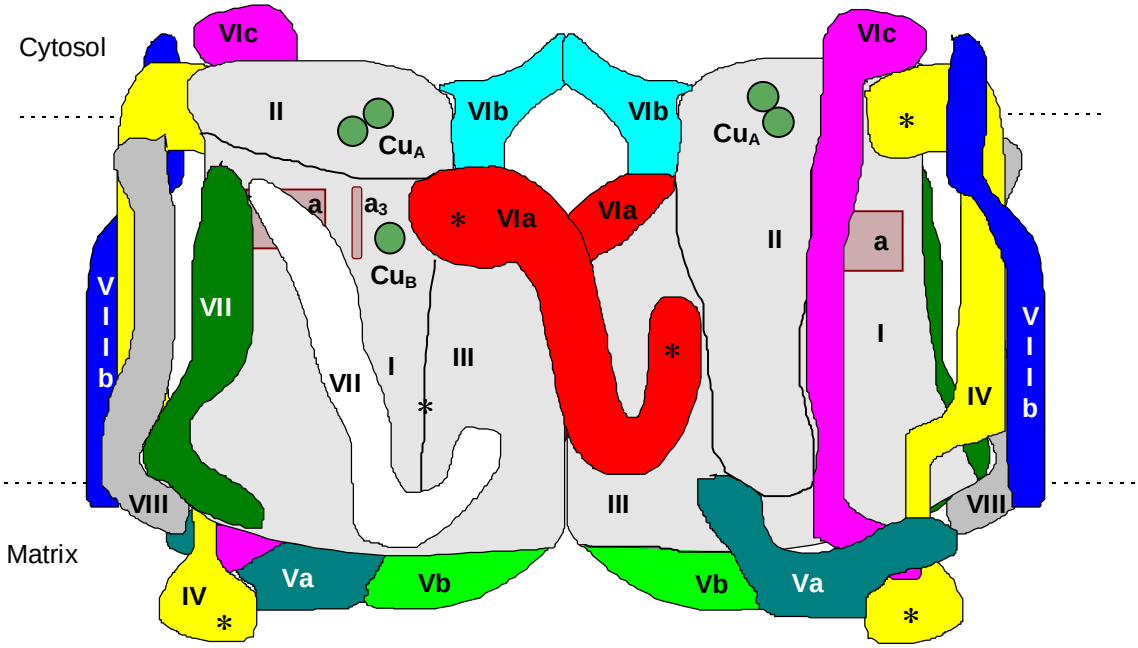

Fig. 37: Schema des dimeren Cytochrom c Oxidase Komplexes, basierend auf der Kristallstruktur des Rinderherz Enzyms (Tsukihara et al., 1996). Die Membran ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Die obere Seite repräsentiert die cytosolische Seite und die untere die Matrixseite. Die Hämzentren a und a_3 sind senkrecht zueinander angeordnet und sind durch dunkelrote Vierecke bzw. Balken dargestellt. Die Zwei Kupfer Atome Cu_A und Cu_B sind durch dunkelgrüne Kreise gekennzeichnet. Die postulierten fünf ATP- und/oder ADP-Bindungsstellen (eine zwischen Untereinheit I und III, zwei an der Untereinheit IV (cytosolische- und Matrixseite), und zwei an der Untereinheit VIa (cytosolische- und Matrixseite)) sind durch Sterne markiert.

Kristallstruktur konnte ein zweites Cholat-Molekül zwischen der katalytischen Untereinheit I und der Untereinheit III identifiziert werden (Tsukihara et al.,1996). Dies impliziert eine zweite Bindungsstelle für ADP (ATP). Eine dritte Bindungsstelle für ATP (ADP) wurde am C-terminalen Ende der Untereinheit VIa der Rinderherz- und Rinderleber COX sowie von COX aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), durch Markierung mit radioaktivem 2-azido-ATP, identifiziert (Taanman et al.,1994). Diese Bindungstelle ist wahrscheinlich, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ebenfalls an der Regulation der Protonentranslokation durch Nukleotide beteiligt. Die vierte Nukleotidbindungsstelle der COX wurde durch Markierungsexperimente mit [γ-^{32}P]-ATP (Bisson et al.,1987) und 8-azido-[γ-^{32}P]-ATP (Rieger et al., 1995) am löslichen Enzym und mit 8-azido-[γ-^{32}P]-ATP am rekonstituierten Enzym (Reimann et al.,1988) an der Untereinheit IV lokalisiert. Die Markierung am rekonstituierten Enzym deutete auf eine ATP (ADP) Bindungsstelle auf der cytosolischen Seite der Untereinheit IV der COX hin. Experimente von Napiwotzki et al. (1997) mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX zeigten, daß diese Bindungsstelle an der Regulation der Aktivität der COX beteiligt ist. In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß die an der Untereinheit IV lokalisierte Bindungsstelle auf der cytosolischen Seite der Untereinheit IV der COX liegt, und den K_M-Wert für Cytochrom c bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen erhöht (Napiwotzki, 1997). In anderen kinetischen Untersuchungen wurde eine zweite Bindungsstelle an der Untereinheit IV der COX lokalisiert, die aber auf der N-terminalen Seite dieser Untereinheit liegt (Arnold and Kadenbach, 1997). Diese fünfte Bindungsstelle inhibiert durch Bindung von intraliposomalem ATP allosterisch die Aktivität der COX. Eine oder zwei weitere Bindungsstellen für ATP (ADP) an den Untereinheiten VIIa,b,c wurden aus Markierungsstudien mit 8-[γ-^{32}P]-azido-ATP (Bisson et al., 1987;Reimann et al.,1988; Rieger et al., 1995) geschlossen. Die Lage einer weiteren ADP Bindungsstelle, die für die spektralen Änderungen an der COX verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt. Sie scheint aber weder an der Untereinheit VIa-H noch an der Untereinheit IV zu liegen, was sich aus Experimenten mit monoklonalen Antikörpern gegen diese beiden Untereinheiten der COX ergibt, die die beobachteten Effekte nicht aufheben (Napiwotzki et al., 1997). Die Lokalisierung der verschiedenen Nukleotidbindungsstellen ist in einem Schema des dimeren Enzymkomplexes (Fig. 37) dargestellt.

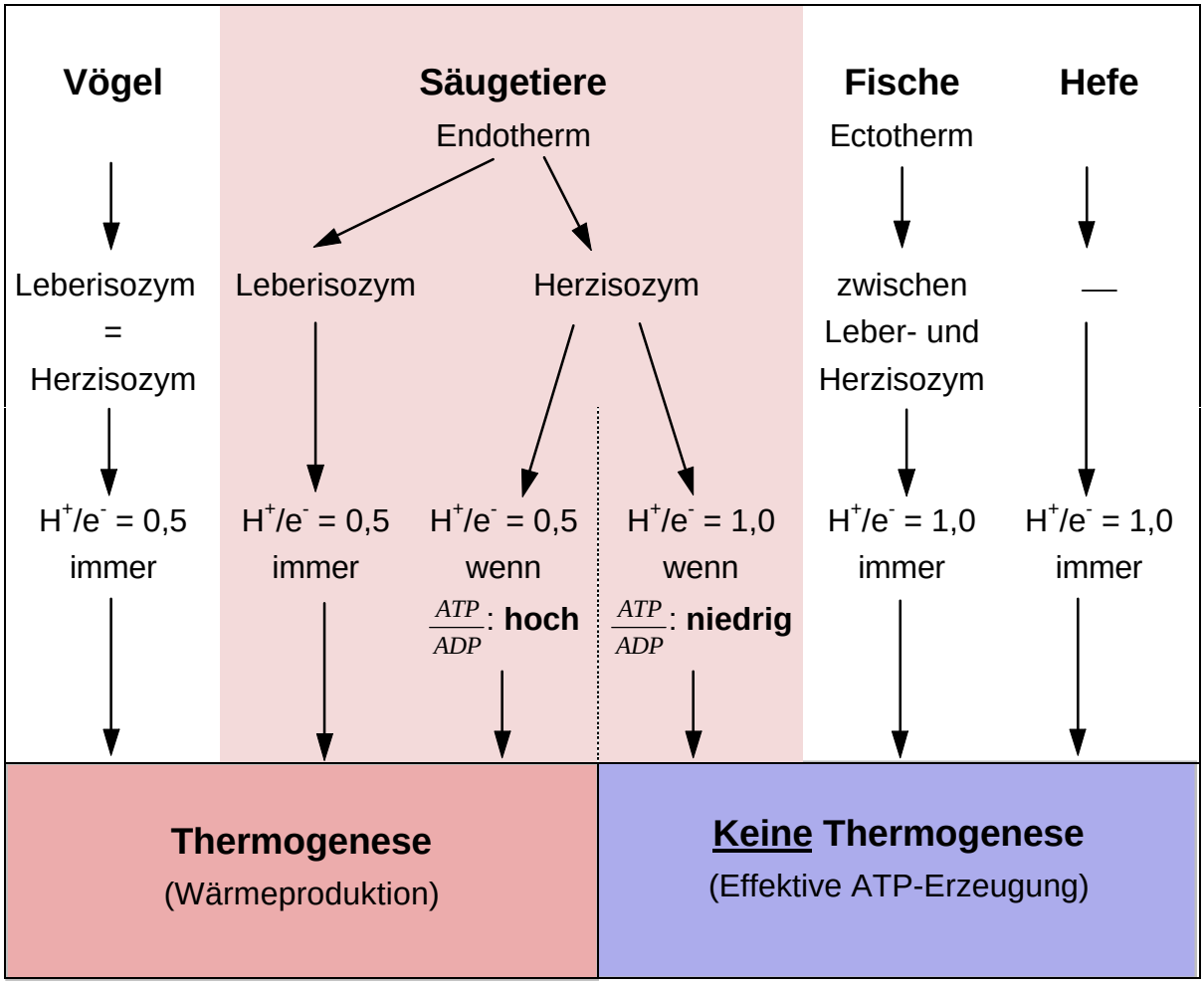

Fig. 36: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese für die Regulation der zitterfreien Thermogenese in endothermen Säugetieren auf der Stufe der Untereinheit VIa der Cytochrom c Oxidase, im Vergleich mit Vögeln, Fischen und Hefe.

4.3 Zusammenfassung der bekannten Nukleotidbindungsstellen an der COX aus Rinderherz

Bisher konnten fünf Nukleotidbindungsstellen in der Rinderherz COX lokalisiert werden (Fig. 37). Eine Bindungsstelle wurde auf der N-terminalen Seite der Untereinheit VIa-H durch Verwendung eines gewebsspezifischen monoklonalen Antikörpers identifiziert (Anthony et al., 1993), und durch Lokalisierung einer Cholat-Bindungsstelle in der Kristallstruktur des Rinderherzenzyms (Tsukihara et al., 1996). Diese Bindungsstelle ist, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, an einer gewebsspezifischen Regulation der Protonentranslokation beteiligt (Frank and Kadenbach, 1996). In der

Säugetier-Untereinheit VIa liegen. Die Daten deuten weiterhin an, daß in ectothermen Fischen keine Isoformen der Untereinheit VIa vorkommen (Exner, 1997) und der gewebsspezifische Mechanismus der Thermogenese in Säugetieren, der durch die Bindung von ATP an die Untereinheit VIa-H ausgelöst wird, nicht vorhanden ist. Weiterhin wurde COX aus Putenleber und Putenherz isoliert (Kadenbach et al.,1997). Im Gegensatz zu allen Säugetieren, in denen in Leber und Herz unterschiedliche Isoformen der Untereinheit VIa exprimiert werden, sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Untereinheit VIa in Putenherz und Putenleber identisch, im Skelettmuskel jedoch unterschiedlich (Kadenbach et al., 1997). Untersuchungen der Protonentranslokation in Abhängigkeit des intraliposomalen Nukleotid-verhältnisses ergaben für das Herz- und das Leberenzym eine H^+/e^--Stöchiometrie von etwa 0,5 (Susanne Arnold, unveröffentlichte Ergebnisse). Es wurde keine Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie durch hohe ATP/ADP-Verhältnisse erhalten. Die Protonentranslokation von rekonstituierter COX aus Putenleber und Putenherz wird demnach nicht durch intraliposomale Nukleotide reguliert (Kadenbach et al., 1997).

Neben der hier vorgestellten Hypothese für den Mechanismus der zitterfreien Thermogenese in Säugetieren, ist zu erwarten, daß noch eine weitere Signalkaskasde an der Erhaltung der Körpertemperatur teilnimmt. Wie dieser Mechanismus aber im Einzelnen funktioniert, ist noch aufzuklären.

In Fig. 36 ist die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese über die Beteiligung der Untereinheit VIa der COX an der zitterfreien Thermogenese in endothermen Säugetieren, im Vergleich mit Vögeln, Bakterien und Fischen, als ectothermen Lebewesen, schematisch dargestellt.

COX begleitet. In Gegenwart von ADP >1% besitzt die COX mit der Leberform der Untereinheit VIa eine H^+/e^--Stöchiometrie von 0,5 im Gegensatz zum Enzym mit der Herzform und dem Enzym aus Bakterien und ectothermen Lebewesen, bei denen die H^+/e^--Stöchiometrie immer 1,0 beträgt. Im Herz- und Skelettmuskel wird die gewebsspezifische Isoform der Untereinheit VIa (VIa-H) exprimiert, um die Effizienz der Energietransduktion während geleisteter Arbeit zu optimieren. Die Untereinheit VIa-H weist an der N-terminalen Domäne (Matrixseite) eine Bindungsstelle für ADP (ATP) auf, welche durch den Austausch von gebundenem ATP durch ADP die H^+/e^--Stöchiometrie von 0,5 auf 1,0 ansteigen läßt. Dieser Austausch geschieht während der Organismus Arbeit leistet, d.h. wenn das ATP/ADP-Verhältnis in der mitochondrialen Matrix abnimmt. Während der Ruhephasen des Organismus steigt das freie ATP/ADP-Verhältnis in den Herz- und Skelettmuskelmitochondrien über 95%. Dieser Anstieg des ATP/ADP-Verhältnis ist mit einem Austausch von gebundenem ATP durch ADP an der N-terminalen Domäne der Untereinheit VIa-H verbunden und führt zu einer Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie auf 0,5. Die halbmaximale Abnahme der Protonentranslokation ist dabei schon bei 98 - 99% ATP (2 -1% ADP) erreicht.

In dieser Arbeit wurde gemessen, daß Isozyme der COX, die die Leberform der Untereinheit VIa (VIa-L) enthalten, eine H^+/e^--Stöchiometrie von 0,5 aufweisen. Diese niedrige H^+/e^--Stöchiometrie von 0,5 der Leber COX spielt offenbar eine Rolle bei der zitterfreien Thermogenese in Säugetieren. Teile der Energie der Sauerstoff-Reduktion werden als Wärme freigesetzt anstatt für die Bildung eines Protonengradienten verwendet zu werden, der für die ATP-Synthese genutzt wird. In Ruhe nimmt demnach der Skelettmuskel, der einen Großteil des Körpergewichtes ausmacht, an der Thermogenese teil. Leistet der Organismus hingegen Arbeit, dann geht die COX des Herz- und Skelettmuskels über zu einer höheren Effizienz der Energietransduktion, und das reduziert den Anteil an metabolischer Wärme.

Während der Evolution haben nur wenige Spezies, wie Säugetiere und Vögel, einen Mechanismus zur Konstanthaltung der Körpertemperatur durch interne Wärmebildung entwickelt. Der Mechanismus der Thermogenese findet weder in ectothermen Fischen, wie Forelle und Karpfen, noch in Bakterien statt. Um die Hypothese der Beteiligung der Untereinheit VIa an der Thermogenese zu bestätigen, wurde COX aus Karpfenherz und Forellenleber isoliert und die Untereinheit VIa kloniert und charakterisiert (Hüttemann et al., 1997). Aus den erhaltenen Daten geht hervor, daß die beiden cDNAs evolutionär zwischen der Leberform (VIa-L) und der Herzform (VIa-H) der

dieser Arbeit gemessenen Werten. Dieser Widerspruch läßt sich zum einen dadurch erklären, daß sämtliche in der Literatur aufgeführten Werte aus Messungen an Mitochondrien stammen und nicht aus Messungen an in Liposomen rekonstituiertem Enzym. Bei Messungen der Protonentranslokation der COX an Mitochondrien müssen alle anderen protonenpumpenden Komplexe der Atmungskette gehemmt werden. Es ist möglich, daß diese Hemmung nicht vollständig war und somit zu hohe Werte für die H^+/e^--Stöchiometrie der COX erhalten wurden. Ein weiterer Grund für die größeren H^+/e^--Stöchiometrien ist eine andere Methode der Auswertung, sowie eine falsche Interpretation der Messergebnisse. In der Arbeit von Wikström und Penttilä (1982) werden nach Extrapolation auf den Zeitpunkt null (Zeitpunkt der Zugabe von Ferrocytochrom c) H^+/e^--Stöchiometrien von 0,6 bis 0,7 erhalten. Die Autoren schließen aus diesen Daten, daß die H^+/e^--Stöchiometrie von Rattenleber COX 1,0 beträgt. Diese Werte liegen jedoch dichter bei einer H^+/e^--Stöchiometrie von 0,5 als von 1,0 und sprechen daher eher für eine geringere Protonentranslokation (0,5 anstatt 1,0). Die Auswertung dieser Messungen ohne die Extrapolation auf den Zeitpunkt null, ergibt H^+/e^--Stöchiometrien von etwa 0,4 bis 0,5. Diese Werte widerum stimmen relativ gut mit den in dieser Arbeit erhaltenen Werte für die Leber und Nieren COX überein.

COX aus Rattenherz von ausgewachsenen Ratten enthält ein Drittel der Leberform und zwei Drittel der Herzform der Untereinheit VIa (Kadenbach et al., 1990). Im Skelettmuskel hingegen wird zu nahezu 100% die Herzform der Untereinheit VIa exprimiert (Anthony et al., 1990). In der COX von fetalen menschlichen Herzen und fetalem Skelettmuskel (Bonne et al., 1992) sowie von Mäusen (Parsons et al., 1996) wird hauptsächlich die Leberform der Untereinheit VIa (VIa-L) exprimiert. Nach der Geburt findet in der Skelettmuskulatur eine fast vollständige Umschaltung zur Herzform der Untereinheit VIa (VIa-H) statt. Im Herzen erfolgt diese Umschaltung hingegen nur teilweise. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen variieren diese Organe in großem Umfang (bis zu einem Faktor von fünf bis zehn) ihre Atmungsrate und damit die Menge der metabolischen Wärme. Aus diesen Gründen könnte der in dieser Arbeit beschriebene molekulare Mechanismus der variablen Effizienz der Energietransduktion in der COX an der Erhaltung der Körperwärme bei geringer Arbeit (z.B. während des Schlafes) partizipieren. Der Mechanismus könnte zum Teil an der sogenannten zitterfreien Thermogenese teilhaben.

Aufgrund der hier dargelegten Daten, wurde die folgende Thermogenese-Hypothese aufgestellt (Fig. 36). Die Evolution der Thermogenese in Säugetieren wurde von der Expression der Leberform der Untereinheit VIa der

4.2 Variation der Protonentranslokation und Thermogenese

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie der COX bei hohen Atmungsraten, wie von Papa et al. (1991) und Capitanio et al. (1991 und 1996) beschrieben, könnte eine physiologische Rolle bei ansteigendem oxidativen Metabolismus unter hohem Substratdruck (z.B. nach Aufnahme von übermässigen Mengen Nahrung) haben. Die in dieser Arbeit beschriebene Regulation der Protonentranslokation durch das intraliposomale (intramitochondriale) ATP/ADP-Verhältnis könnte ebenfalls eine physiologische Rolle im Energiemetabolismus spielen. Es wurde postuliert, daß die Abnahme der Protonentranslokation der COX bei hohen Matrix ATP/ADP-Verhältnissen eine Rolle bei der Thermogenese im Herz- und Skelettmuskel spielt (z.B.: während des Schlafes) (Frank and Kadenbach, 1996; Kadenbach et al., 1995 und Rohdich and Kadenbach, 1993). Die Leberform der Untereinheit VIa (VIa-L) wird in allen Geweben inklusive der glatten Muskulatur exprimiert (Anthony et al., 1990), aber nicht in der Herz- und Skelettmuskulatur (Linder et al., 1995).

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Herz-Isoform der Untereinheit VIa (VIa-H) ATP bindet und die H^+/e^--Stöchiometrie des rekonstituierten Enzyms auf die Hälfte des Wertes abnimmt der unterhalb 98 - 99% intraliposomalem ATP gemessen wird (Fig. 12 und Frank and Kadenbach, 1996). Im Gegensatz zum Herzenzym, zeigte weder das Leberenzym (Kadenbach et al., 1997a) noch das Nierenenzym, welches die Leberform der Untereinheit VIa (VIa-L) der COX enthält, diese Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen (Fig. 17). Die erhaltenen H^+/e^--Stöchiometrien dieser beiden Enzyme betrugen vielmehr nur 0,5 im Gegensatz zum Herzenzym, welches bei niedrigen ATP/ADP-Verhältnissen, eine H^+/e^--Stöchiometrie von 1,0 aufwies. Diese Ergebnisse wurden mit verschiedenen Präparationen des Leber- sowie des Nierenenzyms erhalten (Tab. 2 und Fig. 18). Der fehlende Effekt der Abnahme der Protonentranslokation des Leber- und Nierenenzyms bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen ist nicht auf die allgemein niedrigeren Werte der H^+/e^--Stöchiometrien zurückzuführen. Verschiedene Rinderherz-Oxidasen, die aufgrund von verunreinigten Präparationen ebenfalls eine niedrige H^+/e^--Stöchiometrie aufwiesen, zeigten trotzdem die erwartete Abnahme der Protonentranslokation auf die Hälfte (Fig. 16 und Frank and Kadenbach, 1996).

Die in der Literatur von verschiedenen Autoren angegebenen H^+/e^--Stöchiometrien von etwa 1,0 für Rattenleber COX steht im Gegensatz zu den in

bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen (Fig. 22). Diese Abnahme konnte nur unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden. Der physiologische pH-Wert beträgt innerhalb der Mitochondrien 7,4 und außerhalb der Mitochondrien 7,0. Sobald eine Abweichung von diesen physiologischen pH-Werten erfolgte, wurde die Regulation der Protonentranslokation bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen vollständig oder zumindest partiell aufgehoben.

Neben der Variation des intraliposomalen Nukleotidverhältnisses wurde in dieser Arbeit auch das extraliposomale Nukleotidverhältnis variiert. Wie in den Fig. 27, 28 und 29 dargestellt ist, war ein deutlicher Effekt der extraliposomalen Nukleotide zu beobachten. Im Gegensatz zu den intraliposomalen Nukleotid-effekten (Hemmung der Protonentranslokation durch ATP), hemmte bei den extraliposomalen Nukleotiden ADP die Protonentranslokation wesentlich stärker als ATP. Die physiologische Bedeutung dieses Effektes ist jedoch unklar. Die halbmaximale Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie lag jedoch auch hier, wie im Falle der intraliposomalen Nukleotide, bei 99% extraliposomalem ATP (Fig. 28). Die Hemmung der H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter Rinderherz COX in Anwesenheit von extraliposomalem ADP war identisch der Hemmung der H^+/e^--Stöchiometrie in Anwesenheit von intraliposomalem ATP. In beiden Fällen betrug die Hemmung etwa 50%. Aus der Tatsache, daß die Hemmung von intraliposomalem ATP und extraliposomalem ADP nicht additiv ist folgt, daß ein und derselbe Protonenkanal gehemmt wird. Die beobachteten Effekte durch extraliposomale Nukleotide ließen sich durch einen monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX von der cytosolischen Seite aufheben. Durch die schon unter 3.7 beschriebene Kreuzreaktivität des Antikörpers VIa-H + VIc konnte nicht genau bestimmt werden, ob der Effekt der extraliposomalen Nukleotide auf einer Bindung derselben an die cytosolische Seite der Untereinheit VIa oder VIc beruht. Es wird aber aufgrund der Ergebnisse von Taanman et al. (1994), die eine Bindungstelle für ATP (ADP) auf der cytosolischen Seite der Untereinheit VIa postulieren, davon ausgegangen, daß es sich auch hier um einen Effekt der Bindung von ADP an die Untereinheit VIa (cytosolische Seite) handelt.

Ein monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheit IV der COX hatte keinen Einfluß auf die gemessenen Effekte. Es kann daraus geschlossen werden, daß die Untereiheit IV nicht an der Regulation der Protonentranslokation durch intra- und extraliposomale Nukleotide beteiligt ist. Die Regulation der Protonentranslokation durch Nukleotide ist demnach ein alleiniger Effekt der Untereinheit VIa der COX.

pH-Abhängigkeit der katalytischen Aktivität in betracht gezogen wurden, überein zu stimmen (Wilms et al., 1980; Thörnström et al., 1984). Diese Befunde stehen im Einklang mit dem Vorschlag, daß der pH-Wert einen Einfluß auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im intramolekularen Elektronentransfer in der COX hat und dieser hängt mit der Protonentranslokation zusammen (Fig. 6; Thörnström et al., 1984; Papa et al., 1994; Nicholls and Burko, 1993). Die Zunahme der H^+/e^--Stöchiometrie der ATP-haltigen Vesikel beim Übergang zu alkalischen pH-Werten ist gegenwärtig nicht zu erklären.

Im Unterschied zu den Messungen von Papa et al. (1987) wurde in dieser Arbeit nicht nur der extraliposomale pH-Wert variiert, sondern auch der intraliposomale pH-Wert (Fig. 22B und C).

Die Variation des intraliposomalen pH-Wertes führte zu einer signifikanten Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie (Fig. 22B). Vesikel, die intraliposomal ADP enthielten, besaßen nur im Falle des physiologischen pH-Wertes (intramitochondrial pH 7,4; extramitochondrial pH 7,0) eine H^+/e^--Stöchiometrie von 1. Sobald der pH-Wert saurer oder alkalischer wurde, nahm die H^+/e^--Stöchiometrie stark ab. Die Protonentranslokation von Proteoliposomen, die intraliposomal ATP enthielten, nahm bei saurem pH-Wert ebenfalls ab. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Experimenten von Moroney et al.(1984) in denen gezeigt wurde, daß der Elektronentransfer zwischen Häm a und Häm a_3 durch den pH-Wert auf der Matrixseite inhibiert wird. Diese Hemmung des Elektronentransfers zwischen Häm a und Häam a_3 wirkt sich unmittelbar auf die Protonentranslokation aus, da zwischen diesen beiden Prozeßen ein direkter Zusammenhang besteht (Fig. 6; Thörnström et al., 1984; Papa et al., 1994; Nicholls and Burko, 1993).

Bei gleichzeitiger Variation des intra- und extraliposomalen pH-Wertes (Fig. 22C), entsprach der Verlauf der Protonentranslokation einer Kombination der Variation der extraliposomalen und der Variation des intraliposomalen pH-Wertes. Die H^+/e^--Stöchiometrie der ADP-haltigen Vesikel war bei einem extra- wie intraliposomalen pH von 7,4 am größten. Sowohl bei pH-Werten die darunter lagen, als auch bei pH-Werten die darüber lagen, wurde eine geringere H^+/e^--Stöchiometrie gemessen. Im Falle der ATP-haltigen Vesikel schien allerdings der Effekt der Variation des extraliposomalen pH-Wertes zu überwiegen. Es wurde eine Zunahme der H^+/e^--Stöchiometrie beobachtet, die über den Wert von 0,5 hinausging.

Die Variation des intra- und extraliposomalen pH-Wertes hat vor allem einen Einfluß auf die in dieser Arbeit beschriebene Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie

Dies liegt an der großen Zahl der intrazellulären Bindungsstellen für ADP (Veech et al., 1979). Das an diese Bindungsstellen gebundene ADP wird auf diese Weise mitbestimmt und führt zu den oben erwähnten falschen Werten. Die Konzentration an freiem intrazellulären ADP ist in Wirklichkeit niedriger und wurde auf 0,05 µmol/g "wet weight" für Mausleber (Brosnan et al., 1990), und 30-90 µM für Rattenherz (Wan et al., 1993) bestimmt. Die Gesamtkonzentration von ATP und ADP in der mitochondrialen Matrix von Rattenleber *in vivo* wurde jeweils auf 7,9 mM und 7,6 mM bestimmt (Schwenke et al., 1981). Wenn nur 1/20 des ADP-Gehaltes frei vorliegt (0,38 mM), dann würde das ATP/ADP-Verhältnis an freien Nukleotiden in der mitochondrialen Matrix 20,8 (95,4%) betragen. Diese Kalkulation erklärt, warum die erhaltene Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter Rinderherz COX bei so hohen ATP/ADP-Verhältnissen physiologisch sinnvoll ist (Frank and Kadenbach, 1996).

Die enzymatische Aktivität der COX weist eine definierte pH-Abhängigkeit auf. Kinetische Messungen von Wilms et al. (1980) sowie von Thörnström et al. (1984) am löslichen Enzym zeigen, daß der Turnover mit abnehmendem pH stark ansteigt. Gleichzeitig mit der Zunahme des Turnovers nimmt auch der K_M-Wert für Cytochrom c zu (Wilms et al., 1980; Thörnström et al., 1984; Veerman et al., 1980). Papa et al. (1987) können zeigen, daß die Protonentranslokation im "reductant pulse" bei Variation des extraliposomalen pH-Wertes von pH 6,0 bis pH 7,7 ansteigt und dann bis pH 8,5 wieder abnimmt. Die Atmungskontrolle nimmt mit sinkendem extraliposomalem pH ebenfalls ab. Die Abnahme der Protonentranslokation sowie der Atmungskontrolle in Abhängigkeit des pH-Wertes ist keine Folge von schlecht rekonstituierter COX. Messungen der Orientierung der COX in den Liposomen über den gesamten pH-Bereich zeigten, daß in allen Fällen eine Orientierung von etwa 90% "right side out" erhalten wurde (Papa et al., 1987). Die Abnahme der Protonentranslokation mit sinkendem extraliposomalen pH konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (Fig. 22A). Die pH-Wert abhängige Abnahme der Protonentranslokation scheint mit Änderungen in der Energiekonservierung und mit den Redox-Kinetiken der COX zusammenzuhängen. Wilms et al. (1980) beschreiben die pH-Abhängigkeit des Turnovers der COX durch ein Modell, in welchem wenigstens drei Gruppen am COX/Cytochrom c - Komplex ein Proton aufnehmen können. Die pK-Werte dieser drei Gruppen betragen 8,0, 6,5 und 4,8. Der apparente pK_a-Wert von 6,3, der von Papa et al. (1987) für die Protonentranslokation im "reductant-pulse" Experiment beobachtet wurde, scheint mit dem apparenten pK_a-Wert von einer dieser drei Gruppen, die für die

Untereinheit VIa zur Untereinheit I des anderen Monomers, bewirkt auch dort eine konformative Änderung, die zu einer verminderten Protonentranslokation führt.

Die zwei von Tsukihara et al. (1996) postulierten Kanäle für gepumpte Protonen verlaufen zwischen der Helix 4 und der Helix 3 der Untereinheit I und zwischen den Helices 11 und 12 der Untereinheit I (Fig. 7A, B). Wie schon beschrieben, interagiert die Untereinheit VIa mit der Helix 4 der Untereinheit I. Es wäre nun möglich, daß durch die beschriebenen konformativen Änderungen, bei Bindung von ATP, der Protonenkanal zwischen den Helices 3 und 4 der Untereinheit I zugedrückt wird und somit die H^+/e^--Stöchiometrie reduziert wird.

Die Tatsache, daß die Protonentranslokation der COX aus Rinderleber und Rinderniere nicht durch intraliposomale Nukleotide reguliert wird, läßt auf das Fehlen der Nukleotidbindungsstelle am N-Terminus der Untereinheit VIa dieser beiden Enzyme schließen. Der N-Terminus der Untereinheit VIa des Rinderherzenzyms unterscheidet sich in seiner Aminosäuresequenz von der des Rinderleber- und Rindernierenenzyms. Wie in Kapitel 3.5 gezeigt werden konnte, beträgt die maximale H^+/e^--Stöchiometrie des Leber- und Nierenenzyms nur etwa 0,5 im Gegensatz zum Herzenzym, wo die maximale H^+/e^--Stöchiometrie 1,0 beträgt. Es könnte nun sein, das diese um die Hälfte geringere H^+/e^--Stöchiometrie des Leber- und Nierenenzyms dadurch zustande kommt, daß der N-Terminus dieser beiden Enzyme ständig den Protonenkanal zwischen den Helices 3 und 4 der Untereinheit I zudrückt. Dies führt wie oben schon erläutert zu einer verminderten H^+/e^--Stöchiometrie. Diese Vermutung wäre nur durch die Kristallstruktur des Leber- oder Nierenenzyms zu klären, welche aber noch nicht bekannt ist.

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie von rekonstituierter Rinderherz COX wird nur bei sehr hohen intraliposomalen (Matrix) ATP/ADP-Verhältnissen erhalten. Wie schon erwähnt, erfolgt die Bindung von ATP und/oder ADP wahrscheinlich an derselben Bindungsstelle der N-terminalen Seite der Untereinheit VIa-H (Anthony et al., 1993; Frank and Kadenbach, 1996), aber mit unterschiedlichen Affinitäten (Napiwotzki et al., 1997). Die halbmaximale Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie wurde bei 98% - 99% ATP erhalten (Fig. 12). Dieser Wert ist wesentlich größer, als das gemessene ATP/ADP-Verhältnis in Rattenleber. Es beträgt *in vivo 86,5%* ATP im Cytosol und 50% ATP in der mitochondrialen Matrix (Schwenke et al., 1981). Messungen des Gesamtgehaltes an ADP von Gewebeextrakten ergeben allerdings immer ungefähr um den Faktor 20 zu große Werte für die freie ADP-Konzentration.

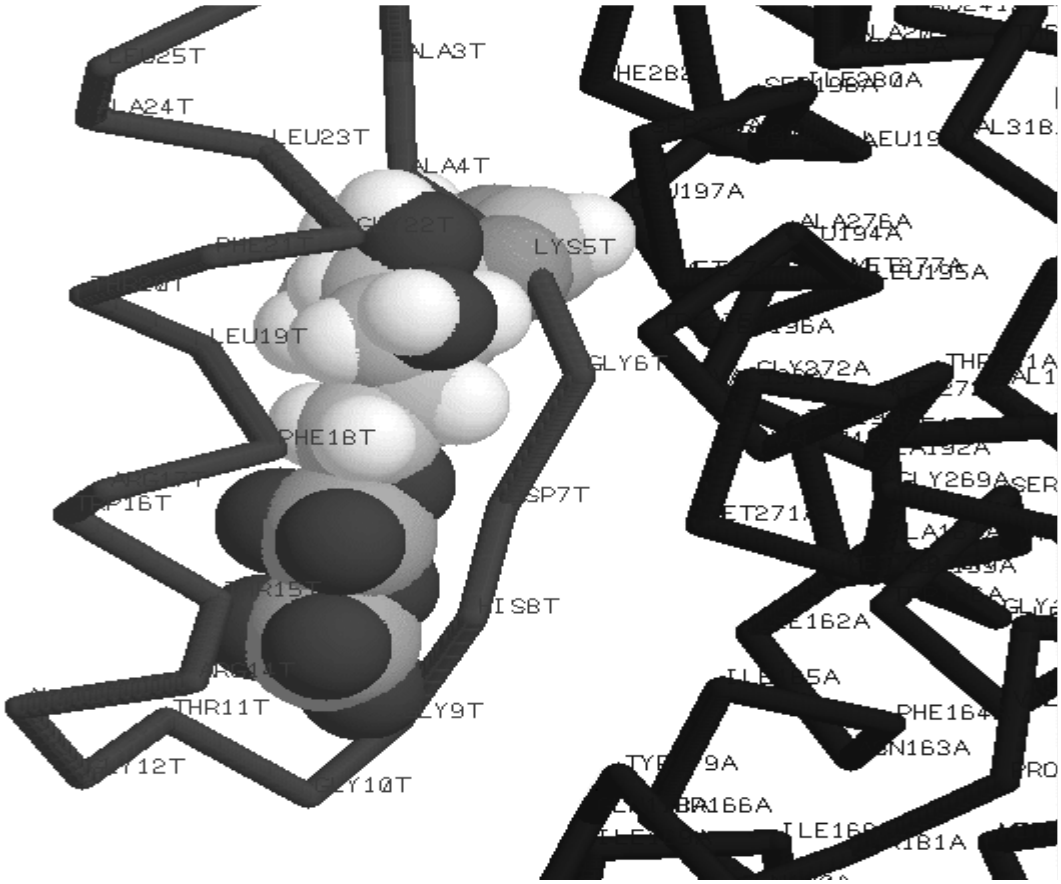

Fig. 35: Ausschnittsvergrößerung der ADP-Bindungsstelle von Fig. 34. Die Untereinheit VIa ist rot dargestellt und die Untereinheit I des anderen Monomers blau. Die Beschriftung an den Untereinheiten stellt die Numerierung der Aminosäuren dar. Die Buchstaben T und A stehen jeweils für die Untereinheit VIa und die Untereinheit I. Die Anpassung des ADP-Moleküls in die Cholat-Bindungsstelle basiert auf den Daten von Tsukihara et al. (1996) und wurde von J. Napiwotzki ausgeführt.

Wie oben schon erläutert, bindet ATP an dieselbe Stelle der Untereinheit VIa wie ADP und bewirkt dadurch eine Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie von 1,0 auf 0,5. Betrachtet man sich die Fig. 35 genauer, wird sehr schnell deutlich, daß eine Bindung von ATP, welches eine Phosphatgruppe mehr enthält als ADP, an diese Stelle mit einer konformativen Änderung der Untereinheit VIa und damit auch der Untereinheit I einhergehen muß. Man kann sich diese konformative Änderung so vorstellen, daß durch die zusätzliche Phosphatgruppe des ATP der N-Terminus der Untereinheit VIa in Richtung der Untereinheit I des anderen Monomers gedrückt wird. Mit anderen Worten, die vorher sehr enge ADP-Bindungstelle wird geöffnet. Durch diese Öffnung der Bindungsstelle wird auch die transmembrane Helix der Untereinheit VIa in ihrer Konformation geändert. Das Hinüberdrücken des N-Terminus der

bestimmt werden. Das Cholat-Molekül befindet sich in einer engen Tasche, die aus der N-terminalen Domäne der Untereinheit VIa-H im Inneren der Membran gebildet wird. Die Aminosäureseitenketten, die den Großteil des Steroid-gerüstes des gebundenen Cholats umgeben und die in der Nähe der Carboxyl-Gruppen liegen, wurden so arrangiert, daß ADP in diese Tasche hineinpaßt. Wie in Fig. 34 und 35 zu sehen ist, läßt sich ein Atommodel des ADP sehr gut in die Cholat-Bindungsstelle einpassen. Das auf der Matrixseite gebundene (oder angepasste) ADP-Molekül ist mit seinen zwei Phosphatgruppen mit den Aminosäureresten Arg^{14} und Arg^{17} der Untereinheit VIa über eine Salzbrücke verbunden. Die zwei Zucker-Hydroxylgruppen und die Aminogruppe des ADP sind über Wasserstoffbrückenbindungen an die Phosphatgruppe des Phoyphatidylethanolamins 5 (PE 5) und an die Carbonylgruppe der Hauptkette des Phe^{21} der Untereinheit VIa gebunden. Es besteht außerdem eine Wechselwirkung der Adenylgruppe mit dem anderen Monomer der COX. Diese Wechselwirkung findet über das Indol des Trp^{275} der Helix 8 der Untereinheit I des anderen Monomers statt, und könnte unter physiologischen Bedingungen zur Stabilität des Dimers beitragen (Fig. 35).

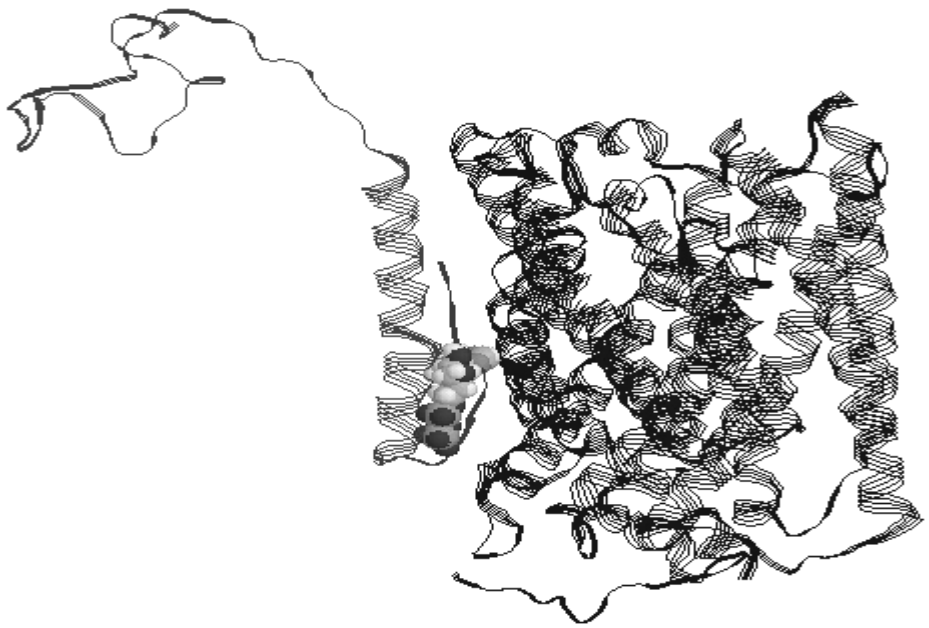

Fig. 34: Einpassung von ADP (als Kalottenmodell: rot: Sauerstoff; gelb: Phosphor; blau: Stickstoff und hellgrau: Kohlenstoff) in die Kristallstruktur der COX aus Rinderherz. Die Untereinheit VIa ist in rot dargestellt und in blau die Untereinheit I des anderen Monomers. Die Anpassung des ADP-Moleküls in die Cholat-Bindungsstelle basiert auf den Daten von Tsukihara et al. (1996) und wurde von J. Napiwotzki ausgeführt.

In Kapitel 3.12 wurde der Einfluß der "second messenger" $CaCl_2$ und cAMP untersucht. Sowohl cAMP als auch $CaCl_2$ hatten keinen Einfluß auf die Abnahme der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Es war allerdings in Gegenwart von extra- und intraliposomalem $CaCl_2$ eine Abnahme der Gesamt H^+/e^--Stöchiometrie zu beobachten (Fig. 26). Diese Abnahme ist mit einer Erniedrigung der Affinität für Cytochrom c durch divalente Kationen zu erklären. Divalente Kationen stören die elektrostatische Interaktion des Ferrocytochrom c und der COX (Papa et al., 1987). Dieser Effekt auf die Cytochrom c/COX Wechselwirkung und damit auf den Mechanismus der Elektronenübertragung auf die Oxidase ist wahrscheinlich die Ursache für die Abnahme der Protonentranslokation. Das durch das divalente Kation Mg^{2+} keine Abnahme der Protonentranslokation gemessen wurde (Fig. 19), lag in der Tatsache begründet, daß in diesem Experiment nur intraliposomal Mg^{2+} zugegen war und somit keine Interaktion mit der Cytochrom c Bindungsstelle stattfinden konnte.

Der molekulare Mechanismus der partiellen "Entkopplung" der Energietransduktion (Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie) basiert auf einem Austausch von gebundenem ADP durch ATP auf der N-terminalen, matrix-orientierten Domäne, der Untereinheit VIa-H (Herz-Typ). Dies folgt aus der Tatsache, daß ein monoklonaler Antikörper gegen die Untereinheit VIa-H, der nicht mit dem Leber-Typ (VIa-L) der Untereinheit VIa (Anthony et al., 1993) reagiert, die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen verhinderte (Fig. 18; Frank and Kadenbach, 1996).

Die Lage der Untereinheit VIa und deren Wechselwirkung mit anderen Untereinheiten des Enzymkomplexes deutet auf eine wichtige funktionelle Rolle dieser Untereinheit bei der Regulation der COX hin. Die transmembrane Helix der Untereinheit VIa interagiert mit der Helix 4 der Untereinheit III auf der gegenüberliegenden Seite des Berührungspunktes von Untereinheit III mit Untereinheit I und hält damit Kontakt zu dem anderen Monomer. Zehn Aminosäurereste der N-terminalen Domäne von Untereinheit VIa befinden sich in der transmembranen Region in Kontakt mit den Helices 5 und 7 von Untereinheit I des anderen Monomers. Diese Kontakte mit dem anderen Monomer scheinen geeignet, um die dimere Struktur der COX zu stabilisieren (Fig. 4).

Die Bindungsstelle für ADP (ATP) auf der N-terminalen Domäne der Untereinheit VIa-H wurde vor kurzem von Tsukihara et al. (1996) in der Kristallstruktur der Rinderherz COX lokalisiert. Es konnte in der Kristallstruktur ein Cholat-Molekül, welches dem ADP in Größe und Struktur sehr ähnlich ist,

Anwesenheit von intraliposomalem ATP. Die Protonentranslokation konnte auch in diesem Fall nicht weiter als um maximal 50% gesenkt werden. Daraus folgt, daß das ATP in sämtlichen Messungen, bei denen die Abnahme der Protonentranslokation um 50% beobachtet wurde, zu 100% vorlag und nicht partiell hydrolysiert wurde.

Die Bindung von ATP (ADP) erfolgt als freies Molekül und nicht als Magnesiumkomplex. Dies folgt aus den Messungen in Gegenwart von intraliposomalem Mg^{2+} (Fig. 19). Weiterhin kann eine größere Komplex-bildungskapazität von ATP gegenüber ADP aus den Messungen in Gegenwart von intraliposomalem EDTA (Fig. 19) ausgeschlossen werden (Kadenbach et al., 1997b). Wäre eine größere Komplexbildungskapazität von ATP die Ursache für die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie, dann hätte in Gegenwart von EDTA keine Änderung der Protonentranslokation durch ATP beobachtet werden dürfen.

Die Inkubation der COX sowie Nukleotid enthaltenden Vesikel mit kleinen Mengen des Protonophores CCCP vor der Messung der Protonentranslokation, hatte so gut wie keinen Einfluß auf die Halbierung der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen. Mit steigenden Mengen des Entkopplers konnte aber eine starke Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie sowohl bei niedrigen, als auch bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen beobachtet werden (Fig. 21). Die durch den Entkoppler erzeugten "Protonenlöcher" haben demnach keinen Einfluß auf die Abnahme der Protonentranslokation bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen, aber einen deutlichen Einfluß auf die Gesamt H^+/e^--Stöchiometrie. Aufgrund der Tatsache, daß sehr kleine "Protonenlöcher" in der artefiziellen Lipidmembran der Proteoliposomen keinen Einfluß auf die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen haben, läßt sich auch das in Fig. 16 erhaltene Ergebnis erklären. Die verschiedenen Rinderherz COX Präparationen, die für dieses Experiment verwendet wurden, wiesen alle eine unterschiedliche Reinheit auf. Dies führte zu unterschiedlich protonendichten Vesikeln. Die durch verunreinigte COX erhaltenen protonenundichteren Vesikel sind vergleichbar mit den durch den Entkoppler CCCP erzeugten Vesikeln. Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen auf 50% des Maximalwertes ist demnach unabhängig von der Protonendichtigkeit der Vesikel, sofern sie in einem begrenzten Rahmen liegt. Stark beeinflußt von der Qualität der Rekonstitution war allerdings die maximale H^+/e^--Stöchiometrie, die mit der Protonenundichtigkeit der Liposomen abnahm.

4 Diskussion

4.1 Regulation der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX durch Nukleotide

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Regulation der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX durch intra- und extraliposomale Nukleotide beschrieben. Die Regulation der COX durch intraliposomale ATP/ADP-Verhältnisse basiert auf einer Bindung von ADP bzw. ATP an die N-terminale Domäne der Untereinheit VIa-H. Die Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderleber und Rindernieren COX, welche die Leberform der Untereinheit VIa (VIa-L) enthalten, wird im Gegensatz zur Rinderherz COX nicht durch intraliposomale Nukleotide reguliert (Kadenbach et al., 1997a).

Hohe intraliposomale ATP/ADP-Verhältnisse vermindern die H^+/e^--Stöchiometrie auf maximal die Hälfte des Wertes der bei 98% - 99% oder niedrigeren ATP Anteilen gemessen wird (Fig. 12). Diese Resultate bestätigten vorausgehende Messungen der Hemmung der Atmungskontrolle (RCR) von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnissen (Fig. 9; Kadenbach et al., 1995). In diesen Messungen wurde sowohl der RCR als auch der RCR_{Val} durch hohe intraliposomale ATP/ADP-Verhältnisse gehemmt. Der RCR_{Val} ist nach Wilson und Prochaska (1990) ein Maß für die H^+/e^--Stöchiometrie. Die partielle "Entkopplung" der COX durch hohe intraliposomale ATP/ADP-Verhältnisse ist spezifisch für Adeninnukleotide. Hohe intraliposomale GTP/GDP-Verhältnisse hemmten weder die Atmungskontrolle (RCR, RCR_{Val}; Fig. 10) noch die Protonentranslokation (Fig. 13 und Kadenbach et al., 1997b). Messungen mit einem nicht hydrolysierbaren Derivat der Nukleosidtriphosphate (PNP-GMP bzw. PNP-AMP) schlossen die Möglichkeit einer partiellen Hydrolyse des GTP bzw. ATP aus. Die nicht zu beobachtende Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie in Gegenwart von intraliposomalem GTP war also keine Ursache von einer erfolgten partiellen Hydrolyse des GTP, sondern ein Beweis für die Spezifität der Bindung von Adeninnukleotiden und der damit verbundenen Regulation der Protonen-translokation (Fig. 13). Eine Messreihe in der in allen Vesikelpräparationen ATP durch das nicht hydrolysierbare Derivat PNP-AMP ersetzt wurde (Fig. 14), ergab einen identischen Kurvenverlauf wie in