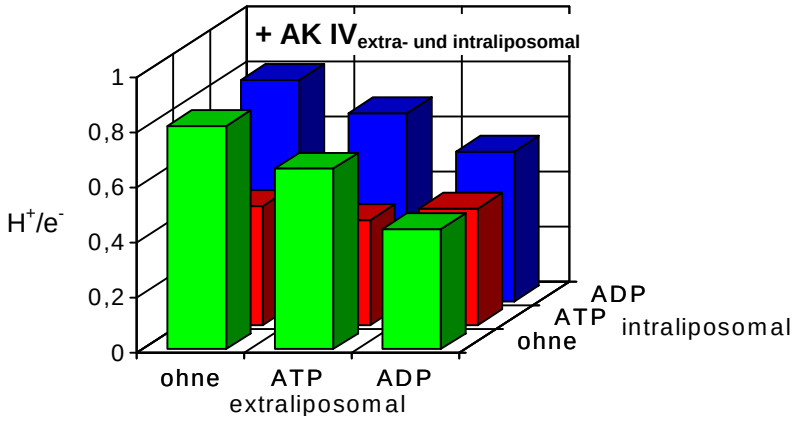

Fig. 32: Einfluß eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheit IV der COX auf den Effekt der extra- und intraliposomalen Nukleotide. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ATP (rote Säulen), 5 mM ADP (blaue Säulen) oder ohne Nukleotid (grüne Säulen), bei gleichzeitiger Zugabe des monoklonalen Antikörpers, gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und 500 µM ADP oder 500 µM ATP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

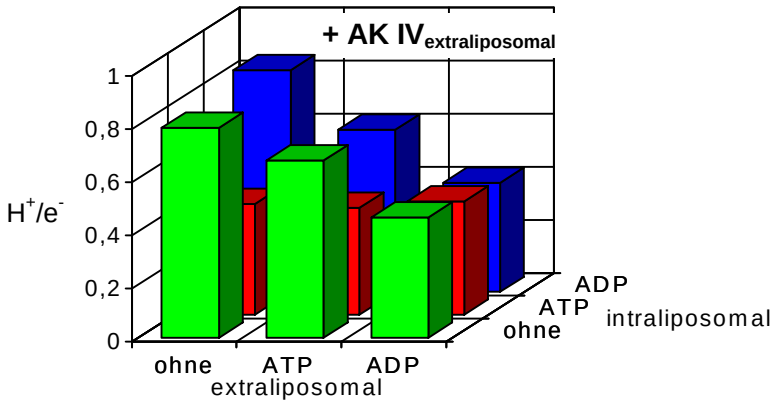

Fig. 33: Einfluß eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheit IV der COX auf den Effekt der extra- und intraliposomalen Nukleotide. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ATP (rote Säulen), 5 mM ADP (blaue Säulen) oder ohne Nukleotid (grüne Säulen), gefolgt von Dialyse. Die Zugabe des Antikörpers von der extraliposomalen Seite erfolgte 6 Stunden vor der Messung. Messbedingungen siehe Fig. 32.

Aus diesen Ergebnissen (Fig. 29- 31) folgt zum einen, wie schon unter 3.7 dargelegt, die Bindung von ATP und ADP an der N-terminalen, matrix-orientierten Domäne der Untereinheit VIa-H, (Frank and Kadenbach, 1996), und zum anderen eine weitere Bindungsstelle auf der cytosolischen Seite der COX. Bei dieser Bindungsstelle kann es sich um die schon von Taanman et al., (1994) beschriebene Bindungsstelle an der C-terminalen, cytosolisch-orientierten Domäne der Untereinheit VIa, als auch um eine Bindungsstelle an der C-terminalen Seite der Untereinheit VIc der COX handeln. Die Möglichkeit einer ATP/ADP-Bindungsstelle an der Untereinheit VIc ergibt sich aus der Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit der Untereinheit VIc (Schneyder et al., 1991; siehe 3.7).

Wie von Napiwotzki et al. (1997) gezeigt wurde, hebt ein monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX die Hemmung der Aktivität, von mit Tween 20 solubilisierter Rinderherz COX, durch ATP auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden parallel zu den oben erläuterten Experimenten dieselben Versuche mit einem Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX durchgeführt. Einerseits wurde während der Rekonstitution der COX mit dem Antikörper gegen die Untereinheit IV inkubiert und andererseits wurde der Antikörper nach der Rekonstitution zugegeben. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Fig. 32 und 33 dargestellt. Der Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX hebt weder die beobachteten Effekte der intra- noch der extraliposomalen Nukleotide auf die Protonentranslokation auf. Die erhaltenen Ergebnisse sind praktisch identisch mit denen ohne Vorinkubation eines Antikörpers (Fig. 29). Damit kann ausgeschlossen werden, daß gemessene Effekte der extraliposomalen Nukleotide auf einer Bindung derselben an der Untereinheit IV beruhen. Auch können unspezifische Antikörpereffekte ausgeschlossen werden. Es handelt sich bei den durch extraliposomale Nukleotide verursachten gemessenen Effekten also um eine Bindung auf der cytosolischen Seite an der Untereinheit VIa oder VIc der COX.

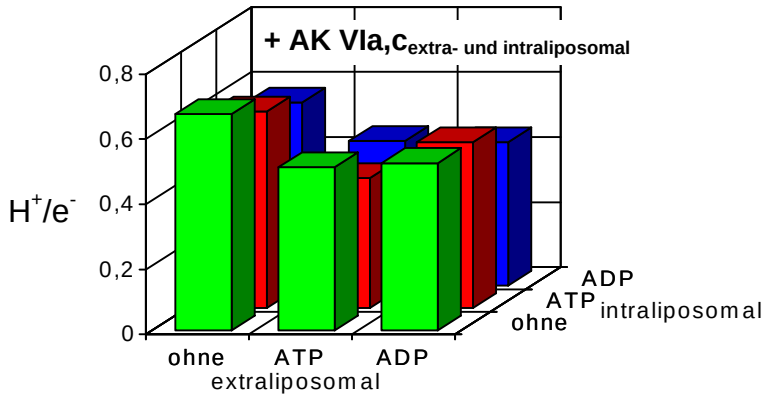

Fig. 30: Einfluß eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX auf den Effekt der extra- und intraliposomalen Nukleotide. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ATP (rote Säulen), 5 mM ADP (blaue Säulen) oder ohne Nukleotid (grüne Säulen), und in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers, gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und 500 µM ADP oder 500 µM ATP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

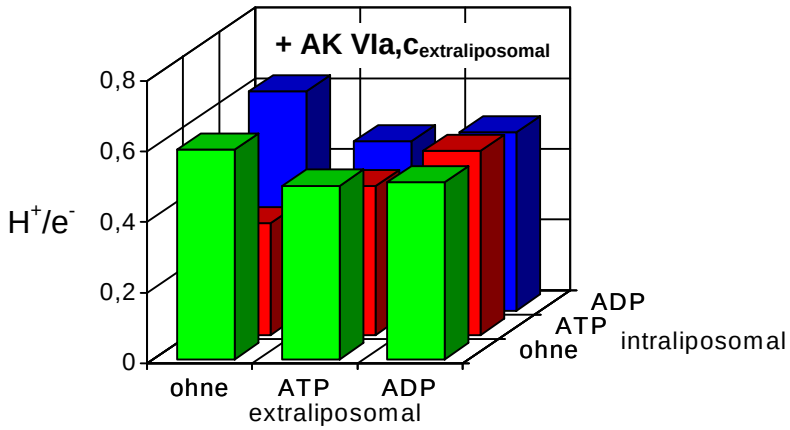

Fig. 31: Einfluß eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX auf den Effekt der extra- und intraliposomalen Nukleotide. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ATP (rote Säulen), 5 mM ADP (blaue Säulen) oder ohne Nukleotid (grüne Säulen), gefolgt von Dialyse. Die Zugabe des Antikörpers von der extraliposomalen Seite erfolgte 6 Stunden vor der Messung. Messbedingungen siehe Fig. 30.

Identische Messungen wurden nach Vorinkubation des Enzyms mit dem Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc durchgeführt (Fig. 30). Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper erfolgte während der Rekonstitution des Enzyms. Der Antikörper konnte auf diese Weise sowohl an die extraliposomale als auch an die intraliposomale Seite des Enzyms binden. Wie schon unter 3.7 gezeigt werden konnte, wurde auch hier die Aufhebung der duch intraliposomales ATP erzeugten Hemmung der Protonentranslokation duch den Antikörper gegen die Untereinheit VIa-H der COX beobachtet. Zusätzlich zu der Aufhebung des intraliposomalen ATP-Effektes, war auch eine Aufhebung der durch extraliposomales ATP bzw. ADP erzeugten Effekte zu beobachten. Daß die H^+/e^--Stöchiometrien in Anwesenheit von extraliposomalen Nukleotiden immer niedriger als die vergleichbaren Werte ohne extraliposomale Nukleotide waren, ist auf die schwierigere Auswertung der Messdaten Aufgrund der schon erwähnten Pufferkapazität der Nukleotide zurückzuführen (kleinere Signale). Die verstärkte Abnahme der Protonentranslokation in Anwesenheit von extraliposomalem ADP ist aber, wie aus Fig. 30 hervorgeht aufgehoben. Es ist außerdem deutlich zu erkennen, daß im Falle von Vesikeln mit intraliposomalem ATP die H^+/e^--Stöchiometrie nun nicht mehr unabhängig davon ist, ob extraliposomal ATP oder ADP vorhanden ist.

Die Inkubation der COX mit dem Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc nach der Rekonstitution, d.h. Bindung des Antikörpers war nur von der extraliposomalen Seite möglich, sollte eine genauere Lokalisierung der Nukleotidbindungstelle(n) ermöglichen. In Fig. 31 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß die Effekte der extraliposomalen Nukleotide wie erwartet, aufgehoben sind, aber im Gegensatz dazu die Hemmung der Protonentranslokation durch intraliposomales ATP weiterhin deutlich zu erkennen ist.

In Fig. 29 ist zunächst die Abhängigkeit der Protonentranslokation von intra- und extraliposomalen Nukleotiden dargestellt. Wiederum war, bei Abwesenheit von äußeren Nukleotiden, die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie durch intraliposomales ATP um 50% zu erkennen. In Anwesenheit von extraliposomalem ATP war diese Abnahme reduziert. Die Anwesenheit von extraliposomalem ADP führte zu einer konstant niedrigen H^+/e^--Stöchiometrie, unabhängig vom intraliposomalen Nukleotid. Weiterhin war eine deutliche Abnahme der Protonentranslokation duch extraliposomales ATP und eine noch stärkere Abnahme duch extraliposomales ADP zu erkennen, wenn die Vesikel intraliposomal ADP enthielten. Diese Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie durch extraliposomales ATP und ADP war ebenso zu beobachten, wenn die Vesikel intraliposomal kein Nukleotid enthielten. Ein anderes Bild ergab sich, wenn die Vesikel intraliposomal ATP enthielten. In diesem Fall betrug die H^+/e^--Stöchiometrie unabhängig von extraliposomalem Nukleotid konstant etwa 0,4.

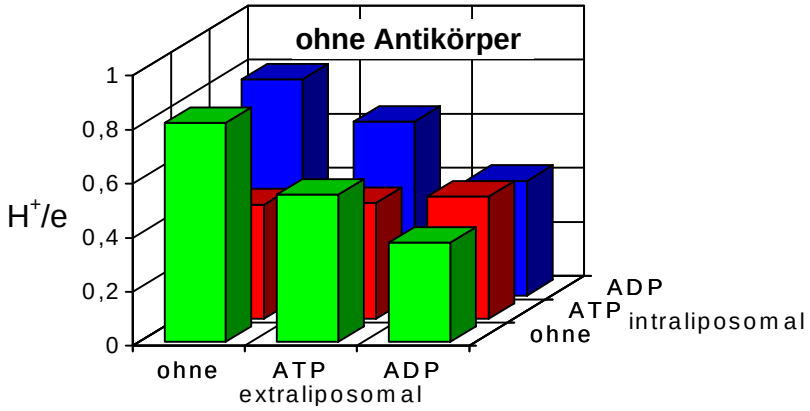

Fig. 29: Einfluß von extraliposomalen Nukleotiden auf die Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX. Messung ohne Vorinkubation eines monoklonalen Antikörpers. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ATP (rote Säulen), 5 mM ADP (blaue Säulen) oder ohne Nukleotid (grüne Säulen), gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und 500 µM ADP oder 500 µM ATP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

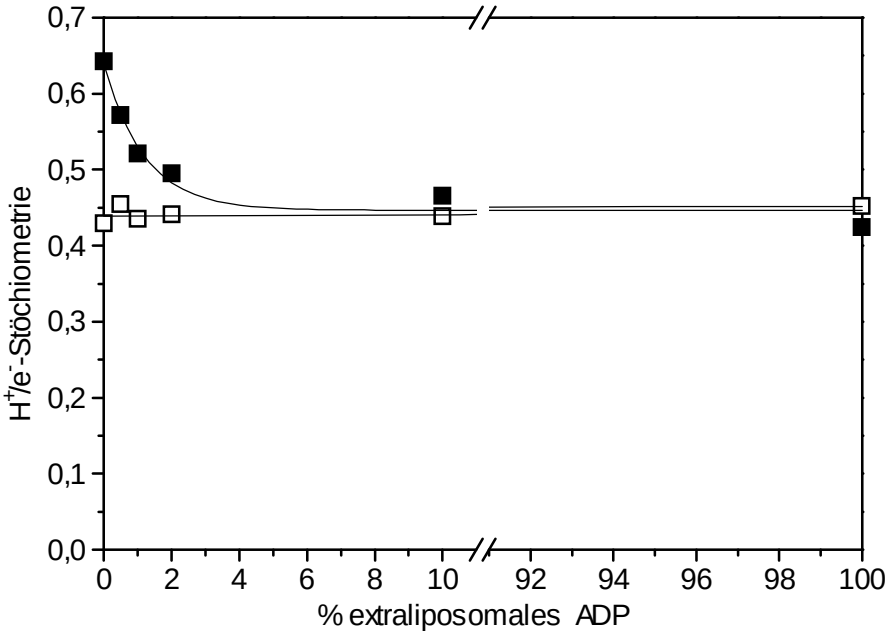

Fig. 28: Varation des extraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses bei konstanten intraliposomalen Nukleotidkonzentrationen. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ATP (offene Vierecke) oder 5 mM ADP (geschlossene Vierecke), gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und des angegebenen prozentualen Anteils an ADP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Die Gesamtkonzentration an extraliposomalem Nukleotid betrug konstant 500 µM. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

3.14 Einfluß monoklonaler Antikörpern auf den Effekt extraliposomaler Nukleotide auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX

Wie bereits gezeigt (3.7), basiert der molekulare Mechanismus der teilweisen "Entkopplung" der Energietransduktion (Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie) der COX auf einem Austausch von gebundenem ADP durch ATP auf der N-terminalen, matrix-orientierten Domäne der Untereinheit VIa-H (Frank and Kadenbach, 1996). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Regulation der Protonentranslokation durch extraliposomales ATP bzw. ADP auch durch den Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc aufgehoben werden kann.

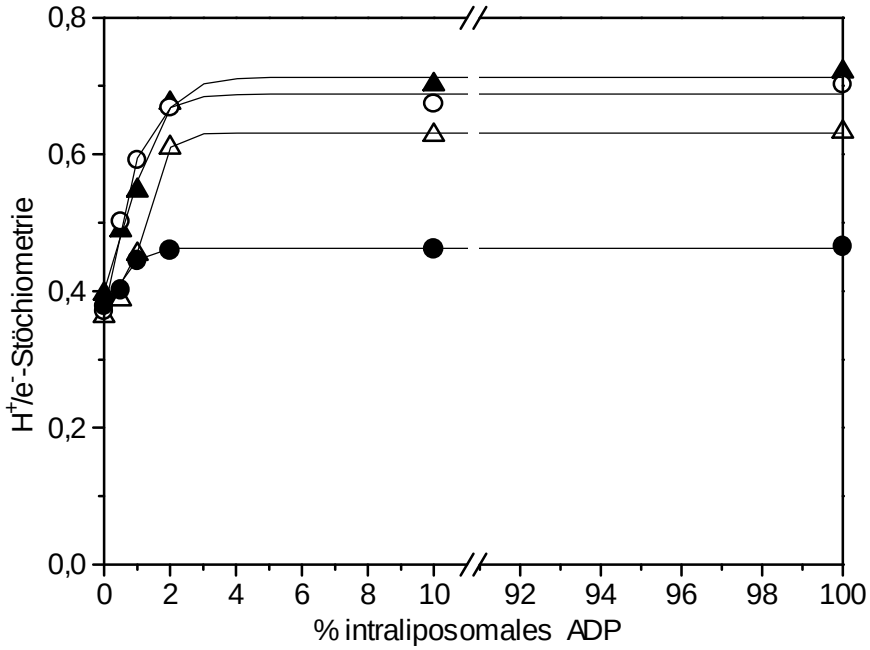

Fig. 27: Einfluß extraliposomaler Nukleotide auf die Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und 500 µM extraliposomaler Nukleotide zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert. Geschlossene Dreiecke: Kontrolle ohne extraliposomale Nukleotide; offene Dreiecke: +500 µM extraliposomales ATP; geschlossene Kreise: +500 µM extraliposomales ADP; offene Kreise: +500 µM extraliposomales AMP.

Fig. 28 zeigt die Abhängigkeit der Variation des extraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses, bei konstantem intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnis, auf die Protonentranslokation. Vesikel, die intraliposomal 5 mM ATP enthielten besaßen eine konstante H^+/e^--Stöchiometrie von etwa 0,45, unabhängig vom extraliposomalen Nukleotidverhältnis. Im Gegensatz dazu war, in Abhängigkeit des extraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses, eine starke Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei Vesikeln die intraliposomal 5 mM ADP enthielten zu beobachten. Die halbmaximale Abnahme der Protonentranslokation lag hier bei ungefähr 99% extraliposomalem ATP (1% ADP).

3.13 Wirkung von extraliposomalen Nukleotiden auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX

Die Messung der Protonentranslokation mit intraliposomalen Nukleotiden entspricht nicht den physiologischen Bedingungen, da in der Zelle immer auch extraliposomale (cytosolische) Nukleotide vorhanden sind. Aus diesem Grund wurden die Messungen der Protonentranslokation auch in Anwesenheit von extraliposomalen Nukleotiden durchgeführt.

Der Einfluß von extraliposomalen Nukleotiden auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX in Abhängigkeit der intraliposomalen ATP/ADP-Konzentration ist in Fig. 27 dargestellt. Aufgrund der Pufferkapazität der Nukleotide erfolgten die Messungen bei einer geringeren Nukleotidkonzentration von 500 µM, die aber ausreicht um vorhandene Effekte zu messen. Die Zugabe der extraliposomalen Nukleotide erfolgte ca. 5 Minuten vor jeder Messung. Eine lange Inkubationszeit der extraliposomalen Nukleotide war in diesem Falle nicht nötig, da durch Rekonstitutionszeit von 22 Stunden sämtliche kryptischen Bindungsstellen, extra- sowie intraliposomal, von Cholat Molekülen befreit wurden. Durch die nach der Rekonstitition immer erfolgte Dialyse, wurden sämtliche noch am Enzym haftenden extraliposomalen Nukleotide entfernt, so daß man von einer tatsächlichen extraliposomalen Nukleotidkonzentration von 500 µM ausgehen konnte.

Die Zugabe von extraliposomalem AMP hatte, wie aus Fig. 27 (offene Kreise) zu entnehmen ist, weder eine Auswirkung auf die Protonentranslokation noch auf die Abnahme dieser durch hohe ATP/ADP-Verhältnisse. Die Zugabe von extraliposomalem ATP führte zu einer Verringerung der Protonentranslokation. Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie wurde durch extraliposomales ATP nur geringfügig beeinflußt (offene Dreiecke). ADP hingegen hatte einen deutlichen Einfluß auf die H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter COX und deren Abnahme duch intraliposomales ATP. Die Protonentranslokation nahm nach Zugabe von extraliposomalem ADP, im Vergleich zu der Kontrollmessung ohne extraliposomale Nukleotide (geschlossene Dreiecke), stark ab. Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen (geschlossene Kreise) war bei extraliposomalem ADP nahezu aufgehoben.

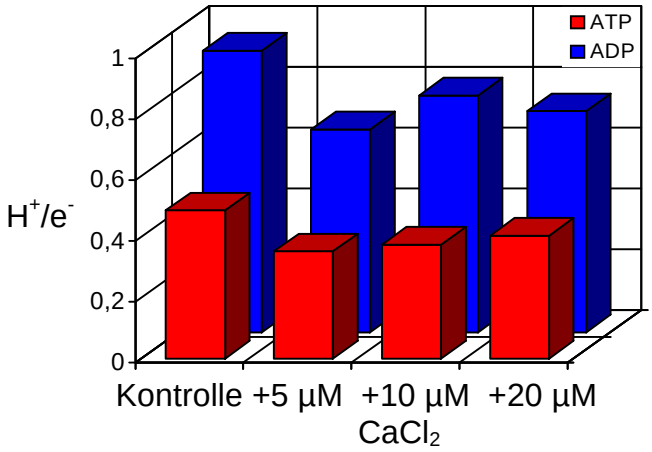

Fig. 25: Einfluß von intraliposomalem $CaCl_2$ auf die H^+/e^--Stöchoimetrie von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ADP (blaue Säulen), 5 mM ATP (rote Säulen) und den angegebenen Mengen $CaCl_2$, gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und den angegebenen Mengen $CaCl_2$ zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

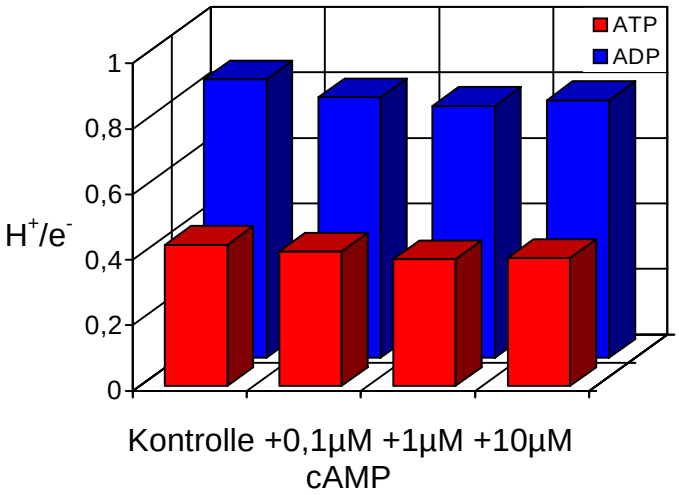

Fig. 26: Einfluß des "second messengers" cAMP auf die Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ADP (blaue Säulen) und 5 mM ATP (rote Säulen), gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und den angegebenen Mengen cAMP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

Dieses Ergebnis zeigte eindeutig, daß es sich weder um einen Effekt der Ionenstärke handelt noch um einen Effekt von K^+. Verantwortlich für die Aufhebung der ATP-Hemmung von rekonstituierter COX war vielmehr die Konzentration an intraliposomalem Cl^-. Das es sich um einen Effekt des intraliposomalen Chloridgehaltes handelte und nicht um einen Effekt des extraliposomalen Chloridgehaltes, ergab sich aus der Tatsache, daß im Messpuffer eine Chloridkonzentration von 100 mM Cholinchlorid und 5 mM KCl vorlag, und geringe Änderungen der Cl^- -Konzentration keinen weiteren Einfluß haben sollten.

3.12 Messung der Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter COX in Abhängigkeit der "second Messenger" $CaCl_2$ und cAMP.

Der am besten bekannte "second messenger" ist 3', 5'-cyclo-AMP (cAMP). Es entsteht durch die Wirkung der Adenylatzyklase, die durch die α-Untereinheit des G-Proteins aktiviert wird. cAMP wirkt dann in der Zelle auf verschiedene Prozesse ein. Es kann z.B. Enzymsysteme aktivieren. Bei manchen hormonalen Systemen übernimmt Calcium die Rolle eines "second messengers". Es wird z.B. durch die Wechselwirkung des Hormons mit dem Rezeptor oder durch Interaktion mit der α-Untereinheit des G-Proteins ein Ionenkanal geöffnet. Calcium strömt aus dem extrazellulären Bereich in die Zellen ein und erhöht die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration. Dadurch werden eine Reihe von Sekundärprozesen ausgelöst. Es sollte nun untersucht werden, ob diese "second messenger" auch einen Einfluß auf die COX haben.

In Fig. 25 und 26 ist die Abhängigkeit der Protonentranslokation von der intra- sowie extraliposomalen $CaCl_2$- und der extraliposomalen cAMP-Konzentration dargestellt. Im Gegensatz zu den Experimenten in 3.11, wurden in diesen Versuchen nur Konzentrationen von $CaCl_2$ und cAMP im µM-Bereich eingesetzt. Höhere Konzentrationen wären nicht mehr physiologisch. Wie aus den beiden Figuren hervorgeht, war kein deutlicher Effekt der beiden "second messenger" messbar. Man konnte lediglich eine geringe Abnahme der H^+/e^--Stöchiomtrie durch $CaCl_2$ feststellen. Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen lag aber weiterhin bei 50%. Die "second messenger" $CaCl_2$ und cAMP haben demnach keinen Einfluß auf die Protonentranslokation.

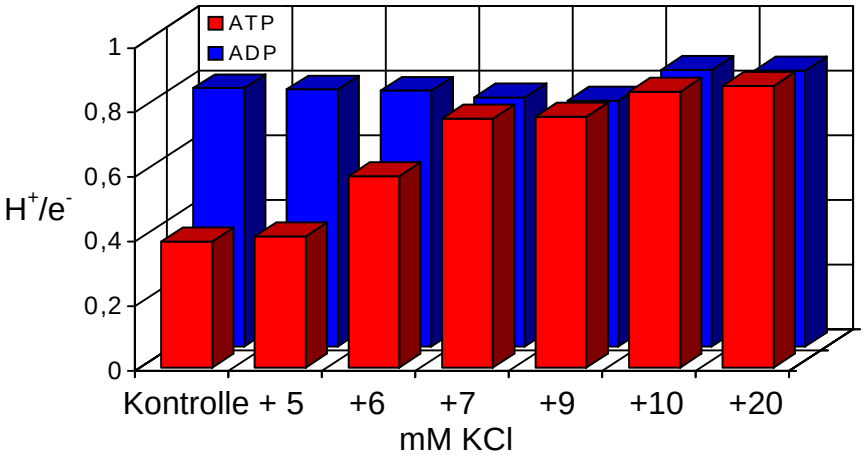

Fig. 23: Einfluß der Ionenstärke auf die Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ADP (blaue Säulen), 5 mM ATP (rote Säulen) und den angegebenen Mengen KCl, gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM KHepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und den angegebenen Mengen KCl zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

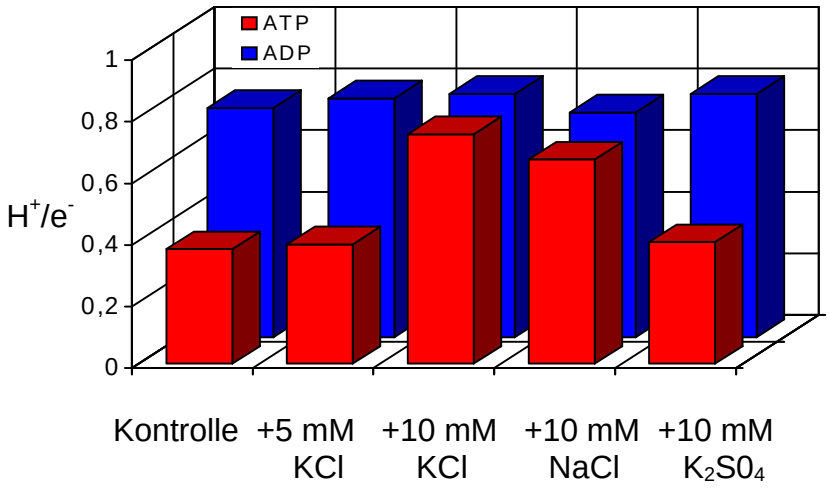

Fig. 24: Messung der Protonentranslokation in Abhängigkeit von verschiedenen Salzen von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ADP (blaue Säulen), 5 mM ATP (rote Säulen) und den angegebenen Mengen KCl, NaCl und K_2SO_4, gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin und den angegebenen Mengen KCl, NaCl und K_2SO_4 zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert.

Bei gleichzeitiger Variation des intra- sowie extraliposomalen pH-Wertes (Fig. 22C) war in keinem Fall die vollständige Hemmung der Protonentranslokation durch ATP um 50% zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 6,5 (extra- und intraliposomal) war die Hemmung der Protonentranslokation vollständig aufgehoben und bei einem pH-Wert von 8,0 war die H^+/e^--Stöchiometrie mit intraliposomalem ATP sogar geringfügig größer als im Falle von intraliposomalem ADP. Der Verlauf der Protonentranslokation bei extra- und intraliposomaler Variation des pH-Wertes entsprach der Kombination der Variation des extraliposomalen und der Variation des intraliposomalen pH-Wertes. Die H^+/e^--Stöchiometrie der Vesikel mit intraliposomalem ADP nahm von 0,45 bei pH 6,5 auf 0,98 bei pH 7,4 zu, um dann bei pH 8,0 wieder auf 0,82 abzunehmen. Parallel dazu stieg die H^+/e^--Stöchiometrie der ATP enthaltenden Vesikel von 0,40 (pH 6,5) auf 0,96 (pH 8,0) an.

3.11 Einfluß der Ionenstärke auf die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen

Um den Einfluß der Ionenstärke auf die H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen zu untersuchen, wurden die Messungen in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an intra- sowie extraliposomalem KCl durchgeführt (Fig. 23). Die Erhöhung der KCl-Konzentration führte ab einer KCl-Konzentration von 6 mM zu einer teilweisen Aufhebung der Hemmung der Protonentranslokation von rekonstituierter COX durch ATP. Eine KCl-Konzentration von 7 mM führte bereits zur vollständigen Aufhebung der ATP-Hemmung. Die Messung der Protonentranslokation in Anwesenheit von NaCl und K_2SO_4 (Fig. 24) gab Aufschluß darüber, ob dieser Effekt auf der steigenden Konzentration von K^+ oder Cl^- beruht. Die Hemmung der Protonentranslokation von rekonstituierter COX durch ATP wurde durch 10 mM KCl sowie durch 10 mM NaCl aufgehoben. Durch die Anwesenheit von 10 mM K_2SO_4 hingegen wurde die H^+/e^--Stöchiometrie nicht beeinflußt.

intraliposomalen pH-Wert von 8,0, war die ATP-Hemmung der Protonentranslokation vollständig aufgehoben. Im Gegensatz zu Fig. 22A, war dies hier aber durch eine Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie der ADP enthaltenden Vesikel und nicht durch einen Anstieg der H^+/e^--Stöchiometrie der ATP enthaltenden Vesikel zu erklären.Bei saureren pH-Werten (7,0 und 6,5), war die Hemmung durch ATP noch vorhanden, aber war deutlich geringer als im Falle der Kontrollmessung (intraliposomal pH 7,4 und extraliposomal pH 7,0).

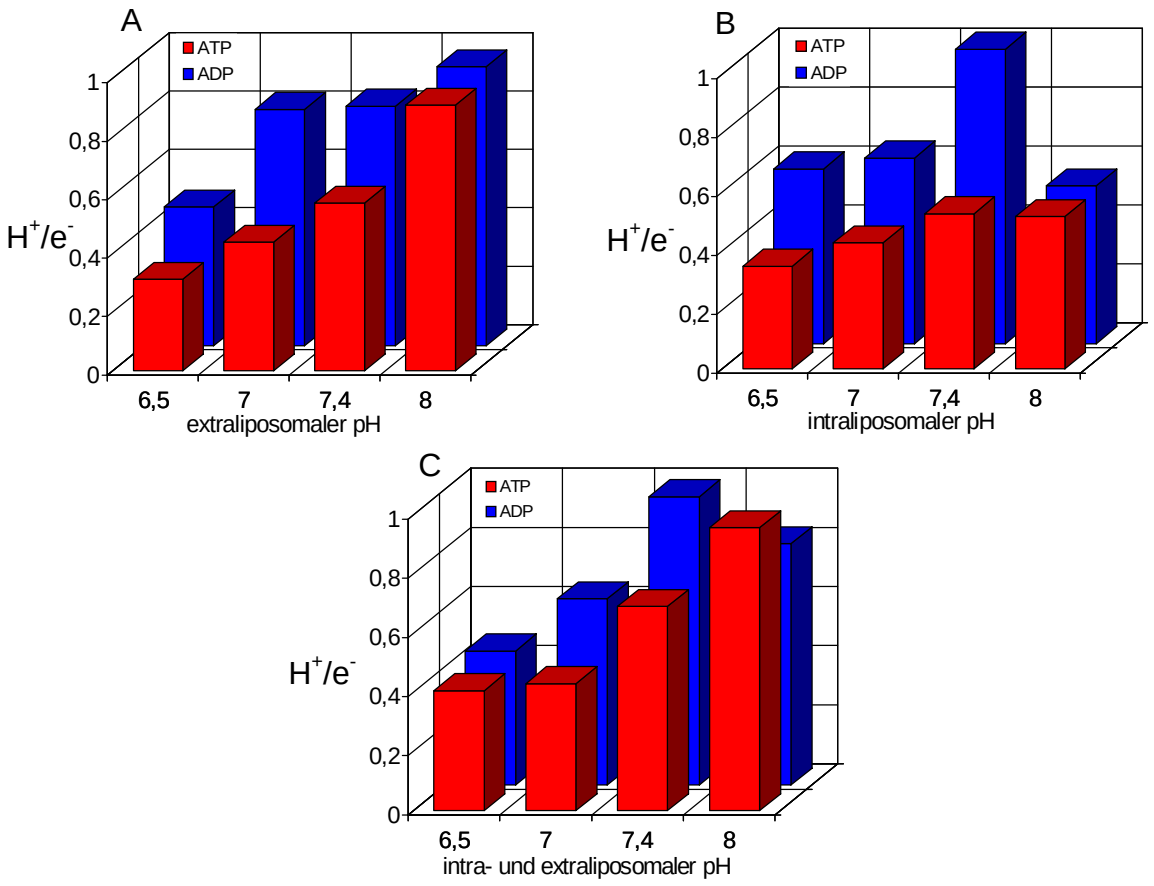

Fig. 22: pH-Wert Abhängigkeit der Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit von 5 mM ADP (blaue Säulen) und 5 mM ATP (rote Säulen) und unter den angegebenen pH-Werten, gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium unter den angegebenen pH-Werten bei einer Temperatur von 25 °C registriert. A: pH-Wert intraliposomal 7,4 und extraliposomal wie angegeben; B: pH-Wert extraliposomal 7,0 und intraliposomal wie angegeben; C: pH-Wert intraliposomal und extraliposomal wie angegeben.

3.10 Einfluß des pH-Wertes auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX

Die von Wilms et al. (1980) und von Papa et al. (1987) durchgeführten Experimente, zeigten einen deutlichen Effekt des pH-Wertes auf die Aktivität und die Protonentranslokation von Rinderherz COX. Aufgrund der dort gezeigten Effekte schien es interessant, den Einfluß des pH-Wertes in Zusammenhang mit der in dieser Dissertation gezeigten Regulation der Protonentranslokation, durch intraliposomale Nukleotide, zu untersuchen.

Die Variation des pH-Wertes, sowohl extra- als auch intraliposomal, hatte einen großen Einfluß auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX und gleichzeitig auf die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen (Fig. 22). Wurde der extraliposomale pH-Wert variiert und gleichzeitig der intraliposomale pH-Wert konstant bei 7,4 gehalten (Fig. 22A), war die Protonentranslokation bei einem extraliposomalen pH-Wert von 6,5 deutlich geringer als bei einem extraliposomalen pH-Wert von 8,0. Dies gilt sowohl für Vesikel die 100% ATP enthielten, als auch für Vesikel mit 100% intraliposomalem ADP. Parallel dazu war eine Aufhebung bzw. Verringerung der Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen zu beobachten, wenn die extraliposomalen pH-Werte 8,0 bzw. 6,5 betrugen. Die Aufhebung der ATP-Hemmung der Protonentranslokation bei einem extraliposomalen pH-Wert von 8,0 war, wie in Fig. 22A zu sehen ist, durch einen Anstieg der Protonentranslokation der ATP enthaltenden Vesikel und nicht durch eine Abnahme der Protonentranslokation der ADP enthaltenden Vesikel bedingt.

Variation des intraliposomalen pH-Wertes (von pH 6,5-8,0) bei einem konstanten extraliposomalen pH-Wert von 7,0 führte zu einem ganz anderen Bild (Fig.22B). Die Protonentranslokation war im Falle von Vesikel-präparationen mit intraliposomalem ADP über den gesamten pH-Bereich von 6,5 bis 8,0 konstant, lag aber insgesamt nur bei einer H^+/e^--Stöchiometrie zwischen 0,5 und 0,6. Einzige Ausnahme bildete dabei die Vesikelpräparation mit einem intraliposomalen pH-Wert von 7,4, dort war eine hohe Protonentranslokation von 1,0 zu erkennen. Bei den Vesikelpräparationen mit intraliposomalem ATP war hingegen ein Anstieg der Protonentranslokation von 0,35 auf ungefähr 0,5 zu beobachten. Die vollständige Hemmung der Protonentranslokation duch ATP um 50% war bei der Variation des intraliposomalen pH-Wertes nur zu beobachten, wenn der intraliposomale pH-Wert 7,4 und der extraliposomale pH-Wert 7,0 betrug. Bei einem

In Fig. 21A ist eine CCCP-Titration der Protonentranslokation in Abhängigkeit des intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses gezeigt. Der Effekt von hohen ATP/ADP-Verhältnissen auf die H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter COX war praktisch unabhängig von der zugegebenen Menge CCCP. Unter 2% intraliposomalem ADP nahm die H^+/e^--Stöchiometrie ab, und war bei 0% ADP (100% ATP) nur noch halb so groß wie der Wert über 2% ADP. Die halbmaximale Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie lag konstant bei 99% ATP (1% ADP). Auffällig war die drastische Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei niedrigen ATP/ADP-Verhältnissen von 0,8 auf 0,2 (Fig. 21B).

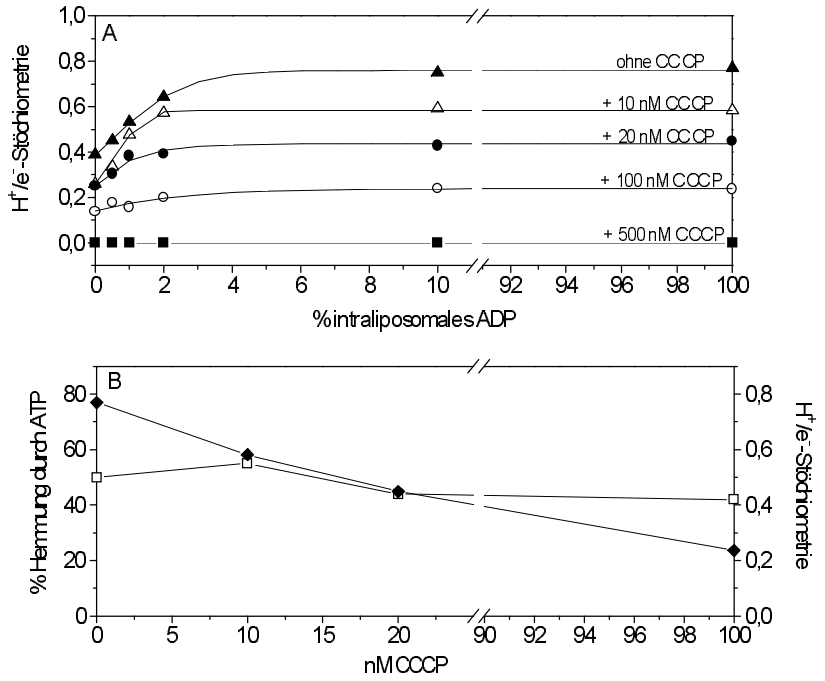

Fig. 21: Einfluß von kleinen Mengen CCCP auf die Abnahme der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin sowie den angegebenen Konzentrationen CCCP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Geschlossene Dreiecke: ohne CCCP; offene Dreiecke: + 10 nM CCCP; geschlossene Kreise: + 20 nM CCCP; offene Kreise: +100 nM CCCP; geschlossene Vierecke: + 500 nM CCCP. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert (A). B: Geschlossene Karos: H^+/e^--Stöchiometrie bei 100% ADP; offene Vierecke: % Hemmung durch ATP.

3.9 Einfluß von CCCP auf die Abnahme der H^+/e^-- Stöchiometrie von rekonstituierter COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen

Die Vorinkubation der rekonstituierten Rinderherz COX mit kleinen Mengen CCCP (10 nM bis 500 nM) führte zu einer deutlichen Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie, wobei jedoch die Unterschiede zwischen ATP und ADP erhalten blieben. Bis zu einer Konzentration von 300 nM konnten noch auswertbare H^+/e^--Stöchiometrien gemessen werden. War eine Konzentration von 500 nM CCCP erreicht, wurde eine vollständige Entkopplung der Protonentranslokation durch CCCP erhalten (Fig. 20).

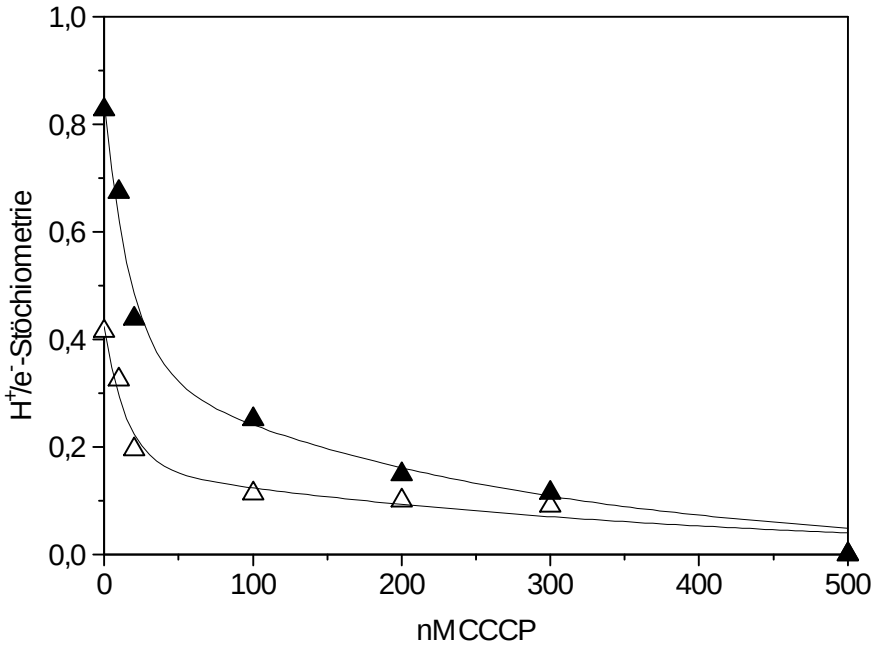

Fig. 20: CCCP-Titration der Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0, 2 µg/mL Valimomycin sowie den angegebenen Konzentrationen CCCP zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert. Geschlossene Dreiecke: intraliposomal 100% ADP; offene Dreiecke: intraliposomal 100% ATP.

3.8 Einfluß von Magnesiumionen und EDTA auf die Hemmung der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen ist unabhängig von Magnesiumionen oder EDTA (Fig. 19). Dieses Ergebnis impliziert, daß ATP und ADP als freie Moleküle an das Enzym gebunden werden und nicht als Magnesiumkomplex. Die Daten aus Fig. 19 schliessen außerdem die größere Komplexbildungskapazität von ATP, verglichen mit ADP, als Ursache für die Verringerung der H^+/e^--Stöchiometrie aus (Kadenbach et al., 1997b).

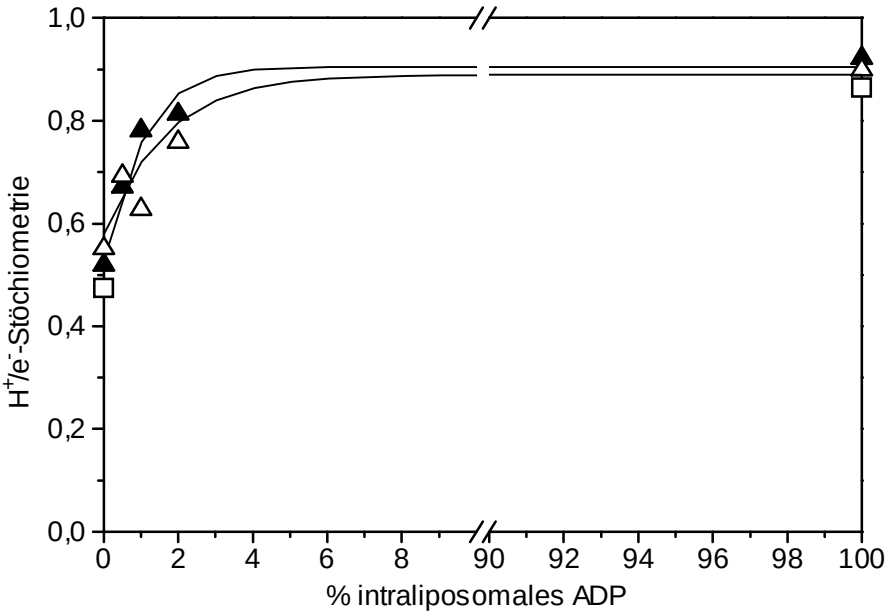

Fig. 19: Effekt von intraliposomalem Mg^{2+} und EDTA auf die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP (Quadrate), in Anwesenheit von 2 mM $MgCl_2$ (geschlossene Dreiecke) oder in Anwesenheit von 2 mM EDTA (offene Dreiecke), gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert.

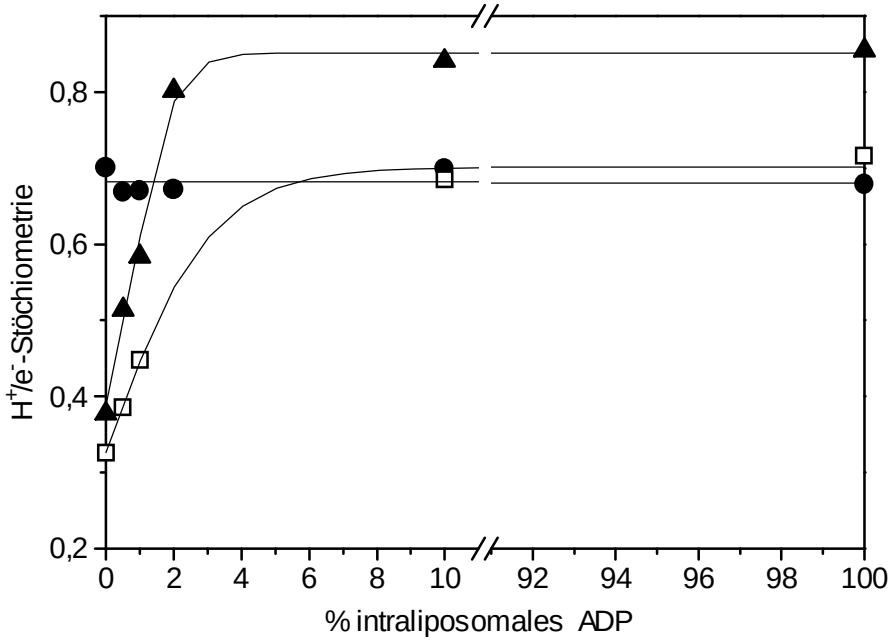

Fig. 18: Einfluß eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX auf die Hemmung der H^+/e^--Stöchiometrie des rekonstituierten Enzyms bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptions-methode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert. Dreiecke: Proteoliposmen die in Abwesenheit eines Antikörpers rekonstituiert wurden; Kreise: Proteoliposmen die in Anwesenheit eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheit VIa-H rekonstituiert wurden; offene Quadrate: Proteoliposomen die in Anwesenheit eines Kontroll Rinder IgG rekonstituiert wurden.

3.7 Einfluß von monoklonalen Antikörpern auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX

Wie von Anthony et al. (1993) gezeigt wurde, hebt ein monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX die Stimulierung der Aktivität von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX durch intraliposomales ADP auf. Die Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers mit zwei Untereinheiten der COX wurde schon von Schneyder et al. (1991) gezeigt. Der Grund für diese Kreuzreaktivität ist in der evolutionären Ähnlichkeit der Untereinheiten VIa und VIc zu finden. Der Antikörper reagiert gewebsspezifisch mit der Herzisoform von Untereinheit VIa (VIa-H), aber nicht mit der Untereinheit VIa des Rinderleberenzyms (VIa-L).

In Fig. 18 ist die Wirkung der Inkubation von rekonstituierter Rinderherz COX mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheit VIa-H auf die Protonentranslokation gezeigt. Die H^+/e^--Stöchiometrie von Proteoliposomen, die das mit Antikörper VIa-H inkubierte Enzym enthielten, wurde bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen nicht gehemmt. Inkubation der Rinderherz COX mit einem unspezifischen Rinder IgG verhinderte die Halbierung der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen nicht. Die Kontrollvesikel, die in Abwesenheit eines Antikörpers rekonstituiert wurden, zeigten wie erwartet die Abnahme der Protonentranslokation um 50%.

Der molekulare Mechanismus der teilweisen "Entkopplung" der Energietransduktion (Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie) in Rinderherz COX basiert auf einem Austausch von gebundenem ATP durch ADP auf der N-terminalen Seite, matrix-orientierte Domäne der Untereinheit VIa-H. Dies folgt aus der Tatsache, daß ein monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheit VIa-H, der nicht mit der Leberisoform der Untereinheit VIa-L reagiert (Anthony et al., 1993), die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen verhindert (Frank and Kadenbach, 1996).

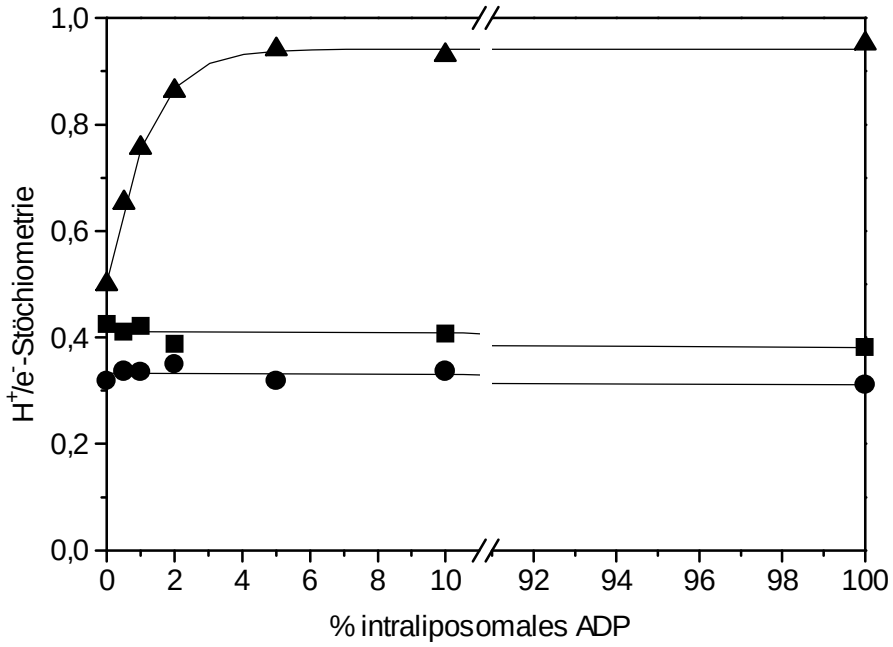

Fig. 17: Einfluß des intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses auf die H^+/e^--Stöchiometrie von Rinderherz COX (Dreiecke), Rindernieren COX (Vierecke) und Rinderleber COX (Kreise). Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert.

3.6 Einfluß von intraliposomalen Nukleotiden auf die Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderleber und Rindernieren COX

In früheren Arbeiten von Kadenbach et al. (1991) konnte gezeigt werden, daß ADP gewebspezifisch mit COX aus Säugetieren reagiert. Im Gegensatz zum Herzenzym, wurde mit rekonstituierter Rinderleber COX keine Stimulation des K_M-Wertes für Cytochrom c durch intraliposomales ADP erhalten. Aufgrund dieser Ergebnisse lag es nahe die Regulierbarkeit der Protonentranslokation von rekonstituierter Leber COX durch hohe ATP/ADP-Verhältnisse zu untersuchen. Dazu wurde Rinderleber und Rindernieren COX nach der hydrophoben Adsorptionsmethode, gefolgt von Dialyse rekonstituiert. Die intraliposmale [ATP + ADP] Konzentration betrug konstant 5 mM (Fig. 17). Während bei der in Liposmen rekonstituierten Rinderherz COX die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie um 50% deutlich zu erkennen war, war diese Abnahme weder beim Leberenzym (Kadenbach et al., 1997a) noch beim Nierenenzym messbar. Die Protonentranslokation betrug unabhängig vom intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnis bei der Leber etwa 0,3 und bei der Niere etwa 0,4.

Der nicht messbare Effekt von hohen ATP/ADP-Verhältnissen auf die H^+/e^--Stöchiometrie war nicht durch die gesamt niedrigere H^+/e^--Stöchiometrie des Leber- und Nierenenzyms bedingt. Wie in Fig. 16 bereits gezeigt werden konnte, wurde eine Abnahme der Protonentranslokation um 50% auch bei Rinderherzenzym-Präparationen erhalten, die lediglich eine H^+/e^--Stöchiometrie von maximal 0,3 aufwiesen. Demnach ist weder die Protonentranslokation des Leberenzyms noch die des Nierenenzyms durch das ATP/ADP-Verhältnisse regulierbar.

Tab. 2: Vergleich der Protonentranslokation von rekonstituierter Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz, Rinderleber und Rinderniere. Rinderherz COX wurde nach der "Triton-Methode" und nach der "Yoshikawa-Methode" isoliert und nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode gefolgt von Dialyse in Liposomen rekonstituiert. Rinderleber und Rindernieren COX wurde nach der "Triton-Methode" isoliert und ebenfalls nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode gefolgt von Dialyse in Liposomen rekonstituiert. Die H^+/e^--Stöchiometrien wurden, wie im Methodenteil beschrieben, in Anwesenheit von 5 mM ADP bestimmt.

Enzym (Isolationsmethode)	**H^+/e^--Stöchiometrie**
COX aus Rinderherz (Triton Methode)	0,656
COX aus Rinderherz (Triton Methode)	0,850
COX aus Rinderherz (Triton Methode)	0,751
COX aus Rinderherz (Triton Methode)	0,759
COX aus Rinderherz (Triton Methode)	0,716
Mittelwert der 5 Rinderherz COX-Präparationen (Triton Methode)	**0,746**
COX aus Rinderherz (Yoshikawa Methode)	0,929
COX aus Rinderherz (Yoshikawa Methode)	0,984
COX aus Rinderherz (Yoshikawa Methode)	0,662
COX aus Rinderherz (Yoshikawa Methode)	0,853
COX aus Rinderherz (Yoshikawa Methode)	0,842
Mittelwert der 5 Rinderherz COX-Präparationen (Yoshikawa Methode)	**0,854**
Mittelwert aller 10 Rinderherz COX-Präparationen	**0,800**
COX aus Rinderleber (Triton Methode)	0,337
COX aus Rinderleber (Triton Methode)	0,412
COX aus Rinderleber (Triton Methode)	0,372
Mittelwert aller 3 Rinderleber COX-Präparationen	**0,373**
COX aus Rinderniere (Triton Methode)	0,425
COX aus Rinderniere (Triton Methode)	0,361
Mittelwert der Rindernieren COX-Präparationen	**0,393**

3.5 Vergleich der Protonentranslokation rekonstituierter COX aus Rinderherz, Rinderleber und Rinderniere

Die Isolation von Rinderherz und Rindernieren COX nach der Isolationsmethode von Yoshikawa erwies sich als äußerst schwierig. Unter den angewandten Bedingungen (siehe Methodenteil) war es nicht möglich, ein reines Enzym zu erhalten. Das Enzym enthielt immer nicht zu vernachlässigende Mengen bc_1-Komplex und andere Verunreinigungen, die nicht zu entfernen waren. Der Versuch, daß erhaltene Enzym mittels einer DEAE-Sephacel-Ionenaustauschchromatographie vom bc_1-Komplex zu reinigen, ergab zu geringe Ausbeuten. Somit erwies sich diese Methode als nicht geeignet. Mit COX, die nach der Triton-Methode isoliert wurde, wurden wesentlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Reinheit und Ausbeute erhalten.

Wie in Tab. 2 zu sehen ist, wurden mit allen Rinderherzenzym Präparationen doppelt so hohe Werte für die H^+/e^--Stöchiometrie wie mit dem Rinderleberenzym erhalten. Aufgrund des nicht so guten Reinheitskoeffizienten (E_{280}/E_{420}) für die vermessene Rinderleber COX (zwischen 2,9-3,2) wurden die Protonentranslokationsexperimente mit rekonstituierter Rindernieren COX wiederholt. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß die niedrige H^+/e^--Stöchiometrie durch verunreinigte COX zustande kam. Der Reinheitsquotient der verschiedenen Rindernieren Präparationen lag zwischen 2,7 und 3,0 (H^+/e^--Stöchiometrien siehe Tab. 2). Der Reinheitsquotient der verwendeten Rinderherz-Präparationen lag zwischen 2,5 und 2,8. Wie in Tab. 2 zu sehen ist, konnte aber auch mit dem reineren Rindernierenenzym keine wesentlich höhere H^+/e^--Stöchiometrie erhalten werden. Es konnte demnach ausgeschlossen werden, daß die niedrige H^+/e^--Stöchiometrie des Leberenzyms durch Verunreinigungen zustande kam. Sämtliche Rinderleber- und Rindernieren-Präparationen ergaben H^+/e^--Stöchiometrien, die ungefähr die Hälfte der mit rekonstituierter Rinderherz COX erhaltenen Werte besaßen. Mit keiner der unterschiedlichen Rinderleber- oder Rindernierenenzym Präparationen konnte eine H^+/e^--Stöchiometrie von annähernd 1,0, wie im Falle des Herzenzyms, erhalten werden.

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen war unabhängig vom maximalen Wert der H^+/e^--Stöchiometrie. Dies folgte aus den Daten die mit 3 verschiedenen COX Präparationen erhalten wurden (Fig. 16; Frank and Kadenbach, 1996). Obwohl die H^+/e^--Stöchiometrien zwischen 0,2 und 0,9 variieren, nahm die Protonentranslokation immer auf die Hälfte ab. Die maximal erreichbare H^+/e^--Stöchiometrie war abhängig von der Reinheit des Enzyms und der damit verbundenen Qualität der Proteoliposomen.

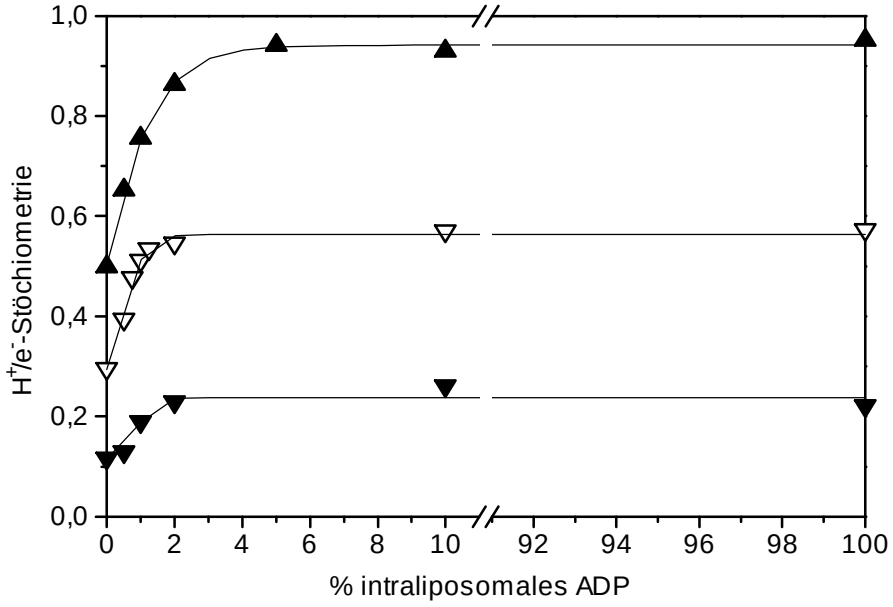

Fig. 16: Abnahme der Protonentranslokation von verschiedenen, in Liposomen rekonstituierten, Rinderherz COX Präparationen bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert. Die dargestellten Daten wurden mit drei unterschiedlichen Enzym-Präparationen erhalten.

Der Einfluß von Adeninnukleotiden auf die Protonentranslokation war nur in Anwesenheit des Kaliumionophores Valinomycin messbar. Wurden die Messungen in Abwesenheit von Valinomycin durchgeführt, bewirkte die Zugabe von Ferrocytochrom c eine Protonenaufnahme durch die rekonstituierte COX (Krab and Wikström, 1978; Papa et al., 1983; O'Shea et al. 1984; Steverding and Kadenbach, 1989). Der Wert der H^+/e^--Stöchiometrie betrug unabhängig vom intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnis ungefähr -0,5 (Fig. 15). Dieser Befund ist dadurch zu erklären, daß durch das aufgebaute Membranpotential die Protonenkonduktivität der Membran erhöht wurde und dadurch die Vesikel Protonen aufnahmen.

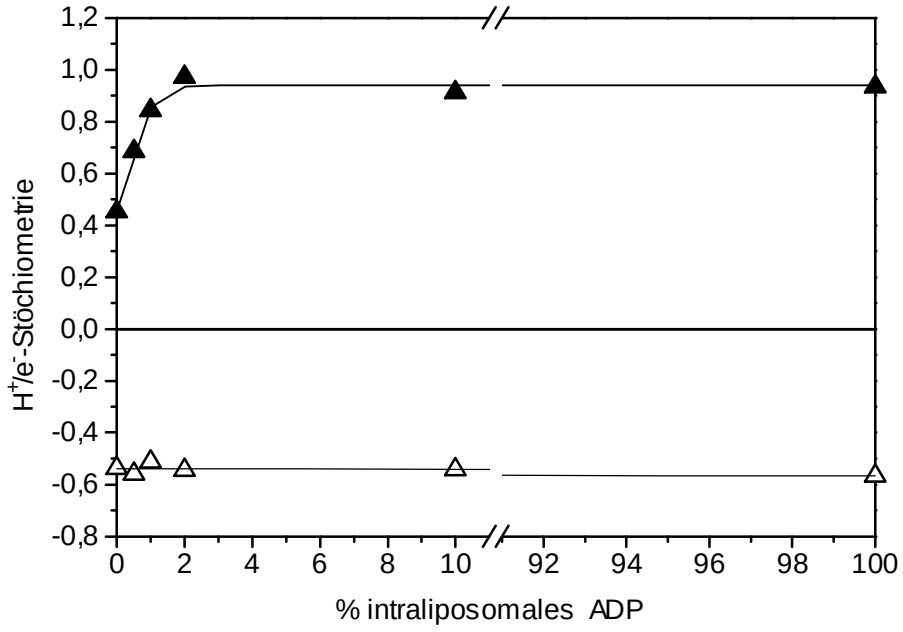

Fig. 15: Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX in Abhängigkeit des intraliposmalen ATP/ADP-Verhältnisses in An- und Abwesenheit des Kaliumionophores Valinomycin. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert: in Anwesenheit von 2µg/mL Valinomycin (geschlossene Dreiecke) und in Abwesenheit von Valinomycin (offene Dreiecke).

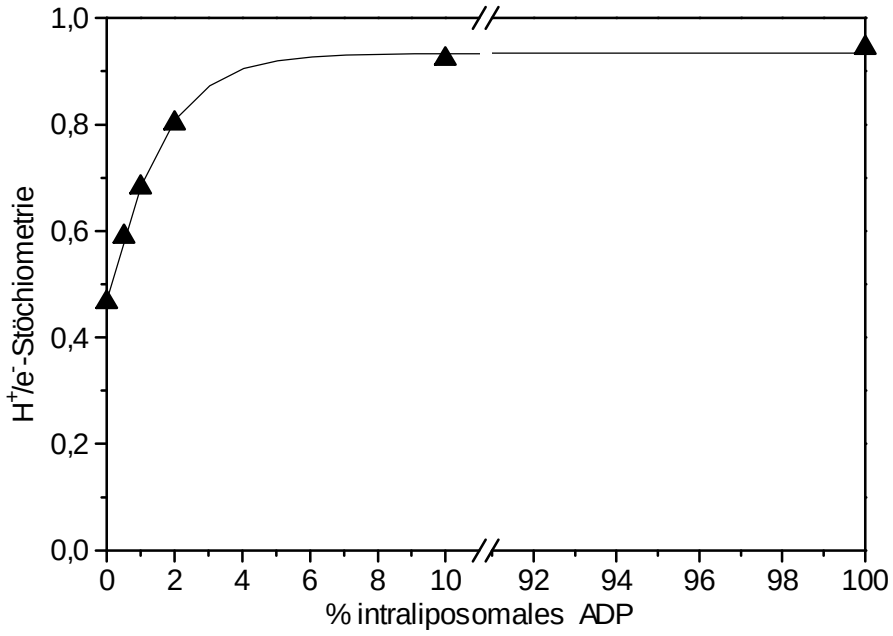

Fig. 14: Messung der Protonentranslokation in Abhängihkeit des intraliposomalen PNP-AMP/ADP-Verhältnisses. Ersatz des ATP in sämtlichen Vesikelpräparationen duch das nicht hydrolisierbare Derivat PNP-AMP. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden im Messpuffer (siehe Fig.5) und 2 µg/mL Valinomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C r egistriert.

Proteoliposomen, die kein intraliposomales Nukleotid enthalten, besaßen dieselbe H^+/e^--Stöchiometrie wie Vesikel, die intraliposomal 5 mM ADP enthielten (Tab. 1). Der Einfluß der Adeninnukleotide auf die Protonentranslokation scheint in einer Bindung von ATP und ADP an dieselbe Bindungsstelle zu liegen. Die Bindung von ATP oder ADP ist abhängig vom ATP/ADP-Verhältnis und nicht von der Konzentration an ATP. Dies geht aus Messungen hervor, in denen 10 mM Gesamtnukleotid anstelle von 5 mM Gesamtnukleotid eingesetzt wurde. Das erhaltene Ergebnis entsprach vollständig dem in Fig. 12 dargestellten. Wie aus Fig. 13 zu entnehmen ist, liegt die halbmaximale Abnahme der Protonentranslokation bei 99% ATP. Aufgrund dieses Ergebnisses liegt die Vermutung nahe, daß die Bindungsstelle für Adeninnukleotide, die zu einer Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie durch ATP führt, ADP mit einer etwa 100 mal höheren Affinität als ATP bindet.

Die partielle "Entkopplung" der Protonentranslokation der COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen ist spezifisch für Adeninnukleotide. Hohe GTP/GDP-Verhältnisse bewirkten keine Halbierung der H^+/e^--Stöchiometrie des rekonstituierten Rinderherz Enzyms (Fig. 13; Kadenbach et al., 1997b).

Um die Möglichkeit der partiellen Hydrolyse des GTP zu GDP und P_i und damit zu hohe H^+/e^--Stöchiometrien auszuschließen, wurde 5 mM PNP-GMP anstelle von GTP verwendet (Fig. 13, offenes Viereck). Auch mit dem nicht hydrolysierbaren GTP-Derivat war keine Verminderung der H^+/e^--Stöchiometrie bei 100% GTP zu beobachten. Dieselbe Kontrolle wurde für den Wert bei 100% ATP durchgeführt sowie für eine komplette Messreihe (Fig. 14). Auch hier war mit dem ATP-Derivat PNP-AMP keine weitere Verminderung der H^+/e^--Stöchiometrie zu messen. Die Protonentranslokation wurde weiterhin um 50% reduziert. Es konnte demnach ausgeschlossen werden, daß die Nukleotidtriphosphate bei der Messung bereits hydrolysiert vorlagen, sondern daß die Vesikel tatsächlich 100% ATP bzw. GTP enthielten. Auch kann ausgeschlossen werden, daß die H^+/e^--Stöchiometrie weiter gesenkt werden kann als 50%.

diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse waren ungünstige Signal/Rausch Verhältnisse bei den Messungen von niedrigen Turnover-Zahlen.

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen hingegen war relativ unabhängig von der Anzahl der Enzymturnover (Fig. 12B). Es war eine leichte Aufhebung der Hemmung der Protonentranslokation bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen festzustellen (von 54% Hemmung bei 4-6 TN auf 40% Hemmungbei 12 TN). Aufgrund der bei acht Enzymturnovern erhaltenen größten Werte für die H^+/e^--Stöchiometrie wurden alle weiteren Messungen bei acht Enzymturnovern durchgeführt.

Aus den Fig. 12 und 13 ist weiterhin zu entnehmen, daß bei 5 mM intraliposomal ATP (0% ADP) die H^+/e^--Stöchiometrie etwa 50% niedriger war als bei Konzentrationen unter 98% ATP (über 2% ADP). Zwischen 2% und 100% ADP innerhalb der Vesikel bleibt die H^+/e^--Stöchiometrie konstant.

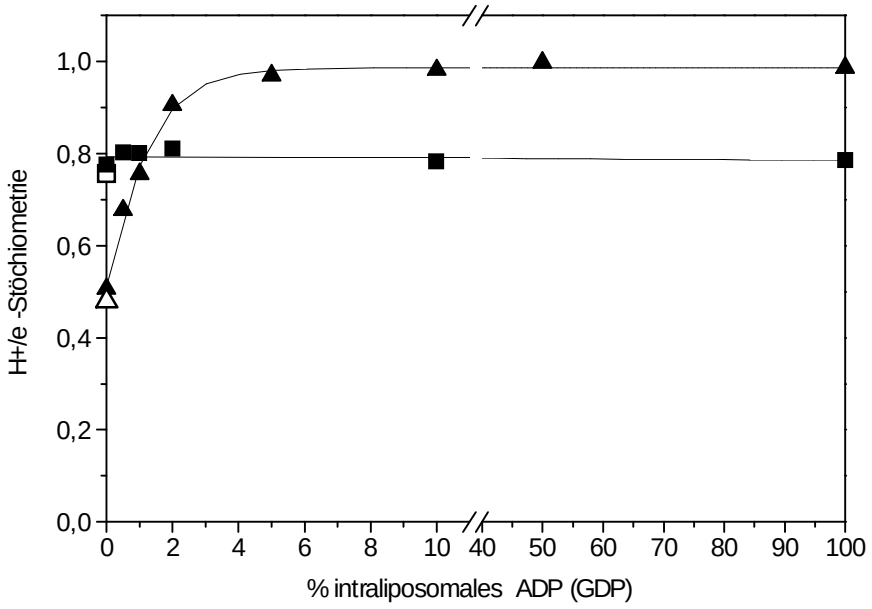

Fig. 13: Protonentranslokation in Abhängigkeit des intraliposomalen ATP/ADP- bzw. GTP/GDP-Verhältnisses. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP bzw GDP, gefolgt von Dialyse. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valinomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 6,4 µM Ferrocytochrom c (entspricht 8 Enzymturnovern) wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25°C registriert. Geschlossene Dreiecke: Intraliposomales ATP/ADP; offenes Dreieck: intraliposomales PNP-AMP; geschlossene Quadrate: intraliposomales GTP/GDP; offenes Quadrat: intraliposomales PNP-GMP.

In Fig. 12A ist die H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter Rinderherz COX in Abhängigkeit des intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses bei verschiedener Anzahl von Turnovern aufgetragen. Es ist eine Zunahme der Protonentranslokation von drei Enzymturnovern bis hin zu acht Enzymturnovern zu beobachten, die dann bei zwölf Turnovern wieder abnimmt.

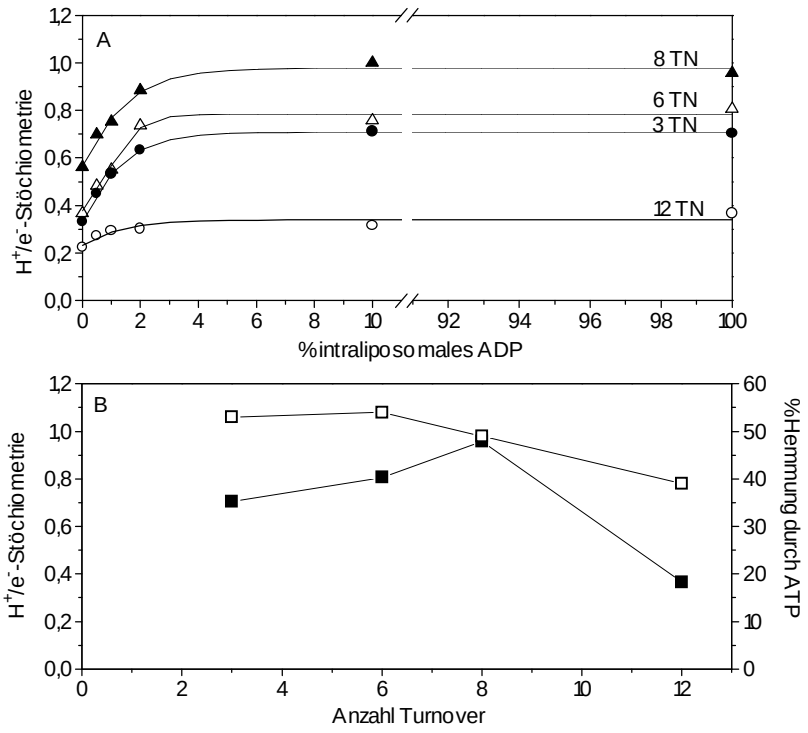

Fig. 12: Turnover-Abhängigkeit der Abnahme der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode gefolgt von Dialyse, in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 2,5-9,5 µM Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert (A), (geschlossene Dreiecke, offene Dreiecke, geschlossene Kreise, offene Kreise). B: Offene Vierecke: % Hemmung der H^+/e^--Stöchiometrie durch ATP; geschlossene Vierecke: H^+/e^--Stöchiometrie bei 100% ADP.

Dieses Resultat entsprach nicht dem erwarteten Ergebnis, da bei erhöhter Turnover-Zahl eine Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie erwartet wird. Diese Abnahme beruht auf der Tatsache, daß durch die erhöhte Turnover-Zahl des Enzyms ein größerer transmembraner Protonengradient aufgebaut wird. Die Konsequenz davon ist ein erhöhter Rückfluß von Protonen, welcher zu einer Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie führt (Casey et al., 1979). Die Ursache für

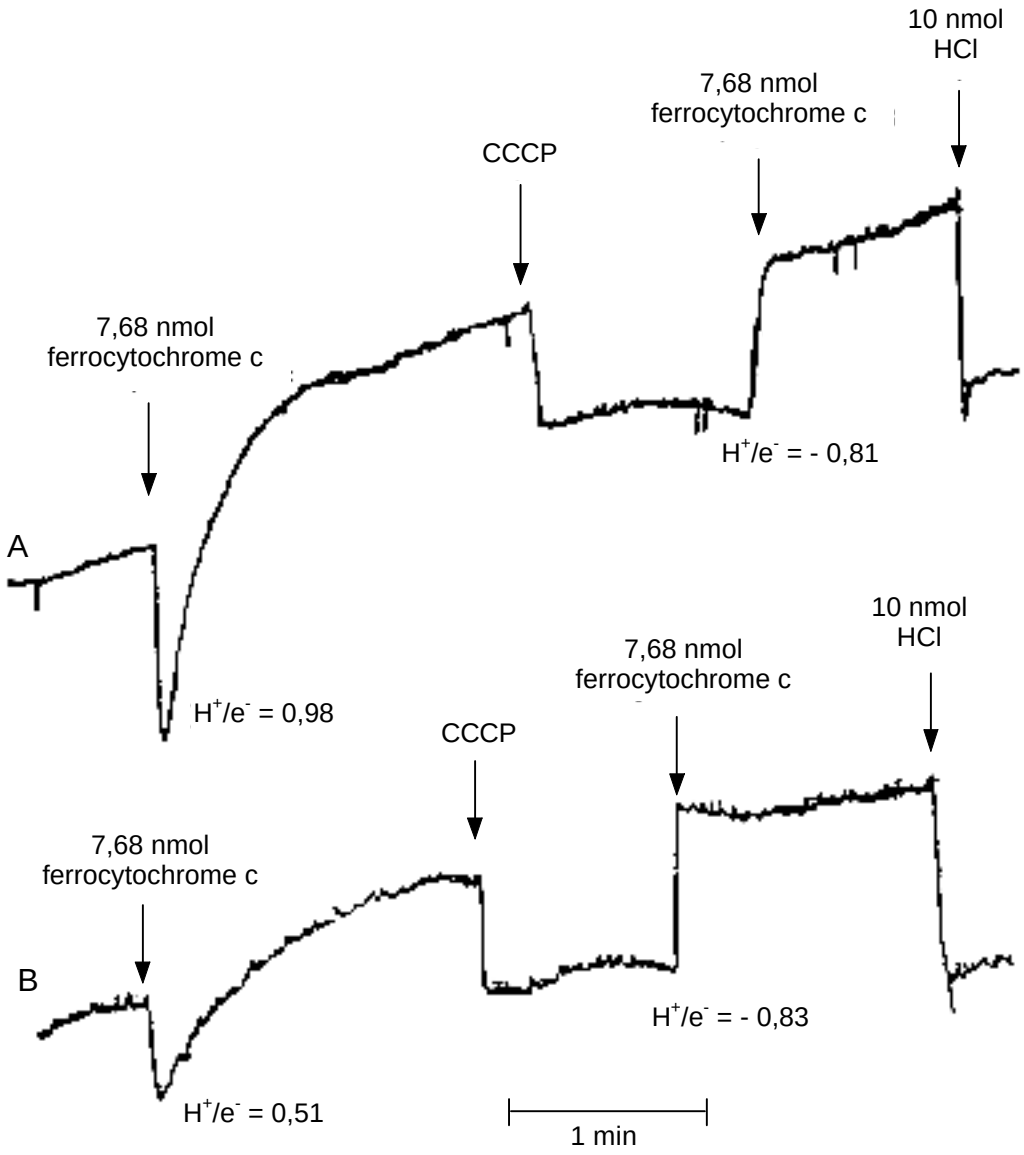

Fig. 11: Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode in Anwesenheit von 5 mM ADP (A) oder 5 mM ATP (B), gefolgt von Dialyse. COX-Vesikel wurden in 1 mM K-Hepes, 100 mM Cholinchlorid, 0,1 mM EDTA, 5 mM KCl, pH 7,0 und 2 µg/mL Valimomycin zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert. Nach Zugabe von 7,68 nmol Ferrocytochrom c wurden die pH-Änderungen im Außenmedium bei einer Temperatur von 25 °C registriert. Dort wo es angegeben ist, erfolgte eine Zugabe von 3µM CCCP. Entnommen aus Frank and Kadenbach, (1996).

3.4 Protonentranslokation rekonstituierter Rinderherz COX in Abhängigkeit von intraliposomalen Nukleotiden

Im Gegensatz zum üblicherweise gemessenen RCR-Wert ist der von Wilson und Prochaska (1990) eingeführte Parameter RCR_{Val} ein direktes Maß für die H^+/e^--Stöchiometrie rekonstituierter COX. Aufgrund der unter 3.1 beschriebenen Unterschiede zwischen ATP- und ADP-inkubierter COX lag es nahe, die Protonentranslokation rekonstituierter COX direkt zu messen.

Rinderherz COX wurde unter Anwesenheit von verschiedenen ATP/ADP-Verhältnissen in Liposomen rekonstituiert. Der Gesamtnukleotidgehalt betrug dabei konstant 5 mM. Nach Zugabe von kleinen Mengen Ferrocytochrom c zu der vesikelhaltigen Reaktionslösung konnte, in Anwesenheit des Kaliumionophores Valinomycin, eine Acidifizierung des Reaktionsmediums registriert werden. Dieser Acidifizierung folgte eine Alkalinisierung (Fig. 11).

Valinomycin komplexiert spezifisch das Kaliumion und transloziert dieses Kation elektrogen über die Lipid-Doppelschichtmembran (Moore and Pressman, 1964). Durch diesen Vorgang wird das entstandene Membranpotential neutralisiert (Sigel and Carafoli, 1980). In Anwesenheit des Protonophores CCCP wird eine Protonenaufnahme, was eine Alkalinisierung des Reaktionsmediums zur Folge hat, mit einer H^+/e^--Stöchiometrie von annähernd 1 durch die rekonstituierte COX registriert (Krab and Wikström, 1978; O'Shea et al., 1984; Steverding and Kadenbach, 1989) (Fig. 11). Der Verbrauch vom einem Proton pro Elektron ist Aufgrund der Wasserbildung im Inneren der Vesikel zu erwarten.

In Fig. 11A enthalten die Proteoliposomen 5 mM ADP, in Fig. 11B dagegen 5 mM ATP im Inneren der Vesikel. Mit Vesikeln, die intraliposomal 5 mM ATP enthalten, erhält man einen um 50% kleineren Peak für die Acidifizierung als im Falle der intraliposomal ADP enthaltenden Vesikel. Die daraus kalkulierten H^+/e^--Stöchiometrien erreichten Werte von 0,98 in Anwesenheit von ADP und 0,51 in Anwesenheit von ATP. Nach Zugabe des Entkopplers CCCP waren die Werte für die H^+/e^--Stöchiometrien annähernd gleich und betrugen -0,81 und -0,83 für die beiden Präparationen.

Wie Fig. 10 zeigt, ist die Abnahme der RCR- und RCR_{Val}-Werte um 50% bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen spezifisch für Adeninnukleotide. Hohe GTP/GDP-Verhältnise bewirken keine Halbierung der Atmungskontrolle.

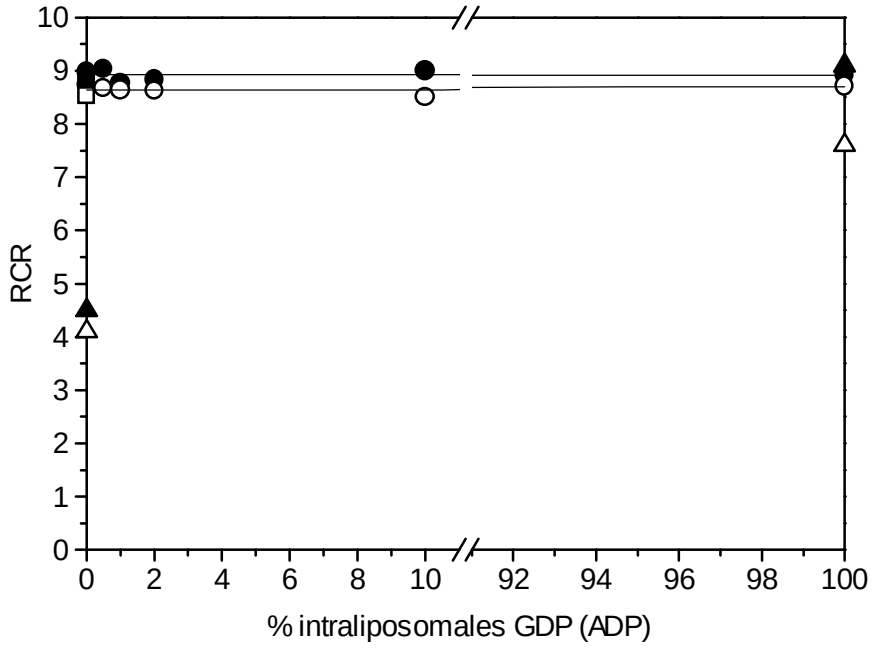

Fig. 10: Messung der Atmungskontrolle von rekonstituierter Rinderherz COX in Abhängigkeit des intraliposomalen GTP/GDP-Verhältnisses. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an GDP (ADP). Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden im Messpuffer (siehe Fig. 1) zu einer Endkonzentration von 20 nM Cytochrom aa_3 suspendiert. Die RCR_{Val}-Werte (GDP: offene Kreise, offenes Viereck ; ADP: offenes Dreieck) wurden in Anwesenheit von 2 µg/mL Valinomycin und die RCR-Werte (GDP: geschlossene Kreise, geschlossenes Viereck; ADP: geschlossenes Dreieck) in Anwesenheit von zusätzlich 3 µM CCCP bei einer Temperatur von 25 °C gemessen. Geschlossenes und offenes Viereck: intraliposomal: 5 mM PNP-GMP.

3.3 Messung der Atmungskontrolle in Abhängigkeit von intraliposomalen Nukleotiden

In Fig. 9 ist die Abhängigkeit der Atmungskontrolle vom intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnis aufgetragen. Zwischen 100 und 10% intraliposomalem ADP (0 und 90% ATP) ist keine Änderung der RCR- (Valinomycin + CCCP-Atmung/gekoppelte-Atmung) sowie der RCR_{Val}-Werte (Valinomycin + CCCP-Atmung/Valinomycin-Atmung) zu erkennen. Nach Erreichen der intraliposomalen ATP Konzentration von 90% (10% ADP) des Gesamtnukleotidgehaltes nimmt der RCR-Wert von 11,5 auf 5,5 ab. Dies entspricht einer relativen Abnahme von etwa 50%.

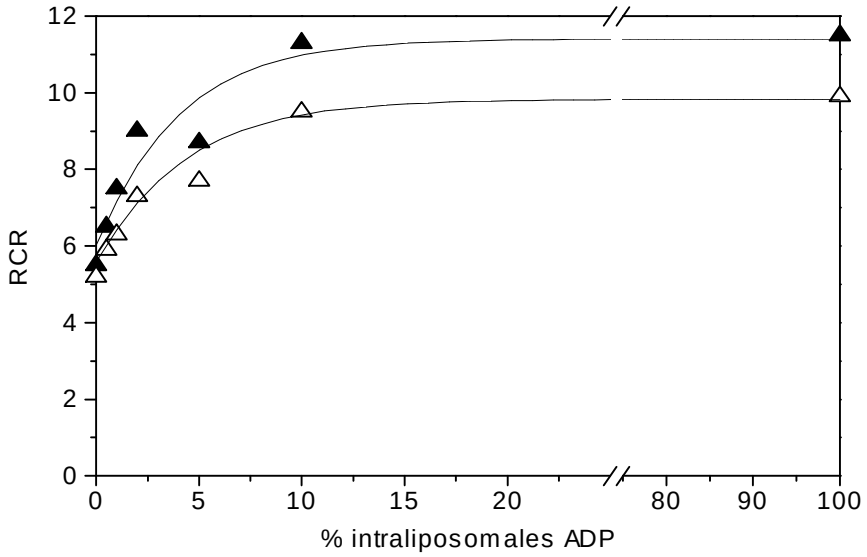

Fig. 9: Messung der Atmungskontrolle von rekonstituierter Rinderherz COX in Abhängigkeit des intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnisses. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode in Anwesenheit des angegebenen prozentualen Anteils an ADP. Die Gesamtkonzentration an intraliposomalem Nukleotid betrug konstant 5 mM. COX-Vesikel wurden in 10 mM K-Hepes, pH 7,4, 40 mM KCl, 25 mM Tris-Ascorbat, 50 µM Cytochrom c zu einer Endkonzentration von 20 nM Cytochrom aa_3 suspendiert. Die RCR_{Val} -Werte (offene Dreiecke) wurden in Anwesenheit von 1µg/mL Valinomycin und die RCR-Werte (geschlossene Dreiecke) in Anwesenheit von zusätzlich 3 µM CCCP bei einer Temperatur von 25 °C gemessen.

Die RCR_{Val}-Werte nehmen parallel dazu um ebenfalls 50% (von 10 auf 5) ab. Die halbmaximale Abnahme der Atmungskontrolle (RCR und RCR_{Val}) ist bei 97,5% ATP (2,5% ADP) erreicht. Diese Messungen bestätigten die schon von Kadenbach et al. (1995) puplizierten Daten.

zunehmender Cytochrom c Konzentration zu erkennen. Im gekoppelten Zustand tritt die Cytochrom c Sättigung, für die Vesikel die intraliposomal 5 mM ATP enthalten, bei ca. 10 µM Cytochrom c ein, wohingegen bei vollständig entkoppelten Vesikeln die Cytochrom c Sättigung erst bei wesentlich höheren Cytochrom c Konzentrationen (50 µM Cytochrom c) erreicht ist. Es ist außerdem unter entkoppelten Bedingungen eine um 30% niedrigere Atmung in Gegenwart von intraliposomalem ATP zu erkennen, verglichen mit der Atmung in Gegenwart von intraliposomalem ADP. Unter gekoppelten Bedingungen ist der Unterschied zwischen der Atmung in Gegenwart von intraliposomalem ATP und intraliposomalem ADP bei hohen Cytochrom c Konzentrationen deutlich geringer. Es fällt allerdings die geringere Affinität für Cytochrom c in Gegenwart von ATP gegenüber ADP ins Auge (Fig. 8B).

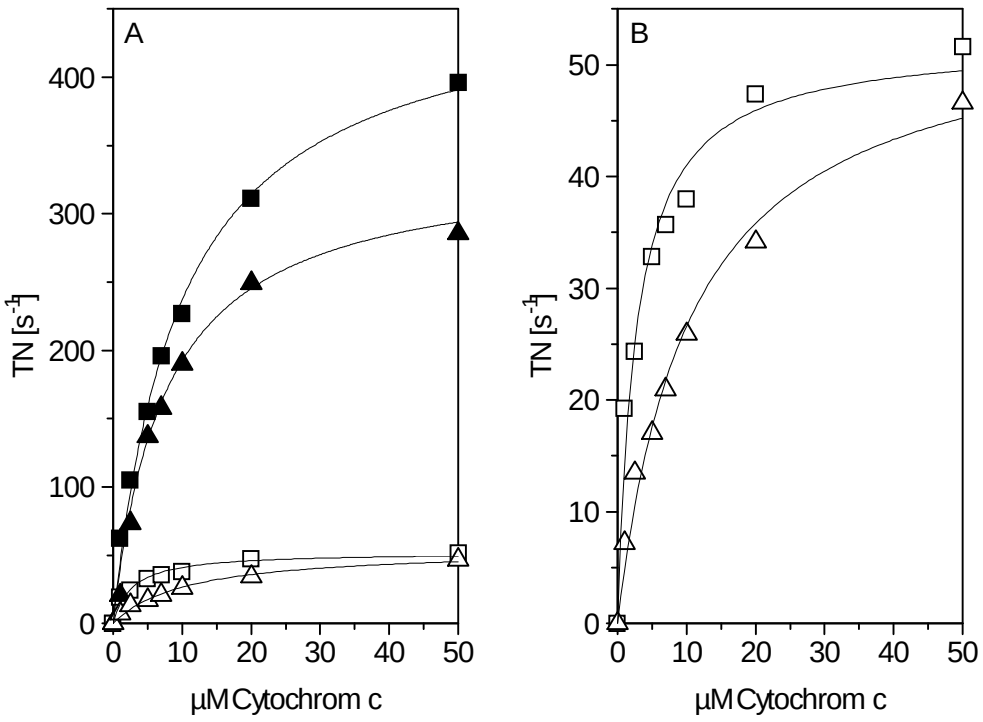

Fig. 8: (A) Cytochrom c Titration der entkoppelten und gekoppelten Atmung von in Liposomen rekonstituierter Rinderherz COX. (B) Ausschnittsvergrößerung der gekoppelten Atmung. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode in Anwesenheit von 5 mM ADP (Vierecke) oder 5 mM ATP (Dreiecke). COX-Vesikel wurden in 10 mM K-Hepes, pH 7,4, 40 mM KCl, 25 mM Tris-Ascorbat zu einer Endkonzentration von 20 nM Cytochrom aa_3 suspendiert und mit steigenden Mengen Cytochrom c bei einer Temperatur von 25 °C titriert. Geschlossene Vierecke: Mit CCCP entkoppelte Atmung (intraliposomal 100% ADP); geschlossene Dreiecke: Mit Valinomycin und CCCP entkoppelte Atmung (intraliposomal 100% ATP); offene Vierecke: Gekoppelte Atmung (intraliposomal 100% ADP);offene Dreiecke: Gekoppelte Atmung (intraliposomal 100% ATP). Die Atmungsrate ist angegeben als "Turnover Number" (TN = mol Cyt c x mol Cyt aa_3 $^{-1}$ x s^{-1}).

hydrophoben Adsorberharzes XAD-2, welches in der Lage ist, neben dem für die Rekonstitution zugesetzten Natriumcholat das nichtionische Detergenz Triton X-100 an seiner Oberfläche zu binden. Es wird somit aus der Lipidphase und vom Enzym entfernt und auf diese Weise werden protonendichtere Vesikel erhalten.

Eine Erklärung für die gefundenen Unterschiede der H^+/e^--Stöchiometrien, Atmungskontrollen und Orientierungen zwischen dem "Triton-Enzym" und dem "Yoshikawa-Enzym" könnte der unterschiedliche Lipidgehalt sein. Es ist bekannt, daß sich der Lipidgehalt von COX, die nach der Triton-Methode isoliert wurde, erheblich von dem des nach der Cholat-Methode, die ähnlich der Methode nach Yoshikawa ist (Wharton and Tzagoloff, 1967; Errede et al., 1978; Hartzell et al., 1978), isolierten Enzyms unterscheidet. So enthält das "Cholat-Enzym" etwa 20 mal mehr Lipid (0,2-0,4 mg Lipid/mg Protein) (Wharton and Tzagoloff, 1967; Errede et al., 1978) als das "Triton-Enzym" (0,01 mg Lipid/mg Protein, Merle and Kadenbach, 1982). Die durch die Isolation bedingte Entfernung von essentiellen Lipiden hat demnach einen negativen Einfluß auf die Aktivität des "Triton-Enzyms".

Für die weiteren Messungen eignete sich das "Triton-Enzym" aber trotz seiner niedrigeren Aktivität genausogut wie das "Yoshikawa-Enzym". Die erhaltenen Ergebnisse waren unabhängig von der Verwendung des "Triton-Enzyms" oder des "Yoshikawa-Enzyms".

3.2 Messung der Atmungsrate in Abhängigkeit von intraliposomalen Nukleotiden

Die Rekonstitution der COX und die damit verbundene Inkubation der Nukleotide erfolgte über einen Zeitraum von etwa 22 Stunden. Diese lange Inkubationszeit war nötig, um sogenannte kryptische Bindungsstellen, an denen ein sehr langsamer Austausch stattfindet, zu besetzen. Diese Zeitabhängigkeit der Nukleotidbindung kann durch am Enzym fest gebundene Cholat Moleküle erklärt werden. Die Menge am kristallinen Rinderherzenzym gebundenem Cholat wurde, durch Verwendung von [Carboxyl-^{14}C]-Cholat während der Isolation, auf 10,0 ± 0,8 mol Cholat/mol COX bestimmt (Napiwotzki et al., 1997).

Fig. 8A zeigt eine Cytochrom c Titration der Atmung in Abhängigkeit von intraliposomalem ATP oder ADP. Es ist ein deutlicher Anstieg der Atmung bei

3 Ergebnisse

3.1 Rekonstitution von Rinderherz Cytochrom c Oxidase

Um die Protonenpumpaktivität der COX unter verschiedenen Einflüssen mesen zu können, war es notwendig, die COX in ein, den Mitochondrien ähnliches, artefizielles Membransystem einzubauen. Die Vorteile dieses künstlichen Systems liegen in der Einfachheit seiner Zusammensetzung gegenüber dem intakten System (den Mitochondrien). Es war demnach in dieser Arbeit von großer Bedeutung als erstes zu kontrollieren, ob dieser Einbau in sogenannte Proteoliposomen (Vesikel) erfolgreich war.

Die Rekonstitution der Rinderherz COX erfolgte wie unter 2.8 beschrieben. In Tab. 1 sind die H^+/e^--Stöchiometrien, Atmungskontrollen (RCR) und Orientierungen mehrerer Vesikel-Präparationen aufgeführt. Es ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den H^+/e^--Stöchiometrien, Atmungskontrollen und den Orientierungen feststellen.

Tab. 1: H^+/e^--Stöchiometrie, Atmungskontrolle (RCR) und Orientierung rekonstituierter "Triton-COX" und rekonstituierter "Yoshikawa-COX". Rinderherz COX wurde nach der "Triton-Methode" und nach der "Yoshikawa-Methode" isoliert und nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode, gefolgt von Dialyse, in Liposomen rekonstituiert. Die H^+/e^--Stöchiometrien, Atmungskontrollen (RCR) und Orientierungen wurden, wie im Methodenteil (2.8) beschrieben, bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Experimente an.

	H^+/e^-	RCR	Orientierung
rekonstituierte" Triton-COX"	0,746 (5)	8,7 (7)	77,9% (6)
rekonstituierte "Yoshikawa-COX"	0,854 (5)	10,1 (5)	90,5% (4)

Die bei Steverding (1990) aufgeführten, sehr schlechten H^+/e^--Stöchiometrien für das "Triton-Enzym" lassen sich durch noch am Enzym haftende Triton X-100 Moleküle erklären. Aufgrund des hydrophoben Charakters der COX haftet das nichtionische Detergenz Triton X-100 sehr gut am Enzym und hat einen störenden Einfluß auf die Rekonstitution, da es sich nicht durch Dialyse entfernen läßt. In dieser Arbeit erfolgte die Rekonstitution mittels des