2.22 Titerbestimmung im ELISA

Die Konzentration der über Protein A-Sepharose aufgereinigten Antikörper wurde mit Hilfe einer Titration im ELISA untersucht. Die Verdünnungen hierfür wurden aus den ankonzentrierten Säuleneluaten angesetzt.

Durchführung: 100 µL 1µM COX wurde mit den vorher angesetzten Antikörperverdünnungen versetzt, mit PBS-Puffer auf 200 µL aufgefüllt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die folgenden Schritte wurden wie unter 2.13 beschrieben durchgeführt.

Die Intensität der einsetzenden Grünfärbung ist proportional der Menge an überschüssigem Antikörper der über Nacht nicht an der COX gebunden hat und somit an das Antigen bindet. Es läßt sich so also eine Aussage machen über die Menge Antikörper, die ausreicht, um 100µL 1µM COX mit Antikörper abzusättigen.

2.21 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Für die meisten immunologischen Reaktionen können ungereinigte Antikörper, d.h. Vedünnungen aus lyophilisierten Zellkulturüberständen, eingesetzt werden. Für einige empfindliche Reaktionen, so bei Messung des Einflußes von Antikörpern auf die Protonentranslokation, wurden jedoch gereinigte Antikörper benötigt. Für die Antikörperreinigung wurde die von Prowse und Jenkin (1978) beschriebene Affinitätschromatographie angewendet. Bei dieser Methode wird die selektive Bindung von Immunglobulinen an Staphylokokkenprotein A ausgenutzt.

Durchführung: Die Reinigung der Antikörper erfolgte bei 4°C. Zuerst wurde die mit Protein A-Sepharose (Sepharose 4 Fast Flow, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) gefüllte Säule mit 0,1 M Phosphatpuffer auf pH 8,0 präequilibriert. Die Säule wurde durch eine Pumpe betrieben, die mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 mL/min lief. Nach dem Auftragen von 50 mL mit 2 M Tris-Base auf pH 8,0 eingestelltem Zellkulturüberstand wurde die Säule mit 50 mL Phosphatpuffer, pH 8,0 gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte durch einen 0,1 M Citratpuffer, pH 4,5. Das Eluat wurde in Fraktionen von 4,5 mL aufgefangen und bei 280 nm photometrisch vermessen. In die Röhrchen des Fraktionssammlers wurden 0,5 mL 2 M Tris-Base vorgelegt, da die Antikörper säurelabil sind. Die Säule wurde anschließend mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,0 reequilibriert. Die einzelnen Fraktionen wurden photometrisch bei 280 nm vermessen. Die Fraktionen, die Antikörper enthielten, wurden vereinigt, auf pH 8,0 eingestellt und im Centricon™ Mikrokonzentrator-30 (Amicon, Witten) ankonzentriert.

Stammlösungen angesetzt. Sowohl Lyophilisate als auch Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.19 Zellzahlbestimmung

Abgespülte Hybridomazellen wurden sedimentiert und in 1-5 mL Medium bzw. PBS resuspendiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; Fläche eines Großquadrates: 0,0025 mm^2) kann die Zellzahl/mL der Ausgangssuspension bestimmt werden, imdem man 5 Großquadrate auszählt und aus der Zellzahl das arithmetische Mittel bildet. Die Zellzahl/Großquadrat sollte zwischen 10 und 80 Zellen liegen. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt:

$Z = M \times 10^4 \times V$ Z = Zellzahl pro mL
M = arithmetisches Mittel aus 5 Großquadraten
V = Verdünnung

2.20 Kontamination der Zellkulturen

Die im Medium enthaltenen Antibiotika und Antimycotika konnten eine Kontamination größtenteils verhindern. Bakterienkontaminationen traten nicht auf. Auftretende Pilzkontaminationen wurden nicht bekämpft, sondern die betreffenden Kulturen wurden vernichtet. Bei Pilzinfektionen in Kulturplatten wurden diese in der entsprechenden Vertiefung mit 40 % (w/v) Cu_2SO_4 Lösung abgestoppt und mit autoklaviertem Paraffinöl überschichtet. Die befallenen Platten wurden täglich mikroskopisch kontrolliert und eine Ausbreitung auf andere Klone wurde zumeist erfolgreich verhindert.

bzw. mit der Pipette suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 150∗g (1200 rpm) abzentrifugiert. Von dem Zellsediment wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in maximal 1 mL des eisgekühlten Einfriermediums resuspendiert und dann in ein oder zwei Kryogefäße überführt. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, stellt aber ein Zellgift dar. Die Kryogefäße wurden deshalb umgehend auf Eis gestellt, um eine toxische Wirkung auf stoffwechselaktive Zellen zu vermeiden.

Um eine langsame Temperatursenkung und damit ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst mindestens eine Stunde im Eis belassen. Dann wurden die Kryogefäße in eine gut verschlossene nicht vorgekühlte Styroporbox (Wandstärke mindestens 5 cm) gestellt. Diese wurde für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Die Temperatursenkung während des Einfrierens entsprach so etwa 0,1°C/min. Anschließend wurden die Kryogefäße in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen muß sehr schnell erfolgen, damit das DMSO nicht den Zellstoffwechsel schädigen kann. Die Kryogefäße wurden einige Sekunden in Methanol getaucht, um einer Kontamination mit Mykoplasmen vorzubeugen, und dann in ein auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad überführt. Die Gefäße wurden solange im Wasserbad belassen bis nur noch Eisklümpchen sichtbar waren. Danach wurden die Gefäße unter der Sterilbank mit 70 % Ethanol desinfiziert und geöffnet. Aus vorbereiteten Röhrchen mit 10 mL frischem IMDM-Medium wurde 1 mL entnommen und langsam zu der Zellsuspension getropft. Die jetzt vollständig aufgetaute Zellsuspension wurde in das vorbereitete Medium gegeben und die Röhrchen 10 Minuten bei 1500∗g (1200 rpm) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät.

2.18 Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern

Für die Massenproduktion der monoklonalen Antikörper, gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc (378, Schneider, 1990) und IV (68H9, Schneider, 1990) der COX, wurden die Zellen in 250 mL Kulturflaschen angezogen. Der Überstand wurde gesammelt, eventuell im Überstand enthaltene Zellen und Zelltrümmer abzentrifugiert, und in Fraktionen von 200 mL lyophilisiert. Von diesen Lyophilisaten, die neben den monoklonalen Antikörpern auch immer geringe Mengen Rinder-IgG aus dem FCS haltigen Medium enthielten, wurden

vorzubeugen wurde dem Medium eine Antibiotikum-Antimycotikum-Lösung und Fungizon zugesetzt. Zusätzlich wurde dem Medium eine Lösung mit Hypoxanthin und Thymidin (HT-Lösung) und mindestens 10 % FCS zugesetzt.

IMDM-Grundmedium:	
IMDM (Pulver)	17,66 g/L
Natriumbicarbonat	3,024 g/L
über "Bottle-Top-Filter" zugeführt:	
HT-Supplement	10 mL/0,5 L
Antobiotikum-Antimycotikum-Lösung	5 mL/0,5 L
Fungizon	2 mL/0,5 L
FCS	50 mL/0,5 L

Das eingefrorene FCS wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut. Nicht benötigtes FCS wurde portionsweise bei -20°C eingefroren, da häufiges Einfrieren und Auftauen das Serum stark schädigt. Das FCS sowie die anderen Zusätze wurden dem Grundmedium kurz vor Verwendung über "Bottle-Top-Filter" oder über Spritzenvorsatzfilter (0.22 µM Porengröße) steril zugesetzt. Auch die übrigen Medienzusätze wurden portioniert bei -20°C gelagert. Um eine Kontamination von frischem Medium auszuschließen, wurde vor der Verwendung eine Probe im Brutschrank inkubiert. Während das Grundmedium mehrere Monate bei 4°C lagerfähig war, sollte FCS-haltiges Medium innerhalb von 3-4 Wochen verbraucht werden.

2.17 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren und Auftauen von Zellen wurde nach der von Peters und Baumgarten (1990) sowie von Lindl und Bauer (1994) beschriebenen Methode vorgegangen. Die einzufrierenden Zellen sollten sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine möglichst hohe Vitalität besitzen. Daher wurde stets am Vortag das Medium gewechselt.

Unmittelbar vor dem Einfrieren wurde das Einfriermedium angesetzt. Hierfür wurde reines FCS sterilfiltriert und mit DMSO versetzt, so daß dies in einer Endkonzentration von 10 % vorlag. Die Lösung wurde auf Eis vorgegekühlt. Die Hybridomazellen wurden möglichst vollständig vom Boden losgeschlagen

Zellkulturmethoden

Allgemeine Vorbemerkungen

In dieser Arbeit wurde mit murinen Hybridomazellen gearbeitet. Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitssterilbank (Sicherheitswerkbank der Klasse II; Modell Gelair HF 48 Bibby Dunn Larbortechnik GmbH, Asbach) in einem separaten Zellkulturlabor, das mit einem Spezialreinigungsmittel gereinigt wurde. Sämtliche verwendeten Materialien und Lösungen waren steril. Die Zellinien wurden in einem mit 5 % CO_2 begasten, auf 37°C beheizten Brutschrank (Modell CO_2-Auto-Zero; Heraeus, Osterode) kultiviert. Der Brutschrank wurde regelmäßig mit 70 % Ethanol gereinigt. Dem Wasserreservoir im Brutschrank wurde zur Vermeidung von Kontaminationen 0,1 % SDS zugesetzt. Zur Kontrolle des Wachstums und der Sterilität der Kulturen wurde ein Umkehrmikroskop mit Phasenkontrast (Invers-Mikroskop, Willovert®) benutzt.

2.15 Hybridomazellen

Die hier kultivierten Hybridomazellen enstammen einer Fusion von Milzzellen immunisierter Balb/c Mäuse mit PAI-Zellen (siehe Possekel, 1992). Sie zeichnen sich durch ungleichmäßige Größe aus und entsprechen in etwa Lymphocyten. Die Zellen wachsen sehr locker auf dem Flaschenboden und lassen sich leicht ablösen. Sie wurden in IMDM-Medium mit 10 % FCS (PAN Systems; Aidenbach) kultiviert. Konfluent gewachsene Zellen wurden durch manuelles Abklopfen vom Flaschenboden und anschließendem Abspülen mit der Pipette auf drei neue Kulturflaschen umgesetzt.

2.16 Herstellung von Medium

Die Kultivierung der Hybridomazellinien erfolgte in IMDM-Meduim. Das käufliche Pulvermedium wurde in sterilem Wasser gelöst und mit Natriumbicarbonat versetzt. Anschließend wurde es über "Bottle-Top-Filter" in vorher autoklavierte Flaschen sterilfiltriert. Um Pilzkontaminationen

gekoppelten sekundären Antikörper mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat (BCIP) und 4-Nitrotetrazolium-Chloridblau (NBT, De Blas und Cherwinski, 1983; Blake et al., 1984). Hierfür wurden Vorratslösungen von 100 mg NBT/1,5 mL 70% DMF (v/v) und 50 mg BCIP/mL DMSO angesetzt und portioniert bei -20°C gelagert. Die Reaktion wurde mit A. bidest. gestoppt, sobald deutliche Banden erkennbar waren, spätesten jedoch nach 10 min.

Waschpuffer:	2,2 mM	NaH_2PO_4, pH 7,2
	6,5 mM	Na_2 HPO_4
	150 mM	NaCl
	0,5 %	Tween-20 (v/v)
Blockierungsreagenz:	Waschpuffer mit 1 % BSA	
Färbepuffer AP:	6,06 g	Tris-Base, pH 9,5
	2,93 g	Glycin
	5,08 g	Mg_2Cl_2 x 6 H_2O
Färbelösung AP:	75 mL	Färbepuffer AP
	330 µL	NBT
	250 µL	BCIP

Folgende Puffer und Färbereagentien wurden verwendet:

Kathodenpuffer:	25 mM	Tris-Base
	40 mM	6-Aminohexansäure
	20 %	Methanol
Anode I-Puffer:	30 mM	Tris-Base
	20 %	Methanol
Anode II-Puffer:	300 mM	Tris-Base
	20 %	Methanol
Amidoschwarz-Lösung:	0,1 %	Amidoschwarz
	45 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
Entfärber:	25 %	Methanol
	10 %	Essigsäure

Immunologischer Nachweis geblotteter Proteine: Zur Erzeugung einer Farbreaktion wurden an alkalische Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper verwendet.
Der abgesättigte Blot wurde mit dem Skalpell der Länge nach in ca. 4 mm breite Streifen geschnitten, die beschriftet und in Blotkammern (Institutswerkstatt der Philipps-Universität) übertragen wurden. Die weitere Durchführung erfolgte stets bei RT; während aller Inkubationszeiten und Waschschritte standen die Blotkammern auf dem Schüttler. Jeder Blotstreifen wurde mit 3 mL Zellkulturüberstand bzw. Antikörperverdünnung für 1,5 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Mischung der einzelnen monoklonalen Antikörperverdünnungen. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellkulturüberstände bzw. Antikörperverdünnungen abgsaugt und 2-3 mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden pro Blotstreifen 3 mL einer 1:1000-Verdünnung Sekundärantikörper zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 1,5 Stunden. Nach 2-3 maligem Waschen wurden 3 mL pro Streifen der stets unmittelbar vor Verwendung angesetzten Färbelösung zugegeben. Die Anfärbung beruht auf einer Farbreaktion der an alkalische Phosphatase

Stunden mit Blockierungslösung (200 µL/Napf) zum Absättigen der unspezifischen Proteinbindungsstellen inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus den Platten ausgeschlagen und dreimal mit je 200 µL Waschpuffer pro Napf gewaschen. Zur Aufbewahrung der Platten wurden die Näpfe mit Waschpuffer gefüllt, die Platten in Alufolie verpackt und bei 4°C gelagert.

Zum Einsatz im Immuntest wurden die Platten ausgeschlagen, mit dem primären Antikörper (100 µL/Napf) versetzt und eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Nach dem Ausschlagen und erneutem dreimaligen Waschen wurden 10 µL/Napf des sekundären Antikörpers aufgetragen. Es handelte sich hierbei um Peroxidase-konjugiertes anti-Maus bzw. anti-Kaninchen IgG, das in Waschpuffer 1/1000 verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug wieder eine Stunde. Nach erneutem Ausschlagen und dreimaligem Waschen wurden 100 µL frisch angesetzter Färbelösung pro Napf zugesetzt. Die Messung des gebildeten grünen Farbstoffs erfolgte nach 15 bzw. 30 min im ELISA-Photometer (Titertek Multiscan Plus; EFLAB, Finnland) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Intensität der einsetzenden Grünfärbung ist proportional der Menge an Antikörper der an das Antigen bindet. Es läßt sich somit also eine Aussage über die Konzentration der Antikörper machen. Die Messungen wurden stets als Doppelbestimmungen mit Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine bekannte Antikörperlösung, als Negativkontrolle wurde der sekundäre Antikörper alleine zugesetzt.

2.14 Westernblot

Proteinblotting: Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll) übertragen. Hierfür wurde eine semitrocken-Blotapparatur mit Plattenelektroden aus Glaskohlenstoff (Modell Pegasus "Semi-Dry-Blot"; PHASE GmbH, Mölln) verwendet. Bei diesem Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) wurde mit Elektrodenpuffer getränktes Saugpapier verwendet. Vor dem Proteintransfer wurde die verwendete Nitrocellulose im Kathodenpuffer getränkt. Die Transferzeit betrug 45 min bei 170 mA. Die transferierten Proteine wurden durch eine reversible Anfärbung mit Amidoschwarz sichtbar gemacht. Nach Markierung der Proteinbanden wurde der Blot mit A. bidest. entfärbt und für 2 Stunden mit einer 1 % Albuminlösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen.

Immunologische Methoden

2.13 ELISA

In dieser Arbeit wurde ein heterogener, indirekter ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") durchgeführt. Bei dieser Methode liegt das Antigen festphasengebunden vor, wird von einem zugesetzten primären Antikörper erkannt und über einen sekundären Antikörper markiert. Der Test wurde speziell für die COX, die ein schwerlösliches Membranprotein ist, modifiziert (Schneyder, 1990). Es wurde zur Beschichtung der Mikrotiterplatten ein Puffer mit sehr hohem Harnstoffgehalt verwendet.

"Coating"-Puffer:	50 mM	Na-Borat, pH 9,5
	8 M	Harnstoff
Waschpuffer:	6,5 mM	Na_2HPO_4, pH 7,2
	2,2 mM	NaH_2PO_4,
	150 mM	NaCl
	0,5 %	Tween-20 (v/v)
Blockierungsreagenz:	Waschpuffer mit 1 % BSA	
Substratpuffer:	100 mM	Na-Acetat, pH 4,2
	50 mM NaP_i	
Färbelösung:	10 mL	Substratpuffer
	1,1 mg	ABTS
	3 µL	30 % H_2O_2

Das Antigen (COX, Holoenzym) wurde in "Coating"-Puffer auf eine Konzentration von 2 bzw. 4 µg COX/mL verdünnt. Die COX sollte in dieser Lösung vollständig in ihre Untereinheiten dissoziiert vorliegen. Pro Napf der Mikrotiterplatte wurden 100 µL der Lösung eingesetzt. Die Beschichtung ("coating") der verwendeten Polyvinyl-/Polystyrolplatten mit dem Antigen erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4°C. Die weitere Durchführung erfolgte bei RT. Die Antigenlösung wurde ausgeschlagen und 2 weitere

Messung der Protonentranslokation in Abhängigkeit von extraliposomalem $CaCl_2$, cAMP, Nukleotiden und der Ionenstärke: Für die Messung der Protonentranslokation mit den angegebenen Substanzen, wurden diese jeweils im Messpuffer gelöst und auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Messbedingungen entsprachen den oben angegebenen.

2.12 Messung der Protonentranslokation

Die Protonentranslokation von COX-Vesikeln wurde im sogenannten "reductant-pulse"-Experiment gemessen (Mitchell et al., 1979; Mitchell and Moyle, 1983; Brunori et al., 1979). Dabei wird zum oxidierten "resting" Enzym in Gegenwart von Valinomycin Ferrocytochrom c hinzugefügt und die Acidifizierung im Außenmedium registriert. Führt man das Experiment in Gegenwart von CCCP durch, so registriert man eine Netto-Alkalisierung der Suspension. Das H^+/e^--Verhältnis läßt sich aus der Menge der freigesetzten bzw. verbrauchten Protonen und der Menge der eingesetzen Reduktionsequivalente (in Form von Ferrocytochrom c) berechnen.

Durchführung: Die COX-Vesikel (wie unter 2.8 beschrieben rekonstituiert) wurden in einer thermostatisierten Messzelle (25 °C) mit Meßpuffer zu einer Endkonzentration von 0,2 µM Cytochrom aa_3 suspendiert (Papa et al., 1987). Das Volumen der Messzelle betrug 2 mL.

Messpuffer:	1 mM	K-Hepes, pH 7,0
	100 mM	Cholinchlorid
	5 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	1 µg/mL	Valinomycin

Es wurden dann 2,5-9,5 µM Ferrocytochrom c hinzugefügt und die Protonentranslokation mit einer pH-Mikrokombinations-Elektrode (InLab® 423, Mettler Toledo, Steinbach), verbunden mit einem pH-Meter (Beckmann Expandomatic IV), registriert. Danach wurde 3 µM CCCP zugegeben und nach erneuter Zugabe von Ferrocytochrom c die Protonentranslokation registriert. Die pH-Änderungen im Außenmedium wurden jeweils nach Zugabe von Ferrocytochrom c mit kleinen Mengen 10 mM Standard HCl-Lösung kalibriert.

Messung der Protonentranslokation in Abhängigkeit des pH-Wertes: Der Einfluß des pH-Wertes auf die Protonentranslokation wurde mit Hilfe des "reductant-pulse" untersucht. Die Messbedingungen entsprachen den oben angegebenen. Der Messpuffer und die Ferrocytochrom c Lösung wurden mit 0,1 M KOH oder HCl auf pH-Werte von 6,5 bis 8,5 eingestellt.

2.10 Herstellung von Ferri- und Ferrocytochrom c-Lösungen

Für Ferricytochrom c Lösungen wurden 40 - 50 mg Cytochrom c in 1 mL Meßpuffer gelöst und die Konzentration nach Reduktion mit Natruimdithionit photometrisch bei 550 nm bestimmt.

Für Ferrocytochrom c Lösungen wurden 40 mg Cytochrom c in 1,5 mL 100 mM K-Hepes, 40 mM Tris, pH 7,4 gelöst und mit wenig Natruimdithionit reduziert. Anschließend wurde 4 Stunden und über Nacht jeweils gegen 500 mL 100 mM Cholinchlorid, pH 7,0 (mit KOH) dialysiert. Zur Konzentrationsbestimmung der Ferrocytochrom c Lösung wurde vor und nach Oxidation mit wenig Kaliumhexacyanoferrat-(III) photometrisch die Extinktion bei 550 nm gemessen.

2.11 Messung der Enzymaktivität

Polarographischer Enzymtest: Die Enzymaktivität der COX wurde polarographisch gemessen, indem der Sauerstoffverbrauch potentiometrisch mit einer Clark-Sauerstoffelektrode in einer thermostatisierten Meßzelle (Volumen 1,6 mL) bei 25°C aufgezeichnet wurde (Ferguson-Miller et al., 1976, 1978).

Messpuffer:	10 mM	K-Hepes, pH 7,4
	40 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	25 mM	Tris-Ascorbat

Für den Enzymtest wurden 20 nM Cytochrom aa_3 rekonstituiert in Proteoliposomen (Endkonzentration) eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde mit Konzentrationen von 5 bis 50 µM Cytochrom c gemessen. Die Proteoliposomen wurden mit 1 µg/mL Valinomycin und 3 µM CCCP entkoppelt.

Bestimmung der Atmungskontrolle (RCR und RCR_{Val}): Verwendet wurden die oben beschriebenen Meßbedingungen. Die Enzymaktivität wurde vor und nach Zugabe von Valinomycin und CCCP bestimmt. Der RCR ist definiert als Valinomycin + CCCP-Atmung/gekoppelte-Atmung. Der RCR_{Val} ist definiert als Valinomycin + CCCP-Atmung/Valinomycin-Atmung.

Herstellung von Proteoliposomen mit unterschiedlichen intraliposomalen pH-Werten: Asolectin wurde in 1,5 % (w/v) Natriumcholat, 100 mM K-Hepes, pH 6,5 - 8,5 (titriert mit 0,1 M KOH) in einer Konzentratiom von 40 mg/mL suspendiert und wie oben beschrieben durch Beschallen klar gelöst. Nach Zugabe der COX in einer Konzentration von 3 µM erfolgte die Rekonstitution nach der hydrophoben Adsorptionmethode.

Proteoliposomen für die Messung der Atmungskontrolle:

Herstellung von Proteoliposomen mit intraliposomalen Nukleotiden: Die Rekonstitution der COX erfolgte nach der bereits oben beschriebenen hydrophoben Adsorptionsmethode. Asolectin wurde in 1,5 % (w/v) Natriumcholat, 10 mM K-Hepes, pH 7,5, 40 mM KCl in einer Konzentratiom von 40 mg/mL suspendiert und durch Beschallen (im Eisbad, dreimal 2 min mit jeweils 2 min Pause bei 30 % Leistung, Branson Sonifier) klar gelöst. Das weitere Vorgehen entsprach dem bereits oben erläuterten Verfahren.

2.9 Messung der Orientierung der Cytochrom c Oxidase in Proteoliposomen

Die Messung der Orientierung der COX in Proteoliposomen beruht auf einer Vorschrift von Casey et al. (1982). Dabei wird der Anteil der COX-Moleküle in den Proteoliposomen mit der Cytochrom c-Bindungsstelle nach außen durch Reduktion des Häm a mit membranimpermeablen und membranpermeablen Reduktionsmitteln in Gegenwart von Cyanid mittels Differenzspektrum ermittelt.

Durchführung: Die rekonstituierte COX wurde mit 10 mM K-Hepes, 40 mM KCl, pH 7,4 auf eine Konzentration von 0,45 µM Cytochrom aa_3 verdünnt. Die Suspension wurde mit 4 mM KCN 5 min inkubiert und dann auf zwei Küvetten verteilt. In der Probenküvette wurde das von außen zugängliche Häm a mit 0,2 µM Cytochrom c und 17,5 mM K-Ascorbat reduziert. Nach 5 min Inkubationszeit wurde das Differenzspektrum von 650 - 550 mm aufgezeichnet. Danach wurde das innenliegende Häm a durch 1,22 mM TMPD reduziert und erneut nach 5 min das Differenzspektrum aufgezeichnet. Die Orientierung in Prozent berechnet sich aus dem Verhältnis der Extinktionsdifferenz vor und nach TMPD-Reduktion.

Proteoliposomen für die Messung der Protonentranslokation:

Herstellung von Proteoliposomen: Die Rekonstitution der COX erfolgte nach der Cholat Dialyse Methode (Casey et al., 1979a und 1979b). Asolectin wurde in 1,5 % (w/v) Natriumcholat, 100 mM K-Hepes, pH 7,5 in einer Konzentration von 40 mg/mL suspendiert und durch Beschallen (im Eisbad, dreimal 2 min mit jeweils 2 min Pause bei 30 % Leistung, Branson Sonifier) klar gelöst. Nach Zugabe der COX in einer Konzentration von 3 µM wurde wie folgt dialysiert:

1. 4 h gegen das 100-fache Volumen 100 mM K-Hepes pH 7,2.
2. 4 h gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes pH 7,2, 27 mM KCl, 73 mM Sucrose.
3. Über Nacht gegen das 200-fache Volumen 1 mM K-Hepes pH 7,2, 30 mM KCl, 79 mM Sucrose.

Herstellung von Proteoliposomen mit intraliposomalen Nukleotiden: Die Beschallung des Asolectins wurde wie oben erläutert durchgeführt. Die Rekonstitution der COX erfolgte nach einer hydrophoben Adsorptionsmethode gefolgt von Dialyse.
Nach Zugabe der COX in einer Konzentration von 3 µM und der Nukleotide in einer Gesamtkonzentration ([NTP]+[NDP]) von 5 mM wurde das Natriumcholat durch Schütteln über 50 mg/mL XAD-2 bei 4°C innerhalb von ca. 22 Stunden entfernt (Shechter und Bloch, 1971). Anschließend wurde 4h gegen das 200-fache Volumen 10 mM K-Hepes pH 7,2, 27 mM KCl, 73 mM Sucrose und über Nacht gegen 1 mM K-Hepes pH 7,2, 30 mM KCl, 79 mM Sucrose dialysiert.

Herstellung von Proteoliposomen mit intra- bzw. extraliposomalen monoklonalen Antikörpern:
Die Rekonstitution der COX erfolgte nach der oben beschriebenen Adsorptionsmethode. Die monoklonalen Antikörper wurden vor der Rekonstitution über XAD-2 hinzugefügt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte auf diese Weise intra- und extraliposomal. Bei Messungen in denen der Antikörper nur von der cytosolischen Seite wirken sollte, wurde der Antikörper erst nach der Dialyse zugegeben. Die Inkubation erfolgte dabei ca. 6 Stunden.

eingegossen. Anschließend wurde die Sammelgellösung vorsichtig über die Trenngellösung geschichtet und mit ihr zusammen polymerisiert. Für analytische Gele wurde zuvor ein Teflonkamm in das Sammelgel gesteckt, so daß Taschen für die aufzutragenden Proben entstanden. Bei präparativen Gelen wurde die Gelkammer bis zu einem Abstand von ca. 5 mm zum oberen Rand gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nach etwa einer Stunde war die Polymerisation beendet. Das Gel wurde in der Elektrophorese-Apparatur befestigt und die Pufferkammern mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden in Probenpuffer gelöst und mindestens 60 min bei RT geschüttelt. Pro Probentasche wurden 30 µg Protein in 20 µL Probenpuffer aufgetragen. Die Proben wurden zunächst 60 min bei 100 V in das Gel einlaufen gelassen. Anschließend wurde die Elektrophorese ca. 18 Stunden bei konstant 220 V durchgeführt. Die Elektrophorese war beendet, wenn der Lauffrontmarker (Bromphenolblau) herausgewandert war. Das Gel wurde aus der Apparatur genommen und unter Schütteln ca. 1 Stunde in der Färbelösung fixiert und angefärbt. Das Entfärben erfolgte unter Schütteln und mehrmaligem Wechseln des Entfärbers.

2.8 Rekonstitution der Cytochrom c Oxidase

Reinigung von Asolectin: Zur Entfernung von Oxidationsprodukten wurde das Asolectin (L-α-Phosphatidylcholin, Typ II, Sigma) nach einer Vorschrift von Kagawa und Racker (1971) gereinigt. Dazu wurden 10 g Asolectin in 200 mL Aceton bei 4°C 48 Stunden gerührt und anschließend filtriert. Der unlösliche Rückstand wurde mit wenig Aceton gewaschen, in 40 mL Diethylether aufgenommen und filtriert. Aus dem klaren Filtrat wurde das Asolectin wiedergewonnen, indem der Ether im Vakuum vollständig abgezogen wurde. Das gereinigte Asolectin wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Reinigung von XAD-2 (Müller et al., 1986): 5 g XAD-2 (Amberlite® XAD-2, Serva, Heidelberg) wurden 15 min in einer Lösung aus 100 mM NaCl und 100 mM Na_2CO_3 langsam gerührt. Anschließend wurde mit einer Fritte abfiltriert, mit 500 mL A. bidest. gewaschen und das Harz nochmal 10 min in Methanol gerührt. Um das Methanol vollständig zu entfernen, wurde mit einer Fritte abfiltriert und mit 1,5 L A. bidest gewaschen. Das so gereinigte Adsorberharz wurde unter A. bidest bei 4°C gelagert.

Sammelgelpuffer	0,125 M	Tris-Cl, pH 6,8
	0,125 % (w/v)	SDS
Elektrodenpuffer:	25 mM	Tris-Cl, pH 8,4
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
APS:	10 %	Ammoniumperoxodisulfat
Probenpuffer:	62,5 mM	Tris-Cl, pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	20 % (w/v)	Glycerin
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
	5 %	Mercaptoethanol
Färbelösung:	0,5 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
	10 % (v/v)	Eisessig
	30 % (v/v)	Isopropanol
Entfärber:	5 % (v/v)	Ethanol
	7,5 % (v/v)	Eisessig
Trenngel:	2,9 g	Harnstoff
(18 % Acrylamid)	11,3 g	Trenngelpuffer
	7,8 g	Acrylamidlösung
	50 µL	APS
	10 µL	TEMED
Sammelgel:	4 mL	Sammelgelpuffer
(10 % Acrylamid)	1 mL	Acrylamidlösung
	25 µL	APS
	5 µL	TEMED

Durchführung: Die Lösungen wurden nicht entgast und Trenngel und Sammelgel gleichzeitig polymerisiert. Nachdem die Polymerisation mit APS und TEMED gestartet worden war, wurde die Trenngellösung bis etwa 2 cm unterhalb des oberen Randes in die senkrecht stehende Gelkammer

Folgende Extinktionskoeffizienten wurden verwendet:

Cytochrom c: $\varepsilon_{550nm}^{red-ox}$ = 21 $mM^{-1}\,cm^{-1}$
(Papa et al.,1983)

Cytochrom aa_3: $\varepsilon_{605-630nm}^{red-ox}$ = 24 $mM^{-1}\,cm^{-1}$
(Von Jagow und Klingenberg, 1972)

$\varepsilon_{603-650nm}^{red}$ = 40 $mM^{-1}\,cm^{-1}$

$\varepsilon_{443-490nm}^{red}$ = 204 $mM^{-1}\,cm^{-1}$
(Wikström et al., 1981)

Der Quotient E_{280nm}/E_{420nm} des oxidierten Spektrums diente als Anhaltspunkt für den Reinheitsgrad der COX. Bei Oxidasen hohen Reinheitsgrades lag dieser Wert zwischen 2.6 und 2.8.

2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das angewendete SDS-PAGE-System (Kadenbach et al., 1983) beruht auf dem diskontinuierlichen Trennsystem von Lämmli (1970). Durch Zusatz von Harnstoff wurde die Trennleistung der Elektrophorese erhöht (Downer er al., 1976). Die Gele weisen 18,75 % Acrylamid und 6 M Harnstoff auf. Die Elektrophorese wurde in ungekühlten, vertikalen Flachgel-Apparaturen durchgeführt (Studier, 1973), mit einem Puffervolumen von 2 x 400 mL und einer Gelgröße von 0,75 x 120 x 220 mm.

Acrylamidlösung;	50 % (w/v)	Acrylamid
	1,56 % (w/v)	N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngelpuffer:	0,75 mM	Tris-Cl, pH 8,3
	7,2 M	Harnstoff
	0,2 % (w/v)	SDS

2.5 Biuret-Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach einer modifizierten Biuret-Methode bestimmt (Kadenbach, 1966). Als Biuret-Reagenz diente die folgende Lösung:

1,5 g Kupfersulfat
4,5 g Kaliumnatriumtartrat
4,0 g Natriumhydroxid
2,5 g Kaliumiodid
in 500 mL bidest. Wasser

Das Reagenz wurde vor Licht geschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Probe mit einem Proteingehalt von 0,5-5 mg wurde in 2 mL bidest Wasser suspendiert, mit 0,2 mL 3 M Trichloressigsäure versetzt und bei RT 30 min. inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden 10 min bei 3000 rpm (Heraeus-Christ Zentrifuge, 1000∗g) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Präzipitat mit 2 mL Biuret-Reagenz gelöst, 15 min inkubiert, anschließend mit 2 mL bidest. Wasser verdünnt und die Extinktion bei 546 nm (2 cm-Küvette, Eppendorfphotometer) gegen Luft gemessen. Zur Bestimmung der unspezifischen Trübung wurde der Farbkomplex durch festes KCN zersetzt und nach 5 min die Extinktion erneut gemessen. Der Proteingehalt berechnet sich wie folgt:

$$(E_{\text{ohne KCN}} - E_{\text{mit KCN}} - 0{,}075) \times 7 = \text{mg}_{\text{Protein der Probe}}$$

2.6 Bestimmung von Cytochrom-Konzentrationen

Für die Konzentrationsbestimmung von Cytochromen wurden Differenzspektren (dithionitreduziert gegen luftoxidiert) oder Absolutspektren (oxidiert und dithionitreduziert) aufgenommen (Uvikon 940 Zweistrahlspektrophotometer Kontron Instruments, München). Für die Bestimmung des Cytochrom aa_3 -Gehalts von trüben Lösungen wurde die Probe in 200 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,2, 5% (w/v) Triton X-100 gelöst. Absolutspektren vom gereinigten Enzym wurden in 200 mM KP_i pH 7,2, 2% (w/v) Natriumcholat, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat aufgenommen.

Detergenz-Lösung	Ammoniumsulfat-Konzentration		Gesamtvolumen
2% Na-Cholat			200 mL
	25% (COX im Überstand)		
		35% (COX im Pellet)	
0,5% Na-Cholat			200 mL
	25% (COX im Überstand)		
		35% (COX im Pellet)	
0,5% Na-Cholat			135 mL
	25% (COX im Überstand)		
		35% (COX im Pellet)	
0,34% Brij 35			200 mL
	25% (COX im Überstand)		
		35% (COX im Pellet)	
0,21% Brij 35			200 mL
über Nacht bei 4°C stehen lassen			
	25% (COX im Überstand)		
		35% (COX im Pellet)	
0,21% Brij 35			135 mL
	25% (COX im Überstand)		
		33% (COX im Pellet)	

Die so gereinigte COX wurde in einem möglichst kleinem Volumen Puffer 9 gelöst und über Nacht gegen Puffer 9 dialysiert. Abschließend wurde 20 min bei 19.000 rpm zentrifugiert. Der COX-Gehalt wurde wie unter 2.6 beschrieben bestimmt. Um die Reinheit der COX festzustellen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.7).
Nach Aliquotieren und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde das Enzym bei -80°C gelagert.

Extraktion der Cytochrom c Oxidase: Sämtliche Ammoniumsulfatzugaben wurden mit Hilfe einer pH-Elektrode verfolgt und der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge immer über pH 7,2 gehalten.

Puffer 4:	40%	Na-Cholat
	100 mM	NaP_i, (pH 7,4)
Puffer 5:	2%	Na-Cholat
	100 mM	NaP_i, (pH 7,4)
Puffer 6:	0,5%	Na-Cholat
	100 mM	NaP_i, (pH 7,4)
Puffer 7:	0,34%	Brij 35
	100 mM	NaP_i, (pH 7,4)
Puffer 8:	0,21%	Brij 35
	100 mM	NaP_i, (pH 7,4)
Puffer 9:	10 mM	NaP_i, (pH 7,4)

Zu 340 mL Mitochondriensuspension wurden 29,6 mL einer 40% igen Na-Cholatlösung (Endkonzentration Na-Cholat 3,2%) gegeben und möglichst schnell (unter genauer Kontrolle des pH-Wertes) festes Ammosiumsulfat bis zu einer Konzentration von 33% Sättigung zugegeben. Nach 30 minütigem Rühren wurde 25 min bei 11.000 rpm (JA-20 Rotor) zentrifugiert, die Präzipitate verworfen und die vereinigten Überstände auf eine Ammoniumsulfat-konzentration von 50% eingestellt. Die Suspension wurde 25 min bei 11.000 rpm zentrifugiert und die erhaltenen Präzipitate in Puffer 5 (2% Na-Cholat) aufgenommen (Gesamtvolumen: 200 mL). Die folgenden Arbeits-schritte bestanden in wiederholtem fraktionierenden Fällen. Sämtliche Zentrifugationen erfolgten für 10 min bei 19.000 rpm (JA-20 Rotor). Nach jeder 25% igen Ammoniumsulfatfällung wurde 30 min gerührt, um die Fällung zu vervollständigen. Die erhaltenen Pellets wurden verworfen, da sie nur geringe Mengen verunreinigter COX enthielten.
Die einzelnen Fällungsschritte sind in folgendem Schema dargestellt:

2.4 Isolierung von Cytochrom c Oxidase nach Yoshikawa (Yoshikawa et al., 1977 und 1988)

Isolierung von Keilin-Hartree-Partikeln: Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.
Folgende Lösungen wurden verwendet:

Puffer 1:	200 mM	NaP_i , (pH 7,4)
Puffer 2:	20 mM	NaP_i , (pH 7,4)
Puffer 3:	100 mM	NaP_i , (pH 7,4)
30% Essigsäure		

800 g schlachtfrischer Rinderherzmuskel wurde von Fett und Sehnen befreit, im Fleischwolf zerkleinert und in sechs Portionen mit je 100 mL Puffer und 750 mL Wasser/Eis-Mischung im "Waring-Blendor" für 10 min bei maximaler Leistung homogenisiert. Anschließend wurde 10 min bei 4500 rpm (JA-10 Rotor) zentrifugiert. Die Pellets wurden nochmals in 1500 mL Puffer 2 homogenisiert und erneut 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit 30% iger Essigsäure auf pH 5,2-5,15 eingestellt und 25 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Mitochondrienfragmente (Keilin-Hartree-Partikel) wurden anschließend in 3 L Wasser aufgenommen und 20 min bei 5500 rpm (JA-10 Rotor) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde durch Pottern in möglichst wenig Puffer 3 bis zu einem Proteingehalt von 30 mg/mL suspendiert. 800 g Fleisch ergeben in der Regel ein Volumen von 340 mL. Die Mitochondriensuspension wurde über Nacht bei 4°C gelagert.

DEAE-Sephacel-Ionenaustauschchromatographie: Die gesammelten oxidasehaltigen Überstände wurden mit bidest. Wasser 1:4 verdünnt (Endkonzentration an KCl: 50 mM) und auf die regenerierte DEAE-Sephacel-Säule aufgetragen.
Vor dem Auftragen wurde die Säule wie folgt regeneriert:

1) 0,2 M NaOH bis sichtbarer Schmutz eluiert ist
2) H_2O
3) 10% HCl bis Eluat sauer
4) H_2O
5) 100 mM Tris-Cl, pH 7,2 bis Eluat-pH gleich Puffer-pH
6) Puffer E (etwa 5 Säulenvolumina)

Über diesen Anionenaustauscher wurde vor allem der Cytochrom bc_1 -Komplex von der COX abgetrennt. Nach beendetem Auftragen wurde die Säule mit dem doppelten Säulenvolumen Puffer E gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte mit Puffer F.

Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung: Zum grünen, die COX enthaltenen Eluat, wurde festes Natriumcholat bis zu einer Konzentration von 1% (w/v) hinzugefügt und anschließend unter Rühren kaltgesättigte Ammonium-sulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 28 % hinzugegeben. Es wurde über Nacht gerührt und der Niederschlag dann 15 min bei 15.000 rpm (Sorvall SS 34-Rotor) abzentrifugiert. Der grüne Überstand wurde nacheinander drei weiteren Ammoniumsulfatfällungen unterzogen (37 %, 42 % und 46 %), die zu unterschiedlich reiner COX führten. Die Sedimente wurden in einer minimalen Menge Puffer B gelöst, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Reinheit und Enzymkonzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe 2.6). Eine weitere Kontrolle der Reinheit lieferte die SDS-PAGE (2.7).

Puffer C:	200 mM	KCl
	10 mM	Tris-Cl, (pH 7,2)
Puffer D:	200 mM	KCl
	10 mM	Tris-Cl, (pH 7,2)
	5 % (w/v)	Trito X-100
Puffer E:	10 mM	Tris-Cl, (pH 7,2)
	0,1 % (w/v)	Triton X-100
Puffer F:	200 mM	NaCl
	10 mM	Tris-Cl, (pH 7,2)
	0,1 % (w/v)	Triton X-100

kaltgesättigte Ammoniumsulfatlösung, (pH 7,4)

Triton X-114 Extraktion: Die Mitochondriensuspension wurde zunächst mit Puffer B auf eine Proteinkonzentration von 25 mg/mL eingestellt. Unter starkem Rühren wurde zunächst ¼ Volumen 1M KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,2 und danach Triton X-114-Lösung zugetropft (ca. 2mL/100 mL Mitochondriensuspension bei Herzmitochondrien und 1 mL/100 mL bei Leber- und Nierenmitochondrien). Nach der Zugabe wurde noch 10 min gerührt und dann 30 min bei 48.000 rpm (Beckmann 55.2 Ti-Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde in Puffer C aufgenommen, wobei das vorherige Gesamtvolumen wieder erreicht wurde, im Potter homogenisiert und erneut 30 min bei 48.000 rpm zentrifugiert.

Triton X-100 Extraktion: Das erhaltene Sediment wurde mit dem gleichen Volumen Puffer D aufgenommen, gründlich gepottert und 30 min bei 48.000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthielt vorwiegend Cytochrom bc_1 -Komplex und wurde verworfen. Das Pellet wurde nochmal in Puffer D gepottert und zentrifugiert. Dieser Extraktionsschritt wurde solange wiederholt, bis der Überstand nahezu farblos war. Das Pellet wurde verworfen und der die COX enthaltende Überstand wie folgt weiterverarbeitet.

Mitochondrien erneut wie zuvor beschrieben, pelletiert. Resuspendieren, Pottern und Abzentrifugieren wurden so lange wiederholt bis der Überstand klar war. Dann wurden die Mitochondrien im Verhältnis 1:1 in Puffer B aufgenommen, gepottert und aliquotiert. Die Mitochondrien konnten bei -80°C gelagert werden.

Isolation aus Rinderleber und Rinderniere

Die Gewinnung von Mitochondrien aus Rinderleber und Rinderniere erfolgte prinzipiell wie beim Herzen, mit einigen Änderungen. Zu Beginn der Präparation entfiel das Zerkleinern des Gewebes im Fleischwolf. Bei der weiteren Vorgehensweise wurde für die Zerkleinerung des Gewebes im "Waring Blendor", sowie für alle weiteren Schritte, ausschließlich der Puffer B verwendet. Bei Verwendung von Puffer A wären die Mitochondrien geplatzt, was zu einer geringeren Ausbeute an intakten Mitochondrien geführt hätte. Der letzte Waschritt der Mitochondrien mußte zudem wesentlich häufiger wiederholt werden als bei Mitochondrien aus Rinderherz. Die 10 minütige Zentrifugation bei 1500 rpm, zur Abtrenung von Actin- und Myosin-Filamenten, entfiel bei der Isolation aus Rinderleber- und Rindernierenmitochondrien. Die Ausbeute an Rinderleber- und Rindernierenmitochondrien war niedriger als bei der Isolation aus Rinderherz.

2.3 Isolierung der Cytochrom c Oxidase aus Mitochondrien nach der Triton-Methode

Die Isolierung der COX aus Mitochondrien nach der Triton-Methode basiert auf der Extraktion mit nichtionischen Detergenzien (Jacobs et al., 1966) modifiziert nach Kadenbach et al. (1986). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

KCl-Lösung:	1 M	KCl
	10 mM	Tris-Cl, (pH 7,2)
Triton X-114-Lösung:	20 % (w/v)	Triton X-114
Puffer B:	250 mM	Saccharose
	10 mM	Tris-Cl, (pH 7,4)

Proteinchemische Methoden

2.2 Isolierung von Mitochondrien aus Rinderherz, Rinderleber und Rinderniere

Die Isolierung von Mitochondrien aus Rinderherz, Rinderniere und Rinderleber beruht auf der Beschreibung von Smith (1967).
Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Puffer A: (10 L)	250 mM	Saccharose
	100 mM	KP_i, pH 9,0
	1 mM	EDTA
Puffer B: (10 L)	250 mM	Saccharose
	10 mM	Tris-Cl, pH 7,6
Tris-Lösung:	2 M	Tris (ungepuffert)

Isolation aus Rinderherz

Durchführung: Ein schlachtfrisches Rinderherz wurde von Fett und Sehnen befreit und in Stücke geschnitten. Bei Bedarf konnte das Gewebe bei -80 °C gelagert werden. In diesem Fall mußte es vor Vewendung über Nacht bei 4 °C aufgetaut werden. Die Fleischstücke wurden in einem Fleischwolf zerkleinert und in Portionen von ca 150 - 200 g mit ca 750 mL Puffer A im "Waring Blendor" homogenisiert. Der pH-Wert wurde kontrolliert und falls nötig mit der 2 M Tris-Lösung auf pH 7,4 - 7,8 korrigiert. Anschließend wurde das entstandene Homogenat in 500 mL Zentrifugenbechern 10 min bei 3000 rpm (JA-10 Rotor) zentrifugiert um Muskelgewebe, Bindegewebe und Zellkerne abzutrennen. Der Überstand wurde durch ein engmaschiges Tuch filtriert, das Sediment zur Erhöhung der Ausbeute erneut mit dem vierfachen Volumen an Puffer B homogenisiert, zentrifugiert und filtriert. Aus den gesammelten Überständen konnten die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 8000 rpm (JA-10 Rotor, 20 min) gewonnen werden. Das Mitochondriensediment wurde mit der fünffachen Menge Puffer B resuspendiert und im Potter homogenisiert. Anschließend wurden Myosin- und Actin-Filamente durch Zentrifugation bei 1500 rpm (JA-10 Rotor, 10 min) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die

PNP-AMP, Li_4-Salz	Fluka, Deisenhofen
GDP, Na_2-Salz (ca. 98% Reinheit)	Sigma, München
GTP, Na_3-Salz (ca. 98% Reinheit)	Sigma, München
PNP-GMP, Li_4-Salz	Fluka, Deisenhofen

Detergenzien,Lipide

Brij-35	Fluka, Deisenhofen
Natriumcholat	Serva, Heidelberg
Triton X-114	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
L-α-Phosphatidylcholin, Typ II (Asolectin)	Sigma, München

Adsorberharz, Säulenmaterialien

Amberlite® XAD-2	Serva, Heidelberg
DEAE-Sephacel	Pharmacia, Freiburg
Protein A Sepharose 4, Fast Flow	Pharmacia, Freiburg

Substanzen für die Zellkultur

Aminopterin (100x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Aqua Dest. (reinst)	Behringwerke, Marburg
Antibiotic-/Antimycotic-Solution (100x)	Gibco BRL, Karlsruhe
CO_2-Gas für Brutschränke	Messer, Griesheim
DMSO (98 %)	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	PAN-Systems; Aidenbach
Fungizon	Gibco BRL, Karlsruhe
HT-Supplement	Gibco BRL, Karlsruhe
IMDM-Pulvermedium	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Paraffinöl	Merck, Darmstadt

Alle weiteren, nicht aufgeführten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. und wurden über das Institut von den Firmen Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg; Roth, Karlsruhe und Riedel-de-Haen, Hannover bezogen.

2 Material und Methoden

Alle während dieser Arbeit hergestellten Puffer, Lösungen und Medien wurden mit bidest. Wasser angesetzt. Die verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a..
Geräte und Lösungen die für die Zellkultur benötigt wurden, wurden vor Gebrauch bei 121°C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.
Arbeiten mit gesundheitsgefährdenden und mutagenen Stoffen erfolgten unter einem Abzug. Die anfallenden Abfälle wurden getrennt gesammelt und entsorgt.

2.1 Material

Organe	
Rinderherzen	Schlachthof, Marburg
Rinderlebern	Schlachthof, Marburg
Rindernieren	Schlachthof, Marburg
Puffersubstanzen	
Hepes	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Substanzen für die Messung von Enzymaktivitäten und Protonentranslokation	
CCCP	Boehringer, Mannheim
Valinomycin	Boehringer, Mannheim
Cytochrom c (Pferdeherz, Typ VI)	Sigma, München
Nukleotide	
AMP	Boehringer, Mannheim
cAMP	Sigma, München
ADP, K-Salz (98-100% Reinheit)	Boehringer, Mannheim
ATP, Na_2-Salz (Grade I: 99% Reinheit)	Sigma, München