

Die mitochondriale Atmungskette höherer Pflanzen

Bericht von Doz. Dr. U. KULL, Stuttgart

Die Atmungskette der Mitochondrien höherer Pflanzen entspricht in ihrem grundsätzlichen Aufbau weitgehend dem entsprechenden System der Tiere, wie dies aus phylogenetischen Gründen auch erwartet werden darf. Allerdings sind die Verhältnisse bei Pflanzen viel weniger gut untersucht, als etwa die Atmungskette der Säuger- und Vogelmitochondrien. Alle grundlegenden Kenntnisse über den Aufbau der Elektronentransportkette wurden an tierischem Material gewonnen und dann häufig durch Analogieschlüsse auf die Pflanzen übertragen. Erst in den letzten Jahren begann man, die einzelnen Komponenten der pflanzlichen Atmungskette zu überprüfen [1, 5]. Dabei wurden zahlreiche Ähnlichkeiten, aber auch eine Reihe erheblicher Unterschiede zu dem gefunden, was aus höheren Tieren über Bau und Funktion der Atmungskette bekannt ist. Die wesentlichen Unterschiede betreffen:

1. Größere Komplexität im Bereich der Cytochrome b bei Pflanzen;
2. Teilweise andersartige Verhältnisse im Bereich der Flavoproteide;
3. Das Vorliegen eines „Nebenweges“ der Endoxydation in pflanzlichen Mitochondrien, der gegenüber Vergiftung der Cytochromoxidase resistent ist;
4. Die Komponenten der Atmungskette sind nicht wie bei höheren Tieren in stets gleichartigen, stabilen, isolierbaren Strukturkomplexen angeordnet. Strukturkomplexe sind zwar nachweisbar, haben aber größere Variationsbreite und offenbar geringere Stabilität.

Durch schonende Isolierung ist es heute möglich, fest gekoppelte (tightly coupled) Mitochondrien aus vielen pflanzlichen Geweben zu gewinnen. In diesen steht die Geschwindigkeit des Elektronentransportes unter Kontrolle der Phosphorylierungsreaktion. Dabei lassen sich 4 verschiedene aerobe Zustände unterscheiden, die entsprechend den Befunden von CHANGE [2] an tierischen Mitochondrien zu klassifizieren sind:

Stadium	Substrat	ADP + P _i	Atmungsrate
1	endogen	endogen	niedrig
2	gegen 0	Überschuß	sehr niedrig
3	Überschuß	Überschuß	hoch
4	Überschuß	gegen 0	niedrig

Durch die Kopplung ist das Verhältnis gebundenes anorganisches Phosphat (P_i) zu verbrauchtem Sauerstoff (P/O-Verhältnis) in engen Grenzen festgelegt. Statt des P/O-Verhältnisses wird oft auch das Verhältnis ADP/O bestimmt. Hierzu wird unter Substratüberschuß eine bestimmte Menge an ADP zugeführt und der Sauerstoffverbrauch gemessen, welcher durch dessen Phosphorylierung verursacht ist. Man mißt also im Stadium 3 der Zellatmung. Der Verbrauch an Sauerstoff kann polarographisch verfolgt werden. Die Zufuhr von ADP bei gegebenem Substratangebot führt zu einer Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Ist alles ADP phosphoryliert,

so kommt es infolge des Übergangs zum Stadium 4 zu einer schlagartigen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit und damit des Sauerstoffverbrauches. Durch Messung dieser Vorgänge bei Zufuhr verschiedener Substrate kann auch die Effektivität der oxydativen Phosphorylierung mit diesen unterschiedlichen Substraten gemessen werden. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten in Zustand 3 und 4 wird als Atmungskontrollgröße bezeichnet (RC = respiratory control). Der RC-Wert gibt die Kopplungsintensität an, das heißt das Ausmaß, in dem die Geschwindigkeit der Substratoxydation durch die Phosphorylierung kontrolliert wird. In der Tabelle 1 sind einige Werte für Mitochondrien aus Blumenkohl wiedergegeben.

Substrat	RC	ADP/O experimentell	ADP/O theoretisch
Succinat	1,35–1,85	1,67	2
Malat	2,64–3,40	2,17–2,69	3
NADH	1,88–2,21	1,07–1,31	(2)

Tab. 1 (nach [1]).

Die experimentellen Werte für das ADP/O-Verhältnis sind geringer als die theoretisch zu erwartenden Werte, da nicht aller aufgenommene Sauerstoff mit der Phosphorylierung des zugeführten ADP in Zusammenhang steht. Dies geht schon daraus hervor, daß auch nach Verbrauch des exogenen ADP im Stadium 4 die Atmungsintensität nicht auf 0 absinkt. Generell schwanken in pflanzlichen Mitochondrien die absoluten Werte der Atmungsrate viel stärker als bei höheren Tieren [3]. Charakteristisch für Mitochondrien der Pflanzen ist ferner, daß als Substrat zugesetztes NADH rasch umgesetzt wird [3]. In tierischen Mitochondrien erfolgt dieser Umsatz in der Regel erst nach Strukturschädigung. Bei NADH-Zufuhr ist das ADP/O-Verhältnis erheblich geringer als bei Applikation von Malat als Substrat. Dies wird dadurch erklärt, daß freies NADP Elektronen unter Umgehung des ersten Phosphorylierungsschrittes an ein Flavoprotein-System abgibt [4]. Allerdings dürfte dann die Oxydation von NADH nicht gegen Inhibitoren der ersten Kopplungsstelle, wie zum Beispiel Rotenon, empfindlich sein, was nur teilweise zutrifft.

Die Identifizierung und die quantitative Bestimmung der Komponenten der Atmungskette erfolgt vorwiegend durch Messung der Absorptionsspektren, bei den Flavoproteiden zusätzlich der Fluoreszenzspektren. Die spezifischen Absorptionsmaxima sind in der Regel im reduzierten und oxydierten Zustand der Verbindungen verschieden. Daher können auch die Redox-Übergänge spektrometrisch quantitativ verfolgt werden. Für die Identifizierung der einzelnen Komponenten ist die Differenzspektrometrie bei tieferen Temperaturen (in der Regel flüss. Stickstoff: 77° K) von Bedeutung. Durch die Verschärfung der einzelnen Absorptionsmaxima werden hier auch sehr eng beieinanderliegende peaks strukturell ähnlicher Komponenten, so zum Beispiel der verschiedenen Cytochrome des b-Typs, noch ge-

trennt und dadurch diese Verbindungen überhaupt erst eindeutig erkennbar. Die Cytochrome sind zumeist durch 3 charakteristische Absorptionsmaxima im reduzierten Zustand ausgezeichnet. Diese werden als α -, β - und γ - (= Soret-) Bande bezeichnet (vgl. Tab. 3).

Beispiele für den quantitativen Aufbau der Atmungskette (Konzentration der Redoxsysteme) gibt die Tabelle 2, in der sowohl stoffwechselaktive Gewebe, als auch Gewebe von Speicherorganen aufgeführt sind. Das Spadix-Gewebe der Aracee *Symplocarpus foetidus* (skunk cabbage) wird wegen der hier besonders ausgeprägten Cyanidresistenz und einer gleichzeitig sehr intensiven Atmung vielfach zu Untersuchungen herangezogen. Die Werte der Tabelle 2 zeigen, daß die Cytochromgehalte der Mitochondrien unabhängig von der Herkunft ziemlich konstant sind und bei etwa 0,1 bis 0,3 nmol/mg Protein liegen. Die Konzentration an Flavoproteiden ist in der Regel 3 bis 5 mal höher, die der Pyridinnucleotide 10 bis 20 mal höher [5]. Zwischen der Atmungsintensität der Gewebe und dem Sauerstoffumsatz pro mg Mitochondrienprotein bestehen

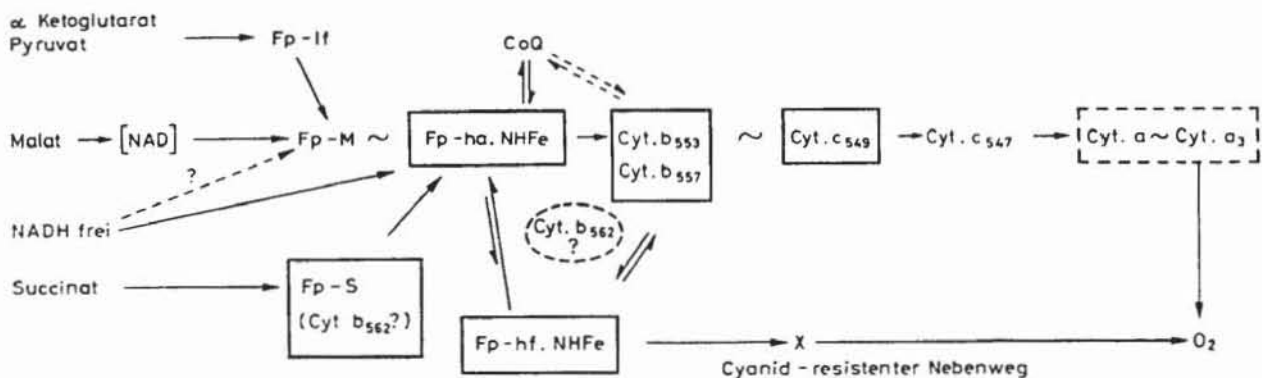
keine Beziehungen. Der letztgenannte Wert bleibt ziemlich gleich. Aufgrund der experimentellen Werte läßt sich berechnen, daß rund 50 bis 70 Elektronen pro Sek. durch das Cytochromoxidase-System der Elektronentransportkette geschleust werden [5]. Die Atmungsintensität hängt also in erster Linie von der Zahl und der Größe der Mitochondrien, genauer der Zahl der Elektronentransportketten, pro Zelle ab.

Wir wollen nun die einzelnen Komponenten der Elektronentransportkette betrachten (vgl. hierzu das Schema der Atmungskette, Abb. 1).

1. *Flavoproteide (Fp) und Nicht-Häm-Eisen (NHFe)*: Im Bereich dieser Verbindungen liegen die Verhältnisse viel komplizierter als noch vor wenigen Jahren angenommen wurde. Durch Anwendung neuer Methoden, vor allem der Bestimmung des Verhältnisses von Fluoreszenz- zu Absorptionsänderungen (= FA-Verhältnis) [6, 7] konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Bei *Phaseolus aureus* wurden 4 verschiedene Flavoproteide gefunden, daneben noch eine weitere, nicht identifizierte flavinhaltige Ver-

	<i>Helianthus tuberosus</i> Knolle	<i>Solanum tuberosum</i> Knolle	<i>Phaseolus aureus</i> Hypokotyl	<i>Brassica oleracea</i> (Blumenkohl) Infloreszenz	<i>Symplocarpus foetidus</i> Spadix
Konzentration der Redoxsysteme (nmol/mg Protein)					
Cytochrom a+a ₃	0,10	0,17	0,11	0,12	0,11
Cytochrome b	0,10	0,20	0,12	0,15	0,23
Cytochrome c	0,15	0,27	0,17	0,21	0,36
Flavoproteide	0,38	0,89	0,58	0,69	2,02
Pyridinnucleotide	0,92	3,50	4,10	2,04	—
Relative Konzentration der Komponenten (Cytochrom c = 1,00)					
Cytochrom a+a ₃	0,69	0,65	0,65	0,60	0,32
Cytochrome b	0,67	0,76	0,67	0,75	0,65
Cytochrome c	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Flavoproteide	2,90	3,30	3,64	3,40	5,80
Pyridinnucleotide	7,5	14,1	17,8	11,5	—
Atmungsintensität					
Q ₀₂ der Mitochondrien (μ l O ₂ /h.mg N)	750	1180	1080	1170	1030
Q ₀₂ der Gewebe (μ l O ₂ /h.g Frischgewicht)	50	40	180	240	4000

Tab. 2. Konzentration der Redox-Systeme und Atmungsintensität (nach [5]).



~ = Phosphorylierungsstellen X = unbekannte Verbindung

Abb. 1. Schema der Atmungskette pflanzlicher Mitochondrien.

bindung [8]. Außerdem ist die bei *Phaseolus* nicht untersuchte Succinatdehydrogenase ein Flavoprotein der Atmungskette (= Fp—S). In pflanzlichen Mitochondrien nicht gefunden wurden die mit der Fettsäure-Oxydation in Zusammenhang stehenden Flavoproteide, die bei Tieren als FpA und als Elektronentransfer-Flavoprotein Fp-ETF bezeichnet werden. Möglicherweise sind diese Komponenten bei Pflanzen in den Glyoxysomen enthalten [8]. Die oben genannten 4 Flavoproteide sind zum Teil entsprechenden Komponenten in tierischen Mitochondrien zu homologisieren. Fp-M, das durch Malat vollständig reduziert wird, entspricht dem Fp-D1 bei Tieren; Fp-ha entspricht sehr wahrscheinlich dem Fp-D2. Fp-lf dürfte das liponsäureoxydierende Flavoprotein der α -Ketoglutarat- und Pyruvat-Dehydrogenase-Systeme sein und somit dem Fp-L der Tiere entsprechen.

Die erste, durch Rotenon oder Amytal hemmbare Phosphorylierungsstelle der Atmungskette liegt bei Pflanzen wie bei Tieren offenbar zwischen den beiden Flavoproteiden Fp-M und Fp-ha (beziehungsweise Fp-D1 und Fp-D2 [7, 9]), also nicht zwischen Pyridinnucleotid und Flavinsystem. Zugeführtes NADH schleust Elektronen in die Kette über Fp-ha ein, dadurch wird die erste Phosphorylierung umgangen [10].

Das Flavoprotein Fp-hf ist eine Komponente, die in tierischen Mitochondrien kein Äquivalent hat. Sie steht mit dem Cyanid-resistenten Nebenweg in enger Verbindung (vgl. Abb. 1). Dabei erfolgt ein Elektronentransfer von Fp-ha zu Fp-hf, der energetisch ungünstig und daher nur bei genügend hohem ATP-Spiegel bevorzugt ist. Dadurch wird unter solchen Bedingungen der Atmungsnebenweg, der kein ATP, sondern ausschließlich Wärme liefert, intensiviert [11]. Diese Wärmeproduktion spielt in Araceen-Infloreszenzen eine bedeutende Rolle.

Die Flavoproteide stehen, wie in tierischen Mitochondrien, mit Nicht-Häm-Eisen-Komplexen in struktureller enger Verbindung. Dies kann vor allem durch ESR-Spektroskopie untersucht werden. Eine genaue Überprüfung der Verhältnisse ist an pflanzlichen Mitochondrien allerdings bisher nicht durchgeführt worden. Über die Zahl der Nicht-Häm-Eisen, welche mit den einzelnen Flavoproteiden in Verbindung stehen, ist daher nichts bekannt.

2. *Ubichinone*: Die Ubichinone oder Coenzyme Q (CoQ) treten in der pflanzlichen Atmungskette als kleinstmolekulare, lipophile Komponente wie in tierischem Material in Erscheinung. Eine gewisse Analogie zu den Plastochinonen der Chloroplasten-Membran ist unverkennbar. Wie letztere haben die Ubichinone sicher unter anderem eine Pool-Funktion („Elektronen-Speicher“) und wahrscheinlich auch die Aufgabe, mehrere Elektronentransportketten als „Pipeline“ miteinander zu verknüpfen [12]. Anders wie in der tierischen Atmungskette scheinen die Ubichinone aber zumindest in ihrer Hauptmenge im Nebenschluß des Elektronentransports und nicht in der Hauptkette zu liegen. Sie stehen dabei in enger Wechselwirkung mit Flavoproteiden.

3. *Cytochrome*: Eine Übersicht über die pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesenen Cytochrome gibt die Tab. 3.

	Absorptionsmaxima in [nm] bei 77° K			Potential in [V] bei pH 7,2
	α	β	γ	
Cytochrom a	600	—	438 u. 445	+ 0,19
a ₃	603	—	445	+ 0,38
Cytochrom b ₅₅₃	553	525–529	430	+ 0,075
b ₅₅₇	557	525	423	+ 0,042
b ₅₆₂	562	534	427	– 0,077
b ₇	560	529	—	– 0,03
Cytochrom c ₅₄₇	547	525	415	+ 0,235
c ₅₄₉	549	517	419	+ 0,235

Tab. 3. In pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesene Cytochrome (vorw. nach [1] und [13]).

Charakteristisch für Pflanzen ist die Komplexität im Bereich der Cytochrome b. Hier lassen sich 3 Komponenten unterscheiden, die entsprechend der Lage des α -Absorptionsmaximums bei tiefer Temperatur benannt werden [5, 9]. Mindestens ein weiteres Cytochrom des b-Typs ist in der pflanzlichen Mikrosomenfraktion nachgewiesen worden, außerdem enthält die Elektronentransportkette der Photosynthese in Plastiden b-Cytochrome. Cytochrom b₅₄₂ entspricht dem Cytochrom b der tierischen Mitochondrien. Seine Funktion ist ziemlich unklar. Es hat das negativste Potential aller b-Cytochrome und steht möglicherweise mit einem Flavoprotein-System (Fp-S?) in Verbindung. Cytochrom b₅₅₃ wird nach vollständiger Reduktion relativ langsam oxydiert. Daher wurde schon angenommen, daß es nicht in den Hauptweg des Elektronentransports eingeschaltet sei [14], jedoch bleibt dies zweifelhaft, da Cytochrom b₅₅₃ zu Fp-ha offenbar in enger struktureller Beziehung steht [10]. Die genaue Stellung von Cytochrom b₅₅₇ ist ebensowenig geklärt.

Cytochrom c₅₄₇, das dem tierischen Cytochrom c in Funktion und Eigenschaften völlig entspricht, ist schon seit 1944 aus Pflanzen bekannt. Mittlerweile sind auch die Primärstrukturen des Proteinanteils einer Reihe von Cytochromen c höherer Pflanzen aufgeklärt worden. Cytochrom c₅₄₉ ist dem tierischen Cytochrom c₁ homolog und wie dieses fest in die innere Mitochondrienmembran gebunden. Es dürfte auch entsprechende Stellung und Funktion in der Elektronentransportkette aufweisen.

Wie in tierischen Geweben sind auch bei Pflanzen zwei spektroskopisch unterscheidbare Cytochrome des a-Typs zu finden: Cytochrom a und Cytochrom a₃ = Cytochromoxidase. Beide sind bisher nicht getrennt isoliert worden, bilden aber offenbar nicht einen stabilen Strukturkomplex wie bei höheren Tieren [15]. Vielleicht sind sogar Cytochrom c₅₄₇ und a enger verknüpft als Cytochrom a und a₃.

Die drei *Phosphorylierungsschritte* in der pflanzlichen Atmungskette entsprechen denjenigen der tierischen Mitochondrien [7, 13, 16]. Die erste Phosphorylierung erfolgt zwischen den Flavoproteiden Fp-M und Fp-ha, die zweite zwischen Cytochrom b und Cytochrom c₅₄₉, die letzte, die für pflanzliche Mitochondrien erst 1967 sicher nachgewiesen wurde, zwischen Cytochrom a und a₃. Die einzelnen Phosphorylierungsstellen können durch dieselben spezifischen Inhibitoren, die bei tierischem Material wirksam sind, gehemmt werden (für Stelle 1: Amytal und Rotenon, für Stelle 2: Antimycin A, für Stelle 3: Azid, Cyanid, Kohlenmonoxid).

Pflanzliche Mitochondrien sind allerdings gegenüber einer Vergiftung durch Cyanid usw. sehr widerstandsfähig, da ein *Nebenweg der Endoxydation* existiert. Über dessen Aufbau besteht bis heute keine Klarheit. Bei *Arum* Spadixgewebe konnte schon 1958 ein besonderes Cytochrom b₅ nachgewiesen werden, das mit dem Nebenweg in Zusammenhang steht [17]. Das Vorhandensein eines autoxydablen Flavoprotein-NHFe-Komplexes und einer besonderen Cytochromoxidase wurde diskutiert. Da die Cyanid-resistente Atmung in Infloreszenz von Araceen besonders intensiv ist, wurden bisher vorwiegend *Arum* und *Symplocarpus* zu entsprechenden Untersuchungen herangezogen, neuerdings ferner auch *Phaseolus* [18]. Der Atmungsnebenweg kann erheblich, aber nicht vollständig gehemmt werden durch Chelatkomplexbildner, welche Eisen binden (zum Beispiel 8-Hydroxychinolin) [1]. Dies spricht für die Beteiligung von Nicht-Häm-Eisen am Nebenweg. Eine spezifische Hemmung wird durch Hydroxamsäuren erreicht [19]. Eine Hemmung der Atmung durch 8-Hydroxychinolin erfolgt nur, wenn vorher die „normale“ Atmungskette durch Cyanid oder Antimycin vergiftet wurde. Dies legt den Schluß nahe, daß die Abzweigung des Nebenwegs im Bereich der Flavoproteide erfolgt, was durch weitere Untersuchungen erhärtet wurde [11, 12].

Allerdings sind im einzelnen schon zwischen den nahe verwandten Formen *Arum* und *Symplocarpus* Unterschiede festzustellen. In *Arum* bleibt das Cytochrom b, bei Gegenwart von Cyanid oxydiert, während in *Symplocarpus* entsprechendes für kein b-Cytochrom beobachtet wird [1, 17]. In den Mitochondrien von *Symplocarpus* findet man unter normalen Bedingungen ohne Vergiftung fast normale P/O-Verhältnisse, während bei *Arum* kaum Phosphorylierung stattfindet. Offenbar ist in *Arum* der Nebenweg auch ohne Vergiftung bevorzugt, während in *Symplocarpus* dieser nur nach Cyanid-Zufuhr größere Bedeutung erlangt [20]. Gleichzeitig wird aus diesen Befunden erkennbar, daß bei höheren Pflanzen offenbar eine größere strukturelle Vielfalt im Aufbau der Elektronentransportkette besteht, als etwa in den Mitochondrien von Säugern und Vögeln.

[(1) C. LANCE, Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg. **15**, 259 (1969). — (2) B. CHANCE, G. R. WILLIAMS, Adv. Enzymol. **17**, 65 (1956). — (3) H. IKUMA, W. D. BONNER, Plant Physiol. **42**, 67 (1967). —

(4) B. CHANCE und Mitarb., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **57**, 1498 (1967). — (5) C. LANCE, W. D. BONNER, Plant Physiol. **43**, 756 (1968). — (6) P. B. GARLAND und Mitarb., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **58**, 1696 (1967). — (7) B. CHANCE und Mitarb., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **57**, 1498 (1967). — (8) B. T. STOREY, Plant Physiol. **46**, 13 (1970). — (9) B. CHANCE und Mitarb., Ann. Rev. Plant Physiol. **19**, 295 (1968). — (10) B. T. STOREY, Plant Physiol. **46**, 625 (1970). — (11) M. ERECINSKA, B. T. STOREY, Plant Physiol. **46**, 618 (1970). — (12) B. T. STOREY, J. T. BAHR, Plant Physiol. **44**, 115 (1969). — (13) P. L. DUTTON, B. T. STOREY, Plant Physiol. **47**, 282 (1971). — (14) B. T. STOREY, Plant Physiol. **44**, 413 (1969). — (15) B. T. STOREY, Plant Physiol. **45**, 455 (1970). — (16) W. D. BONNER, M. PLESNICAR, Nature **214**, 616 (1967). — (17) D. S. BENDALL, Biochem. J. **70**, 381 (1958). — (18) B. T. STOREY, Plant Physiol. **45**, 447 (1970). — (19) G. R. SCHONBAUM und Mitarb., Plant Physiol. **47**, 124 (1971). — (20) B. T. STOREY, J. T. BAHR, Plant Physiol. **44**, 126 (1969). — Weitere Literatur ist in [1, 5, 9] angegeben.]