Die Abnahme der Protonentranslokation bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen weist eine starke pH-Wert Abhängigkeit auf, die nur bei physiologischen pH-Werten 50% beträgt.

Eine zweite Bindungsstelle für Adeninnukleotide konnte durch Experimente mit extraliposomalen (cytosolischen) Nukleotiden nachgewiesen werden. Diese Bindungsstelle ist ebenfalls an der Regulation der Protonentranslokation beteiligt. Durch extraliposomales ADP wird die Protonentranslokation gehemmt. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX konnte die Bindungsstelle auf der cytosolischen Seite der Untereinheit VIa (VIc) lokalisiert werden. Die physiologische Bedeutung der cytosolischen Nukleotidbindungsstelle auf der Untereinheit VIa ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Hypothese aufgestellt, daß die COX an der Wärmeerzeugung durch zitterfreie Thermogenese beteiligt ist. Es wird postuliert, daß das Leber- und Nierenenzym immer partiell entkoppelt ist und das Herzenzym einer Regulierung unterliegt. In Ruhe ist es ebenfalls partiell entkoppelt, kann aber durch das Leisten von Arbeit, was eine Erniedrigung des ATP/ADP-Verhältnisses zur Folge hat, in ein streng gekoppeltes Enzym umgewandelt werden. Verantwortlich für die Regulierung der Thermogenese des Herzenzyms ist die Untereinheit VIa-H und die am N-Terminus lokalisierte ATP (ADP) Bindungsstelle.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird erstmalig eine Regulation der Protonentranslokation der Cytochrom c Oxidase (COX) durch Nukleotidbindung an die Untereinheit VIa beschrieben. Die Messung der Protonentranslokation erfolgte mittels der „reductant-pulse“ Methode an in Liposomen rekonstituierter COX. Der Mechanismus der Regulation der Protonentranslokation durch hohe intraliposomale (intramitochondriale) ATP/ADP-Verhältnisse basiert auf der Halbierung der H^+/e^--Stöchiometrie der COX aus Rinderherz durch Bindung von ATP an die N-terminale, Matrix orientierte Domäne der Untereinheit VIa-H (Herzform). Diese Halbierung der H^+/e^--Stöchiometrie wird durch die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheit VIa-H der COX aufgehoben.

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie um 50% bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen ist nicht bei COX aus Rinderleber und Rinderniere zu beobachten, welche die Leberform der Untereinheit VIa (VIa-L) exprimieren. COX aus Rinderleber und Rinderniere unterliegt demnach keiner Regulation der Protonentranslokation durch intraliposomale Nukleotide. Im Gegensatz zu der COX aus Rinderherz, die eine H^+/e^--Stöchiometrie von maximal 1,0 aufweist, weist die COX aus Rinderleber und Rinderniere nur eine H^+/e^--Stöchiometrie von 0,5 auf.

Die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie durch hohe intraliposomale ATP/ADP-Verhältnisse ist spezifisch für Adeninnukleotide, da bei Messungen mit intraliposmalem GTP (GDP) keine Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie zu beobachten ist. Die Anwesenheit von intraliposomalen Magnesiumionen und EDTA hat keinen Effekt auf die Abnahme der Protonentranslokation um die Hälfte, was auf eine Bindung von ATP (ADP) als freies Molekül schließen läßt und die höhere Komplexbildungskapazität von ATP gegenüber ADP ausschließt.

Variation des Enzymturnovers und die partielle Entkopplung der Protonentranslokation durch geringe Mengen CCCP haben keinen Einfluß auf die Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen, aber es ist eine Abnahme der Maximal-H^+/e^--Stöchiometrie zu beobachten.

Die "second messenger" $CaCl_2$ und cAMP zeigen keine Wirkung auf die Regulation der H^+/e^--Stöchiometrie durch intraliposomale Nukleotide.