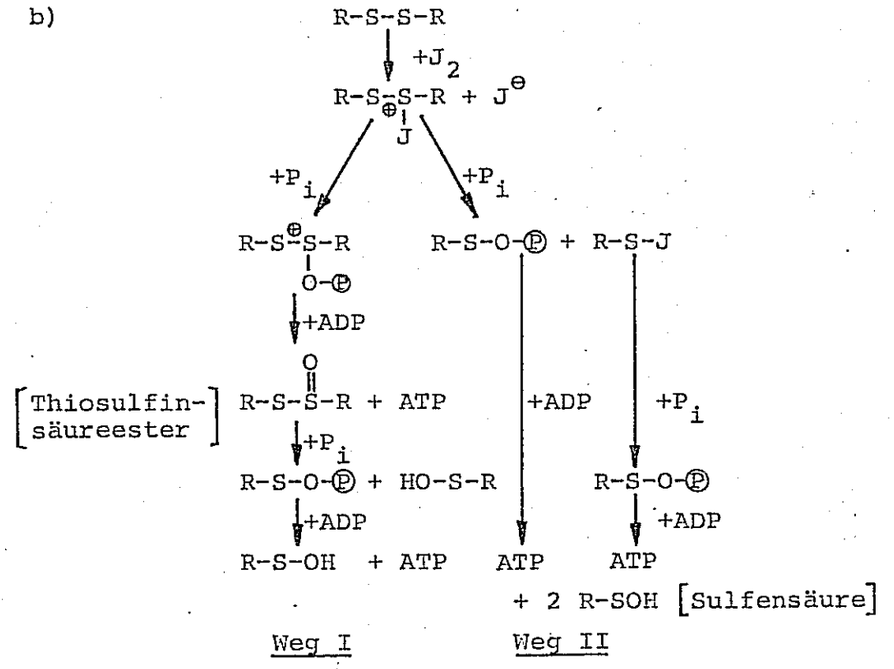
Die Beobachtungen, daß Thiolgruppen in die Energie-Transfer-Reaktionen der Mitochondrien und submitochondrialen Partikel, aber auch der löslichen Kopplungsfaktoren eingreifen [22,23,32,33,34,44] lenkte das Interesse zu den Mechanismen, welcher Art Thiol-Gruppen in die Aktivierung von Orthophosphat durch Oxydation eingreifen könnten.

Bäuerlein zeigte in Modellreaktionen [6], daß durch Oxydation von Thiol-Gruppen (a), wie auch Disulfid-Gruppen (b) mit Brom, Jod, Hämin + O_2, sowie $CuCl_2$ + O_2 in Gegenwart von ADP + P_i oder AMP + P_i in wasserfreiem Medium hohe Ausbeuten an ATP bzw. ADP zu erreichen sind:

a) $R\text{-}SH + Br_2 \longrightarrow R\text{-}S\text{-}Br \xrightarrow{+P_i} \left[R\text{-}S\text{-}O\text{-}PO_3^{2\ominus}\right] \xrightarrow{+ADP} R\text{-}S\text{-}O^{\ominus} + ATP$

Sulfenylphosphat ($R\text{-}SO\sim PO_3H_2$) wurde als wahrscheinliches Intermediat vorgeschlagen [87].

b)



Diese gefundenen Reaktionsmechanismen in homogener Phase mußten nun am biologischen Material mittels geeigneter Abfangreagentien nachgewiesen werden.

2. Lipophile Maleinimide

Die Bestimmung der Gesamt-Thiol-Gruppen-Konzentration in Mitochondrien unter verschiedenen physiologischen Bedingungen

(wie State 4, State 3 u.a.) ist zur Zeit noch recht widersprüchlich, da nicht einfach zu messen. Die Bestimmung müßte mit wirklich alle Thiol-Gruppen erfassenden Reagentien durchgeführt werden.

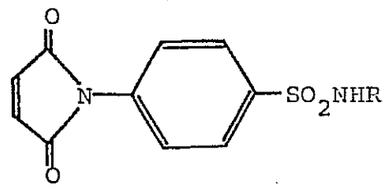
Die bisher benutzten Nachweisreagentien besitzen unterschiedliche Membran-Durchdringbarkeit [35]. Dazu fehlt den membrandurchdringenden Reagentien die Eigenschaft Thiol-Gruppen in wirklich rein lipophiler Umgebung quantitativ zu erfassen.

Während zum Beispiel N-Äthylmaleinimid (NEM) die Membran durchdringt, ist N^4-(N^1-Acetyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid (ASPM), ein die Membran nicht passierendes Reagenz. NEM besitzt, wie später noch ausgeführt wird, nicht die Fähigkeit das gleiche reaktive Zentrum wie N^4-(N^1-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid (NSPM) anzugreifen.

ASPM ist ein von Merz und Wieland [61] unter anderen synthetisiertes Nachweisreagens für Thiol-Gruppen. Die Verbindung reagiert trotz ihres raumerfüllenden Substituenten in vielen Fällen rasch mit funktionellen Thiol-Gruppen in Enzymen. Es wird auf aromatische Wechselwirkung verwiesen. Zur Verfolgung der Reaktion wurde die Substanz mit 35 S markiert.

N-Alkylmaleinimide mit wachsender Kettenlänge wurden von Heitz et al [45], sowie von Anderson et al [3] mit Cystein, Glutathion sowie mehreren Thiol-Proteinen getestet. Es konnte gezeigt werden, daß eine Reaktivitätssteigerung der Reagentien mit wachsender Alkylkettenlänge zu Thiol-Gruppen in mehr lipophiler Umgebung auftritt.

In Anbetracht der widersprüchlichen Ergebnisse in der Bestimmung des Gesamtthiol-Gehaltes von Mitochondrien, bekam ich nun die Aufgabe neue lipophile Thiolreagentien zu synthetisieren [50]. Es sollten darin die Eigenschaften des ASPM und der N-Akylmaleinimide vereint werden:



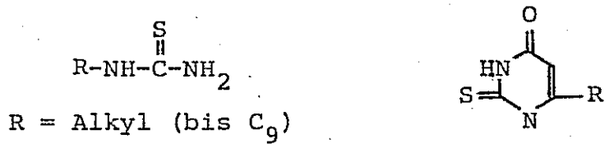
R = Alkyl (bis C_9)

N^4-(N^1-Alkyl-sulfamoylphenyl)-maleinimide

Es sollte damit eine eventuelle Variation von Thiol-Gruppen während der Atmungskettenphosphorylierung - möglicherweise durch Oxydation verursacht - zu finden sein. Das ich mit NSPM eine funktionelle Thiol-Gruppe der Atmungskettenphosphorylierung gezielt modifizieren konnte, ist dem Umstand zu verdanken, daß das aktive Zentrum - wie angenommen - in rein lipophile Umgebung eingebettet ist und durch dieses Reagenz in dieser Umgebung am schnellsten erreichbar ist.

3. Lipophile Thioharnstoffe, Thiouracile

Da nun, wie schon ausgeführt, Sulfenylphosphat in lipophiler Umgebung als mögliches Intermediat einer Phosphataktivierung für die anschließende ATP-Bildung fungieren könnte, erhielt ich ebenfalls den Auftrag, geeignete lipophile Sulfensäurereagentien zu synthetisieren und zunächst einmal ihre Reaktivität an einem geeigneten Modell zu testen [50]:



N-Mono-alkyl-Thioharnstoffe 6-Alkyl-2-Thiouracile

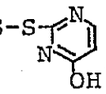
Möglicherweise spielen Sulfensäure-Gruppen allgemein bei enzymkatalysierten Reaktionen eine Rolle [1].

In vitro lassen sich freie Thiol-Gruppen in Proteinen leicht zu Sulfensäure-Gruppen oxydieren.

Cunningham und Nuenke [25-28] und Cunningham [29] erarbeiteten mit ß-Lactoglobulin als Modellsubstrat ein Verfahren zur Thiol-Gruppenbestimmung über Sulfenyljodid:
Rinder-ß-Lactoglobulin bildet ein stabiles Sulfenyljodid, seine Thiol-Gruppe befindet sich in lipophilem Bereich. Der Grund für die Einführung des Jods in die Untersuchungen von Protein-Thiol-Gruppen liegt in der Stabilität der gebildeten Sulfenyljodide in biologischem Material und der leichten Nachweisbarkeit des Umsetzungsgrades (UV-Spektrum von J_3^-, J^-). Sie stellten fest, daß

Thiouracil und Thioharnstoff die am besten reagierenden Reagentien seien - unter Bildung gemischter Disulfide:

a) P-SJ + $H_2N-\overset{\overset{S}{\|}}{C}-NH_2$ $\xrightarrow{pH6/5^oC}$ P-S-S-$\overset{\overset{NH}{\|}}{C}-NH_2$ + H^+ + J^-.

b) P-SJ + $\xrightarrow{pH6/5^oC}$ P-S-S-  + H^+ + J^-.

Das gemischte Disulfid aus b) wurde am Umsatz mit $[2-^{14}C]$-Thiouracil und anschließender Fraktionierung an Sephadex G-25 verfolgt. Es ist zu bemerken, daß das Disulfid in Lösung nur bei sauren pH-Werten und nicht zu hohen Temperaturen einigermaßen stabil ist.

Die neu synthetisierten lipophilen Thioharnstoffe und Thiouracile testete ich analog dem Verfahren von Cunningham. Das wichtigste Ergebnis dieser Versuche ist, daß die Geschwindigkeit der Reaktion tatsächlich von der Lipophilie der getesteten Reagentien abhängt (Fig.7).

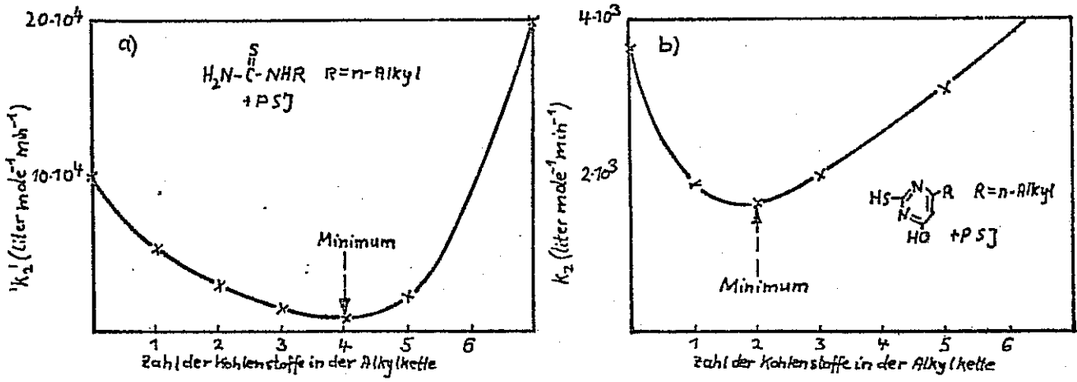


Fig.7: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Alkylseitenkette (Lipophilie) der getesteten Thioharnstoffe (a) Thiouracile (b) [50].

Der n-Heptyl-Thioharnstoff, sowie das n-Heptyl-Thiouracil erwiesen sich als die am schnellsten reagierenden Reagentien, der

Endumsatz war bereits nach einer Minute bei 100 % (höhere Glieder der Reihen waren aus Löslichkeitsgründen nicht zu testen). Die Thioharnstoff- sowie Thiouracil- analogen Harnstoff und Uracil waren uneffektiv.

Diese Ergebnisse ermöglichten es nun, auf meine eigentliche Aufgabe - die Suche nach einer Sulfensäurefunktion bei der mitochondrialen Atmungskettenphosphorylierung - überzugehen.

Anfangsschwierigkeiten in der Isolierung gut gekoppelter Rinderherz-Mitochondrien und der Messeung der Atmungsgeschwindig- mit der Clark-Elektrode konnte ich schließlich dadurch überwinden, daß ich zur Vervollkommnung dieser Techniken zu Prof.Klingenberg fahren durfte.

C.Messung der Atmungsgeschwindigkeit

1.Benutzte Kopplungsseiten-spezifische Substrate

a.Kopplungsseite 1. Das zur Reaktion benötigte NADH muß durch Reduktion des in den Mitochondrien vorhandenen NAD^+ hergestellt werden, da NADH nicht von den Mitochondrien aufgenommen wird. Das wird durch Zusatz von Glutamat und Malat erreicht. Diese beiden Substrate werden wie Succinat von den Mitochondrien aufgenommen. Die Reduktion von NAD^+ ($E_o' = -0{,}32$ Volt) durch Malat ($E_o' = -0{,}17$ V) wird möglich, wenn die Konzentration des entstehenden Oxalacetats durch Transaminierung mit Glutamat klein gehalten wird:

$$\text{Malat} + NAD^+ \longrightarrow \text{Oxalacetat} + NADH + H^+$$
$$\text{Glutamat} + \text{Oxalacetat} \longrightarrow \alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{Aspartat}$$
$$NADH + 1/2\ O_2 + 3\ ADP + 3\ P_i \xrightarrow{FMN} NAD^+ + H_2O + 3\ ATP.$$

Blockung endogener Succinatatmung mit Malonat. P/O = 3, RCR = 5-6.

b.Kopplungsseite 2.

$$\text{Succinat} + 1/2\ O_2 + 2\ ADP + 2\ P_i \xrightarrow{FAD} \text{Fumarat} + H_2O + 2\ ATP.$$

P/O = 2, RCR = 3-4.

Blockung endogener NADH-abhängiger Substratatmung mit Rotenon.

c.Kopplungsseite 3.

$$\underline{\text{Ascorbat}} + 1/2\ O_2 + ADP + P_i \xrightarrow{TMPD} \text{Dehydroascorbat} + H_2O + ATP$$

Endogene Substratatmung nicht geblockt. P/O = 1, RCR = 1,5-2.

2.Messung des ADP/O-Quotienten mit der Sauerstoffelektrode [20]

a.Prinzip. Mit der Sauerstoffelektrode wird polarographisch die Sauerstoffkonzentration der Reaktionslösung gemessen und mit einem Schreiber zeitabhängig registriert (Fig.8).

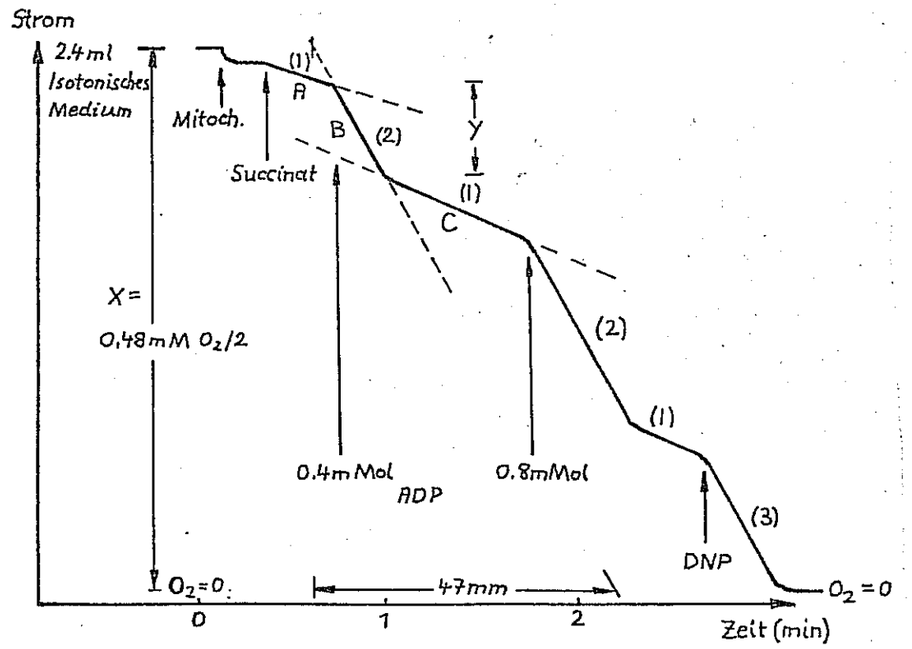


Fig.8: Die Registrierung des Sauerstoffverbrauchs von Miochondrien in verschiedenen Zuständen der oxydativen Phosphorylierung: (1) kontrollierter Zustand (State 4),(2) aktiver Zustand (State 3), (3) entkoppelter Zustand.

Aus der Abnahme der Sauerstoffkonzentration im aktiven Zustand und der Konzentration des dabei phosphorylierten ADP läßt sich der ADP/O- (P/O-)Quotient bestimmen. Das Reaktionsmedium enthält Phosphat.

Auf diese Weise läßt sich zeigen, daß die Atmungsaktivität der Mitochondrien von der Phosphorylierung kontrolliert wird. Die Mitochondrien atmen in Gegenwart eines Substrates (Succinat) und Phosphat nur mit geringer Aktivität (kontrollierter Zustand der oxydativen Phosphorylierung). Erst auf Zusatz von ADP, wodurch die Phosphorylierung ermöglicht wird, erreicht die Atmung die Maximalaktivität (aktiver Zustand der oxydativen Phosphorylierung). Nach Phosphorylierung der zugesetzten Menge ADP fällt die Atmungsaktivität wieder auf die des kontrollierten Zustandes zurück. Aus der im aktiven Zustand verbrauchten Menge Sauerstoff und der entsprechenden Menge an zugesetztem ADP läßt sich die Phosphorylierungsausbeute (ADP/O- oder P/O-Quotient) errechnen. Auf Zusatz von 1,4-Dinitrophenol (DNP) wird die Atmung von der Phosphorylierung entkoppelt, d.h. die Atmung erreicht die Maximalaktivität ohne Phosphorylierung.

b.Berechnung. (1) Die Strecke Y wird gewonnen durch Ausmessen der senkrechten Strecke zwischen den Schnittpunkten der Kurven A und B, sowie B und C in mm. Dies ergibt den Betrag des Sauerstoffverbrauchs der ADP stimulierten Atmung (State 3). Benutzt wurden bei jeder Messung luftgesättigte Lösungen.
(2) Der Zeigerausschlag X in mm ergibt den totalen Sauerstoffgehalt des Reaktionsmediums (Fig.8). Luftgesättigte Lösung bei 25^{o}C und Normaldruck: 0,24 mM O_2.
(3) (Sauerstoffgehalt des Mediums/X mm)·Y mm· ml Reaktionsmedium·2 = Mikroatome verbrauchter Sauerstoff.
(4) Mikromole ADP addiert/Mikroatome O_2 verbraucht = ADP/O- oder P/O-Verhältnis.

Im oben gezeigten Beispiel (Fig.8) enthält das Medium 240 nMol O_2 pro ml und X = 86 mm. Y = 15 mm; das ergibt 201 nAtome Sauerstoff verbraucht während aktiver Atmung (State 3). Addiert wurden 400 nMol ADP. Das ADP/O-Verhältnis beträgt somit 400/201 = 1,99.

Das Atmungskontrollverhältnis (RCR, [17]) ist definiert als Atmungsgeschwindigkeit in Gegenwart von ADP zu der Atmungsgeschwindigkeit nach Verbrauch des zugesetzten ADP.

Die Atmungsgeschwindigkeit wird angegeben als

$$\mu\text{Mol } O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Protein hr}^{-1} \text{ bei } 25^{o}\text{C.}$$

Im Beispiel beträgt die RCR:

Geschwindigkeit B/Geschwindigkeit C = 4:

Luftgesättigte Lösung	240 µ Mol/l
Reaktionsgefäß	2,4 ml
Protein	3 mg
Schreibervorschub	30 mm/min

$$B: \frac{240\,\mu\text{Mol} \cdot 2{,}4\ \text{ml} \cdot 30\ \text{mm} \cdot 60\ \text{min}}{10^3\ \text{ml} \cdot 3\ \text{mg Prot} \cdot 47\ \text{mm min hr}} = 7{,}35\ \frac{\text{Mol } O_2}{\text{mg Prot hr}}$$

$$C: \frac{240\,\mu\text{Mol} \cdot 2{,}4\ \text{ml} \cdot 30\ \text{mm} \cdot 60\ \text{min}}{10^3\ \text{ml} \cdot 3\ \text{mg Prot} \cdot 188\ \text{mm min hr}} = 1{,}84\ \frac{\text{Mol } O_2}{\text{mg Prot hr}}$$

RCR = B/C = 7,35/1,84 = 4.

Die Konzentrationsangaben benutzter Lösungen folgt bei den Ergebnissen der Messungen.

Die Ausführung der Messung ist im experimentellen Teil beschrieben.

c.Sauerstoffelektrode nach Clark. Das Gerät zur polarographischen Messung der Sauerstoffkonzentration (Mikro-pO_2-Meßeinheit Eschweiler und Co, Kiel) besteht aus einer Pt-Elektrode (Kathode) und einer Ag/AgCl-Elektrode (Anode), die zusammen von einer KCl-Lösung umgeben sind. Durch eine sauerstoffdurchlässige Teflonmembran (Dicke 12 µ m), sowie eine KCl getränkte Cuprophanmembran sind beide Elektroden von der Reaktionslösung abgetrennt (Fig.9).

An den Elektroden spielen sich folgende Vorgänge ab:

Pt-Elektrode	$O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow H_2O_2$	(a)
	$H_2O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow 2\,H_2O$	(b)
Ag/AgCl-Elektrode	$4\,Ag + 4\,CL^- \longrightarrow 4\,AgCl + 4\,e^-$	(c)
Zusammen	$O_2 + 4\,H^+ + 4\,Ag + 4\,Cl^- \longrightarrow 4\,AgCl + 2\,H_2O$	(d)

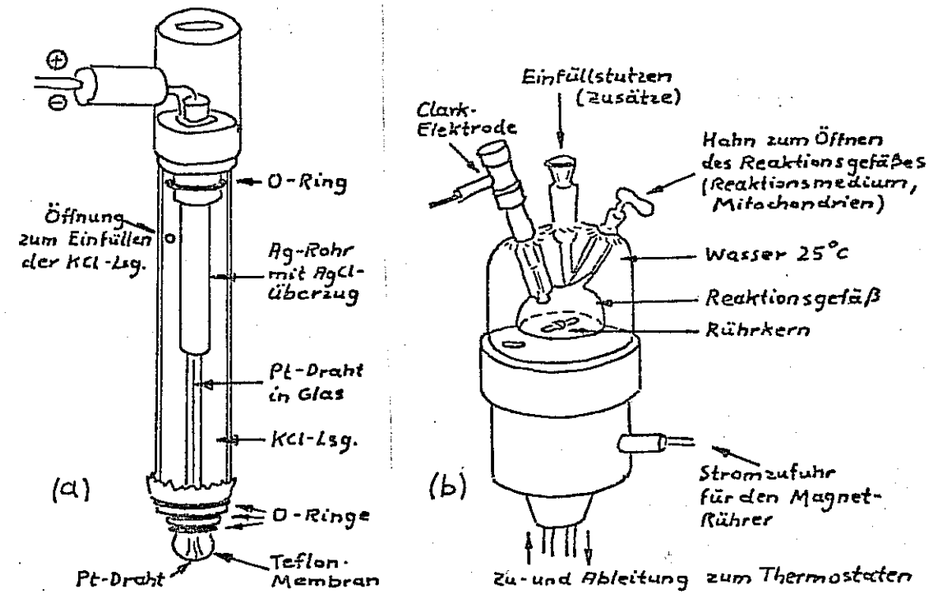


Fig.9: Aufbau der Sauerstoffelektrode sowie des Reaktionsgefäßes (Eschweiler u.Co, Kiel).
(a) Sauerstoffelektrode (b) Reaktionsgefäß

Bei genügend großer Spannung (ca. 0,6 V -Polarisationsspannung) wird aller Sauerstoff, der sich in unmittelbarer Nähe der Pt-Elektrode befindet, abgeschieden. Der dabei fließende Strom wird durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffes durch die Teflonschicht und die KCl-Lösung zur Pt-Elektrode bestimmt. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist in diesem Fall der Sauerstoffkonzentration proportianal. Der Diffusionsweg muß klein sein, damit die Sauerstoffelektrode schnell auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung anspricht. Das wird dadurch erreicht, daß die KCl-Schicht (Cuprophan) und die Teflonmembran dünn gehalten werden und die Reaktionslösung gerührt wird.

II. HAUPTTEIL

A. Wirkung der Thiol- und Sulfensäurereagentien auf die gekoppelte Atmung von Rinderherz-Mitochondrien

1. Wirkung der Sulfensäurereagentien [7]

a. n-Alkyl-Thioharnstoffe. Die Effekte der n-Alkyl-Thioharnstoffe sind in Tab.2 zusammengefaßt. Zum Vergleich wurde der n-Nonyl-Harnstoff, welcher wegen mangelnder Nucleophilie nicht mit der angenommenen Sulfensäure-Gruppe reagieren sollte, sowie das Lösungsmittel Äthanol mit der maximal benutzten Menge - als Blindwert -, mitgemessen.

Am Anfang jeder Messung wurde durch ADP-Zugabe die Atmungskontrolle getestet.

Tab.2: Wirkung der n-Alkyl-Thioharnstoffe

Kopplungsstelle (Substrat)	Verbindungen	nMol / mg Prot.	% Inhib. St. 4→St. 3* bezogen auf meßb. Atm. (DNP, CCCP)	% Inhib. Entkoppl. bezogen auf meßb. Atm. (DNP, CCCP)	% Stimmul. St. 4
I (Glutamat, Malat)	Thioharnstoff	330	-	-	-
	n-Methylthio-harnstoff	330	-	-	-
	n-Propylthio-harnstoff	330	-	-	-
	n-Pentylthio-harnstoff	330	-	-	-
	n-Heptylthio-harnstoff	330	30	20	-
	n-Nonylthio-harnstoff (MNT)	140	100	100	35
	n-Nonyl-harnstoff	350	100	100	40
	Äthanol	+	-	-	-

* St.4 → St.3 = State 4 → State 3 = Übergang kontrollierter Atmung (Substrat, P_i) zu aktivem Zustand (Substrat, P_i, ADP)

Inhib. = Inhibierung; Stimmulierung = Stimmul.; Entkoppl. = Entkopplung; meßbare Atmung = meßb. Atm.

Fortsetzung Tab.2:

Kopplungs-stelle (Substrat)	Verbindungen	nMol / mg Prot.	% Inhib. St. 4→St. 3 bezogen auf meßb.Atm.	% Inhib. Entkoppl. (DNP,CCCP)	% Stimmul. St. 4
	Thioharnstoff	330	-	-	-
	↓				
	n-Heptylthio-harnstoff	330	-	-	-
II	n-Nonylthio-harnstoff	170	100	100	70
(Succinat)	" n.Olig.	170	100	100	-
	n-Nonyl-harnstoff	350	100	100	75
	Äthanol	+	-	-	-
III (Ascorbat, TMPD)	n-Nonylthio-harnstoff	120	-	40 % St 3 Stimmul. (Dicoumarol)	100
	Äthanol	+	-	-	-

Die höheren Glieder der Reihe sind im benutzten Reaktionsmedium nicht löslich und fallen bei Zugabe sofort aus (Trübung) - von den Mitochondrien werden sie jedoch sofort aufgenommen, quasi 'aufgesaugt' (verschwindende Trübung).

n-Cetyl-Thioharnstoff, sowie n-Cetyl-Harnstoff fällen die Mitochondrien aus dem Medium aus und sind somit nicht zur Messung brauchbar, können aber möglicherweise zur Protein-Isolierung benutzt werden.

Zum besseren Verständnis der Tabelle 2 - Figur 10:
hier werden die typischen mit der Sauerstoffelektrode erhaltenen 'Atmungskurven' gezeigt. Die jeweils bei den Messungen verwendeten Bedingungen werden bei diesen Kurven angegeben.

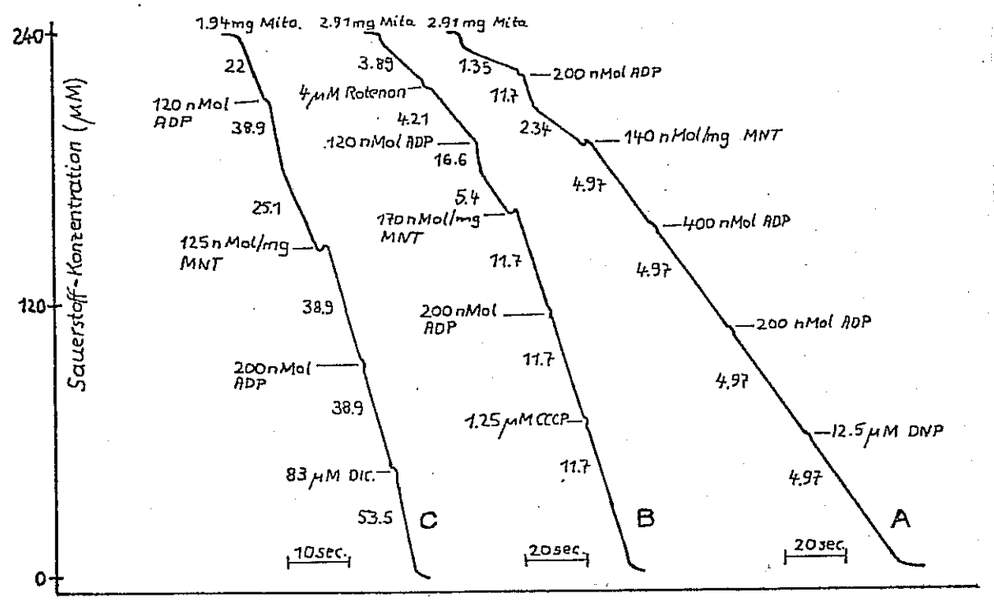


Fig.10: Effekt von MNT auf die gekoppelte Atmung von Rinderherz-Mitochondrien.
Die Zahlen an den Kurven geben die Atmungsgeschwindigkeit in μMol O_2 mg^{-1} Protein hr^{-1} bei 25°C an.
Experiment A: Rinderherz-Mitochondrien (2,91 mg) werden addiert zur Reaktionsmischung bestehend aus 2,4 ml 0,25 M Saccharose enthaltend 2,5 mM Glutamat, 2,5 mM D,L-Malat, 5 mM Malonat, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Phosphat und 20 mM Tris-HCl, pH 7,4.
Experiment B: Rinderherz-Mitochondrien (2,91 mg) werden addiert zur Reaktionsmischung bestehend aus 2,4 ml 0,25 M Saccharose enthaltend 10 mM Succinat, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Phosphat und 20 mM Tris-HCl, pH 7,4.
Experiment C: Rinderherz-Mitochondrien (1,94 mg) werden addiert zur Reaktionsmischung bestehend aus 2,4 ml 0,25 M Saccharose enthaltend 2,5 mM Ascorbat, 0,25 mM TMPD, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Phosphat und 20 mM Tris-HCl, pH 7,4.

Zugabe von Rinderserumalbumin (2,5 mg/3,4 mg Mitochondrien) als mögliches Absorptionsmittel (lipophile Wechselwirkung) des n-Nonyl-Thioharnstoffes hatte keinen Einfluß auf dessen Wirkung.

Ebensowenig verhindert Dihydroliponsäure (160 µM) - als möglicher Cofaktor der ATP-Synthase [37] - die Wirkung. Auch Dithiothreitol (80 µM) ein Disulfid reduzierendes Agens, sowie 1,4-Dithiobutan (400 µM) können die Wirkung nicht verhindern.

Um Wirkungen auf den Glutamat-Transport auszuschließen wurde auch α-Ketoglutarat (10 mM), sowie ß-Hydroxybutyrat (10 mM) als Substrat der Kopplungsseite I benutzt - es wurden die gleichen Effekte mit gleicher Konzentration (MNT usw.) erzielt.

Wirkungen auf den Phosphat-Transport können ebenfalls ausgeschlossen werden, was bei den Messungen mit den Maleinimiden deutlicher zu zeigen ist (Seite 65).

b.6-n-Alkyl-2-Thiouracile. Die Effekte der 6-n-Alkyl-2-Thiouracile sind in Tab.3 zusammengefaßt. Zum Vergleich wurde hier das 6-n-Nonyl-2-Uracil, welches ebenfalls (wie der n-Nonyl-Harnsto wegen mangelnder Nucleophilie nicht mit der angenommenen Sulfensäure-Gruppe reagieren sollte, sowie die Lösungsmittel DMF und Äthanol mit den maximal benutzten Mengen - als Blindwert -, mitgemessen.

Auch hier wurde am Anfang auf Atmungskontrolle getestet.

Für die Löslichkeit der getesteten Thiouracil-Verbindungen gilt ähnliches wie für die der Thioharnstoffe.

-- Zum besseren Verständnis der Tabelle 3 - Figur 11. --

Zugabe von Rinderserumalbumin, Dihydroliponsäure, Dithiothreit sowie 1,4-Dithiobutan können auch hier die Wirkung von 6-n-Nonyl-2-Thiouracil nicht verhindern.

Auch mit α-Ketoglutarat (10 mM), sowie ß-Hydroxybutyrat (10 mM als Substrate werden die gleichen Effekte bei gleichen Konzentrationen (NTU usw.) wie mit Glutamat, Malat als Substrat auf die gekoppelte Atmung erzielt.

Für den Phosphat-Transport gilt dasselbe wie für n-Nonyl-Thioharnstoff.

Skatol (3-Methyl-Indol), das als nucleophiles Reagens für eine Sulfensäure-Abfangreaktion fungieren könnte, hat keinen Einfluß auf die Phosphorylierung - es fehlt hier die lipophile Seitenkette.

Tab.3: Wirkung der 6-n-Alkyl-2-Thiouracile

Kopplungs-stelle (Substrat)	Verbindungen	nMol / mg Prot.	% Inhib. St. 4→St. 3 bezogen auf meßb.Atm. (DNP,CCCP)	% Inhib. Entkoppl.	% Stimmul. St. 4
I (Glutamat, Malat)	Thiouracil	330	-	-	-
	n-Mehylthiou.	330	-	-	-
	n-Pentylthiou.	330	-	-	-
	n-Heptylthiou.	330	100	100	40
	n-Nonylthiou.	230	100	100	40
	"	30 *	100	100	-
	(NTU)	25 **	100	100	-
	n-Nonyluracil	900	100	100	50
	"	30 *	30	20	-
	"	25 **	30	20	-
	Äthanol	+ **	-	-	-
	Skatol	280	-	-	-
	Na_3PSO_3	280	100	-	-
	$Na_2PSO_3C_9H_{19}$	280	-	-	-
	Phalloidin	1200	-	-	-
	DCCD	60	100	-	-
	"	15	100	-	-
	Cyclohexyl-isocyanat	60	-	-	-
	DMF	+	-	-	-
II (Succinat)	Thiouracil	240	-	-	-
	n-Pentylthiou.	240	-	-	-
	n-Heptylthiou.	240	100	100	60
	n-Nonylthiou.	210	100	100	70
	" n.Olig.	210	100	100	-
	n-Nonyluracil	800	100	100	80
	Äthanol	+	-	-	-
	Na_3PSO_3	280	100	-	-
	DCCD	50	100	-	-
III (Ascorbat, TMPD)	n-Nonylthio-uracil	145	-	(Dicoumarol) 40 % St 3 Stimmul.	100

Zur Tabelle 3:

Kopplungsstelle II - Skatol, $Na_2PSO_3C_9H_{19}$, Phalloidin, Cyclohexylisocyanat und DMF bei gleichen Konzentrationen wie bei Kopplungsstelle I ohne Wirkung.

^{x} = 10 Minuten Inkubation, ^{xx} = über Nacht Inkubation.

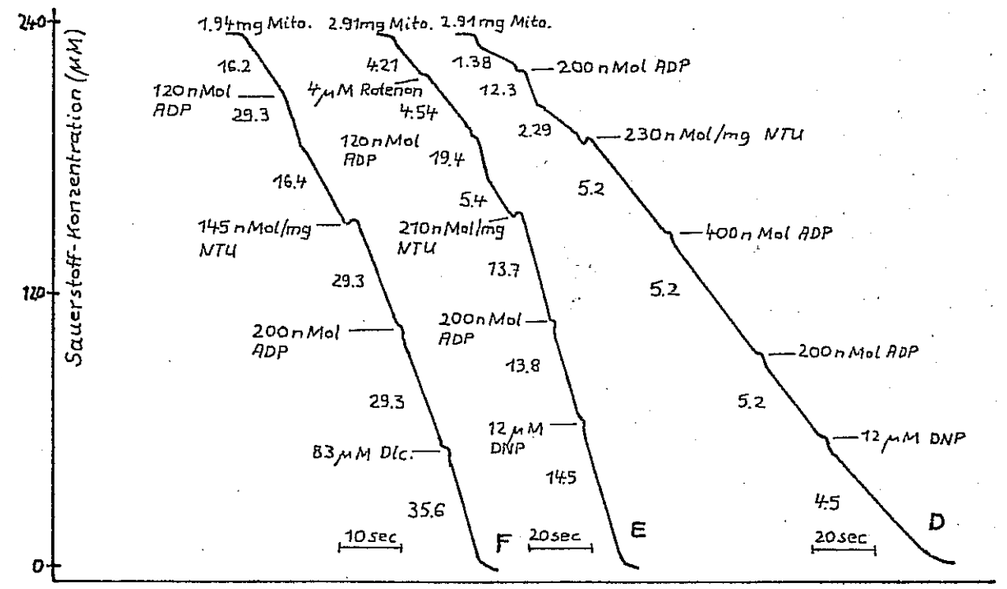


Fig.11: Effekt von NTU auf die gekoppelte Atmung von Rinderherz-Mitochondrien.
Die Zahlen an den Kurven geben die Atmungsgeschwindigkeit in µMol O_2 mg^{-1} Protein hr^{-1} bei 25°C an.
Für die Experimente D, E,F gilt dasselbe wie für A,B und C der Figur 10.

Phalloidin, ein Knollenblätterpilzgift (von Prof.Th.Wieland zur Verfügung gestellt), welches die ATP-Bildung bei Muskelaktin beeinflußt, hat ebenfalls keinen Effekt auf die gekoppelte Atmung von Rinderherz- Mitochondrien.

Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) wurde zum Vergleich mitgemessen, um einen Eindruck von der Wirksamkeit der Sulfensäure-

Reagentien zu vermitteln.

Der Einfluß von Nonylthiophosphat (Syntheseprodukt aus Labor Dr.Bäuerlein), sowie Thiophosphat wird mit späteren Messungen diskutiert, ist aber auch hier im Zusammenhang mit den anderen Messungen von Interesse.

2.Wirkung des Thiolreagenses Maleinimid [51]

Die Wirkung der N^4-(N^1-Alkyl-sulfamoylphenyl)-maleinimide,sowie ihrer Ausgangsverbindungen ist im Vergleich zu verschiedenen anderen Maleinimiden, sowie zu der N^4-(N^1-Nonyl-sulfamoylphenyl)-succinimid-Verbindung und Nonylamin, Acetnonylamin, in Tabelle 4 aufgezeigt. Auch hier wurden die Lösungsmittel mit der maximal benutzten Menge als Blindwert - mitgemessen.

Zum besseren Verständnis der Tabelle 4 - Figur 12:

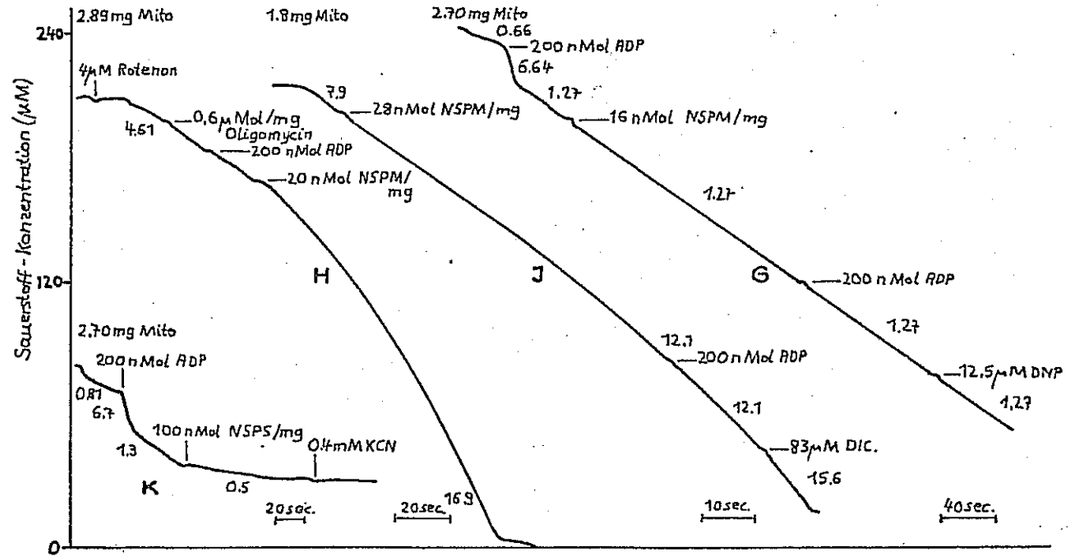
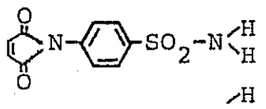
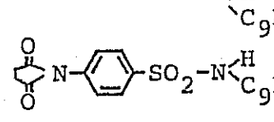


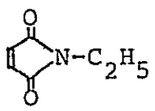
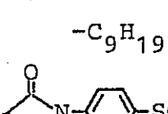
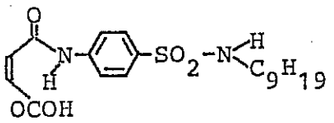
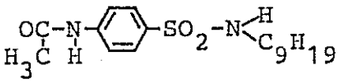
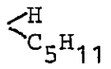
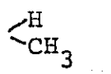
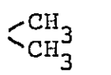
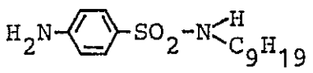
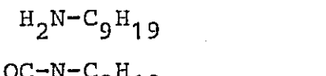
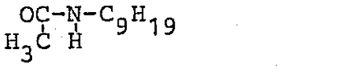
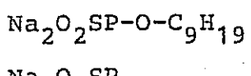
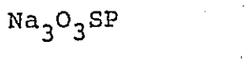
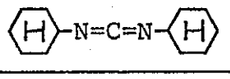
Fig.12: Effekt von NSPM und NSPS auf die gekoppelte Atmung von Rinderherz- Mitochondrien.
Die Zahlen an den Kurven geben die Atmungsgeschwindigkeit in µMol O_2 mg^{-1} Protein hr^{-1} bei 25°C an.
Für die Experimente G und K, sowie H, J gilt dasselbe wie für A, sowie B und C der Figur 10.
Die Atmungshemmung wurde auf maximale Atmungshemmung mit 0,6 mM KCN bezogen.

Jede Messung wurde mit einer Atmungskontrolle (ADP indiziert) begonnen.

Tab.4: Wirkung n-substituierter Maleinimide auf Kopplungsstelle I mit Glutamat, Malat als Substrat

Verbindungen Formel	Abkürzung	nMol / mg Prot	% Inhib St 4→St 3 bezogen auf meßb.Atm (DNP,CCCP)	% Inhib Entkoppl bezogen auf meßb.Atm (DNP,CCCP)	% Stimmul St 4	nMol / mg Prot	% Atmungs-hemmung
		60	-	-	-	60	-
$-NH-CH_3$	MSPM	60	-	-	-	60	-
$-NH-CH(CH_3)_2$		60	-	-	-	60	-
$-NH-COCH_3$	ASPM	60	-	-	-	110 nach ADP-Zugabe	100
$-NH-CH(CH_3)-COCH_3$		60	-	-	-	60	-
$-NH-C_3H_7(n)$		60	-	-	-	60	-
$-NH-C_3H_7(n)$		60	-	-	-	60	-
$-NH-C_5H_9$		60	-	-	-	60	-
$-NH-C_7H_{15}$		30	100	100	-	30	-
$-NH-C_9H_{19}$	NSPM	12-16 7- 8*	100 100	100 100	- -	90-110	100
	NSPS	70	50	50	-	120	100

* = 5 Minuten Inkubation

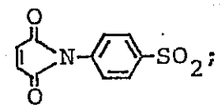
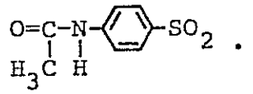
	NEM	130	90	90	–	300	100
	NNM	60	100	100	30	250	100
	offenes NSPM	130	100	100	–	300	100
	ANSA	30	100	100	–	30 75-90	40 100
		140	50	50	–	140	–
		300	–	–	–	300	–
		300	–	–	–	300	–
	NSA	75	100	100	–	400	30
		180	–	–	–	180	–
		180	–	–	–	180	–
		280	–	–	–	280	–
		280	100	–	–	280	–
	DCCD	60 15	100 100	– –	–	60 15	– –

Fortsetzung der Tab.4

Kopplungs-stelle (Substrat)	Verbindungen	nMol / mg Prot	% Inhib St 4→St 3 bezogen auf meßb.Atm (DNP,CCCP)	% Inhib Entkoppl	% Stimmul St 4
II (Succinat)	$R\text{-}NH_2$	110	30	30	-
	$R\text{-}NHCH_3$	110	30	30	-
	$R\text{-}N(CH_3)_2$	110	30	30	-
	ASPM	110	100	100	20
	$R\text{-}NCH_3COCH_3$	110	30	30	-
	$R\text{-}NHC_3H_7$ (n)	110	30	30	-
	$R\text{-}NHC_3H_7$ (i)	110	30	30	-
	$R\text{-}NHC_5H_{11}$	70	100	100	-
	$R\text{-}NHC_7H_{15}$	60	100	100	20
	NSPM	20-26	100	100	90
	" n.Olig.	24	100	100	90
	NNM	120	(100)	(100)	100
	NEM	300	-	-	-
	NSPS	170	100	100	50
	offenes NSPM	110	100	100	20
	$R'\text{-}NHCH_3$	300	-	-	-
	$R'\text{-}N(CH_3)_2$	300	-	-	-
	$R'\text{-}NHC_5H_{11}$	300	-	-	-
	ANSA	130	100	100	50
	NSA	150	100	100	90
	$H_2N\text{-}C_9H_{19}$	300	-	-	-
	$CH_3CONH\text{-}C_9H_{19}$	180	-	-	-
	$Na_2O_2SPO\text{-}C_9H_{19}$	280	-	-	-
	Na_3O_3SP	280	100	-	-
	DCCD	50	100	-	-
				(Dicoumarol)	
III (Ascorbat, TMPD)	NSPM	28	(100)	40 % St 3 Stimmul	100
	NNM	120	100		60
	NEM	280	-	-	-
	NSPS	280	(100)	40 % St 3 Stimmul	100
	ANSA	280	100		-

Keine Atmungshemmung auch bei höheren Konzentrationen

Zur Tabelle 4:

Kopplungsstelle II - R =  ; R' =  .

Für die Löslichkeit der Verbindungen gilt ähnliches wie für die der Thioharnstoffe.

NSPM wurde auch mit α-Ketoglutarat (10 mM), sowie ß-Hydroxybutyrat (10 mM) als Substrat getestet. Es ergaben sich die gleichen Effekte wie für Glutamat, Malat als Substrat und dies bei denselben Konzentrationen von NSPM. Erläuterungen dazu in der Diskussion.

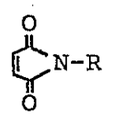
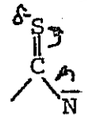
Der mögliche Einfluß von NSPM auf den Phosphat-Transport wird ebenfalls später erläutert.

Dicyclohexylcarbodiimid wurde zum Vergleich mitgemessen, um einen Eindruck von der Wirksamkeit des NSPM zu vermitteln.

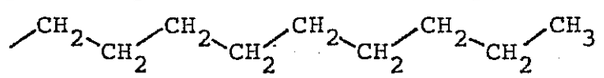
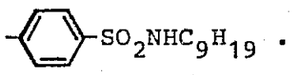
3.Diskussion der Ergebnisse

Man kann die Ergebnisse mit den gemessenen Verbindungen (Tab.2-4 mittels hauptsächlich zwei verschiedenen Effekten erklären:

I) Chemische Reaktion mit funktioneller Gruppe,

 Maleinimid-Doppelbindung,  Nucleophiler Schwefel.

II)Lipophile Wirkung aufgrund lipophiler Alkylkette sowie lipophiler Alkylkette plus aromatischem Ring,

  .

Bei der chemischen Reaktion handelt es sich um die beabsichtigte Abfangreaktion von Thiol- oder Sulfensäure-Gruppen (NSPM, NNM, sowie MTU,NMT). Bei der lipophilen Wirkung (Stimulierung von State 4 durch MTU, NMT bei Substratseite I-III; Atmungshemmung durch ANSA, NSPS bei Substratseite I) um eine unbeabsichtigte Nebenwirkung der die chemische Reaktion spezifisch in lipophile Bereiche der Mitochondrien lenkenden lipophilen Kraft.

Die sehr spezifische Reaktion des Thiol-Reagenses NSPM bei kleiner Konzentration (Inhibierung State 4→State 3, Inhibierung DNP-Entkopplung bei Seite I; sowie Entkopplung bei Seite II) ist dieser starken lipophilen Kraft von aromatischem Kern ([47] : Untersuchungen zur hydrophoben Bindung von Sulfanilamid an Bio-Gel sowie Sephadex) und lipophiler Kette - wie beabsichtigt - zuzuordnen (Vergleich mit MSPM und NNM).

Während NNM sehr schnell die Membran durchdringt und somit das für die oxydative Phosphorylierung verantwortliche Zentrum fast 'übergeht', besitzt das ebenfalls durchdringende Reagenz NSPM einen aromatischen Ring, welcher in das spezifische reaktive Zentrum zwischen ATP-Synthese und Atmungskette (zu sehen an der Wirkung von ANSA) lenkt.

Die Atmungshemmung (begleitet von State 4→State 3 Inhibierung, Inhibierung der DNP-Entkopplung) der Substratseite I durch ANSA beruht auf dem, die spezifische Reaktion von NSPM ermöglichenden lipophilen Teil, sowie der Acetyl-Amid-Gruppe der Verbindung (Vergleich mit NSA). Das eine Atmungshemmung bei kleinerer Konzentration als mit NSPM, NSPS erreicht wird, liegt daran, daß der sterisch hindernde Maleinimid- sowie Succinimid-Ring fehlt, wodurch eine Komplex-Bildung leichter möglich ist.

ANSA besetzt wahrscheinlich die Coenzym Q spezifische Region des NADH-Dehydrogenase-Komplexes (Komplex I), da mit Succinat als Substrat (Seite II) keine Atmungshemmung erzielt wird. Das diese Coenzym Q spezifische Region wahrscheinlich auch Kopplungsstelle I enthält, wird bei Betrachtung der Wirkung von NSA deutlich.

NSA besitzt aufgrund der fehlenden Acetyl-Gruppe eine andere Elektronendichte im aromatischen Kern und ist somit nicht in der Lage dieselbe Wirkung wie ANSA (NSPM, NSPS) in Bezug auf eine Atmungshemmung von Seite I zu erreichen.

Das mit NSPM bei kleinerer Konzentration der Glutamat-Transport nicht beeinflußt wird, wird deutlich dadurch, daß erst bei viel höherer Konzentration von NSPM eine Atmungshemmung erfolgt.

NSA, MNT, NTU haben erst bei höherer Konzentration die gleiche Wirkung wie NSPM (ANSA, NSPS) in Bezug auf die Inhibierung von State 4→State 3, sowie Inhibierung der DNP-Entkopplung. Zum Unterschied zu NSPM wird jedoch durch Oligomycin die Entkopplung

der Substratseite II verhindert.

Die Blockierung der DNP-(CCCP-)Entkopplung parallel zur Inhibierung von State 4→State 3 der Seite I, sowie die Entkoppler-Wirkung an Seite II, durch die Verbindungen, vor allem aber von NSPM, MNT, NTU, deutet auf die enge Verbindung von Komplex I (Kopplungsstelle I) sowie Komplex III (Kopplungsstelle II) mit Komplex V (DNP-Entkoppler-Bindungsseite). Der unterschiedliche Oligomycin-Einfluß auf die Wirkung dieser Verbindungen, zeigt deren verschiedene funktionelle Wirkung im gleichen Zentrum zwischen Komplex I, Komplex III und Komplex V.

Der Nicht-Einfluß auf die DNP-Entkopplung von DCCD (Na_3SPO_3) ist einer der Beweise für dessen Angriff nach der Entkoppler-Bindungsseite auf Komplex V, ein Beweis dafür ist auch dessen gleiche Wirkung auf alle Kopplungsseiten.

Die verschiedene Wirkung von NSPM, MTU, NMU, auf die 3 Kopplungsseiten ist einer der Beweise für deren Angriff zwischen Atmungskette und ATP-Synthese.

Die teilionischen Verbindungen ASPM und offenes NSPM können die Mitochondrien-Membran nicht durchdringen, wodurch ihre schwache Wirkung auf die Kopplungsseiten zu erklären ist.

Das Phosphat analoge, ionische Thiophosphat verhindert die ATP-Bildung nach dem Energie-Pool [66]. Durch den nucleophilen Schwefel wird der Phosphat-Überträger blockiert. Das lipophile, stark ionische Nonyl-Thiophosphat hat keine Wirkung auf die mitochondriale Energie-Übertragung. Wahrscheinlich verhindert hier die lipophile Kette in Verbindung mit der Ionenform (ASPM, off.NSPM) das Durchdringen der Mitochondrien-Membran.

Die bei höheren Konzentrationen wirksamen Sauerstoffanalogen der Sulfensäure-Abfangreagentien MNT, NTU,-N-Nonyl-Harnstoff und 6-n-Nonyl-Uracil-haben die gleiche Wirkung aufgrund der gegenüber dem Schwefel sehr viel kleineren nukleophilen Kraft ihres Sauerstoffes.

Durch Ultraschall-Behandlung wird die Innen-Seite der inneren Mitochondrien-Membran nach außen gedreht. Im Endeffekt sind NADH- sowie Succinat-Dehydrogenase von außen frei zugänglich. Die

erwartete Wirkung von ANSA und NSPM (MTU und NMT): Die Atmungshemmung mit NADH als Substrat tritt so stark in den Vordergrund, daß die reversible, energiegetriebene Elektronen-Übertragung nicht mehr zu messen ist [79]. Auch mit diesen Partikeln wird keine Succinat-Atmungshemmung erzielt, ähnlich wie an ganzen Mitochondrien was ein weiterer Beweis dafür ist, daß die Succinat-Dehydrogenase nicht Thiol-gebunden arbeitet.

An der isolierten ATPase (F_1) war, wie von anderen Gruppen für Thiol-Reagentien schon berichtet (zuletzt von Griffiths [37]), mit NSPM, NNM keine Wirkung zu erreichen. Wegen der ähnlichen Wirkung der Sulfensäure-Reagentien MNT, NTU an Mitochondrien, war auch keine Wirkung dieser Reagentien zu erwarten - dies bestätigte sich [8].

B. Synthese der radioaktiv markierten Abfangreagentien

Nachdem ich jetzt durch die Messungen mit der Sauerstoffelektrode ein recht detailliertes Bild der Wirkungen meiner synthetisierten Sulfensäure- sowie Thiolreagentien auf die oxydative Phosphorylierung erhalten hatte, konnte ich den nächsten Schritt meiner Arbeit ausführen - die radioaktive Markierung der wirksamsten Verbindungen.

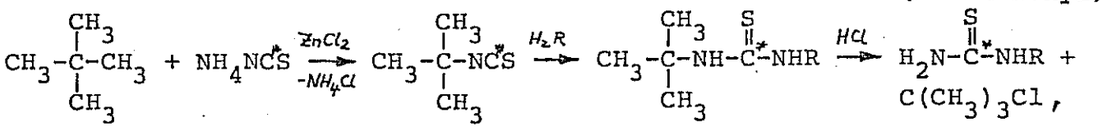
Es sollten damit in der oxydativen Phosphorylierung eventuell wirkende Sulfensäure- wie Thiolgruppen - in Analogie zu den Modellreaktionen von Bäuerlein [6] angenommen - abgefangen und diese funktionellen Gruppen tragenden Verbindungen isoliert und wenn möglich identifiziert werden.

1. ^{35}S-NTU: 6-n-Nonyl-2-[^{35}S-]Thiouracil

Die am besten reagierenden Sulfensäurereagentien waren der n-Nonyl-Thioharnstoff (MNT) und das 6-n-Nonyl-2-Thiouracil (NTU).

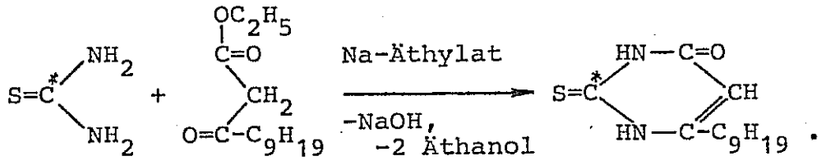
Die radioaktive Markierung von n-Nonyl-Thioharnstoff (MNT) mit ^{14}C oder ^{35}S wäre wohl sehr gut möglich,

(R = n-Nonyl)



aber das Ausgangsmaterial ($NH_4N\overset{*}{C}S$ oder $C(CH_3)_3N\overset{*}{C}S$) ist zu teuer und eine Synthese aus $KN\overset{*}{C}S$, welches billig zu kaufen ist, wäre zu aufwendig und die Ausbeute an Endprodukt dann entsprechend nieder.

Sehr gut realisieren läßt sich dagegen die Synthese von ^{14}C- oder ^{35}S-markiertem 6-n-Nonyl-2-Thiouracil,



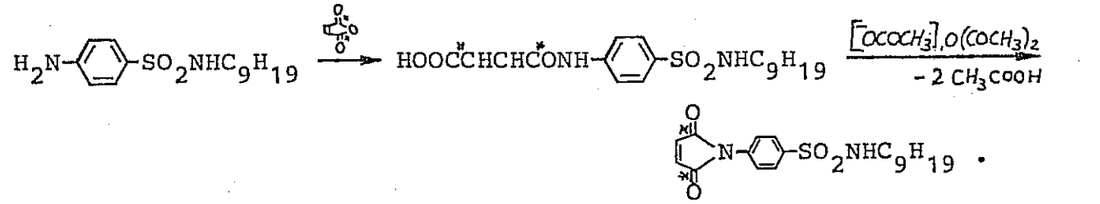
Der als Ausgangsmaterial dienende Thioharnstoff ist als ^{35}S- wie ^{14}C-markierte Verbindung nicht zu teuer. Die Reaktion kann in einer Stufe durchgeführt werden. Die Ausbeute liegt bei 90 %.

Ich entschloß mich daher, das Thiouracil-Derivat zu synthetisieren (Experiment.Teil) und verzichtete auf die Markierung des Thioharnstoffes, was wohl in Anbetracht der in etwa gleichen Wirkung auf die Mitochondrien gut zu vertreten ist.

2.1,4-^{14}C-NSPM: N^4-(N^1-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-[1,4-^{14}C-] maleinimid

Das am besten reagierende Thiolreagenz war NSPM.

Die ^{14}C-Isotopen-Markierung von NSPM kann in 2 Stufen mit 1,4-^{14}C-Maleinsäureanhydrid, welches preiswert zu kaufen ist, mit hoher Ausbeute (über 90 %) schnell durchgeführt werden,



Diese Art der Markierung hat den Vorteil, daß die Radioaktivität

nach der Reaktion mit Thiol-Gruppen - auf jeden Fall an der Thiol-Verbindung hängen bleibt.

Die Synthese analog der von Merz et al [61] für ^{35}S-ASPM, mit trägerfreiem ^{35}S-Sulfat, erarbeiteten Vorschrift, wurde deshalb nicht benutzt.

Ich markierte also NSPM durch Einsatz von 1,4-^{14}C-Maleinsäure-anhydrid (Experiment.Teil).

3. ^{14}C-DCCD: Dicyclohexyl-[^{14}C-]carbodiimid

Da Dicyclohexylcarbodiimid ebenfalls als Thiolreagenz wirken könnte, habe ich dieses nach den von Stekhoven [82], sowie Altendorf [2] beschriebenen Methoden ^{14}C-Isotopen-markiert (Experiment.Teil). Ich konnte hiermit eine eventuelle Aussage über die Bindung an eine Thiol-Gruppe erhalten, den bisher fehlt bei allen durchgeführten Untersuchungen mit DCCD ein Hinweis auf den Bindungsort dieses Reagenses.

Nachdem ich die Synthese der Isotopen-markierten Verbindungen beendet hatte, ging ich zur Reaktion der Mitochondrien mit diesen radioaktiven Reagentien über. Die so radioaktiv markierten Mitochondrien wurden zunächst der SDS-Gelelektrophorese unterworfen um festzustellen, ob eventuell radioaktiv markierte Proteine vorhanden sind und falls vorhanden - welches Molekulargewicht sie besitzen.

C. SDS-Gelelektrophorese markierter Mitochondrien

1. durch ^{35}S- bzw. ^{14}C-NTU markiert

Die von Beechey [16] benutzte Methode, zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese seiner $CHCl_3$/MeOH-Extrakte von DCCD behandelten Mitochondrien, mußte für meine Sulfensäurereagentien behandelten Mitochondrien abgewandelt werden. Da ich hier als Produkt meiner Behandlung ein gemischtes Disulfid aus dem 6-n-Nonyl-2-Thiouracil mit einer mitochondrialen Sulfensäure-Gruppe erwartete, durfte zur Elektrophorese kein Disulfid-spaltendes-Reagenz wie DTT benutzt werden. Außerdem ist das gemischte Disulfid bei höheren pH-Werten

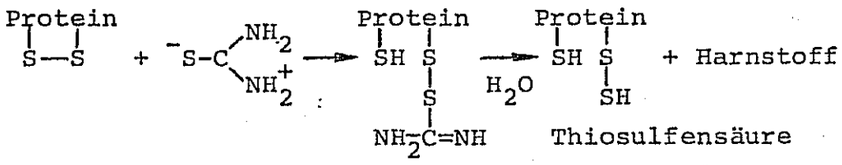
und Temperaturen nicht stabil, weshalb ich mich dazu entschloß, zu einem Elektrophorese-pH-Wert von 5 mittels Acetat-Puffer überzugehen. Auch unter diesen Bedingungen ist die Beweglichkeit der Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht.

Cunningham [29] konnte z.B. bei einem pH-Wert von 6,1 und einer Temperatur von 5°C das gemischte Disulfid von ß-Lactoglobulin-sulfenyljodid mit 2-^{14}C -Thiouracil mit einer Sephadex G-25-Säule aus dem Reaktionsgemisch isolieren.

Zunächst benutzte ich als Abfangreagenz ^{14}C-NTU, welches ich in einer Konzentration von etwa 20 nMol/mg Protein - was einer Inhibierung von ca. 95 % von State 4-State 3, sowie Inhibierung der Entkopplung entspricht - mit der Mitochondrien-Suspension reagieren ließ.

Bei jeder benutzten Methode - sowohl mit 10 % Gelen (Methode b, ohne DTT - Exp.Teil) als auch mit 15 % Gelen (Methode C, Ohne DTT - Exp.Teil) war nur ein Peak zu sehen. Ein Vergleich mit ^{14}C-NTU ohne Mitochondrien zeigte, daß dieses fast die gleiche Mobilität besaß. Da sich die Radioaktivität aus der Mitochondrien-Suspension leicht mit Äthanol - dem Lösungsmittel von ^{14}C-NTU - auswaschen ließ, nahm ich zunächst an, daß unter den angewandten Bedingungen ein eventuell entstandenes Reaktionsprodukt wieder gespalten sei.

Hier half mir nun eine Arbeit von Maloof [59] weiter. Sie fanden, daß Thioharnstoff nach Reaktion mit einem Protein-Disulfid (unter oxydierenden Bedingungen) einer Desulfurierung zum Harnstoff unterliegt, als zweites Produkt fanden sie Thiosulfensäure:



Aufgrund dieser Arbeit synthetisierte ich ^{35}S-NTU und führte die Elektrophorese mit ^{35}S-NTU radioaktiv gemachten Mitochondrien durch es gab dieselben Ergebnisse wie mit ^{14}C-NTU (Fig.13). Da ich zumindest einen Teil der Radioaktivität in einem Protein (oder einer anderen Verbindung als Reaktionspartner des NTU) erwartete (nach Reaktion zum gemischten Disulfid, sowie anschließender Hydrolyse - durch Schwefelaustausch in der Thiosulfensäure), ging ich dazu über die Äthanol-Lösung mit den radioaktiven Produkten näher zu untersuch

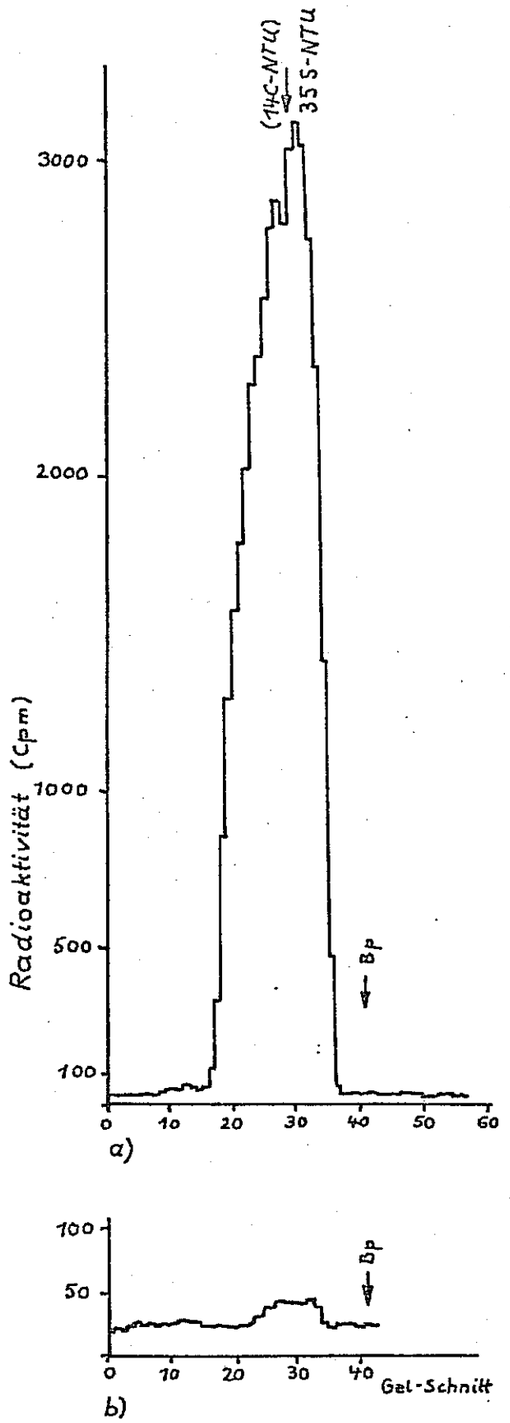


Fig.13: a) Radioaktivitätsverteilung in SDS-Polyacrylamid-Gels nach Elektrophorese von ^{35}S-NTU inkubierten Mitochondrien (22 nMol pro mg Protein).
b) Restaktivität nach Äthanol-Behandlung von a).

Elektrophorese-Bedingungen:
Methode c) Experiment. Teil, d.h.
pH 5; 10 Min.- 4 mA/Gel,
10 Min.- 6 mA/Gel, 1 1/2 Std.-
8 mA/Gel;
ohne DTT;
Auftrag: 160 µg Protein.

Bevor ich jedoch zu den Ergebnissen dieser weiteren Untersuchung übergehe, zunächst die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Untersuchungen mit ^{14}C-NSPM und ^{14}C-DCCD.

2.durch 1,4-^{14}C-NSPM markiert

Da meine Variation (Methode b, Exp.Teil) der Beechey-Gelelektrophorese-Methode (Methode a, Exp.Teil) bessere Trenneigenschaften für mitochondriale Proteine zeigte, benutzte ich das Verfahren allgemein um die weiteren Untersuchungen durchzuführen.

a.Molekulare Organisation der Mitochondrien-Proteine. Zunächst wollte ich sehen, wie sich die Organisation der Mitochondrien-Protei nach Disulfid-Spaltung durch DTT-Zusatz verändert. Dazu inkubierte ich die Mitochondrien-Suspension mit 124 nMol ^{14}C-NSPM/mg Protein (je nach Untersuchungsmethode wird von einem Gesamtthiol-Gehalt von 70 bis 100 nMol/mg Protein berichtet). Diese radioaktiv markierten Mitochondrien unterwarf ich - einmal ohne, einmal mit DTT - der Gel-Elektrophorese (Fig.14). Zum Vergleich ließ ich nicht markierte Mitochondrien mitlaufen, fixierte deren Proteinverteilung und machte sie mit Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar (Fig.15).

Das wesentliche Ergebnis dieses Versuches ist die Veränderung der 33000, 29000 MG-Peaks durch DTT: Der 33000 MG-Peak (Hansteins Entkoppler-bindendes-Protein [41]) wird nur wenig kleiner, während der 29000 Peak (Klingenbergs ATP/ADP-Carrier [54]) in einen 27000 MG-Peak umgewandelt wird.

Die Verteilung der MG-Peaks unterhalb 10000 wird verändert und die Zahl an radioaktiven Verbindungen in diesem Gebiet steigt durch DTT (Fig.14).

Aufgrund der Gesamt-Veränderungen durch DTT kann gesagt werden, daß Thiol-Gruppen und Disulfid-Brücken eine wesentliche Rolle in der strukturellen Organisation der Mitochondrien spielen (dazu [5]).

Zu bemerken ist, daß gerade die Proteine sehr stark durch ^{14}C-NS markiert werden, welche eine wesentliche Rolle in der oxydativen Phosphorylierung spielen, dazu soll im folgenden mehr gesagt werden.

Eine zweite wichtige Aussage bildet die Tatsache, daß das Gebiet unterhalb MG 10000 sehr stark markiert wird, während in den

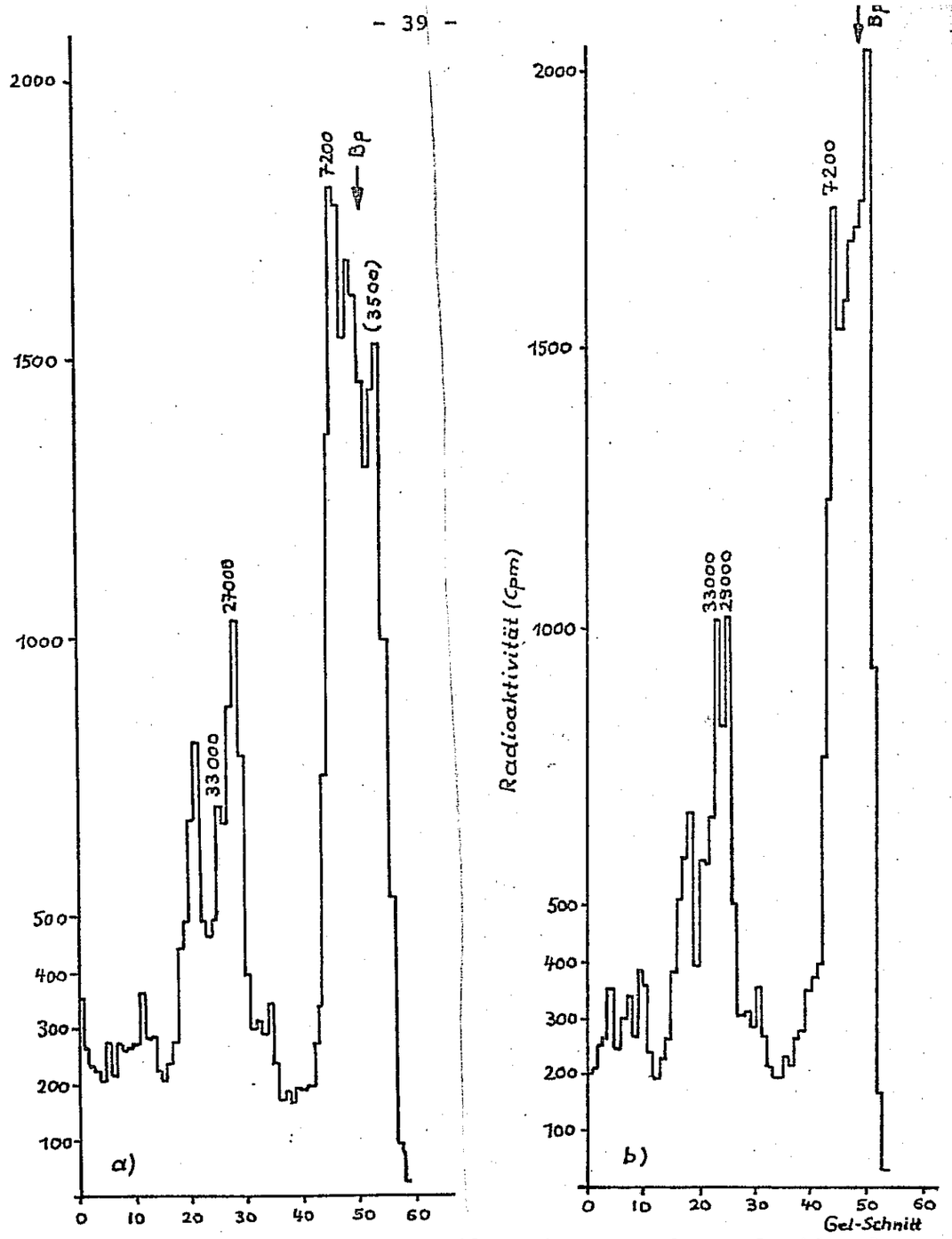


Fig.14: a) Radioaktivitätsverteilung in SDS-Polyacrylamid-Gels nach Elektrophorese von ^{14}C-NSPM inkubierten Mitochondrien (124 nMol pro mg Protein).

Elektrophorese-Bedingungen: Methode b) Experiment.Teil, d.h. pH 5; 6 mA/Gel; mit DTT; Auftrag: 175 µg Protein.

b) analog a) aber ohne DTT.

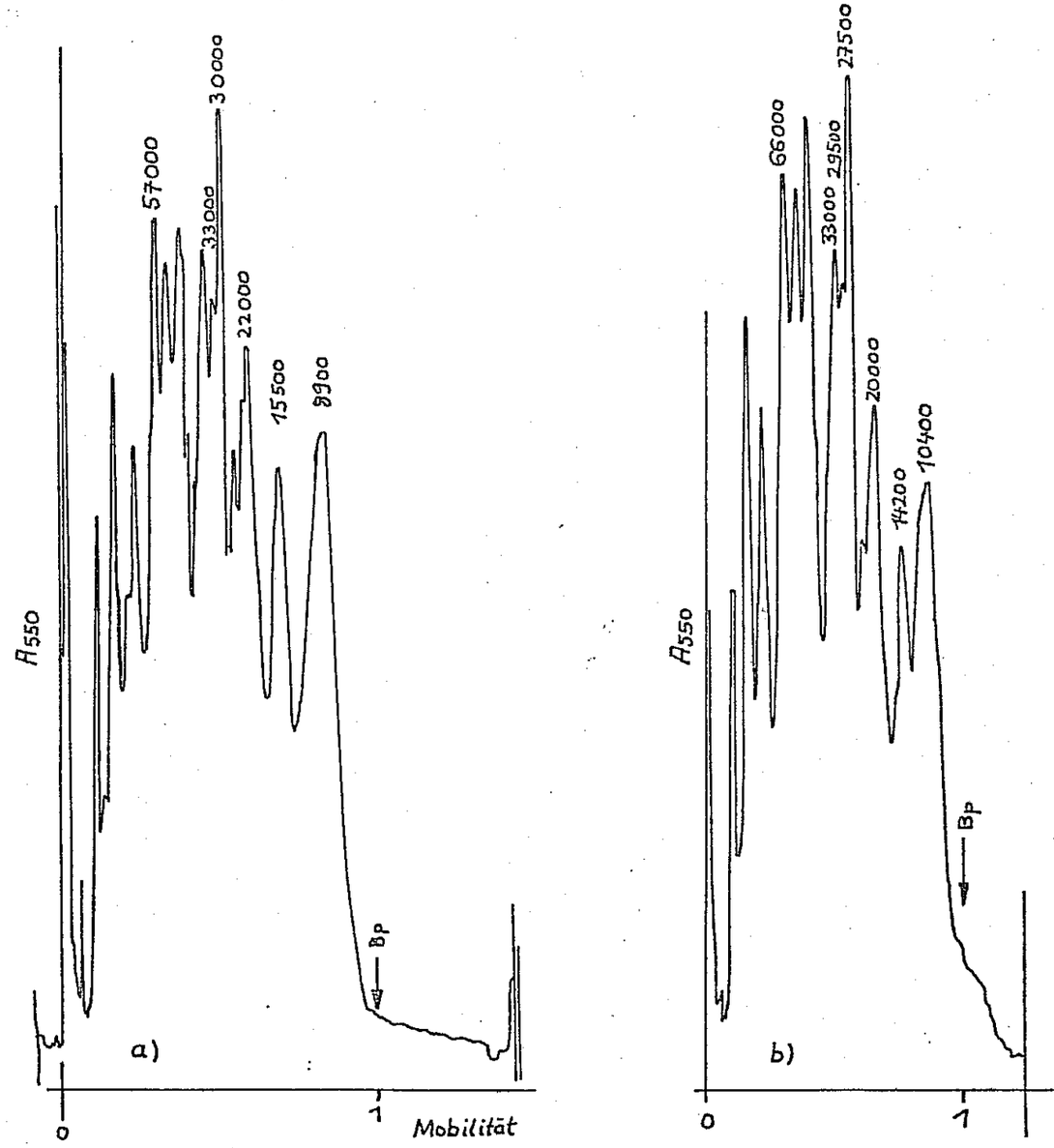


Fig.15: a) Densitometerkurve der fixierten und mit Coomassie-Brillian Blau sichtbar gemachten Proteine der Mitochondrien-Suspension.

Elektrophorese-Bedingungen: Methode b) Experiment.Teil, d.h. pH 5; 6 mA/Gel; mit DTT; Auftrag: 175 µg Protein.

b) analog a) aber ohne DTT.

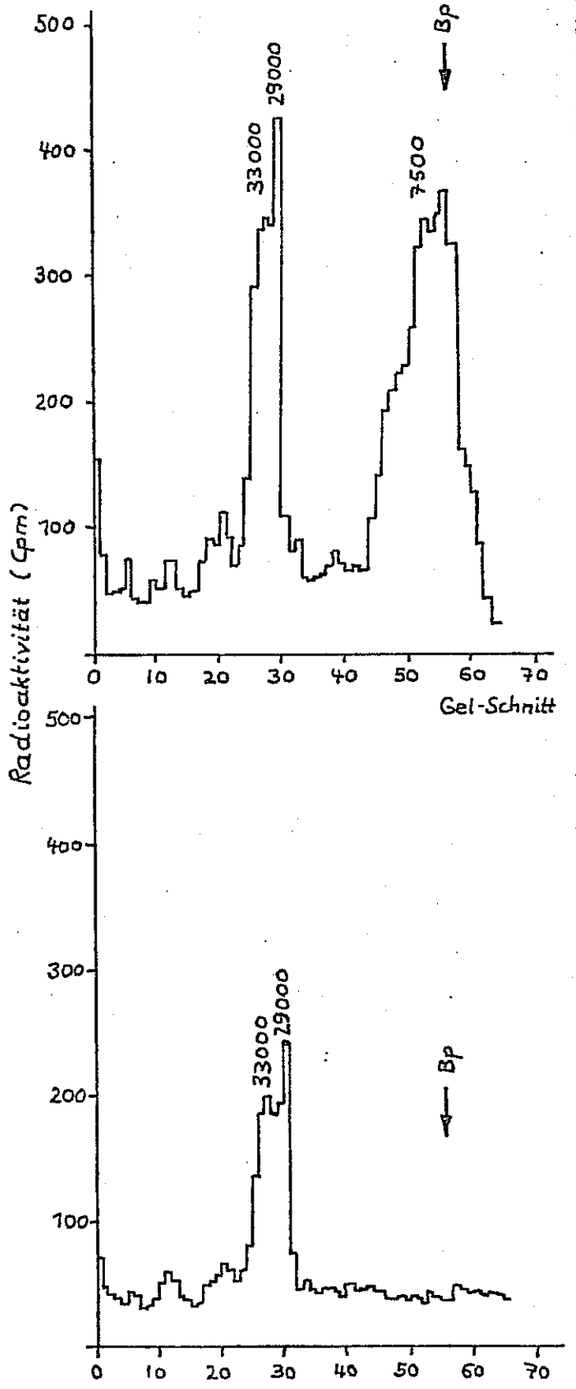


Fig.16: a) Radioaktivitäts-verteilung in SDS-Polyacryl-amid-Gels nach Elektrophorese von ^{14}C-NSPM inkubierten Mitochondrien (14,14 nMol/mg Protein).

Elektrophorese-Bedingungen: Methode b) Experiment.Teil, d.h. pH 5; 6 mA/Gel; ohne DTT; Auftrag: 160 µg Protein.

b) analog a) aber weitere Behandlung: fixiert und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt.

angefährbten Gel-Protein-Verteilungen unterhalb MG 10000 kaum ein Protein zu sehen ist (ähnliches auch bei Hatefi [43]). Dies läßt vermuten, daß Proteine mit kleinerem MG als 10000 fast vollständig durch die tagelange Anfärbeprocedur aus dem Gel ausgewaschen werden. Dazu machte ich einen weiteren Versuch und zwar trennte ich markiert Mitochondrien-Proteine mit Methode b (Exp.Teil) und verglich die Radioaktivitätsverteilung im Gel direkt nach dem Lauf mit der nach fixieren und anfärben erhaltenen (Fig.16): Ungefähr 40 % Radioaktivität der 30000 Peaks, sowie die ganze Radioaktivität unterhalb MG 10000 ist durch die Anfärberei verlorengegangen. Das es sich zum größtenteil um Protein-gebundene Radioaktivität handelt, wird in der Isolierung des Hauptradioaktivitätspeaks MG 7500 von 7 nMol ^{14}C-NSPM mg Protein (notwendig für 95 % Inhibierung von State 4→State 3 und Inhibierung von DNP-Entkopplung) inkubierten Mitochondrien gezeigt.

Die Tatsache, daß sich die kleineren Proteine aus dem Gel auswaschen lassen, kann eventuell zu deren Isolierung dienen.

b.Identifizierung der ^{14}C-NSPM-bindenden Proteine in ox.Phos.

Um die State 4→State 3 vermittelnden, sowie DNP entkoppelnden Protei feststellen zu können, markierte ich die Mitochondrien mit unterschiedlichen Mengen an ^{14}C-NSPM: 70,7 - 14,14 - 9,43 - 4,7 - 1,9 und 6,9 nMol/mg Protein (95 % Inhibierung von State 4→State 3, Inhibierung von DNP-Entkopplung) und verglich die so erhaltenen Radioaktivitätsverteilungen (Fig.17 und 18).

Mit 70 nMol/mg Protein lassen sich alle Mitochondrien Proteine mehr oder weniger stark markieren (einfärbbare Proteine).

Mit 9,4 nMol/mg Protein lassen sich Hansteins Entkoppler-bindendes-Protein, Klingenbergs ADP/ATP-Carrier, ein 7500 MG-Protein und kleinere Verbindungen markieren, während mit 6,9 nMol/mg Protein Klingenbergs ADP/ATP-Carrier nicht mehr angegriffen wird.

Mit 4,9 nMol/mg Protein werden das Entkoppler-bindende-Protein und das 7500 MG-Protein im Verhältnis von 1:3,4 angegriffen (bei 6,9 nMol/mg Protein im Verhältnis von 1:2,3), bei noch kleineren Konzentrationen verschiebt sich das Verhältnis weiter auf die Seite des 7500 MG-Proteins. 4,9 nMol/mg Protein entspricht 50 % Inhibierur von State 4→State 3, aber nur ca. 30 % Inhibierung der DNP-Entkopplung. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß nur die Reaktion des

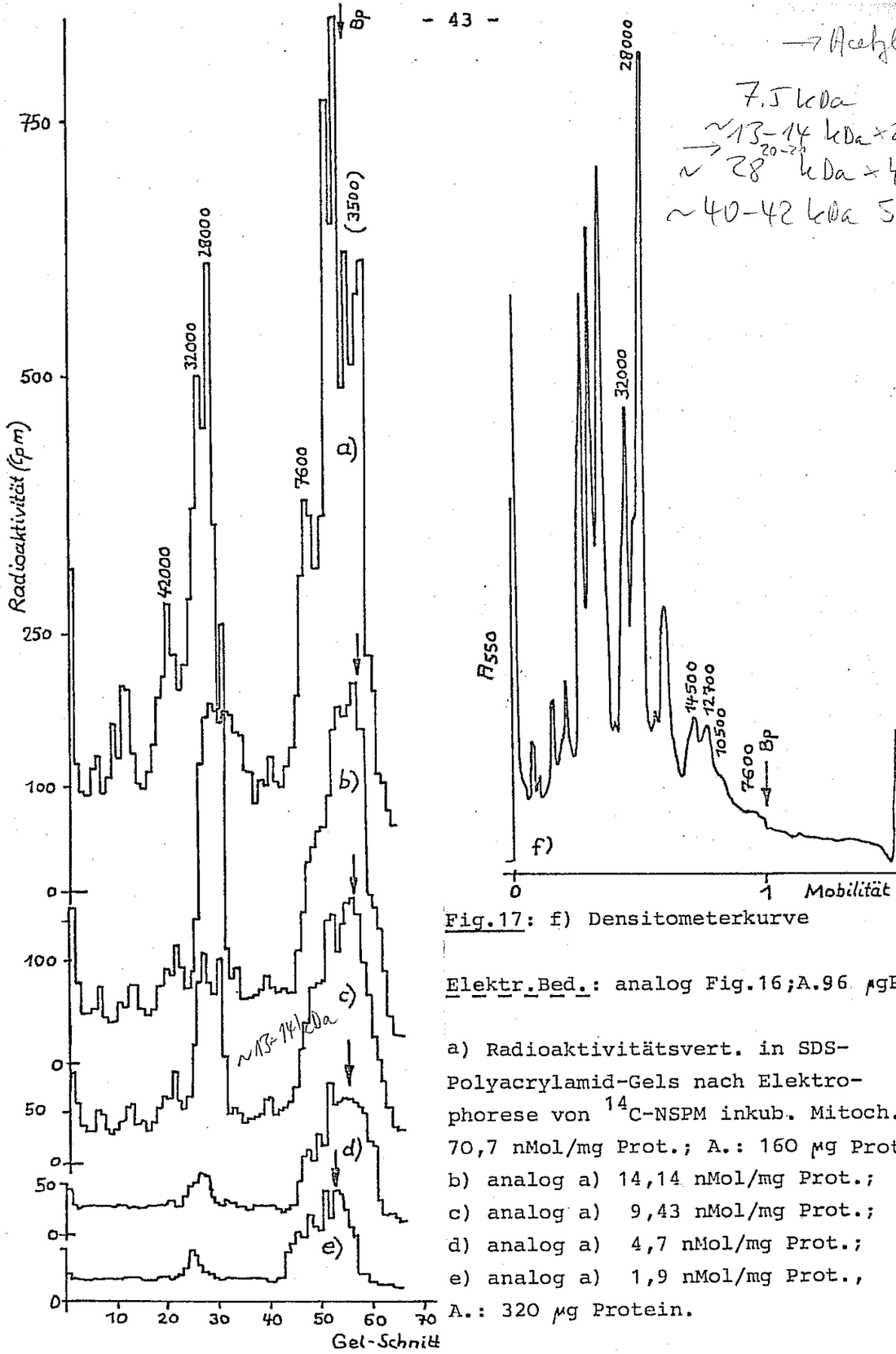
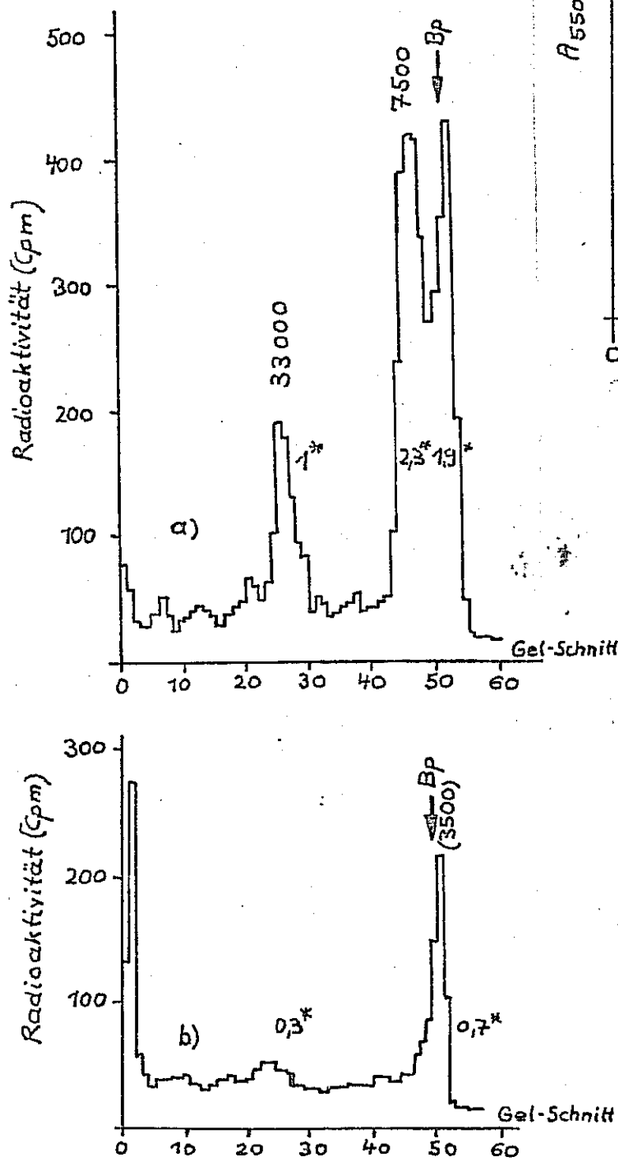


Fig.17: f) Densitometerkurve

Elektr.Bed.: analog Fig.16;A.96 µg

a) Radioaktivitätsvert. in SDS-Polyacrylamid-Gels nach Elektrophorese von ^{14}C-NSPM inkub. Mitoch. 70,7 nMol/mg Prot.; A.: 160 µg Prot
b) analog a) 14,14 nMol/mg Prot.;
c) analog a) 9,43 nMol/mg Prot.;
d) analog a) 4,7 nMol/mg Prot.;
e) analog a) 1,9 nMol/mg Prot.,
A.: 320 µg Protein.



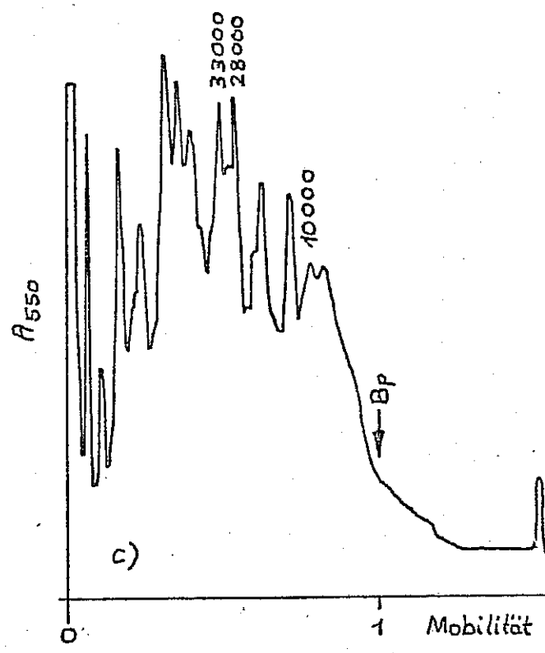
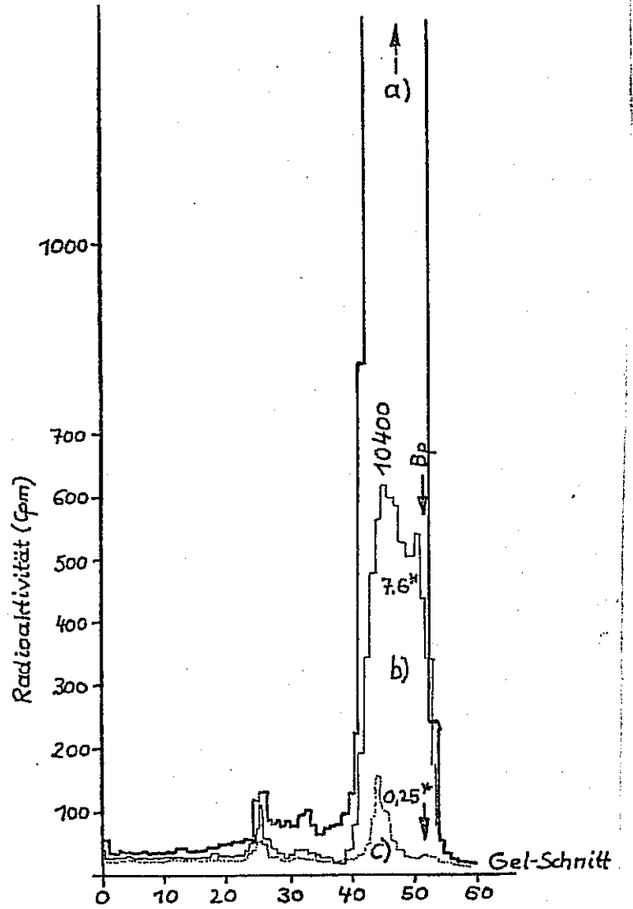


Fig.18: c) Densitometerkurve

Elektrophorese-Bedingungen: analog Fig.16; Auftrag: 200 µg

a) Radioaktivitätsverteilung in SDS-Polyacrylamid-Gels nach Elektrophorese von ^{14}C-NSPM inkub. Mitochondr., 6,9 nMol/mg Protein;
*Die Zahlen an den Peaks bedeuten nMol/mg Protein.

b) Restaktivität nach Äthanol-Behandlung von a).



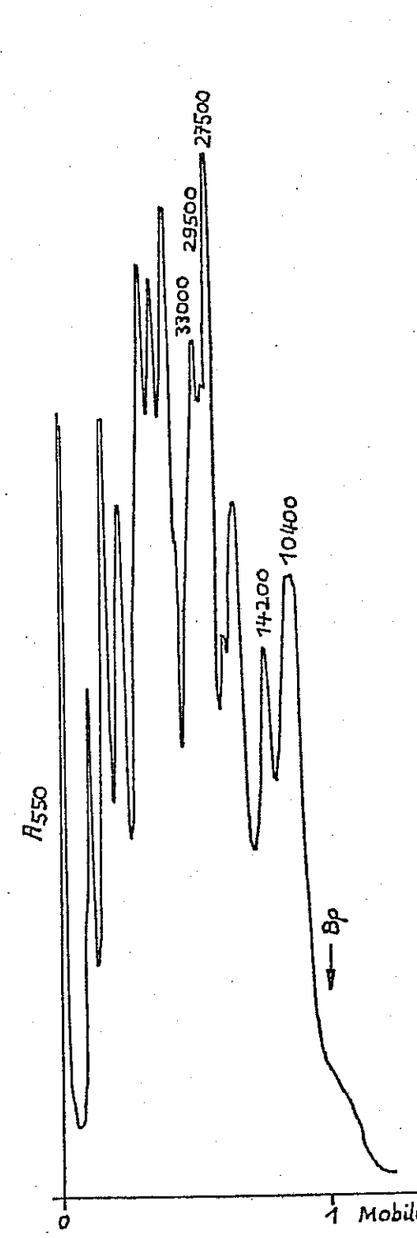


Fig.19: a) Radioaktivitätsverteilung in SDS-Polyacrylamid-Gels nach Elektrophorese von ^{14}C-DCCD inkubierten Mitochondrien, 116 nMol/mg Protein.

Elektrophorese-Bedingungen: Methode b) Experiment.Teil, d.h. pH 5; 6 mA/Gel; ohne DTT; Auftrag: 175 µg Protein.

b) 7,71 nMol/mg Protein.
c) Restaktivität nach Äthanol-Behandlung von b).

d) Densitometerkurve

7500 MG-Proteines mit NSPM für den Inhibierungseffekt auf State 4 → State 3 verantwortlich ist (Die Werte beziehen sich auf Koppl.st.I).

Die Radioaktivität der mit 6,9 nMol/mg Protein ^{14}C-NSPM inkubierten Mitochondrien läßt sich bis zu 82 % aus der incubierten Mitochondrien-Suspension auswaschen. Diesen Äthanol-Extrakt untersuchte ich anschließend weiter.

3.durch ^{14}C-DCCD markiert

15 nMol DCCD/mg Protein inhibieren State 4→State 3, wenn die Mitochondrien-Suspension 10 Minuten dieser Menge an DCCD ausgesetzt wird [9]. Dieser Wert ist mit meinen Ergebnissen mit MNT, NTU und vor allem NSPM gut zu vergleichen. Da DCCD sehr rasch zum Dicyclohexylharnstoff hydratisiert wird, kann man annehmen, daß nur ein Teil dieser Menge (möglicherweise weniger als die Hälfte) unverändert zum aktiven Zentrum gelangt.

Ich führte die Inkubation mit 7,7 nMol/mg Protein - analog der ^{14}C-NSPM-Incubation - durch (etwa 80 % Inhibierung von State 4 → State 3).

Der Hauptpeak im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Elektrophorese erscheint bei MG 10400 (Fig.19).

Da mit ^{14}C-DCCD eine gänzlich andere Radioaktivitätsverteilung im SDS-Polyacrylamid-Gel als mit ^{14}C-NSPM erzielt wird, ist mit Sicherheit eine Reaktion als Thiolreagenz auszuschließen (Fig.19 a)

Die Radioaktivität ist fast vollständig mit Äthanol (97-98 %) aus der ^{14}C-DCCD markierten Mitochondrien-Suspension auszuwaschen. Den Äthanol-Extrakt untersuchte ich anschließend - parallel zu den ^{35}S-NTU- und ^{14}C-NSPM-Äthanol-Extrakten - weiter.

D. Isolierung der radioaktiv markierten Verbindungen

Die radioaktiv markierten Proteine der Äthanol-Extrakte mußten vor allem aus einer Mischung von Proteinen mit Phospholipiden isoliert werden.

Für die Phospholipid-Abtrennung von Proteolipiden (Protein-Lipid-Komplex = löslich in organischem Lösungsmittel aber unlöslich in Wasser) gab es bisher keine zufriedenstellende Trennmethode. Beechey [16] isolierte das mit ^{14}C-DCCD markierte Protein zusammen mit Cardiolipin (und möglicherweise anderen Lipiden) aus einem MeOH/$CHCl_3$-Extrakt aus Mitochondrien-Suspensionen, die durch Inkubation 2 nMol ^{14}C-DCCD/mg Protein enthielten, mittels diskontinuierlicher Sephadex-LH_{20}-Säulenfraktionierung - Laufmittel $CHCl_3$-$CHCl_3$/MeOH [80]. Zuvor hatte er den $CHCl_3$/MeOH-Extrakt mit Wasser gewaschen, eingeeng mit Äther gefällt und anschließend wieder in $CHCl_3$/MeOH gelöst. In anderen Laboratorien wurde die gleiche Methode benutzt.

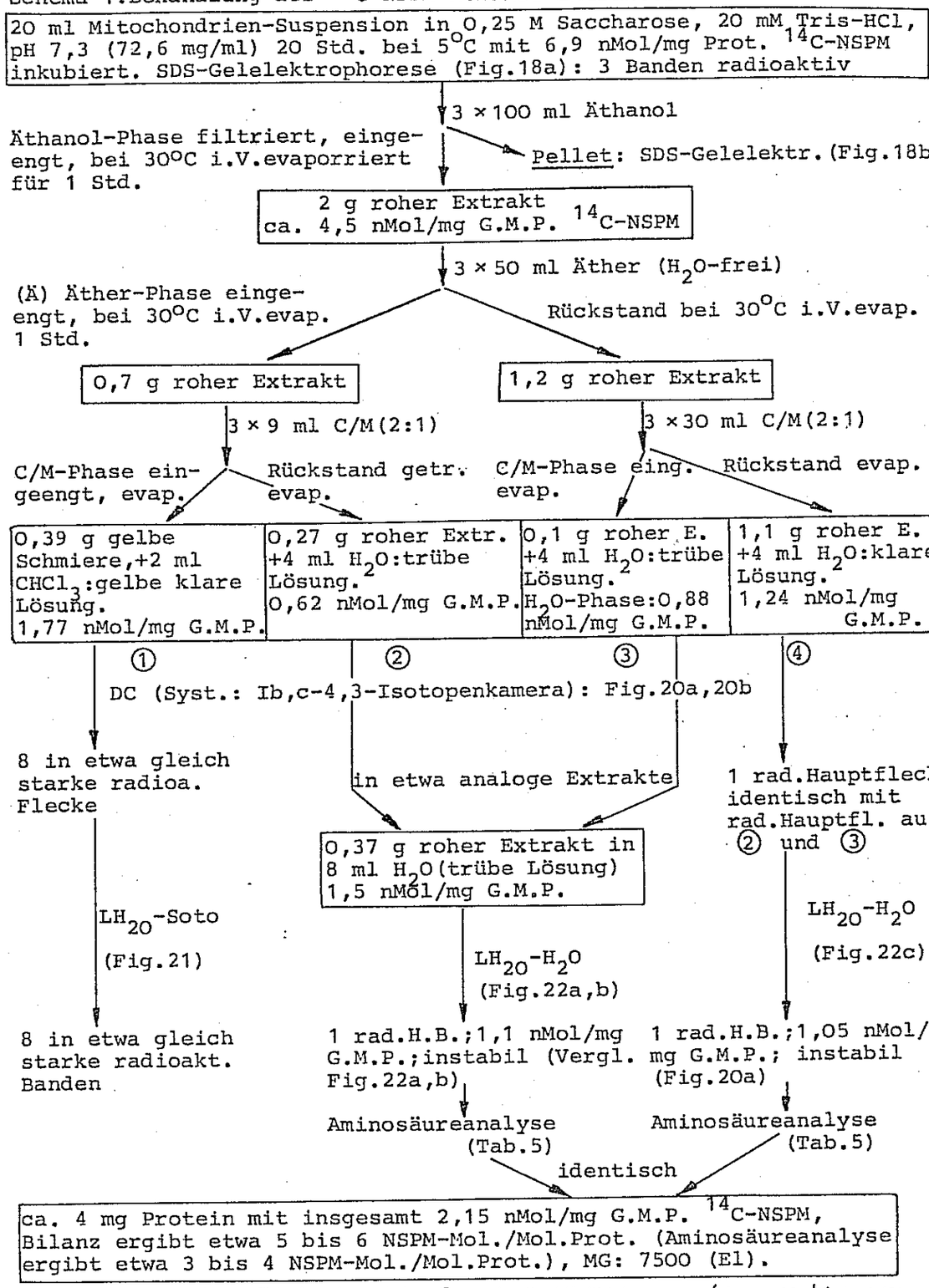
Aufgrund der Löslichkeit der Lipide und Phospholipide in Alkohol Äther und Chloroform, entschloß ich mich dazu die Äthanol (H_2O)-Extrakte nacheinander gut mit Äther und $CHCl_3$/MeOH (2:1) zu waschen. Die Phospholipide sollten größtenteils in Äther übergehen. Nach der Äther und $CHCl_3$/MeOH-Behandlung des Äthanol (H_2O)-Extraktes erwartet ich vollends von Lipiden befreite Proteine. Diese Proteine müßten anschließend in Wasser zu lösen sein. Durch diese Art der Behandlung sollte auch der größte Teil der nicht Protein-gebundenen Radioaktivität entfernbar sein.

Ich erhielt tatsächlich fast lipidfreie wasserlösliche Extrakte, welche ich anschließend mit Sephadex-LH_{20} trennen konnte.

Das überraschenste Ergebnis dieser Extraktionen ist wohl die Tatsache, daß auch das von Beechey ^{14}C-DCCD markierte Protein nach dieser Behandlung nicht mehr zu finden ist - die Radioaktivität findet sich ausschließlich in der $CHCl_3$ extrahierbaren Fraktion der $CHCl_3$/MeOH-Sephadex-Säulentrennung und ist nicht Protein-gebunden!

1. ^{14}C-NSPM markiert

Schema 1: Behandlung des ^{14}C-NSPM-Äthanol-Extraktes



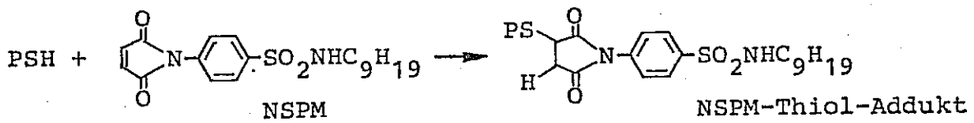
nMol/mg G.M.P. = isolierter Teil der eingesetzten Gesamtradioaktivität bezogen auf Ausgangsproteinmenge; evap. = bei 30°C i.V. für 1 Std. evaporiert

Die $CHCl_3$-Lösung nach Äther und $CHCl_3$/MeOH-Behandlung des Äthanol-Extraktes ① enthält die verschiedenen Phospholipide (wie Lecithin, Phosphatidylserin usw.), Coenzym Q (mit $NaBH_4$ reduzierbar), wenig Protein, sowie 8 verschiedene radioaktive Verbindungen (nicht Protein gebunden: Fig.20a,21).

Wegen der geringen gebundenen Radioaktivität pro Bande (0,2 bis 0,4 nMol/mg G.M.P.) - im Verhälnis zu den anderen Extrakten - waren diese Verbindungen (in der Gel-Elektrophorese mit gleicher Mobilität wie Bromphenolblau) für mich weniger von Interesse und ich untersuchte sie daher nicht weiter.

Die übrigen Lösungen enthalten je einen radioaktiven Protein-Hauptpeak von gleicher Mobilität in der Elektrophorese (7500 MG) und auf der Sephadex-Säule (Fig.20a,b;22a,c,d;18). Das Protein spaltet langsam an der Luft ein nicht Protein-Fragment (Aminosäureanalyse) ab (3 Tage stehen bei geschlossenem Kolben-1.Lauf,Fig.22a; nach mehrmaligem Öffnen des Kolbens an der Luft-6.Lauf,Fig.22b). Mehrere Anzeichen deuten darauf hin, daß es sich um ein Glykoprotein handelt (Schwarz-Färbung nach dem Erhitzen mit 2 N H_2SO_4, schwarzer Niederschlag nach der Totalhydrolyse des Proteines), zur Bestätigung sind jedoch genauere Untersuchungen notwendig - im Rahmen dieser Arbeit war dies nicht möglich.

Der Beweis für die Reaktion von NSPM mit Cystein-SH-Gruppen im Protein ergibt sich aus dem Vergleich mit Glutathion-NSPM-,sowie Cystein-NSPM-Totalhydrolysaten:



Im Totalhydrolysat ist neben dem S-(1,2-Dicarboxyäthyl)-L-Cystei auch Sulfanilsäure nachzuweisen; Cystein fehlt ganz. Auf die Anzahl der Cysteine im Protein läßt sich durch Vergleich mit dem Glutathion NSPM-Totalhydrolysat schließen, es ergibt sich ein Wert von 3 bis 4 Cysteinen pro Molekül Protein (spektroskopischer Vergleich im AS-Analysator).

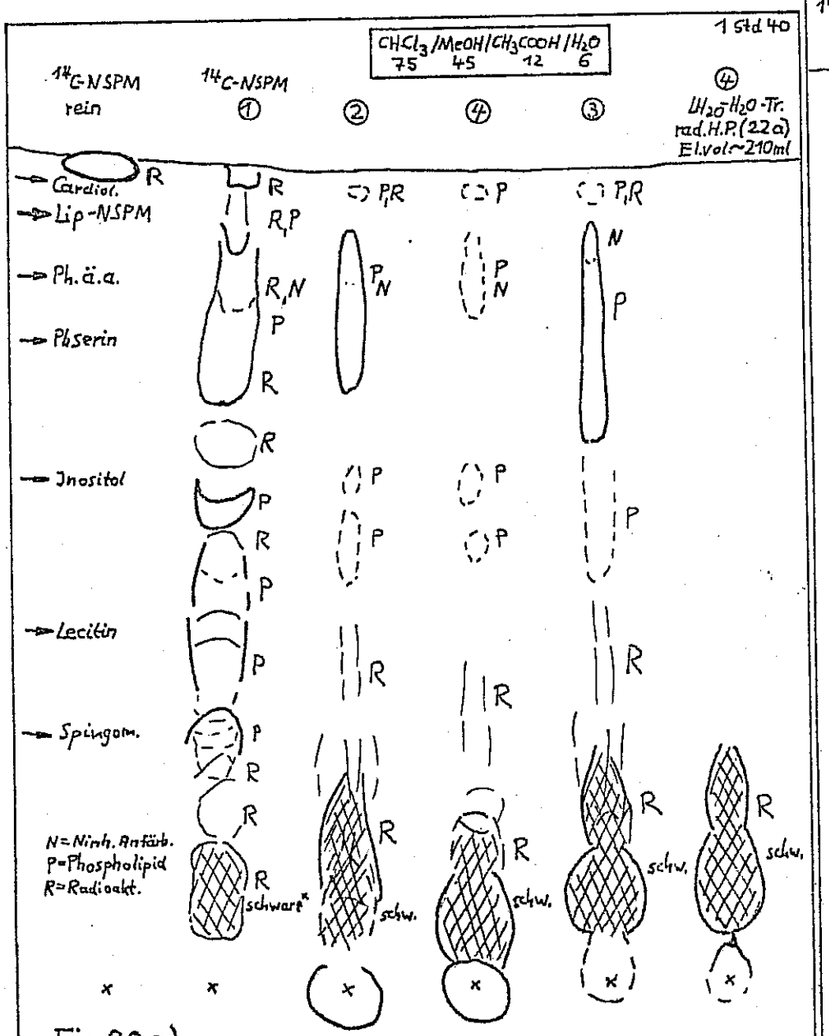


Fig.20a)

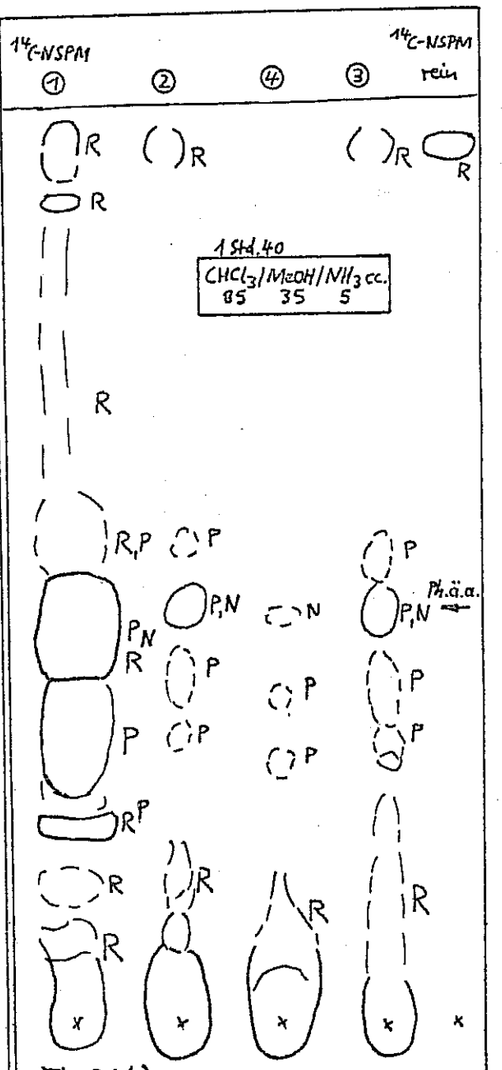
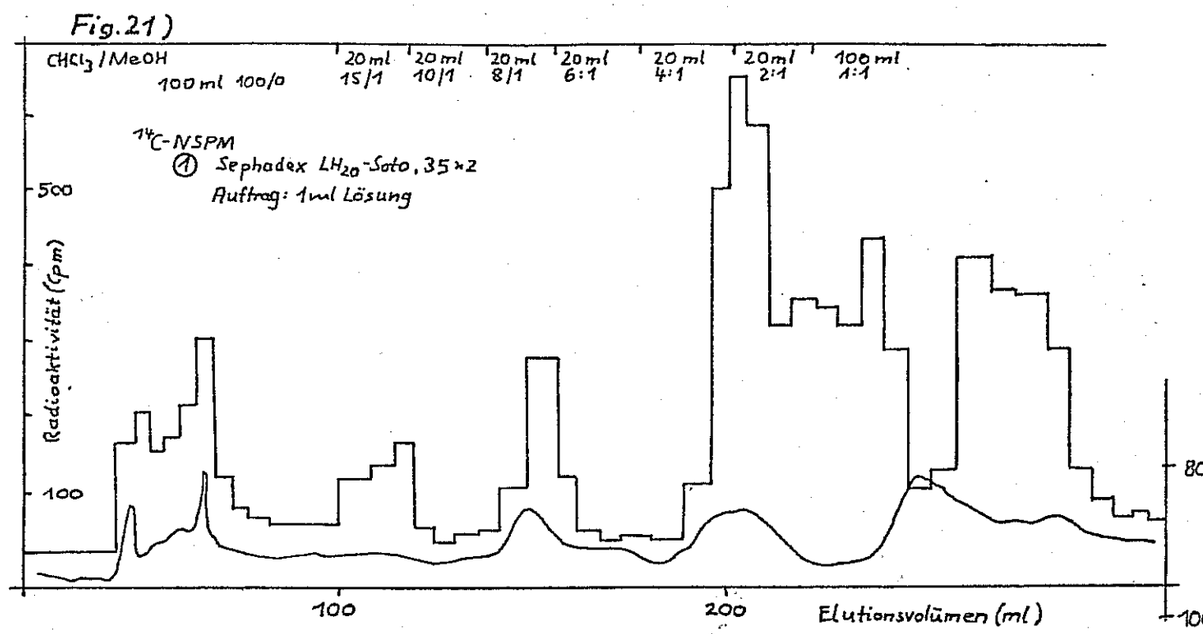


Fig.20b)

Fig.21)



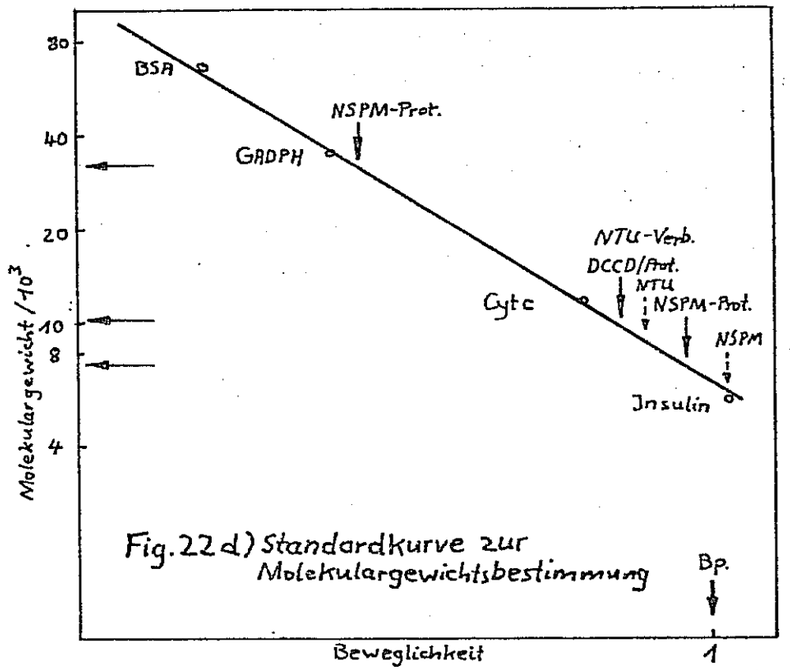


Fig.22d) Standardkurve zur Molekulargewichtsbestimmung

Fig. 22 a)

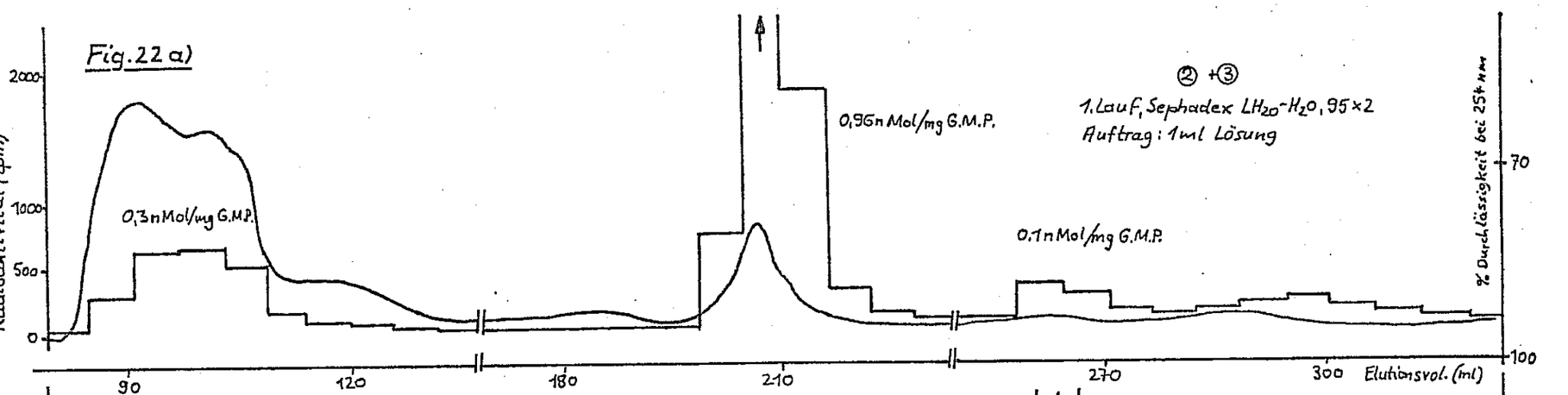


Fig. 22 b)

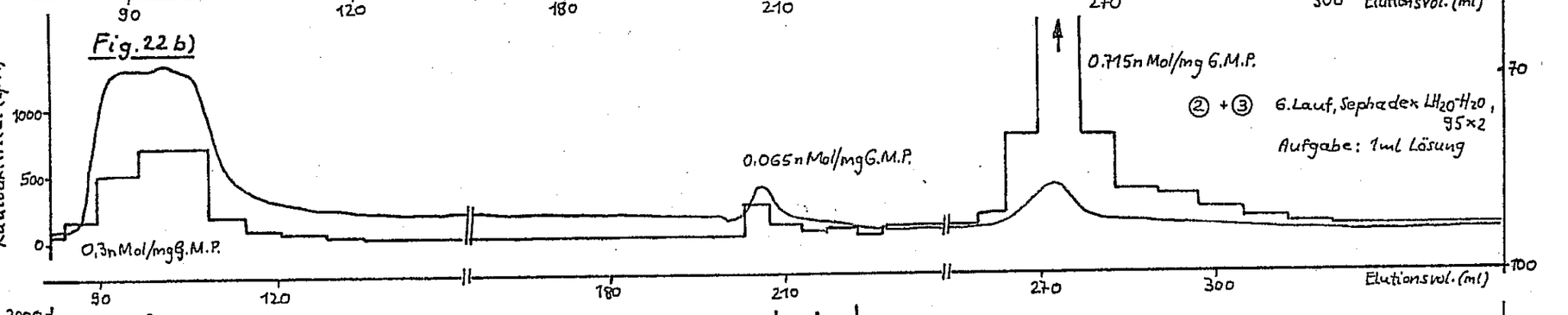
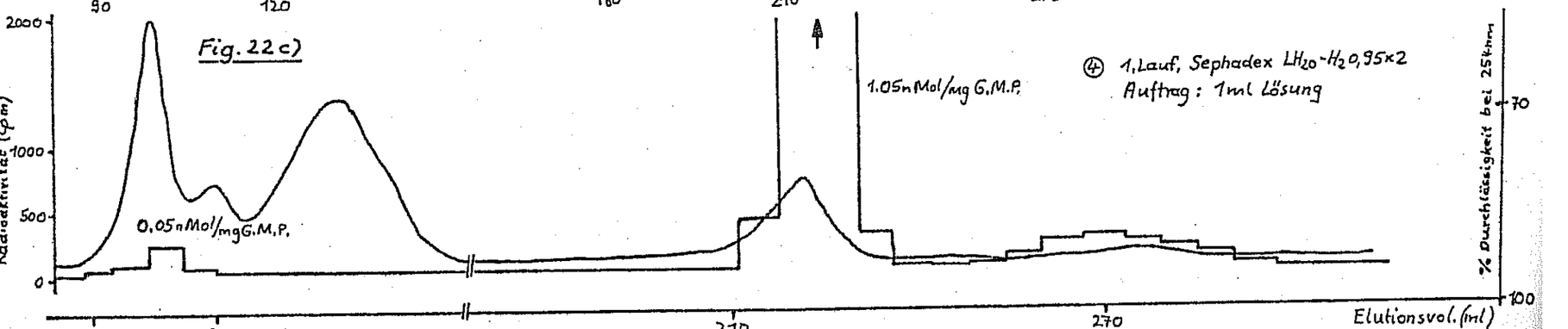


Fig. 22 c)



Die aus den beiden H_2O-Lösungen (nach Isolierung aus ② und ③, sowie ④) erhaltenen beiden ^{14}C-NSPM-markierten Proteine sind auch in der Aminosäurezusammensetzung identisch.

Das ebenfalls in der Aminosäurezusammensetzung identische Spaltprodukt wird zur Aufstellung der Gesamt-Bilanz von isoliertem ^{14}C-NSPM-bindendem Protein (MG: 7500) benötigt. Durch Proteinbestimmung und Summierung über die einzelnen erhaltenen Fraktionen läßt sich zeigen, daß etwa 4 mg Protein (Lowry) aus 1450 mg Gesamt-Mitochondrien-Protein (Biuret) ungefähr 30 % der zur Mitochondrien-Suspension zugegebenen ^{14}C-NSPM-Menge gebunden enthalten.

Tab.5: Aminosäureanalysen

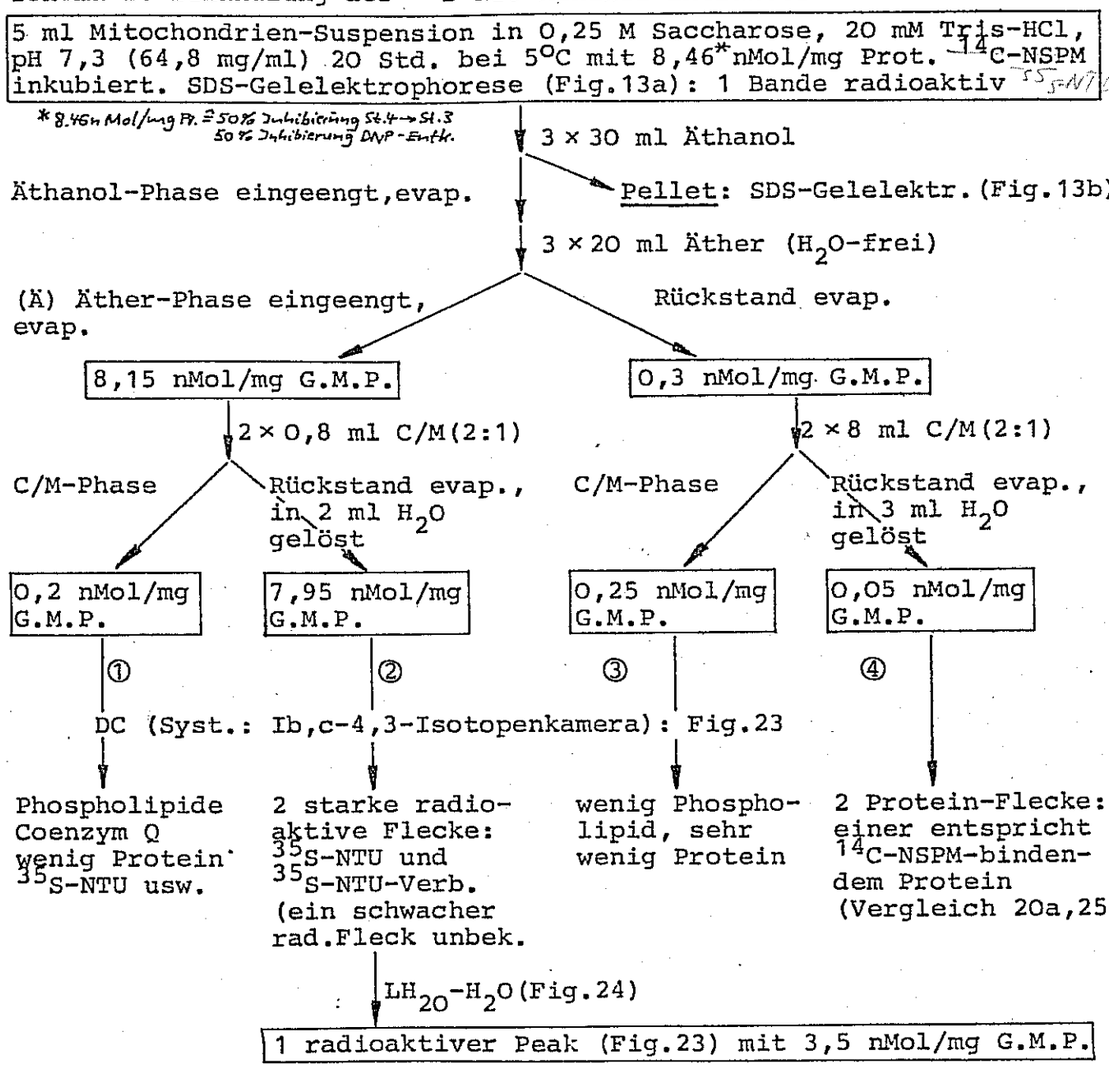
Aminosäure	B.H.ATPase Inhibitor [13]	F_1-Untereinheit 9 [85]	^{14}C-NSPM-bindendes Protein	
Asp	8	3	1,7	5
Thr	–	3	1	3
Ser	6	4	1	3
Glu	20	2	1,7	5
Pro	–	2	1	3
Gly	6	9	2	6
Ala	11	9	2,3	7
Val	2	5	1	3
Met	–	2		1
Ile	4	7	0,7	2
Leu	5	10	1,3	4
Tyr	1	1		1
Phe	2	5	0,7	2
Lys	11	2	1	3
His	6	0		1
Arg	9	1	0,7	2
Cys	–	–		3bis4*
Summe	91	65		54 bis 55
Mindest MG**	10500	8900		5640

*S-(1,2-Dicarboxyäthyl)-L-Cystein

**Mindest MG = Summe der Aminosäure-MG (n) – $H_2O \cdot (n-1)$, im Vergleich mit MG 7500 aus der Elektrophorese.

2. ^{35}S-NTU markiert

Schema 2: Behandlung des ^{35}S-NTU-Äthanol-Extraktes



Die Wasserlösung ② des Äther-Extraktes nach $CHCl_3$/MeOH-Behandlun enthält fast die gesamte eingesetzte Radioaktivität. Aus DC-Untersuchungen ist zu ersehen, daß es sich um ^{35}S-NTU sowie Protein assoziierte Radioaktivität im Verhältnis von etwa 1:1 handelt (neben einem unbekannten kleineren Radioaktivitätspeak). Trennung dieser Verbindungen auf LH_{20} zeigt, daß nur die Protein assoziierte

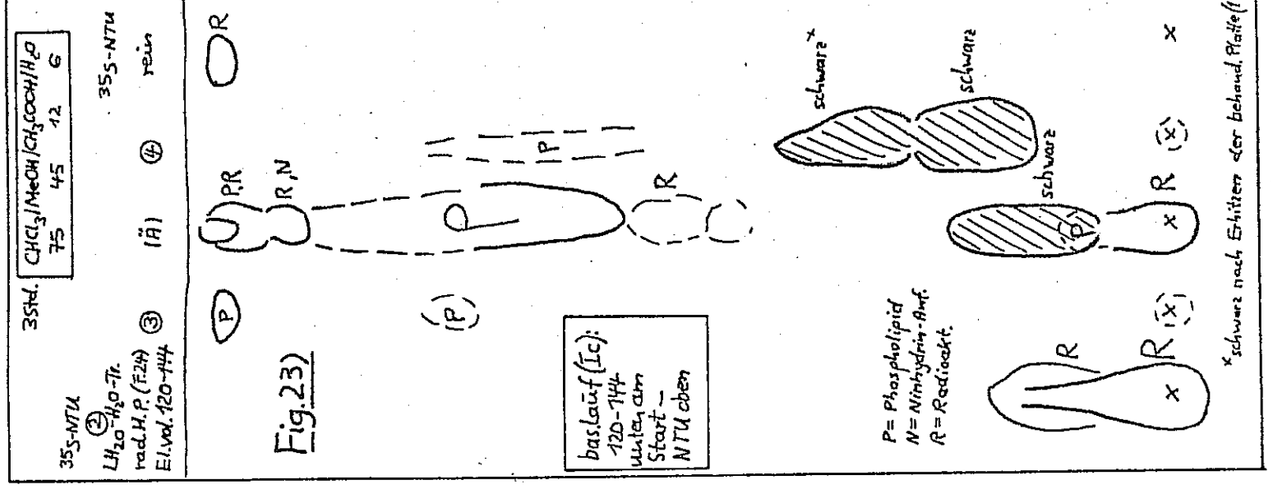

3Std.
CHCl3/MeOH/CH3COOH/H2O
75 45 12 6
35S-NTU
LH2O-H2O-Tl.
rad.H.P.(F24)
El.vol. 120-144
35S-NTU
rein
(Ä1)
basLauf (Ic):
120-144
unten am
Start –
NTU oben
P= Phospholipid
N= Ninhydrin-Aufn.
R= Radioakt.
schwarz
schwarz
schwarz
x schwarz nach Eintönen der behand. Platte (F

Fig.23)

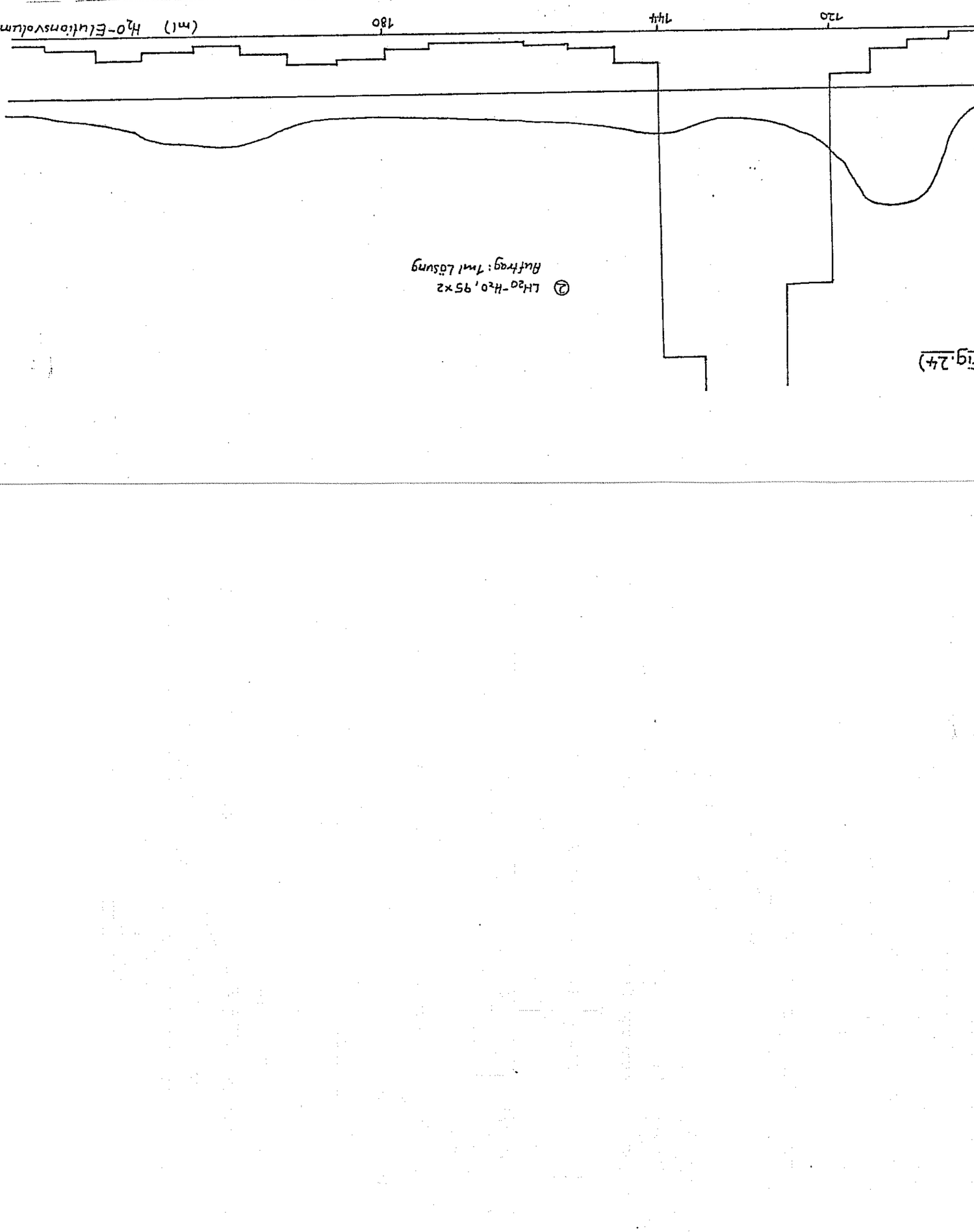

Radioaktivität (cpm)
5000
1000
100
90
120
144
180
(ml) H2O-Eluitionsvolumen
② LH2O-H2O, 95×2
Auftrag: 1ml Lösung

Fig.24)

Radioaktivität mit H_2O eluierbar ist, während ^{35}S-NTU am Kopf der Säule zurückbleibt. Die eluierbare, markierte Verbindung erscheint in enger Nachbarschaft zu anderen Proteinen und ist daher nicht sauber abzutrennen. Die Aminosäurezusammensetzung zeigt Glu, Gly, sowie Cysteinsäure im Verhältnis von Glu:Gly - 1:1 und Cysteinsäure größer 1. Die anderen Aminosäuren zeigen nur ca. 1/5 Intensität der vorausgenannten Aminosäuren. Man findet somit durch das Trennverfahren (Schema 2) schwach Protein-verunreinigtes, radioaktives Glutathion.

Weitere Reinigung und zusätzliche analytische Untersuchungen sollen diesen Befund weiter ergänzen(im Anschluß an diese Arbeit).

3. ^{14}C-DCCD markiert

Wie schon angedeutet, läßt sich das von Beechey isolierte DCCD-bindende Protein durch diese Art der Mitochondrien-Behandlung (Schem nicht mehr finden. Die Radioaktivität findet sich fast ausschließlic im $CHCl_3$-Eluat der LH_{20}-Säulentrennung (Soto) der C/M-Lösung aus dem Äther-Extrakt. Zu finden sind hier im wesentlichen 2 radioaktive nicht-Protein-Verbindungen (DC, Fig. 25,26): Bei der einen Verbindun handelt es sich um den verunreinigten Dicyclohexylharnstoff (El.vol. 64 bis 76: 47 % der eluierbaren Radioaktivität; NMR: NH bei 3,35 - CH_2 bei 1,27/1,29 ppm), bei der anderen Verbindung um das verunreini te Additionsprodukt von DCCD mit wahrscheinlich Cholin (El.vol. 40 bis 52: 51 % der el.Rad.; NMR: $\overset{+}{N}(CH_3)_3$ bei 3,5 - CH_2 bei 1,27/1,29 ppm zugehörig zu Cyclohexyl, Intensitätsverhältnis ca. 1,1/2,4).

Für das letztere Produkt sind nach weiterer Reinigung zusätzlich Untersuchungen notwendig.

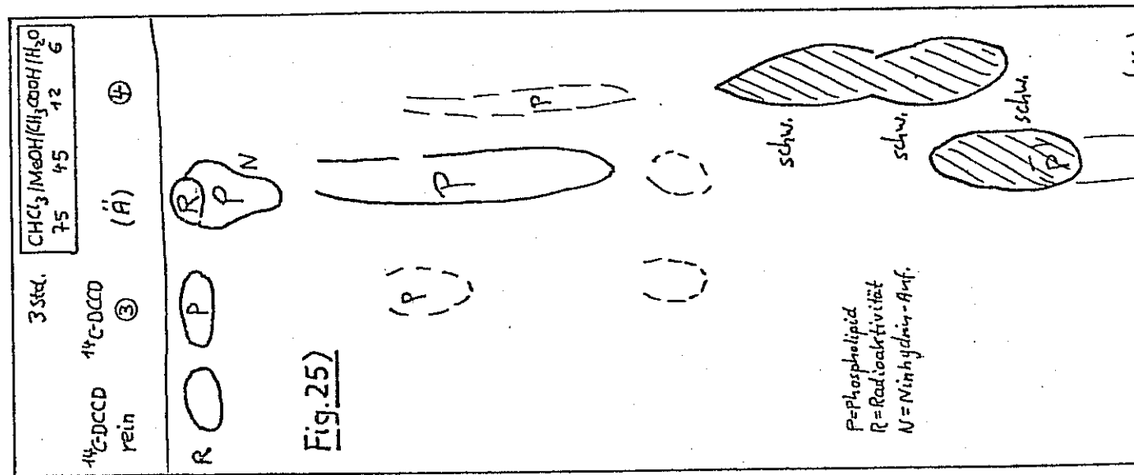
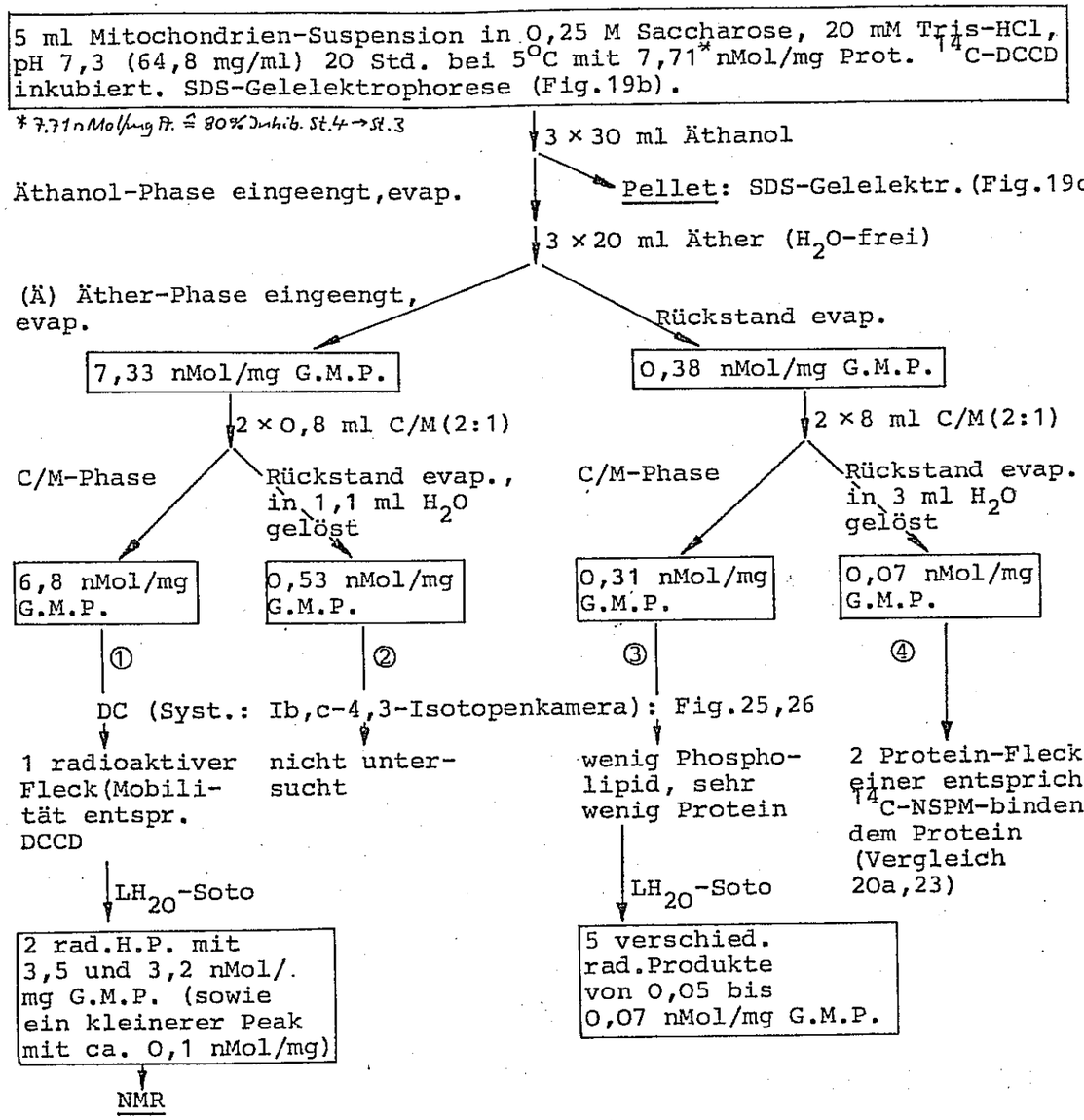


Fig.25)

Schema 3: Behandlung des ^{14}C-DCCD-Äthanol-Extraktes



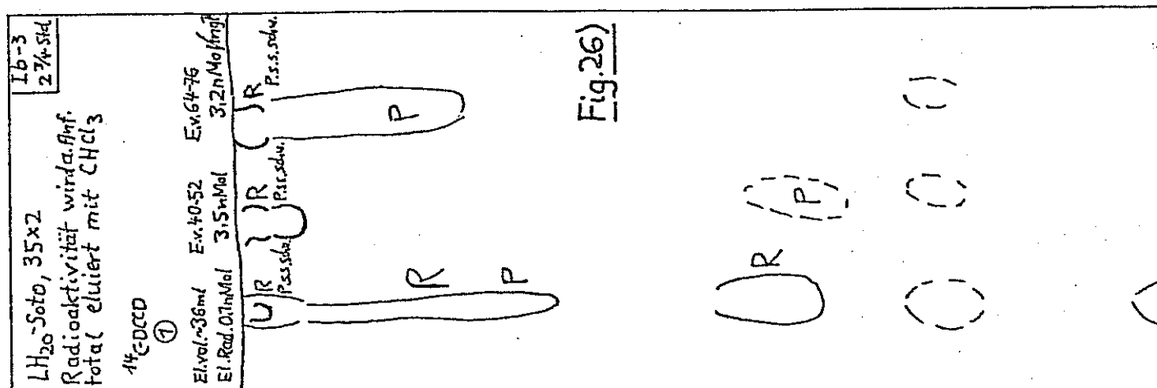


Fig.26)

E.Mitochondriale Thiol-Gruppenbestimmung mit ^{14}C-NSPM

Schema 4: Bestimmungssequenz

30 bis 40 µl Mitochondrien-Suspension (ca. 3 mg Protein, je nach Susp.) in 0,25 M Saccharose, 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 plus 1 ml Reaktionsmedium (a bis f)

↓ 1 Minute schütteln (bei e:30,60,90 Sekunden nach ADP)

+ ^{14}C-NSPM, 10 mM

↓ 90 Sekunden schütteln (bei f:5 Minuten)

+ 100 µl Cystein-HCl, 0,1 M

↓ 5 Minuten schütteln

+ 200 µl Trichloressigsäure, 50 %(w/v)

↓ 5 Minuten schütteln, 5 Minuten zentrifugieren

Überstand	Pellet
+ Überstand	mit 2×200 µl Trichloressigsäure waschen
+ 10 ml Insta-Gel	+ 400 µl Ameisensäure, conc.
↓ zählen	↓ 5 Minuten schütteln
	+ 10 ml Insta-Gel
	↓ zählen

Reaktionsmedien:

a) 1 ml 0,25 M Saccharose enthaltend 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4.

b) 1 ml 0,25 M Saccharose enthaltend 2,5 mM Glutamat, 2,5 mM D,L-Malat, 5 mM Malonat, 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 7,

c) entsprechend b) zusätzlich 10 mM Phosphat.

d) entsprechend b) zusätzlich 2,5 mM ADP.

e) entsprechend c) zusätzlich 2,5 mM ADP.

f) 1 ml 0,25 M Saccharose enthaltend 20 mM Tris-HCl, pH 7,4.

Die Mitochondrien wurden im Reaktionsmedium mit 100 nMol/mg Prot. ^{14}C-NSPM 90 Sekunden lang reagieren lassen. Der Überschuß an ^{14}C-NSPM wurde anschließend mit Cystein abgefangen und das ^{14}C-NSPM markierte Protein mit 50 %iger (w/v) Trichloressigsäure niedergeschlagen. Der Überstand sowie das gefällte Protein (nach lösen in conc.Ameisensäure) wurden auf ihre Radioaktivitätsverteilung getestet. Es wurden 3 analoge Messungen mit jedem Reaktionsmedium durchgeführt. Die Messungen wurden mit 2 verschiedenen Mitochondrien-Präparationen analog wiederholt (Tab.6).

Tab.6: Markierter Thiol-Gehalt unter verschiedenen physiol.Reaktionsbedingungen

Reaktionsmedium	enthaltend	-SH-Durchschnittswerte nMol/mg Prot.im Pellet	Reaktionszeit/Min.
a	-	92,5	1,5
b	Gl	90	1,5
c	Gl,P_i(St.4)	85,5	1,5
d	Gl,ADP	85,5	1,5
e	Gl,P_i,ADP(St.3)	84,5	1,5

Aus den Messungen (Tab.6) ist zu entnehmen, daß eine erreichbare Thiol-Gruppen-Abnahme in den Mitochondrien von 2 bis 3 nMol/mg Protei durch Glutamat-Zugabe erreicht wird (a,b), dies steht im Einklang mit dem Thiol-gebundenen Glutamat-Transport durch die Mitochondrien-Membran [44,60].

Die weitere Abnahme der erreichbaren Thiol-Gruppen-Konzentration von etwa 4 nMol/mg Protein durch P_i oder ADP (b,c-b,d) ist zu erklären, mit dem Thiol-gebundenen ADP-Transport [54].

Keine Variation von Thiol-Gruppen ist zu finden zwischen State 4 und State 3-Bedingungen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einer gefundenen Variation von 13 Thiol-Gruppen/mg Protein zwischen State 4 und State 3 [73]. Diese Differenz ist in Relation zu 40 bis 50 nMol erreichbaren Thiol-Gruppen/mg Protein zu betrachten und wird schon dadurch recht unwahrscheinlich.

Die Titration des Thiol-Gehaltes von Rinderherz-Mitochondrien mit ^{14}C-NSPM ist im Prinzip möglich, wenn auch nur indirekt nach meiner benutzten Methode.

^{14}C-NSPM reagiert sehr schnell mit Thiol-Gruppen der Mitochondrien-Suspension. Das Thiolreagenz ist jedoch so lipophil, daß es auch im Überschuß an Cystein gebunden (nach Abfangreaktion) mit den Proteinen zusammen durch Trichloressigsäure ausfällt. Da auch nicht-Protein-Thiol-Gruppen (Glutathion u.a.) mit ^{14}C-NSPM reagieren, sind nicht alle erreichbaren Thiol-Gruppen nach Reaktion im Pellet zu finden.

Der ^{14}C-NSPM-Gehalt im Überstand steigt sprunghaft an, nachdem alle erreichbaren Protein-Thiol-Gruppen reagiert haben, wodurch sich zwei charakteristische ^{14}C-NSPM-Verteilungen zwischen Pellet und Überstand - vor und nach Reaktion der Thiol-Gruppen - einstellen. Es wird dadurch möglich recht genaue Angaben über den erreichbaren Gesamt-Thiol-Gehalt zu bekommen (Fig.27):

Pellet	97 bis 98 nMol/mg Protein
Überstand	6 bis 7 nMol/mg Protein
Gesamt	103 bis 105 nMol/mg Protein

Die Einstellzeit der Verteilung betrug 5 Minuten.

Chude und Boyer [18] fanden mit p-Mercuribenzoat einen Protein-gebundenen Thiol-Gehalt von ca.70 nMol/mg Protein nach 6 M Guanidin-Hydrochlorid-Behandlung.

Gautheron [36] fand mit DTNB (5,5'-Dithio(2-nitrobenzoesäure)) einen Thiol-Gehalt von ca.100 nMol/mg Protein ebenfalls unter 6 M Guanidin-Hydrochlorid-Behandlung.

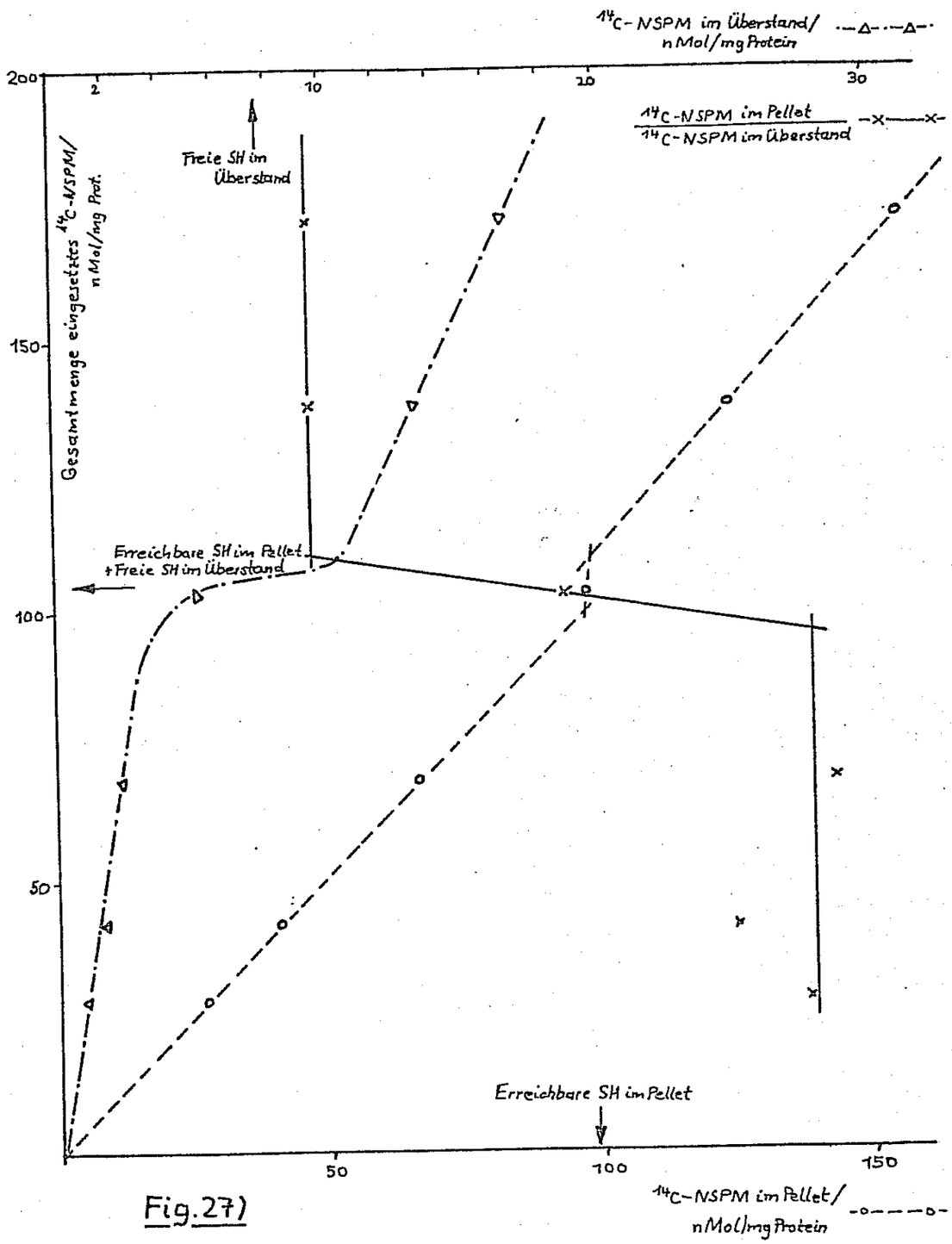

^{14}C-NSPM im Überstand/
nMol/mg Protein
$\frac{^{14}C\text{-NSPM im Pellet}}{^{14}C\text{-NSPM im Überstand}}$
Gesamtmenge eingesetztes ^{14}C-NSPM/
nMol/mg Prot.
Freie SH im Überstand
Erreichbare SH im Pellet
+Freie SH im Überstand
Erreichbare SH im Pellet
^{14}C-NSPM im Pellet/
nMol/mg Protein
200
150
100
50
2
10
20
30
50
100
150

Fig.27)

F.Zusammenfassung der Ergebnisse

1.mit DCCD

1966 wurde DCCD zum ersten Mal als Inhibitor der oxydativen Phosphorylierung beschrieben [9]. Auf die DNP-Entkopplung hat DCCD keinen Einfluß. 40 nMol/mg Mitochondrien-Protein (15 nMol nach 10 Minuten Inkubation) sind notwendig zur vollständigen Inhibierung von State 4 → State 3-Übergang. Die Wirkung ist ähnlich der von Oligomycin [72].

Nach Übernacht-Behandlung von Mitochondrien mit 2 nMol DCCD/mg Protein (100 % Inhibierung St.4→St.3) wird der $CF_o \cdot F_1$-Komplex isolier dessen Phospholipid stimulierte ATPase-Aktivität gegenüber der $CF_o \cdot F$ Isolierung unbehandelter Mitochondrien zu 70 bis 80 % inhibiert ist. Wenn der $CF_o \cdot F_1$-Komplex erst nach Isolierung mit DCCD behandelt wird gibt es eine Phospholipid stimulierte ATPase [71].

DCCD ist kombiniert mit einer Proteolipid-Fraktion [55], welche durch $CHCl_3$/MeOH zu 75 % aus der Mitochondrien-Membran isoliert werden kann [15]. Die Reinigung des Proteolipids aus dem $CHCl_3$/MeOH-Extrakt erfolgte nach waschen des Extraktes mit Wasser, fällen mit Äther und anschließender Wiederauflösung in $CHCl_3$/MeOH, auf Sephadex LH_{20} nach der Soto-Methode [80]. Das Proteolipid wird im $CHCl_3$/MeOH-Eluat gefunden. Als bindendes Phospholipid wurde Cardiolipin festgestellt. Die DCCD-Bindung wurde dem Proteolipid-Protein zugeschrieben welches ein MG von 10000 nach Gel-Elektrophorese besitzt [16].

Die OS-ATPase wird nach Stekhoven et al [82] durch 5 bis 6 nMol DCCD/mg Protein, der 3 bis 4fachen Menge von Beechey et al [10], inhibiert. Ein 13000 bis 14000 MG-Protein kann daraus als bindendes Protein nach der Beechey-Methode isoliert werden (nicht identisch mit OSCP, MG: 17000 bis 18000).

Untersuchungen an E.Coli, Neurospora Crassa, Hefe-Mitochondrien ergaben andere Ergebnisse.

Die gemischten Phospholipide, Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin, stellen die mit DCCD inhibierte ATPase-Aktivität submitochondrialer Partikel (Rattenleber) wieder her. Vorbehandlung dieser Phospholipide mit DCCD ergeben eine Präparation, welche in der Lage ist, den Inhibitor zu submitochondrialen Partikeln zu transportieren

Phosphatidylcholin allein war voll effektiv, während Phosphatidylserin dagegen inaktiv war (reversible - irreversible Bindung von DCCD). Phosphatidylserin hat eine ungewöhnlich hohe Aktivität in der ATPase-Restaurierung submitochondrialer Partikel nach DCCD-Behandlung [49].

Durch $^{32}P_i$-Einbau in Phosphatidylsäure und folgender Bildung der verschiedenen Phospholipide, Phosphatidylserin, Phosphatidyläthanolamin und vor allem Phosphatidylcholin, läßt sich zeigen, daß die Phospholipid-Biosynthese sich auch im Herz abspielt [52].

Die eigenen Ergebnisse mit ^{14}C-DCCD zeigen, daß die Phospholipide und mit ihnen die ^{14}C-Aktivität von den Mitochondrien-Proteinen durch spezielle Behandlung ganz abtrennbar sind - im Gegensatz zu den Ergebnissen von Beechey et al [15,16,55]. Gefunden wurden die Reaktionsprodukte jedoch ebenfalls zusammen mit einem 10000 MG-Protein (nach Elektrophorese ^{14}C-DCCD inkubierter Mitochondrien: Fig.19b,c; 22d).

Als Reaktionspartner von DCCD in den Mitochondrien kommen primär die Phospholipide in Frage [14]. Dies wiederum wird unterstützt, durch die gefundenen Reaktionsprodukte von DCCD (zur Chemie von DCCD siehe [56]): 47 % Dicyclohexylharnstoff und 51 % DCCD-Cholin von 7,7 nMol DCCD/mg Mitochondrien-Protein (dazu S.56).

Als Konsequenz der beschriebenen Ergebnisse kann die folgende These formuliert werden:

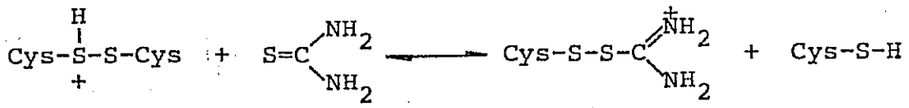
Durch Angriff von DCCD auf die Phospholipide wird im ATP-Synthes Zentrum die ATP-Bildung verhindert (dazu mehr bei der NSPM-Diskussio

2.mit NTU

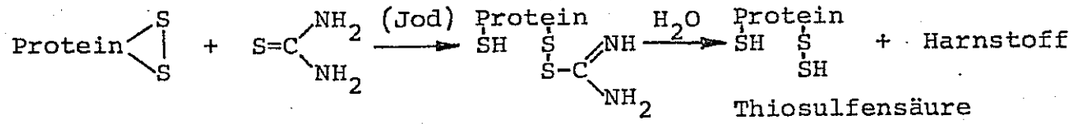
Das Sulfensäurereagenz NTU (MNT) inhibiert die oxydative Phosphorylierung sowie die DNP-Entkopplung der Substratseite I bis II, stimuliert die Substratseite II zu 70 % und entkoppelt Substratseite III. Die Stimulierung wird durch Oligomycin verhindert. Konzentrationen von 30 nMol/mg Protein nach 10 Minuten Inkubation sind notwendig für 100 %ige Wirkung- 8,5 nMol/mg Protein ergeben eine 50 %ige Wirkung (S.24).

Die Wirkung erfolgt zwischen dem NADH-Dehydrogenase-Komplex (K I dem Cytochrom b-c_1-Komplex (K III) und dem ATP-Synthase-Komplex (K V) - und zwar näher dem letzteren.

MNT ist in der Lage Cystin in streng saurem Medium zu spalten [83]



Auch mit einem Protein-Disulfid unter oxydierenden Bedingungen ist der Thioharnstoff in der Lage ähnlich zu reagieren. Hier folgt der Spaltung jedoch eine Desulfurierung zum Harnstoff [59]:

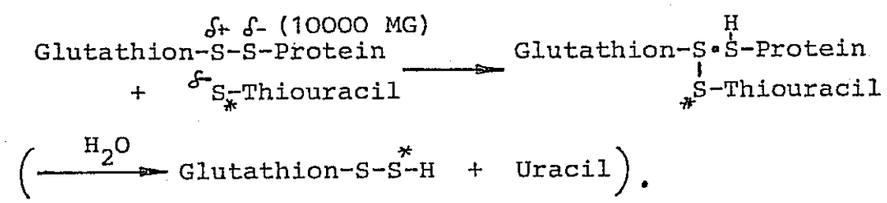


Mit Thiouracil ist die gleiche Reaktionsfolge zu erwarten.

Die beschriebene Inhibierung kann erklärt werden durch die Reaktion eines solchen aktivierten Protein-Disulfides mit den Sulfensäurereagentien. Dieses aktivierte Disulfid (zur Aktivierung mehr bei der NSPM-Zusammenfassung) muß die mechanistische Beschreibung des hypothetischen Hoch-Energie-Intermediates sein (X~Y)[7]. Das hier keine Thiol-Gruppe zu einer Maleinimid-Reaktion befreit wird, zeigen die Messungen mit ^{14}C-NSPM. Dies ist jedoch kein Argument gegen den beschriebenen Mechanismus, wenn er ergänzt wird – dies erfolgt bei der NSPM-Zusammenfassung.

Das die Reaktion stattgefunden hat, zeigen die DC-Untersuchungen der Rohextrakte der ^{35}S-NTU behandelten Mitochondrien, sowie des durch Sephadex LH_{20} abgetrennten verunreinigten Reaktionsproduktes: Die Radioaktivität verteilt sich 1:1 auf dieses Reaktionsprodukt und ^{35}S-NTU (S.54).

Beim isolierten, verunreinigten Reaktionsprodukt handelt es sich wahrscheinlich um das gemischte Disulfid des Glutathions mit ^{35}S-NTU (nach Totalhydrolyse gespalten,S.56). Ähnlich wie die DCCD-Reaktionsprodukte findet man dieses NTU-Reaktionsprodukt bei MG 10000 (El.,S. Dieses 10000 MG-Protein spielt wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der ATP-Synthese. Folgende Reaktionen sind denkbar (analog [59])



3.mit NSPM

Das Thiol-Reagenz NSPM inhibiert State 4 →State 3-Übergang, sowie die DNP-Entkopplung der Substratseite I mit 12 bis 16 nMol/mg Protein. Eine 5 Minuten Inkubation der Mitochondrien-Suspension mit 7 bis 8 nMol/mg Protein ergibt den gleichen Effekt. Die Substratseite II wird durch 20 bis 26 nMol NSPM/mg Protein entkoppelt. Die Entkopplung wird durch Oligomycin (0,6 nMol/mg Protein, analoge Konc.bei NTU nicht verhindert. Mit 28 nMol NSPM/mg Protein wird auch die Substratseite III entkoppelt.

Die Wirkung erfolgt zwischen den Atmungsketten-Komplexen und Komplex V und zwar in der Nähe der zuerst genannten.

Isoliert werden konnte ein ^{14}C-NSPM-bindendes Protein vom MG 7500 (nach SDS-Gelelektrophorese). Das Mindest-MG 5640 ergibt sich aus der Aminosäureanalyse. Das Molekül enthält 3 bis 4 Cystein-Reste und ist ein schwach saures, lösliches Protein. Anzeichen deuten darauf, daß es sich um ein Glycoprotein handelt.

Es handelt sich um ein bisher in der Literatur nicht beschriebenes farbloses Protein. Das Protein, das mit NSPM reagiert hat, besitzt ein UV-Maximum von 263 nm.

--- Der P_i-Transport wird durch diese kleinen NSPM-Konzentrationen nicht beeinflußt, denn die P_i-Translocase, MG 26500 [39], wird unterhalb 7 nMol/mg Protein nicht angegriffen.---

Sanadi et al [74] isolierten einen Faktor B, MG 29200, lokalisiert zwischen Elektronentransport-System und Komplex V. Ein wasserlösliches farbloses Protein, welches aktive Thiol-Gruppen enthält und Energie-gebundene Funktionen von Submitochondrialen Partikeln stimuliert.

Mehrere dieser Faktoren wurden bisher beschrieben (MG 43500, 47000). Die neueste Isolierung eines solchen Faktors beschreibt You, K.S. und Hatefi, Y. [88]. Es handelt sich um ein farbloses 11000 bis 12000 MG-Protein (UV-Max. 278 nm) mit 6facher Faktor B-Aktivität für ATP-getriebenen reversiblen Elektronen-Transfer. Dieser Faktor enthält ebenfalls aktive Thiol-Gruppen. Der Faktor ist funktionell lokalisiert zwischen Elektronen-Transport und mitochondrialer Entkoppler-Bindungsseite.

Das neue 7500 MG-Protein kann in die Reihe der B-Faktoren eingeordnet werden, wenn man die Eigenschaften vergleicht.

Das keiner der beschriebenen B-Faktoren durch ^{14}C-NSPM (bei kleinen Konzentrationen) markiert wird, zeigt, daß nur dieses neue 7500 MG-Protein für die Inhibierung der Kopplungsstelle I (S. 42, 46) durch das Maleinimid verantwortlich ist. Das Protein vermittelt zwischen Atmungskette und Energie-Pool.

Die Entkopplung der Kopplungsstelle II durch NSPM bei höheren Konzentrationen als für Kopplungsstelle I (S. 27, 29) ist nicht eindeutig zu erklären. Bei den angewandten Konzentrationen von NSPM (ca.7 nMol/mg Protein) werden das NPA-(DNP- ?)bindende Protein, sowie das 7500 MG-Protein gleichermaßen angegriffen (S. 42).

Das NPA-bindende Protein hat möglicherweise Faktor B-Eigenschafte (Sanadis Faktor B ?) und vermittelt zwischen Kopplungsstelle II und Energie-Pool(?).

Zusammenfassung von 1 bis 3:

a)DCCD greift die Phospholipide an, wodurch die ATP-Synthese verhindert wird. DCCD-Cholin wurde als eines der möglichen Reaktionsprodukte identifiziert (Eingriff von DCCD in die Basenaustauschreaktionen der Phospholipide?).

b)NTU greift ein aktiviertes Protein-Glutathion-Disulfid an, welches das bisher hypothetisch angenommene Hoch-Energie-Intermediat (X~Y) sein könnte. Ein 10000 MG-Protein (Beechey-Protein?) könnte das an Glutathion gebundene Protein sein. Der Glutathion-Schwefel muß positiviert sein (Reaktion mit NTU).

c)NSPM greift die zwischen Hoch-Energie-Intermediat (X~Y) und Atmungskette vermittelnden B-Faktoren an.

Die Titration der erreichbaren Thiol-Gruppen von Mitochondrien-Suspensionen zeigen keine Differenz zwischen State 4 und State 3-Bedingungen.

Um die Aktivierung des beschriebenen Disulfides zu erklären, sollen zunächst einige bekannte Reaktionen aufgezeigt werden:
I. Primäre Phosphate gehen beim Glühen unter Abspaltung von Wasser über die Stufe der Diphosphate und Polyphosphate in Metaphosphate über (Polymerisation):

$$2\ KH_2PO_4 \xrightarrow{-H_2O} K_2H_2P_2O_7 \xrightarrow{-H_2O} 2\ KPO_3.$$

Analog verhalten sich die Ammoniumderivate solcher Phosphate:

$$2\ MgNH_4PO_4 \longrightarrow Mg_2P_2O_7 + 2\ NH_3 + H_2O;$$

$$NaNH_4HPO_4 \longrightarrow NaPO_3 + NH_3 + H_2O.$$

II. Festes Ammoniumsulfid $(NH_4)_2S$ wird beim Vermischen von 2 Mol Ammoniak und 1 Mol Schwefelwasserstoff bei $-18^{\circ}C$ unter Ausschluß von Wasser als weiße Kristallmasse erhalten:

$$2\ NH_3 + H_2S \rightarrow (NH_4)_2S.$$

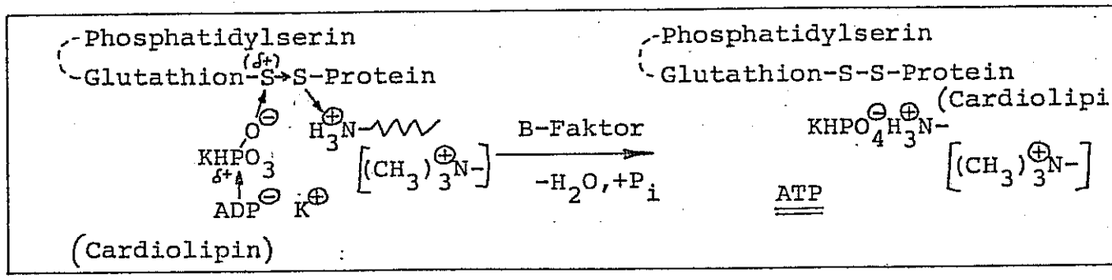
Es zerfällt bereits bei Zimmertemperatur in Ammoniak und Ammoniumhydrogensulfid, welches seinerseits leicht in Ammoniak und Schwefelwasserstoff dissoziiert:

$$(NH_4)_2S \xrightarrow[-NH_3]{} NH_4HS \xrightarrow[-NH_3]{} H_2S.$$

III. Quaternäre Ammoniumsalze wie z.B. $R_4N^+J^-$ ergeben bei Behandlung mit feuchtem Silberoxyd ('AgOH') basische Lösungen, die in ihrer Basenstärke mit anorganischen Alkalien zu vergleichen sind.

Die Phospholipide Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylcholin (Phosphatidylserin) entsprechen den Stickstoffbasen.

Man kann annehmen, daß diese Phospholipide im ATP-Synthese-Zentrum als Ammoniumphosphate vorliegen und für die Aktivierung des Protein-Glutathion-Disulfides verantwortlich sind:



Bei diesem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus handelt es sich um einen synchron-Mechanismus: Das Sulfenylphosphat, sowie das Ammoniumsulfid werden nicht frei (es ist also keine -SH-Differenz zwischen State 4 und State 3 zu erwarten).

Das Glutathion ist möglicherweise verestert mit Phosphatidylseri

Die B-Faktoren spielen wahrscheinlich den Vermittler zwischen Atmungskette und ATP-Synthese-Zentrum durch Abziehen von Wasser aus letzterem (→Thiolacton?).

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Methoden und Hilfsmittel

1. Isolierung von Rinderherz-Mitochondrien

Intakte Rinderherz-Mitochondrien wurden isoliert nach der Methode von Smith [21], modifiziert durch den Gebrauch von Subtilisin (Methode Labor Prof. Klingenberg):

Ein Rinderherz wurde, 1 bis 2 Stunden nach dem Tode des Tieres, vom Schlachthof geholt und sofort in Eis gelegt (zur Kühlung auf dem Transport in das Labor).

- Alle weiteren Arbeiten wurden bei 4 bis 6°C ausgeführt. -

Fett und Sehnen wurden sehr sorgfältig vom Herz entfernt und das Muskelgewebe dann in 1 bis 2 cm Würfel geschnitten. Durch waschen mit 2 l 0,25 M Saccharose (für biochemische und mikrobiol. Zwecke, Merck), 2 mM an EGTA-Tris, pH 7,3 (Med.1) wurde der größte Teil des Blutes entfernt (ausgedrückt). Anschließend wurden die Würfel zweimal durch den Fleischwolf gedrückt, einmal grob (5 mm Löcher) und einmal fein (2 mm Löcher).

400 g Gehacktes, 200 mg Subtilisin (36,9 AE/g Novo, Mainz), sowie 800 ml 0,25 M Saccharose, 20 mM an Tris-Base (Med.2) wurde zusammengerührt unter pH-Kontrolle. Sobald die Mischung bei pH-Werten war, die den Mitochondrien schaden konnten (7 oder weniger), wurde so schnell wie möglich auf $7{,}3 \pm 0{,}1$ nachgestellt mit Med.2. Im Starmix (Elektrostar, Typ MXC) wurde nun in Stufe 1 - 5 Sekunden in Stufe 2 - 15 Sek. und in Stufe 3 - 30 Sekunden unter Luftausschl (Gefäß mit Med.3 aufgefüllt) homogenisiert. Dieses Endhomogenat mit 1 M Tris-Base (pH 10,8, unneutralisiert) wieder auf pH 7,3 eingeste mit 0,25 M Saccharose, 20 mM an Tris-HCl, pH 7,3 (Med.3) auf 2,1 l aufgefüllt und 25 Minuten unter pH-Kontrolle langsam gerührt.

Das Homogenat wurde 20 Minuten bei 440 g (Beckman, J 21 B, Kühl zentrifuge, JA 10 Rotor, 2000 rpm) zentrifugiert. Der überstand wurde vorsichtig dekantiert, so daß das lose gepackte Pellet nicht aufgewirbelt wurde, und durch eine 6-fache Lage Mulltuch gegossen. Die Suspension auf 2,1 l aufgefüllt mit Med.3 und nach verteilen

auf 6 Zentrifugenbecher von je 400 ml 20 Minuten bei 8880 g (Beckman, Kühlzentrifuge, JA 10 Rotor, 9000 rpm). Das resultierende Pellet bestand gewöhnlich aus 3 verschiedenen Schichten:
(I) eine leichte, lose gepackte, hellbraune Schicht (leichte Rinderherz-Mitochondrien), (II) eine dunkelbraune Schicht (schwere Rinderherz-Mitochondrien) und eine rotbraune Schicht auf dem Boden des Zentrifugenbechers (restliches Blut).

Den Überstand mit dem Fett weggesaugt (Wasserstrahlpumpe) und mit Zellstoff das am Becherrand und an den Wandungen sitzende Fett vorsichtig weggewischt. Die erste Schicht besteht aus zerstörten Mitochondrien und wurde deshalb abgeschieden. Dies wurde erreicht durch Zugabe von etwa 20 ml Med.3 und leichtes Schwenken der Becher, wobei das leichte Pellet aufgewirbelt wurde und mit dem Medium abgesaugt werden konnte. Die dunkelbraune Schicht wurde in 10 ml Med.3 aufgenommen durch Aufwirbeln mit einem 15 ml Homogenisatorstab. Die 3.Schicht wurde weggeworfen. Die vereinigten Suspensionen wurden homogenisiert, mit Med.3 wieder auf 2,1 l verdünnt und erneut bei 9000 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Alle Zentrifugationen wurden sehr schnell hintereinander durchgeführt, um die Proteinase möglichst rasch zu entfernen.

Das Pellet wurde in etwa 15 ml Med.3 aufgenommen und homogenisiert; es resultierten 20 bis 25 ml Mitochondrien-Suspension mit etwa 70 bis 90 mg Protein pro ml Suspension. Die Protein-Konzentration wurde gemessen durch die Biuret-Methode in Gegenwart von 0,1 % Desoxycholat [46]. Alle Mitochondrien-Präparationen wurden sofort auf strukturelle Unversehrtheit - mit dem Kriterium der Atmungskontrolle [17] - getestet.

Das Atmungskontroll-Verhältnis (RCR = Respiratory control ratio) betrug 5 bis 6 mit Glutamat, Malat als Substrat; das ADP/O-Veráltnis war annähernd 3. Mit Succinat als Substrat betrug RCR = 3 bis 4; ADP/O war etwa 2.

Für die Präparation und die Reagentien-Lösungen wurde Ionenaustauscher-Wasser, welches anschließend ein Ionenaustauscher-Faß (Elgostat) passiert hatte, mit einer spezifischen Leitfähigkeit kleiner $0{,}08 \cdot 10^{-6}$ $cm^{-1}\Omega^{-1}$ benutzt.

So präparierte Mitochondrien zeigten etwa 2 bis 3 Tage Atmungskontrolle, wenn sie bei $0^{o}C$ gelagert wurden.

2.Durchführung_der_Messung_mit_der_Clark-Elektrode_

a.Vorbereiten der Meßeinheit. Zunächst wurde die pO_2-Meßeinheit hergerichtet (Anleitung: Eak 1 - Mikro-pO_2-Meßeinheit, Eschweiler und Co, Kiel) und mittels Klemmhalterung im Reaktionsgefäß befestigt.

Nun wurde das Polarogramm der pO_2-Elektrode (Strom-Spannungs-Kennlinie) aufgenommen. Dazu wurde die Polarisationsspannung von 0 auf 1000 mV in 50 mV-Schritten verändert und der zugehörige Stromverlauf ermittelt. Die normale Arbeits-Polarisationsspannung liegt bei 600 mV. Sie liegt ca. in der Mitte des spannungsunabhängigen Strombereiches. Das Polarogramm gibt auch Aufschluß über die Güte der Elektroden. Wenn der Strom im spannungsunabhängigen Teil bei einer Spannungserhöhung von 100 mV mehr als 10 % zunahm, mußte die Elektrode neu hergerichtet werden.

Im Anschluß an das Einstellen der Arbeitspolarisationsspannung wurden Elektrode sowie Schreiber geeicht, und zwar mit 2 %- und 12 % O_2-Eichgasmischung (Vorschrift, Eschweiler und Co, Kiel).

Das Ansprechen der Elektrode wurde mit Dithionit geprüft ($Na_2S_2O_4 \cdot 2\ H_2O$, Absorptionsmittel für Sauerstoff).

Die Eichung sowie sämtliche Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

b.Messung. Zunächst wurden mittels 5 ml Spritze 2,4 ml Reaktionsmedium in das Gefäß eingefüllt. Dies mußte sehr sorgfältig vorgenommen werden, da sonst Luftblasen an die Elektrode gelangten, die eine Messung verhinderten. Leichtes Rühren während dem Einfüllvorgang ist dabei von Vorteil. Zum Schluß wurde volle Rührgeschwindigkeit eingestellt und eine Minute offen gerührt. Es wurde so eine luftgesättigte Reaktionsmischung, sowie stabile Zeigerstellung (Schreiber) erhalten.

Reaktionsmedien:

I) 19,1 ml Medium 3 (0,25 M Saccharose, 20 mM an Tris-HCl, pH 7,3)
0,4 ml KCl, 1 M
0,1 ml $MgCl_2$, 1 M
0,2 ml K-Phosphat-Puffer, 1 M, pH 7,3

0,2 ml K-Succinat, 1 M, pH 7,3

II) Succinat ersetzt durch:
0,05 ml K-Glutamat, 1 M, pH 7,3,
0,05 ml K-Malat, 1 M, pH 7,3,
0,10 ml K-Malonat, 1 M, pH 7,3.

III) Succinat ersetzt durch:
0,10 ml K-Ascorbat, 0,5 M, pH 7,3,
0,o5 ml TMPD, 0,1 M (Äthanol), Medium 3 erhöht auf 19,15 ml.

IV) Succinat ersetzt durch:
0,20 ml K-Hydroxybutyrat, 1 M, pH 7,3.

Nach Zugabe von 30 bis 50 µl Mitochondrien-Suspension (ca. 3 mg Protein) mit der Eppendorf-Pipette wurde das Gefäß mit dem Hahn verschlossen (Fig.9 b,S.19) und weiter gerührt bis konstante Atmungsgeschwindigkeit erreicht war.

Jetzt wurde vor jeder weiteren Zugabe durch den Einfüllstutzen (Zusätze, Fig.9 b) der Rührmotor abgestellt und nach Zugabe sofort wieder an. Der Zusatz erfolgte mit Hamilton-Spritzen, 10 bis 50 µl. Das Einspritzen mußte sehr schnell vor sich gehen, um nicht zuviel Luft eindiffundieren zu lassen (wenn der Vorgang schnell genug erfolgt, kann die minimal eindiffundierende Luft vernachlässigt werden).

Allgemeine Zusätze:
ADP, 40 mM
DNP, 10 mM, pH 7 mit KOH
KCN, 0,1 M
Rotenon, 2 mM (Äthanol)
Dicoumarol, 20 mM, pH ca.7,4 mit KOH
CCCP, 1 mM, Tris-Salz, pH 7,4
Oligomycin, 0,5 mM (Äthanol) bei MG 400

Sobald der Sauerstoff im Reaktionsgefäß verbraucht ist, muß das Gefäß gut ausgespühlt werden, da die Membran der Elektrode gegen verschiedene Chemikalien, sowie organische Lösungsmittel sehr empfindlich ist. Zudem muß die Elektrode immer feucht bleiben.

3.Proteinbestimmung

a.Biuret, mit Desoxycholat[46].

Lösungen, I: 5 % Desoxycholat
II: 2,25 % Kaliumnatriumtartrat in 0,2 N NaOH,
anschließend 0,75 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ und 1,25 % KJ.
III: 200 ml von B mit 300 ml 0,2 N NaOH
(Biuret-Reagens, aufbewahrt in brauner Flasche).

Zur Probe 100 µl Mitochondrien-Suspension (60 bis 100 mg/ml Protein), 200 µl der Lösung A gegeben. Nach gutem Durchmischen 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen, 5 ml Lösung C addiert, mit dest.Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Extinktion bei 546 nm (Eppendorf-Photometer) in einer 2 cm Küvette (gegen Luft) gemessen. Die Leerprobe enthielt 5 ml Biuret-Reagens (Lösung C), 200 µl Lösung A, sowie 4,8 ml Wasser.

Der Faktor der Biuret-Lösung wurde mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Der Faktor lag bei 19 bis 20.

Die Proteinmenge ergab sich somit zu:

ΔE_{546} · Faktor des Biuret-Reagenses = mg Protein im Bestimmungsansatz.

b.Lowry[58].

Lösungen, I: 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH
II: 1 % $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
III: 2 % Natriumkaliumtartrat
IV: 50 ml von A mit 0,5 ml von B und 0,5 ml von C
V: 10 ml Folinreagens in 12 ml Wasser

Zur Probe , 200 µl (bis zu 100 µg Protein), wurde 1 ml der Lösung C gegeben. Nach gutem Durchmischen ließ man die Probe 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen und gab 100 µl der Lösung E zu. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Extinktion an einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 gemessen.

Bei Proben mit 5 bis 25 µg Protein wurde bei 750 nm Wellenlänge gemessen und bei höherer Proteinmenge bei 500 nm.

Als Standard und zur Bestimmung der Eichkurve wurde Rinderserum-albumin verwendet.

4.SDS-Gelelektrophorese

a.Beechey-Methode [16]. Polyacrylamid-Gele (6 mm·100 mm) wurden hergestellt aus einer Acrylamid-Stammlösung; 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7, 1 % SDS (w/v); frisch bereiteter 1,5 % Persulfat-Lösung (w/v) und N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminoäthan im Volumen-Verhältnis von 15/13,5/1,5/0,04.

Die Acrylamid-Lösung bestand aus 20 % Acrylamid (w/v), 0,6 % N,N'-Methylendiacrylamid (w/v) und 1 % SDS in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.

Die Gele wurden 1 Stunde bei 4 mA/Gel vorlaufen lassen.

Die Proben (20 bis 30 µl) wurden 30 Minuten bei 50°C in 1 ml Denaturierungspuffer (3 % SDS w/v , 5 mM EDTA, 5 mM DTT und 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7) geschüttelt, bevor sie auf die Gele aufgetragen wurden. Mitochondrien-Suspensionen mit 60 bis 100 mg Protein/ml wurden direkt in diesem Puffer denaturiert. Danach wurde 0,1 ml Glycerin, sowie 1 Tropfen 0,5 % Bromphenolblau (w/v) in Wasser addiert. Auf die Gele wurde 50 bis 100 µl der Probelösung (80 bis 150 µg Protein) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7, 1 % SDS (w/v) bei 6 mA/Gel unter Wasserkühlung und leichtem Rühren des Elektrophorese-Puffers, solange bis die Bromphenolblau-Bande ca. 2 cm vom Ende entfernt war (etwa nach 4 Stunden). Die Bande wurde markiert durch Einstich mittels Nadel.

Die Gele wurden 20 Stunden fixiert und vom SDS freigewaschen durch 50 % Trichloressigsäure (w/v); angefärbt durch 2 Stunden Stehen in 0,25 % Coomassie-Brilliant-Blau (w/v) in 20 % Trichloressigsäure (w/v) und entfärbt durch 4 bis 5 Tage waschen mit 7 % Essigsäure (v/v). Beim Waschen die Medien mehrmals erneuern.

Die Protein-Verteilung auf dem Gel wurde gewonnen mit dem Zeiss-Densitometer bei 550 nm, nach dem Entfärben der Gele.

Die Radioaktivitäts-Verteilung im Gel wurde indiziert durch Schneiden der Gele direkt nach dem Elektrophorese-Lauf in 1 mm Scheiben mit einem Gel-Slicer (The Mickle Laboratory Engineering Co, Gomshall, Surrey, U.K.). Die Gele wurden dazu mit Wasser durch CO_2-Schnee auf der Schneide-Plattform angefroren. Jede Scheibe wurde mit 500 µl 28 % H_2O_2 (w/v) in Scintillations-Gläsern durch

Erhitzen auf 60°C und 24 Stunden schütteln mit einem Mini-Shaker (Braun-Melsungen) gelöst.

Zur Messung der Radioaktivität wurde zu jeder Probe 10 ml Insta-Gel (Packard-Instrument) addiert und im Packard-Scintillationszähler (LSC-2450) gezählt.

Eine Molekulargewichts-Standardkurve wurde erhalten mit Rinderserumalbumin, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Cytochrom c und Insulin mittels Zeiss-Densitometer bei 550 nm nach dem Entfärben

b.1.Variation der Beechey-Methode. Polyacrylamid-Gele wurden hergestellt mit 0,1 M Na-acetat-Puffer, pH 5, 1 % SDS. Mit diesen Gelen wurde kein Vorlauf durchgeführt.

Der Denaturierungspuffer wurde ersetzt durch 0,1 M Na-acetat-Puffer, pH 5, 3 % SDS, 5 mM EDTA - einmal mit, einmal ohne 5 mM DTT; Probenmenge 20 bis 100 µl; Auftrag 20 bis 100 µl (30 bis 150 µg Protein).

Die Elektrophorese erfolgte in 0,1 M Na-acetat-Puffer, pH 5, 1 % SDS bei 6 mA/Gel unter Wasserkühlung und leichtem Rühren des Elektrophorese-Puffers, solange bis die Bromphenolblau-Bande ca. 2 cm vom Ende entfernt war (2 bis 3 Stunden).

c.2.Variation der Beechey-Methode. Polyacrylamid-Gele wurden hergestellt mit der Acrylamid-Stammlösung; 0,1 M Na-acetat-Puffer, pH 5, 1 % SDS; Persulfat-Lösung und N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminoäthan im Volumen-Verhältnis von 15/4/1/0,04.

Wie bei b) Ersatz des Phosphat-Puffers durch Acetat-Puffer in der Acrylamid-Lösung.

Polymerisation im Dunkelraum mit Infrarot-Licht; kein Vorlauf.

Elektrophorese in Acetat-Puffer unter Wasserkühlung und leichtem Rühren 10 Minuten bei 4 mA/Gel, 10 Minuten bei 6 mA/Gel und 1 1/2 Stunden bei 8 mA /Gel.

--- Die genaue Menge des aufgegebenen Proteines, sowie die jeweilige Elektrophorese-Bedingung, wurde bei den erhaltenen Verteilungskurven angegeben.---

5.Mitochondriale Thiol-Gruppen-Bestimmung mit 14C-NSPM

Die Bestimmungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ausgeführt
In die Gefäße wurde 1 ml luftgesättigte Reaktionslösung, sowie
30 bis 40 µl (2 bis 3 mg Protein) Mitochondrien-Suspension
pipettiert und gut gerüttelt (Rotationsmischer 3300 Eppendorf).

Reaktionsmedien:

a) 3,90 ml Medium 3 (0,25 M Saccharose, 20 mM Tris-HCl,pH 7,3);
   80 µl KCl, 1 M; 20 µl $MgCl_2$, 1 M.
b) 3,86 ml Medium 3; 80 µl KCl; 20 µl $MgCl_2$;
   10 µl Glutamat, 1 M; 10 µl Malat, 1 M; 20 µl Malonat, 1 M.
c) 3,82 ml Medium 3; 80 µl KCl; 20 µl $MgCl_2$; 40 µl K-Phosphat, 1 M,
   pH 7,3; 10 µl Glutamat; 10 µl Malat; 20 µl Malonat.
d) 3,74 ml Medium 3; 80 µl KCl; 20 µl $MgCl_2$;
   10 µl Glutamat; 10 µl Malat; 20 µl Malonat -
   zu 1 ml dieser Mischung: 30 µl ADP, 84 mM.
e) 3,70 ml Medium 3; 80 µl KCl; 20 µl $MgCl_2$; 40 µl Phosphat;
   10 µl Glutamat; 10 µl Malat; 20 µl Malonat.
f) Medium 3.

Nach 1 Minute (bei e, 30 - 60 - 90 Sekunden nach 30 µl ADP,84 mM
rütteln, entsprechende Menge, frisch in Äthanol gelöstes, 14C-NSPM,
10 mM, zugegeben und 1 1/2 Minuten (bei f, der Thiol-Gruppen-
Titration, 5 Minuten) reagieren lassen. Nun 100 µl Cystein·HCl,0,1 M
zugemischt, 5 Minuten gerüttelt, mit 200 µl 50 % Trichloressigsäure
das Protein gefällt, nach 5 Minuten rütteln in der Tischzentrifuge
(Eppendorf 3200) zentrifugiert. Den Überstand vorsichtig in
Scintillationsgläser (mit 10 ml Insta-Gel) pipettiert, das Pellet
noch zweimal mit 200 µl 50 % Trichloressigsäure gewaschen und die
Waschflüssigkeit zum Überstand gemischt. Die Radioaktivität des
Überstandes im Packard-Scintillationszähler (LSC-2450) gemessen,
ebenso die Radioaktivität des Pellets nach dem Lösen in 400 µl
Ameisensäure (mit 10 ml Insta-Gel).

Bei jeder Messung erfolgten drei Bestimmungen nebeneinander,
außerdem wurden diese entweder alle bei 5°C oder 25°C ausgeführt.
--- Das Schema zu diesen Bestimmungen ist im Hauptteil (S.58)
angegeben.---

6.Herstellung radioaktiv markierter Mitochondrien

a.zur Elektrophorese. 200 bis 600 µl Mitochondrien-Suspension in 0,25 M Saccharose, 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 (70 bis 120 mg Prot/ml) wurde über Nacht bei 4°C mit der entsprechenden Menge radioaktiver Reagentien-Lösung inkubiert.

Die Angabe der jeweiligen Menge erfolgte bei den radioaktiven Verteilungskurven im Hauptteil.

Ein Teil der Proben wurde dreimal mit 1 ml Äthanol gewaschen und anschließend mit Acetat-Puffer (Phosphat-Puffer) wieder unter Lösung auf das ursprüngliche Volumen gebracht.

b.zur Extraktion. 5 ml Mitochondrien-Suspension in 0,25 M Saccharose, 20 mM Tris-HCl, pH 7,3 (65 bis 72,5 mg Protein/ml) wurde über Nacht bei 4°C mit 7 bis 8 nMol/mg Protein radioaktiver Verbindung inkubiert. Diese Konzentration entspricht etwa der, für 95 % Inhibierung der oxydativen Phosphorylierung mit NSPM, notwendigen Menge.

Die verwendeten Mitochondrien-Suspensionen wurden auf Atmungskontrolle getestet. Es wurden nur Präparationen mit einer RCR von 5 bis 6 für Glutamat,Malat als Substrat benutzt (ebenso bei a).

Je zweimal 100 µl der radioaktiven Mitochondrien-Suspension wurden zur Elektrophorese vorbereitet. Eine Probe wurde mit Äthanol gewaschen, die Kontrolle nicht.

7.Extraktion der radioaktiv markierten Mitochondrien

Es werden hier die im Hauptteil (S.48 ,54 ,57) gezeigten Schemata experimentell belegt.

Zur Extraktion wurde die Mitochondrien-Suspension gleich in Zentrifugengläsern (30 ml), passend zum 60 TI Rotor der Beckman L_5-75 Ultrazentrifuge, inkubiert.

Sämtliche folgenden Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt.

a.Äthanol-Extraktion. Die Gläser mit der radioaktiven Mitochondrien-Suspension wurden zunächst halb mit Äthanol gefüllt, 15 Min. geschüttelt (Whirlmix, Cenco Instruments, 1 Probe), dann ganz mit Äthanol gefüllt, verschlossen und 5 Minuten bei 8000 g (Beckman,

L_5-75 Ultrazentrifuge, TI-60 Rotor,10000 Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert über Filterpapier und bei 30°C im Vakuum eingeengt.

Das Pellet wurde mit Acetat-Puffer auf das Anfangsvolumen wie vor Extraktion gelöst und eine Probe daraus zur Elektrophorese vorbereitet.

b.Äther-Extraktion des Äthanol-Rückstandes. Den Äthanol-Rückstan bei 4°C in Äther stehen lassen (anfangs mehrmals geschüttelt), nach zwei Tagen die Äther-Phase vorsichtig mit einer Pipette abgehoben. Diese Procedur noch zweimal wiederholt, jetzt allerdings nur noch zwei Stunden stehen lassen.

Die Äther-Phase bei 30°C im Vakuum zur Trockene eingeengt, ebenso den Rückstand.

c.Chloroform/Methanol-Extraktion der Rückstände aus b. Mit einer Mischung aus 2:1-$CHCl_3$/MeOH die beiden Rückstände aus b) dreimal extrahiert: Dabei die Mischung zum Rückstand gegeben, mehrmals geschüttelt, 1 Stunde stehen lassen und mit einer Pipette abgehoben.

Den Rückstand bei 30°C im Vakuum zur Trockene eingeengt und in wenigen ml Wasser aufgenommen.

--- Es wurden so zum Schluß der verschiedenen Extraktionen zwei $CHCl_3$/MeOH- sowie zwei Wasser-Lösungen erhalten, welche mittels Säulenchromatographie weiter getrennt werden konnten. Zudem wurden die Lösungen dünnschichtchromatographisch untersucht.---

8.Säulenchromatographie

a.Sephadex-LH_{20}-Trennung der $CHCl_3$/MeOH-Extrakte [80]. Die $CHCl_3$/MeOH-Extrakte der radioaktiv inkubierten Mitochondrien wurden auf einer Sephadex-LH_{20}-Säule (1,8·40 cm, 35 cm Gel und 1,5 cm Sand), welche nach der Methode von Soto [80] präpariert wurde, getrennt.

Die Säule wurde equilibriert mit $CHCl_3$ und 1 ml Extrakt wurde aufgegeben. Es wurde mit folgender Lösugsmittelsequenz eluiert:

100 ml $CHCl_3$, 20 ml $CHCl_3$/MeOH (15:1,v/v), 20 ml $CHCl_3$/MeOH (10:1,v/v), 20 ml $CHCl_3$/MeOH (8:1,v/v), 20 ml $CHCl_3$/MeOH (6:1,v/v), 20 ml $CHCl_3$/MeOH (4:1,v/v), 20 ml $CHCl_3$/MeOH (2:1,v/v), 100 ml $CHCl_3$/MeOH (1:1,v/v).

Der Verlauf der Eluierung wurde kontinuierlich durch UV-Absorption des Eluats bei 254 nm mit dem Uvicord Typ I (LKB,Stockhol verfolgt, zusätzlich wurde das Eluat noch mit einem Differential-Refraktiometer R 403 (Waters Messtechnik GmbH) kontrolliert.

Die Fraktionen (5 bis 6 ml) wurden mit einem synchron dazu gesteuerten Fraktionssammler Ultrarac (LKB,Stockholm) aufgefangen.

Eine 100 µl Probe der einzelnen Fraktionen wurde mit 10 ml Scinti-Gel (Roth) vermischt und nach 30 Minuten wurde die Radioaktivität im Packard-Scintillationszähler (LSC-2450) gemessen.
--- Eine typische Elutionskurve dazu ist im Hauptteil (S.51) zu sehen.---

b.Sephadex-LH_{20}-Trennung der wässrigen Extrakte. Die H_2O-Extrakt der radioaktiv incubierten Mitochondrien wurden auf einer Sephadex-LH_{20}-Säule (2,5·100 cm, 95 cm Gel) getrennt. Das Sephadex wurde analog der Soto-Methode vorgereinigt, jetzt aber in Wasser gequollen

Die Säule wurde mit Wasser equilibriert, 1 ml Extrakt wurde aufgegeben und mit Wasser eluiert.

Der Verlauf der Eluierung wurde kontinuierlich durch UV-Absorption des Eluats bei 254 nm mit dem Uvicord Typ I (LKB,Stockholm) aufgefangen.

Eine 100 µl Probe der einzelnen Fraktionen wurde mit 10 ml Insta-Gel (Packard-Instrument) vermischt und nach 30 Minuten wurde die Radioaktivität im Packard-Scintillationszähler (LSC-2450) gemessen.
--- Elutionskurven dazu im Hauptteil (S.52,55).---

Mit Sephadex G-50, medium, als Trägermaterial wurde analog verfahren. Es war hiermit jedoch keine Trennung zu erzielen.

9. Aminosäureanalyse

Die quantitative Bstimmung der Aminosäuren im Totalhydrolysat erfolgte mit dem Beckmann-Analysator Unichrom C nach der Methode von Stein und Moore [81], sowie dem automatischen Aminosäure-analysator der Firma Biotronik.

Zur Totalhydrolyse wurde die Probe mit 6 N HCl 20 Stunden bei 110°C im geschlossenen Röhrchen gehalten und dann filtriert, eingeengt und getrocknet im Exsikkator über P_4O_{10}/KOH.

Zum Vergleich wurde Glutathion mit NSPM (1:1) reagieren lassen, analog den Protein-^{14}C-Verbindungen behandelt und der Aminosäure-analyse unterworfen. Dasselbe wurde auch mit Cystein und NSPM durchgeführt. Das freie Glutathion-Totalhydrolysat, sowie das freie Cystein, wurde ebenfalls im Aminosäureanalysator untersucht.

Reaktionsansatz von Glutathion und NSPM:
0,126 g NSPM (0,333 mMol) + 0,102 g Glutathion (red., 0,333 mMol) in 2 ml Äthanol/0,2 ml H_2O 2 Stunden bei 25°C gerührt, eingeengt und getrocknet (analog erfolgte der Umsatz von Cystein·HCl mit NSPM).

10. Dünnschichtchromatographie, Anfärbereagentien

Verwendet wurden DC-Fertigplatten:

I) Kieselgel F_{254}, Schichtdicke 0,25 mm (Merck)
II) Kieselgel F_{254}, Schichtdicke 2 mm (Merck)
III) Aluminium-Oxyd G, Schichtdicke 0,25 mm (neutral, Typ E, Merck)
IV) Mikropolyamid-Fertigfolie F 1700 (Schleicher u. Schüll)

Als Laufmittel diente:

a) $CHCl_3$/MeOH/H_2O/NH_3 cc. - 130/70/8/0,5 [8]
b) $CHCl_3$/MeOH/H_2O/AcOH- 50/30/4/8 [76]
c) $CHCl_3$/MeOH/NH_3 cc.- 85/35/5 [30]
d) Benzol -

Anfärbereagentien:

1) zum Nachweis der cyclischen Maleinimide [86]

Lösung a: 20 g Hydroxylammoniumchlorid in 50 ml Wasser lösen. Die Lösung mit Äthanol auf 200 ml auffüllen und kühl lagern.

Lösung b: 50 g Kaliumhydroxyd in möglichst wenig Wasser lösen. Dann mit Äthanol auf 500 ml auffüllen.

Sprühlösung I: 1 Vol. a mit 2 Vol. b mischen. Das ausfallende KCl abfiltrieren. Die so erhaltene Sprühlösung im Kühlschrank aufbewahren (ca. 2 Wochen haltbar).

Sprühlösung II: 10 g feinstgepulvertes Fe(III)-chlorid ($FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$) in 20 ml HCl (36 %ig) lösen. Die Lösung solange mit 200 ml Diäthyläther schütteln, bis eine homogene Mischung entstanden ist. Dise Lösung ist gut verschlossen längere Zeit haltbar.

2) zum Nachweis von Thiouracil [38]

Sprühlösung: 0,5 g Nitroprussid-Natrium werden in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 0,5 g Hydroxylammoniumchlorid und 1 g Natriumhydrogencarbonat versetzt. Nach dem Aufhören der Gasentwicklung werden 2 Tropfen Brom zugefügt Dann wird mit Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Das Reagenz ist etwa 2 Wochen haltbar.

3) zum Nachweis von Phospholipiden (Molybdän-Spray) [31]

Lösung a: Zu 200 ml 25 N H_2SO_4 8,02 g MoO_3 addieren und leicht erhitzen bis eine Lösung vorliegt.

Lösung b: In 100 ml a 0,356 g Mo-Staub 15 Minuten kochen. Die Lösung kühlen und vom ungelösten Rückstand dekantieren.

Sprühlösung: Gleiche Volumen a und b mischen. Zur Mischung 2 Vol. Wasser geben. Die Lösung hat eine grün-gelbe Farbe und ist Monate haltbar.

Die Platten werden leicht besprüht, bis sie gleichmäßig feucht sind. Anschließend werden sie bei 80°C getrocknet.

4) zum Nachweis von Aminogruppen (Ninhydrin-Spray)

Sprühlösung: 1,2 g Ninhydrin in 30 ml 2 N AcOH, 350 ml n-BuOH und 600 ml MeOH.

Die DC-Platten auf 110°C erwärmen, besprühen und anschließend 10 Minuten bei 110°C bis zur optimalen Farbentwicklung erhitzen.

Das Molybdän-Spray (3) und das Ninhydrin-Reagenz (4) wurde meist zusammen benutzt. Dazu wurden die DC-Platten zunächst mit Reagenz (4), anschließend mit Reagenz (3) behandelt.

11.Weitere Hilfsmittel

Die DC-Platten mit den radioaktiven Proben wurden nach dem Lauf (vor dem Besprühen) mit Isotopenkamera (Birchover Instruments LTD) sowie Dünnschichtscanner (Berthold, Typ LB 2723) auf radioaktive Banden untersucht.

UV-Spektren wurden mit einem Spektrophotometer Unicam SP 800 (Leitz,Wetzlar) aufgenommen.

Die Massenspektren fertigte Herr Dr. W.Otting im Hause an, im Hause wurden auch die NMR-Spektren von Herrn H.Griebel aufgenommen. Die Elementaranalysen sind von Frl. E.Crummenerl und Herrn G.Riethmüller, die Aminosäureanalysen von Herrn Dr. G.Georgopoulos. Ihnen allen ist an dieser Stelle herzlich zu danken. Zu danken habe ich außerdem den Technikern J.Briaire, H.Gaugler und B.Küchler für ihre Hilfsbereitschaft.

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert und wurden im Schmelzpunktsapparat Modell Dr.Tottoli (Büchi, Schweiz) bestimmt.

Zur Charakterisierung und Identifizierung der einzelnen Verbindungen wurden außerdem noch die Siedepunkte, Brechungsindices, IR-Spektroskopie sowie die Gaschromatograhie herangezogen.

Lösungsmittel. Es wurden nur reinste Lösungsmittel-hauptsächlich von Merck - verwendet, welche teilweise wasserfrei gemacht werden mußten nach herkömmlichen Methoden: Äthanol wurde über Mg-Spänen getrocknet, Äther absolutiert über Na-Draht, Aceton über Molekularsi

Käufliche Chemikalien und Biochemikalien.

Bayer: Tert.Butylisocyanat

BDH chemicals Ltd: Lecitin in $CHCl_3$/MeOH, Cardiolipin vom Rind

Biomol: Phosphatidylinosit, Dithiothreitol (DTT), N-Äthylmaleinimid (NEM)

Boehringer: α-Ketoglutarsäure, Antimycin A, Adenosindiphosphat-Di-Na-Salz (ADP), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel), Cytochrom c (Pferdeherz)

Calbiochem.,San Diego: Phosphatidylserin, Desoxycholsäure

Fluka: L-Glutaminsäure-Mono-K-Salz, 4-Acetaminobenzolsulfochlori Maleinsäureanhydrid, Essigsäureanhydrid, n-Nonylamin,

Ammoniumthiocyanat, Thioharnstoff, N-Methylthioharnstoff, N-Äthylthioharnstoff, 4(6)-Methyl-2-Thiouracil, 4(6)-Propyl-2-Thiouracil

Merck: L(+)-Ascorbinsäure, N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin, Malonsäure, DL-Äpfelsäure, Cystein-Hydrochlorid, 3,3'-Methylen-bis(4-hydroxycumarin) oder Dicoumarin, Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), DL-Liponsäure, Bernsteinsäureanhydrid, Tert-Butylchlorid, Caprinsäurechlorid, Seesand mit Säure gereinigt und geglüht

Pierce chem.Comp.: Spingomyelin, Phosphatidyläthanolamin

Riedel de Haen: Bernsteinsäure

Serva: DL-ß-Hydroxybuttersäure-Na-Salz, Coenzym Q 10, m-Chlorocarbonyl-cyanidephenylhydrazone (CCCP), Albumin aus Rinderserum

Sigma: Rotenone, Oligomycin, Insulin aus Rinder-Pankreas.

Die nicht aufgeführten Verbindungen waren meist von Merck und Biomol (SDS-Gelelektrophorese-Reagentien). Es wurden nur analysensaubere Substanzen benutzt.

B.Synthesen

1.N-n-Alkyl-Thioharnstoffe

Die Darstellung der N-n-Alkyl-Thioharnstoffe erfolgte nach den Vorschriften von Nair [63], sowie meiner Diplomarbeit [50].

2.N-n-Nonyl-Harnstoff

Die Darstellung erfolgte in Analogie zur Synthese des N-n-Nonyl-Thioharnstoffes.

a.1-n-Nonyl-3-tert.Butyl-Harnstoff. 4,95 g (0,05 Mol) tert. Butylisocyanat in 25 ml Petroläther eingetropft in eine Lösung von 7,16 g (0,05 Mol) n-Nonylamin in 25 ml Petroläther bei 2 bis 6°C. 3 Stunden bei 25°C rühren lassen, im Vakuum bis 40°C zur Trockene eingeengt. Alle Kristallisationsversuche schlugen fehl.

Ausbeute: 12,47 g Öl (feucht).

b.N-n-Nonyl-Harnstoff. 12,47 g (ca.0,05 Mol) 1-n-Nonyl-3-tert. Butyl-Harnstoff in 50 ml HCl conc. auf 75 bis 105°C aufgeheizt, dabei innerhalb 45 Minuten tert.Butylchlorid abdestilliert, abgekühlt, mit NH_3 conc. (ca.48 ml) neutralisiert, abgesaugt, gewaschen mit viel Wasser, getrocknet über KOH und H_2SO_4 conc. im Vakuum über Nacht.

Ausbeute: 8,8 g (94,4 %); Smp. 106°C; DC-Ia: 1 Fleck

$C_{10}H_{22}N_2S$ (186,36) Ber.: C 64,5 H 11,81 N 15,05

Gef.: C 64,29 H 11,94 N 15,00

NMR: sauberes Produkt.

3.N-n-Cetyl-Harnstoff

Die Darstellung erfolgte in Analogie zur Synthese des N-n-Nonyl-Thioharnstoffes.

4.Acetnonylamid

14,3 g (0,1 Mol) n-Nonylamin in 100 ml Dioxan gelöst, 10,2 g

(0,1 Mol) Essigsäureanhydrid zugetropft und 2 Stunden sieden lassen. Das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, dann im Hochvakuum bei 4 mm destilliert. $Kp._4$: 150 bis 155°C; Ausbeute: 11,3 g (61 %)

$C_{11}H_{23}NO$ (185,3) Ber.: C 71,29 H 12,51 N 7,56
Gef.: C 71,16 H 12,78 N 7,41

5.6-n-Alkyl-2-Thiouracile

Die Darstellung der 6-n-Alkyl-2-Thiouracile erfolgte nach den Vorschriften von Anderson et al [4], sowie meiner Diplomarbeit [50].

6.6-n-Nonyl-Uracil

Die Darstellung erfolgte in Analogie zur Synthese des 6-n-Nonyl-2-Thiouracils.

1,15 g (0,05 g-Atom) metall.Na verteilt in 25 ml wasserfreiem Äthanol; 2,1 g (0,035 Mol) Harnstoff und 6,06 g (0,021 Mol) n-Caprinessigester (85 %ig) zur klaren Lösung gegeben. Die Mischung 6 1/2 Stunden bei Rückflußtemperatur gekocht, über Nacht bei Raumtemperatur rühren lassen. Eingeengt bis 50°C im Vakuum zur Trockene, den Rückstand in 25 ml Wasser gelöst. Das Produkt (Schmiere) ausgefällt mit 3,5 ml HCl conc. und nachfolgendem Ansäuern zu pH 4 mit Eisessig. Das Rohprodukt in wenig Petroläther verrührt, abgesaugt und umkristallisiert aus Äthanol, getrocknet im Vakuum über Nacht mit P_4O_{10} bei 60°C.

Ausbeute: 1,27 g (26,6 %); Smp. 161°C; NMR: sauberes Produkt.

$C_{13}H_{22}N_2O_2$ (238,48) Ber.: C 65,5 H 9,23 N 11,73
Gef.: C 65,58 H 9,33 N 11,86

7.6-n-Nonyl-2-[^{14}C-]Thiouracil

Eingesetzt wurden 2 mCi ^{14}C-Thioharnstoff (NEN), geliefert als 4 ml Äthanol-Lösung mit einer Aktivität von 56 mCi/mMol und 2,8 mg Trockensubstanz.

In Vorversuchen mit inaktivem Material wurde die Synthese eingehend untersucht und die folgende beschriebene Vorschrift für die mikropräparative Synthese ausgearbeitet.

a) 1,15 g (0,05 g-Atom) metall.Na wurde in 25 ml absol.Äthanol verteilt.

b) In einem 5 ml Kolben wurde die Lösung des ^{14}C-Thioharnstoffes zusammen mit 35,2 mg inaktivem Thioharnstoff im N_2-Strom bei 70 bis 80°C langsam zur Trockne eingeengt. Auf diese Weise wurden 38 mg (0,5 mMol) ^{14}C-Thioharnstoff mit einer Radioaktivität von 4 mC/mMol erhalten. Mit Eppendorf-Pipetten wurde unter Rühren (Magnetkern) 200 µl (ca.0,7 mMol, 85 %ig) n-Caprinessigester sowie 500 µl Na-Äthylat in Äthanol (1 mg Atom a) einpipettiert und auf Rückflußtemperatur erhitzt (Luftkühlung mit Mikrokühler). Es wurde 6 1/2 Stunden bei Rückflußtemperatur gerührt, wobei sich langsam ein Niederschlag bildete. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Sodann wurde der Ansatz im Wasserstrahlvakuum bis 50°C zur Trockene eingeengt. Nach Addition von 1,5 ml Wasser, 70 µl HCl conc., sowie 20 µl Eisessig wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, abgenutscht im Wasserstrahlvakuum (dabei gut mit Wasser gewaschen). Das so erhaltene Produkt wurde 24 Stunden im Vakuum bei 25°C über KOH und H_2SO_4 getrocknet.

Bei 5 Vorversuchen mit inaktivem Material lagen die Ausbeuten zwischen 121 und 126 mg, was 95 bis 99 % der Theorie entspricht.

Der Schmelzpunkt lag bei 138 bis 139°C. CHN-Analysen waren in Ordnung. Das UV-Spektrum der Äthanol-Lösung zeigte einen charakteristischen Peak bei 275 nm. DC-Ia2: 1 pos.Fleck.

Die Ausbeute beim radioaktiven Ansatz betrug 124,8 mg (98 %). Das UV-Spektrum der Äthanol-Lösung stimmte mit den inaktiven Produkten überein, genauso auch die DC. Der Dünnschicht-Scanner zeigte jedoch auf der Platte (nach DC) zwei radioaktive Banden: Das Produkt war mit 25 % radioaktiv verunreinigt.

Die Reinigung wurde dünnschichtchromatographisch durchgeführt, System IIa: 60 mg aktive Substanz wurde in 5 ml Äthanol und 1 ml Aceton gelöst, aufgetragen und getrennt. Die UV-absorbierende Bande wurde von der Platte gelöst, mit 25 ml Äthanol eluiert, das Eluat zur Trockene eingeengt. Es wurden so 30 mg 9,5 % radioaktiv verunreinigtes Produkt erhalten.

Eine 2. anschließende präp.Trennung ergab schließlich 16 mg 100 % radioaktiv sauberes Produkt, welches in 3,14 ml Äthanol gelöst wurde.

Es stand somit eine 20 mM Äthanol-Lösung von ^{14}C-NTU mit einer spez.Aktivität von 1,9 mCi/mMol zur Verfügung.

8.6-n-Nonyl-2-[^{35}S-]Thiouracil

Eingesetzt wurden 10 mCi ^{35}S-Thioharnstoff (NEN), geliefert als 28,6 mg Trockensubstanz mit einer Aktivität von 26,3 mCi/mMol.

Die Synthese erfolgte analog der des ^{14}C-NTU.

In einen 5 ml Kolben 9,4 mg inaktiven Thioharnstoff eingewogen, mit Aceton aus der Ampulle aktiven Thioharnstoff eingegeben und mit einem N_2-Strom bei 40 bis 50°C langsam wieder zur Trockene eingeengt Auf diese Weise wurden 38 mg (0,5 mMol) ^{35}S-Thioharnstoff mit einer Radioaktivität von 19,8 mCi/mMol erhalten.

Das Produkt beim Abnutschen mit sehr viel Wasser gewaschen und für 2 Tage im Vakuum über KOH, P_4O_{10} und H_2SO_4 getrocknet.

Die Ausbeute betrug 116,2 mg (91 %), nach DC-Ia (254 nm) sehr schwach verunreinigte - radiochemisch saubere Substanz, welche in 8 ml Äthanol und 2 ml Aceton gelöst wurde.

Es stand somit eine 45,66 mM Äthanol/Aceton-Lösung von ^{35}S-NTU mit einer spez.Aktivität von 10,3 mCi/mMol zur Verfügung.

9.N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid

Die Darstellung erfolgte nach den Vorschriften von Merz et al [61] sowie meiner Diplomarbeit [50].

a.N^4-Acetyl-N^1-n-Nonylsulfanilamid. 28,8 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ (0,1 Mo in 100 ml Wasser und 10 ml Äthanol gelöst, dazu 40 ml (31,5 g; 0,22 Mol) n-Nonylamin eingerührt; 46,74 g 4-Acetaminobenzolsulfochlorid (0,2 Mol) portionsweise innerhalb 5 Minuten zwischen 30 und 40°C zugegeben, mit 150 ml Wasser und 15 ml Äthanol verdünnt. Nun 18 Stunden bei 30°C gerührt, abgesaugt, gut mit viel Wasser gewasche und getrocknet über KOH und H_2SO_4 im Vakuum für 24 Stunden.

Ausbeute: 58,4 g (85,6 %); Smp. 110°C

$C_{17}H_{28}N_2O_3S$ (340,45) Ber.: C 59,2 H 8,22 N 8,22
Gef.: C 59,53 H 8,25 N 8,4

b.N^1-n-Nonylsulfanilamid. 17,02 g N^4-Acetyl-N^1-n-Nonylsulfanil-

amid (0,05 Mol) 1 Stunde mit 80 ml 18,5 %iger HCl Rückfluß gekocht, abgekühlt, unter Eiskühlung mit Na_2CO_3-Lösung (mit ca. 63 g $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ in 110 ml Wasser) auf pH 6 eigestellt, abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen, getrocknet über P_4O_{10}, KOH und H_2SO_4 im Vakuum bei 50°C. Die Analysen (IR, MS, Cl-Bestimmung) ergaben eine Mischung der gewünschten Verbindung mit dem zugehörenden Hydrochlorid (38/62%). Die Trennung erfolgte durch Umkristallisieren aus Toluol (275 ml plus 13,8 g Mischung, Smp. 117-203°C). Beim Rückstand handelte es sich um das Hydrochlorid (Smp. 216-217°C).

Kristallisat-Ausbeute: 5,3 g (35,5 %); Smp. 116°C

$C_{15}H_{26}N_2O_2S$	(298,45)	Ber.:	C 60,3	H 8,71	N 9,38	Cl 0
		Gef.:	C 60,98	H 9,08	N 8,96	Cl 0

c.N^4-Maleoyl-N^1-n-Nonylsulfanilamid. 14,4 g N^1-n-Nonylsulfanilamid (ca.0,048 Mol)- Mischung mit dem Hydrochlorid - in 55 ml wasserfreiem Aceton gerührt, bei 40°C 4,73 g (0,048 Mol) Maleinsäureanhydrid in 20 ml wasserfreiem Aceton zugetropft (Gelbfärbung), 3 1/2 Stunden bei 30°C gerührt ($CaCl_2$-Rohr; starker Niederschlag nach 15 Minuten), 15 Minuten bei 0°C gerührt, abgesaugt, getrocknet über Blaugel bei 75°C im Vakuum über Nacht.

Die Reinigung erfolgte über das Na-Salz: 33,2 ml 1 N NaOH plus 13,16 g Rohprodukt (Smp. ab 164°C), mit 1 N HCl bei 0°C langsam unter starkem Rühren auf pH 7 eingestellt, abgesaugt, getrocknet.

Ausbeute: 4,7 g (24,5 %); Smp. 170°C

$C_{19}H_{28}N_2O_5S$	(396,51)	Ber.:	C 57,5	H 7,06	N 7,06
		Gef.:	C 57,25	H 7,1	N 7,26

d.N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-maleinimid. 2,5 g N^4-Maleoyl N^1-n-Nonylsulfanilamid (0,0063 Mol) mit 0,38 g wasserfreiem Na-aceta und 17 ml Essigsäureanhydrid auf 100°C aufgeheizt, 10 Minuten zwischen 95 und 100°C gerührt, heiß - unter starkem Rühren - in 85 ml Wasser von 0°C einfiltriert, 2 Stunden bei 0°C gerührt (öl wird kristallin), abgesaugt, gut mit Wasser von 0°C gewaschen, getrocknet über P_4O_{10}, KOH und H_2SO_4 im Vakuum bei 50°C für 24 Std.

Ausbeute: 2,11 g (88,5 %); Smp. 90-92°C; DC-Ia1: 1 pos.Fleck

$C_{19}H_{26}N_2O_4S$	(378,51)	Ber.:	C 60,2	H 6,86	N 7,4
		Gef.:	C 60,35	H 6,9	N 7,21

NMR: 100 % nicht acetyliertes, sauberes Produkt.

10. N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-succinimid

a. N^4-Succinyl-N^1-n-Nonylsulfanilamid. 5,87 g N^1-n-Nonylsulfanilamid (ca.0,02 Mol) - Mischung mit dem Hydrochlorid - in 25 ml wasserfreiem Aceton auf 40°C erhitzt, 2 g Bernsteinsäureanhydrid (0,02 Mol) in 10 ml wasserfreiem Aceton zugetropft, 5 Stunden bei 30°C und 15 Minuten bei 0°C gerührt ($CaCl_2$-Rohr), abgesaugt, in 20 ml 1 N NaOH verrührt, filtriert und die Lösung mit 1 N HCl bei 0°C langsam unter starkem Rühren auf ca. pH 7 eingestellt (schwach sauer). Es bildete sich ein gelartiger Niederschlag, um diesen zu kristallisieren, zunächst 1 ml Äthanol und dann 20 ml Äther zugegeben, abgesaugt, gut mit Wasser von 0°C gewaschen, 4 Stunden bei 65°C über P_4O_{10} im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,9 g (11,3 %); Smp. 176°C

$C_{19}H_{30}N_2O_5S$ (398,51) Ber.: C 57,2 H 7,53 N 7,03
Gef.: C 57,52 H 7,81 N 6,45

b. N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-succinimid. 0,8 g N^4-Succiny N^1-n-Nonylsulfanilamid (0,002 Mol) mit 0,12 g wasserfreiem Na-acetat und 5,5 ml Essigsäureanhydrid auf 100°C erhitzt, 15 Minuten zwischen 95 und 100°C gerührt, heiß - unter starkem Rühren - in 30 ml Wasser von 0°C filtriert, 2 Stunden bei 0°C gerührt (Öl wird kristallin), abgesaugt, gut mit Wasser von 0°C gewaschen, 3 Stunden getrocknet über P_4O_{10} im Vakuum bei 60°C.

Ausbeute: 0,59 g (77,5 %); Smp. 105°C; DC-Ia: 1 Fleck

$C_{19}H_{28}N_2O_4S$ (380,51) Ber.: C 59,92 H 7,36 N 7,36
Gef.: C 60,47 H 7,49 N 7,24

NMR: 100 % nicht acetyliertes, sauberes Produkt.

11. N-n-Nonyl-maleinimid [19]

Zu 4,9 g Maleinsäureanhydrid (0,05 Mol) in 10 ml Xylol bei 80 bis 90°C 7,16 g n-Nonylamin (0,05 Mol) eingetropft, auf 180°C aufgeheizt und dabei Xylol mit Reaktionswasser abdestilliert, die Mischung 2 Stunden weiter bei 180°C gekocht. Bei 20 mm Hg-Säule und 200°C versucht zu destillieren, dabei ging jedoch nur sehr wenig Substanz über, die sofort bei tieferer Temperatur weiß kristallin

erstarrte. Der braune schmierige Rückstand wurde verworfen.

Ausbeute: 620 mg (5,6 %); Smp. 48°C; NMR: saubere Substanz

$C_{13}H_{21}NO_2$ (223,13) Ber.: C 69,96 H 9,42 N 6,28

Gef.: C 69,96 H 9,63 N 6,11 .

12. N^4-(N^1-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-[1,4-^{14}C-]maleinimid

Eingesetzt wurden 1 mCi [1,4-^{14}C-] Maleinsäureanhydrid (Amersham) geliefert als 4,95 mg Trockensubstanz mit einer Aktivität von 20 mCi/mMol.

In Vorversuchen mit inaktivem Material wurde die Synthese eingehend untersucht und die folgende beschriebene Vorschrift für die mikropräparative Synthese ausgearbeitet.

a. N^4-[1,4-^{14}C-]Maleoyl-N^1-n-Nonylsulfanilamid. In die Probenampulle (mit $CaCl_2$-Rohr) 77 mg N^1-n-Nonylsulfanilamid (0,258 mMol), sowie 20 mg inaktives Maleinsäureanhydrid (0,204 mMol) zu 4,95 mg aktivem [1,4-^{14}C-] Maleinsäureanhydrid (0,05 mMol - zusammen mit inaktivem: 0,254 mMol) eingewogen, dazu 0,4 ml wasserfreies Aceton und auf 40°C aufgeheizt (klare Lösung), nach einigen Sekunden bei etwa 33°C starke Niederschlagsbildung, nach verdünnen mit 1,2 ml Aceton 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Die Lösung mit Aceton in einen 10 ml Reaktionskolben gespült, im Vakuum bei 25°C eingeengt, die Ampulle nochmal mit Aceton in den Kolben ausgespült, im Vakuum bei 25°C wieder zur Trockene eingeengt.

Bei inaktiven Vorversuchen lag der Schmelzpunkt des so erhaltenen Produktes bei 170°C, DC-Ia,Ib zeigte einen Fleck.

b. N^4-(N^1-n-Nonyl-4-sulfamoylphenyl)-[1,4-^{14}C-]maleinimid. In den 10 ml Kolben (mit $CaCl_2$-Rohr) 27,5 mg Na-acetat eingewogen, 1 ml Essigsäureanhydrid zugegeben und auf 100°C aufgeheizt, 10 Minuten zwischen 95 und 100°C (nicht höher!) gerührt, schnell auf 0°C abgekühlt und unter starkem Rühren (Magnetkern) 5 ml Wasser von 0°C einpipettiert, 2 Stunden bei 0°C gerührt (Öl wird kristallin), vorsichtig abgenutscht, gut mit Wasser von 0°C gewaschen und im Vakuum über P_4O_{10}, KOH bei 50°C für 24 Stunden getrocknet.

Bei inaktiven Vorversuchen lagen die Ausbeuten bei 90 bis 95 %.

Der Schmelzpunkt war bei 92°C. CHN-Analysen waren in Ordnung. Das UV-Spektrum der frisch in Äthanol gelösten Verbindung zeigte einen charakteristischen Peak bei 244 nm, der charakteristische Peak der offenen Verbindung bei 285 nm war verschwunden (erschien jedoch wieder nach 1 bis 2 Stunden stehen der Verbindung in Äthanol). DC-Ia1: Im UV bei 254 nm 1 Fleck mit positiver Hydroxamsäurereaktion.

Die Ausbeute beim radioaktiven Ansatz betrug 96 mg (99,9 %). Das UV-Spektrum der frisch in Äthanol gelösten Verbindung zeigte das Spektrum der inaktiven sauberen Substanz. DC-Ia1: Im UV bei 254 nm ein Hauptfleck mit positiver Hydroxamsäurereaktion, sowie ein sehr schwacher Nebenfleck. Der Dünnschichtscanner zeigte ein radioaktives Produkt.

Es standen somit 96 mg Trockensubstanz von radioaktiv sauberem ^{14}C-NSPM mit einer spez.Aktivität von 3,73 mCi/mMol zur Verfügung.

13.N,N'-Dicyclohexyl-[^{14}C-]carbodiimid [2;82]

Ich ging aus von 2 mCi ^{14}C-Harnstoff geliefert als 2,08 mg Trockensubstanz mit einer Aktivität von 60 mCi/mMol (Amersham).

In Vorversuchen mit inaktivem Material wurde die Synthese eingehend studiert, bevor die radioaktive Darstellung erfolgte.

a.N,N'-Dicyclohexyl-[^{14}C-]Harnstoff. In einen 5 ml Kolben 27,9 m inaktiven Harnstoff eingewogen, aus den Probenampullen (zwei mit je 1 mCi) mit ca. 2 ml absolutem Äthanol 2,08 mg aktiven Harnstoff dazu gespült und im N_2-Strom bei 70 bis 80°C langsam wieder zur Trockene eingeengt. Auf diese Weise wurden 30 mg (0,5 mMol) ^{14}C-Harnstoff mit einer spez.Aktivität von 4 mCi/mMol erhalten. Nun 1 ml Cyclohexylamin addiert und unter Rühren (Magnetkern) und Luftkühlung (Mikrokühler) 6 Stunden bei 145°C gekocht. Die Reaktionsmischung anschließend auf 0°C abgekühlt, mit 2 ml Wasser verdünnt, vorsichtig abgenutscht und bei 50°C im Vakuum über KOH, H_2SO_4 für 24 Stunden getrocknet.

Bei inaktiven Vorversuchen lag die Ausbeute bei 82 bis 89 %, der Schmelzpunkt bei 226°C.

b.N,N'-Dicyclohexyl-[^{14}C-]carbodiimid. Im 5 ml Kolben (Luftkühler, $CaCl_2$-Rohr) das trockene Rohprodukt (a) zusammen mit 2 ml redestilliertem Pyridin und 40 µl frisch destilliertem $POCl_3$ unter Rühren (Magnetkern) 2 Stunden bei 90°C gekocht, abgekühlt und mit 8 ml Hexan extrahiert. Die Hexan-Phase dreimal mit 5 ml Wasser von 0°C gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bis 50°C zur Trockene eingeengt.

In Vorversuchen mit inaktivem Material lagen die Ausbeuten bei 57 bis 70 mg (55,3 bis 67,9 %), der Schmelzpunkt lag bei 34-35°C, DC-IVd-Jod: 1 Fleck.

Die Ausbeute beim radioaktiven Ansatz betrug 61,9 mg (60 %), DC-IVd-Jod: 1 Fleck. Der Dünnschichtscanner zeigte ein radioaktives Produkt. Das Produkt wurde in 5,9 ml Hexan aufgenommen.

Es stand somit eine 50 mM Lösung in Hexan zur Verfügung mit einer spez.Aktivität von 3,18 mCi/mMol, welche bei -30°C aufbewahrt wurde.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Allison, W.S. (1976), Acc.Chem.Res. 9, 293.
2) Altendorf, K.H. (1975), Febs Letters 59, 268.
3) Anderson, B.M., Vasini, E.C. (1970), Biochemistry 9, 3348.
4) Anderson, G.W., Halberstadt, I.F., Miller, W.H. und Robbin jr., R.O. (1945), J.Amer.Chem.Soc. 67, 2197.
5) Azocar, O., Munoz, E. (1976), Eur.J.Biochem. 68, 245.
6) Bäuerlein, E. (1974), in: Glutathion (Flohe, L. et al, Eds), 44, Georg Thieme Publishers, Stuttgart.
7) Bäuerlein, E., Kiehl, R. (1976), Febs Letters 61, 68.
8) Bäuerlein, E. (1976), Persönliche Mitteilung.
9) Beechey, R.B., Holloway, C.T., Knight, I.G., Roberton, A.M. (1966), Biochem.Biophys.Res.Commun. 23, 75.
10) Beechey, R.B., Holloway, C.T., Knight, T.G., Roberton, A.M. (1967), Biochemistry 6, 3867.
11) Beyer, R.E., Brink, T.W., Crankshaw, D.L., Kuner, J.M., Pasternak, A. (1972), Biochemistry 11, 961.
12) Boyer, P.D. (1975), Biol.Energy Transductions 34, 1711.
13) Brocks, J.C., Senior, A.E. (1971), Arch.Biochem.Biophys.147,467.
14) Bruni, A., Pitotti, A., Contessa, A.R., Palatini, P. (1971), Biochem.Biophys.Res.Commun. 44, 268.
15) Cattel, K.J., Lindop, C.R., Knight, I.G., Beechey, R.B.(1970), Biochem.J. 117, 1011.
16) Cattel, K.J., Lindop, C.R., Knight, I.G., Beechey, R.B.(1971), Biochem.J. 125, 169.
17) Chance, B. (1959), in: Ciba Symp.Reg.Cell Metabolism (Wolstenholme, G.E., Connor, O., Eds), 91.
18) Chude, O., Boyer, P.D. (1974), Arch.Biochem.Biophys. 160, 366.
19) Coleman, P. (1959), J.org.Chem. 24, 135.
20) Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (1967), Methods in Enzymology 10,41
21) Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (1967), Methods in Enzymology 10,81
22) Cooper, C., Lehninger, A.L. (1956), J.Biol.Chem. 219, 519.
23) Cooper, C., Lehninger, A.L. (1957), J.Biol.Chem. 224, 561.
24) Coty, W.A., Pedersen, P.L. (1974), J.Biol.Chem. 249, 2593.

25) Cunningham, L.W., Nuenke, B.J. (1959), J.Biol.Chem. 234, 1447.
26) Cunningham, L.W., Nuenke, B.J. (1960), J.Biol.Chem. 235, 1711.
27) Cunningham, L.W., Nuenke, B.J. (1960), Biochim.Biophys.Acta 39, 565
28) Cunningham, L.W., Nuenke, B.J. (1961), J.Biol.Chem. 236, 1716.
29) Cunningham, L.W. (1964), Biochemistry 3, 1629.
30) Cuzner, M.L., Davison, A.N. (1967), J.Chromat. 27, 388.
31) Dittmer, J.C., Lester, R.L. (1964), J.Lip.Res. 5, 126.
32) Fluharty, A.L., Sanadi, D.R. (1962), Biochemistry 1, 276.
33) Fluharty, A.L., Sanadi, D.R. (1963), Biochemistry 2, 519.
34) Fonyo, A., Bessmann, S.P. (1966), Biochem.Biophys.Res.Commun. 24, 61.
35) Gaudemer, Y., Latruffe, N. (1975), Febs Letters 54, 30.
36) Gautheron, D.C. (1973), Biochimie 55, 727.
37) Griffiths, D.E. (1976), Bioenergetic Werkshop on Electrontransport, Oxidative Phosph.-Photophosph., Hamburg.
38) Grote, I.W. (1931), J.Biol.Chem. 93, 25.
39) Hadway, P., Kadenbach, B. (1976), Eur.J.Biochem. 67, 573.
40) Hanstein, W.G., Hatefi, Y. (1974), J.Biol.Chem. 249, 1356.
41) Hanstein, W.G. (1976), Biochim.Biophys.Acta 456, 129.
42) Hatefi, Y., Stiggall, D.L., Galante, Y., Hanstein, W.G. (1974), Biochem.Biophys.Res.Commun. 61, 313.
43) Hatefi, Y., Hanstein, W.G., Galante, Y., Stiggall, D.L. (1975), Fed.Proceedings 34, 1699.
44) Haugaard, N., Lee, N.H., Kostrzewa, R., Horn, R.S., Haugaard, E.S (1969), Biochim.Biophys.Acta 172, 198.
45) Heitz,J.R., Anderson, C.D., Anderson, B.M. (1968), Arch.Biochem. Biophys. 127, 627.
46) Jacobs, E.E., Jacob, M., Sanadi, D.R., Bradley, L.B. (1956), J.Biol.Chem. 223, 147.
47) Janado, M., Shimada, K., Horie, N., Nishida, T. (1976), J.Biochem 80, 69.
48) Kagawa, Y., Racker, E. (1966), J.Biol.Chem. 241, 2467.
49) Kagawa, Y., Kandrach, A., Racker, E. (1973), J.Biol.Chem.248,676
50) Kiehl, R. (1975), Diplomarbeit, Heidelberg, MPI für med.Forsch.
51) Kiehl, R., Bäuerlein, E. (1976), Febs Letters 72, 24.
52) Kiss, Z. (1976), Eur.J.Biochem. 67, 557.

53) Klingenberg, M. (1975), in: Ciba Foundation Symposium 31 (n.s.),
54) Klingenberg, M. (1975), Febs Letters 56, 129.
55) Knight, I.G., Holloway, C.T., Roberton, A.M., Beechey, R.B. (196
Biochem.J. 109, 27 P.
56) Kurzer, A. (1967), Chem.Rev. 67, 107.
57) Lee, C.-P., Erster, L. (1968), European J.Biochem. 3, 385.
58) Lowry, O.H., Rosebourg, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951),
J.Biol.Chem. 193, 265.
59) Maloof, F., Spector, L. (1959), J.Biol.Chem. 234, 949.
60) Meijer, A.J., Brouwer, A., Reijugoud, D.J., Hoek, J.B., Tager,
J.M. (1972), Biochim.Biophys.Acta 283, 421.
61) Merz, H., Pfleiderer, G., Wieland, Th. (1965), Biochem.Zeitschri
342, 66.
62) Mitchell, P. (1976), Biochem.Soc.Transactions 4, 399.
63) Nair, G.V. (1966), Indian J.Chem. 4, 516.
64) Ohnishi, T., Wilson, D.F., Asakura, T., Chance, B. (1972),
Biochem.Biophys.Res.Commun. 46, 1631.
65) Ohnishi, T. (1976), Eur.J.Biochem. 64, 91.
66) Packer, L., Tavares de Sonsa, J., Utsumi, K., Schonbaum, G.R.
(1972), Fed.Proc. 31, A 431.
67) Phillips, G. (1969), J.Biol.Chem. 244, 3330.
68) Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., Racker, E. (1960),
J.Biol.Chem. 235, 3322.
69) Pullman, M.E., Monroy, G.C. (1963), J.Biol.Chem. 238, 3762.
70) Rieske, J.S., McLennan, D.H., Coleman, R. (1964), Biochem.Biophy
Res.Commun. 15, 338.
71) Roberton, A.M., Holloway, C.T., Knight, I.G., Beechey, R.B.
(1966), Biochem.J. 100, 78 P.
72) Roberton, A.M., Holloway, C.T., Knight, I.G., Beechey, R.B.
(1968), Biochem.J. 108, 445.
73) Sabadie-Pialoux, N., Gautheron, D.C. (1971), Biochim.Biophys.
Acta 234, 9.
74) Sanadi, D.R., Lam, K.W., Kurup, C.K.P. (1968), Proc.Natl.Acad.
Sci.U.S. 61, 277.
75) Senior, A.E. (1974), Biochim.Biophys.Acta 301, 249.
76) Skipski, V.P., Peterson, R.F., Barclay, M. (1964), Biochem.J.
90, 374.
77) Slater, E.C. (1966), Comprehensive Biochemistry 14, 327.

78) Slater, E.C. (1967), Eur.J.Biochem.1, 317.
79) Solis, C. (1976), Persönliche Mitteilung.
80) Soto, E.F., Pasquini, J.M., Placido, R., Torre, J,L. (1969), J.Chromat. 41, 400.
81) Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958), Analyt.Chem. 30, 1190.
82) Stekhoven, F.S., Waitkus, R.F., Moerkerk, Th.B. (1972), Biochemistry 11, 1144.
83) Toennies, G. (1937), J.Biol.Chem. 120, 297.
84) Tzagoloff, A., Byington, K.H., McLennan, D.H. (1968), J.Biol. Chem. 243, 2405.
85) Tzagoloff, A. (1974), The Biogenesis of Mitochondria (Kroon-Saccone, Ed), 405.
86) Whittacker, V.P., Wijesundera, S. (1952), Biochem.J. 51, 348.
87) Wieland, Th., Bäuerlein, E. (1968), Angew.Chem.Int.Ed. 7, 893.
88) You, K.S., Hatefi, Y. (1976), Biochim.Biophys.Acta 423, 398.

Lebenslauf

8.10.1947	geboren in Worms Vater: Heinz Kiehl, Former Mutter:Herta, geb. Fuhr
1955 - 1962	Volksschulen in Ludwigshafen
1962 - 1966	Aufbaugymnasium in Annweiler
1966 - 1968	Fachschulanwärter in der BASF
1968 - 1971	Ingenieurschule in Mannheim
10.2.1971	Ingenieur (grad.) für Chemische Technik
11.4.1971	Immatrikulation an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg
16.12.1971	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
14.2.1974	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
März 1974 - Dez. 1974	Diplomarbeit am Max-Plank-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Naturstoff-Chemie, Heidelberg über "Synthese lipophiler Thiol- und Sulfensäure-Reagentien"
Jan. 1975 - Dez. 1976	Durchführung der vorliegenden Arbeit am Max-Plank-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Naturstoff-Chemie, Heidelberg.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit, bin seit April 1974 verheiratet und habe seit Oktober 1976 eine Tochter.