4 Diskussion 86
4.1 Regulation der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX durch Nukleotide 86
4.2 Variation der Protonentranslokation und Thermogenese 95
4.3 Zusammenfassung der bekannten Nukleotidbindungsstellen an der COX aus Rinderherz 99

5 Ausblick 102

6 Zusammenfassung 104

7 Literaturverzeichnis 106

8 Anhang 128
8.1 Abkürzungen 128

2.19 Zellzahlbestimmung 47
2.20 Kontamination der Zellkulturen 47
2.21 Reinigung von monoklonalen Antikörpern 48
2.22 Titerbestimmung im ELISA 49

3 Ergebnisse 50
3.1 Rekonstitution von Rinderherz Cytochrom c Oxidase 50
3.2 Messung der Atmungsrate in Abhängigkeit von intraliposomalen Nukleotiden 51
3.3 Messung der Atmungskontrolle in Abhängigkeit von intraliposomalen Nukleotiden 53
3.4 Protonentranslokation rekonstituierter Rinderherz COX in Abhängigkeit von intraliposomalen Nukleotiden 55
3.5 Vergleich der Protonentranslokation rekonstituierter COX aus Rinderherz, Rinderleber und Rinderniere 63
3.6 Einfluß von intraliposomalen Nukleotiden auf die Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderleber und Rindernieren COX 65
3.7 Einfluß von monoklonalen Antikörpern auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX 67
3.8 Einfluß von Magnesiumionen und EDTA auf die Hemmung der Protonentranslokation von rekonstituierter Rinderherz COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen 69
3.9 Einfluß von CCCP auf die Abnahme der H^+/e^-- Stöchiometrie von rekonstituierter COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen 70
3.10 Einfluß des pH-Wertes auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX 72
3.11 Einfluß der Ionenstärke auf die Abnahme der H^+/e^-- Stöchiometrie von rekonstituierter COX bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen 74
3.12 Messung der Protonentranslokation von in Liposomen rekonstituierter COX in Abhängigkeit der "second Messenger" $CaCl_2$ und cAMP 76
3.13 Wirkung von extraliposomalen Nukleotiden auf die Protonentrans-lokation von rekonstituierter COX 78
3.14 Einfluß monoklonaler Antikörpern auf den Effekt extraliposomaler Nukleotide auf die Protonentranslokation von rekonstituierter COX 80

1 Einleitung 1
1.1 Energietransduktion in biologischen Membranen 1
1.2 Struktur der Cytochrom c Oxidase 2
1.3 Protonentranslokation der Cytochrom c Oxidase 10
1.4 Regulation der Cytochrom c Oxidase durch Nukleotide 16
1.5 Cytochrom c Oxidase und Thermogenese 19
1.6 Zielsetzung 21

2 Material und Methoden 22
2.1 Material 22

Proteinchemische Methoden
2.2 Isolierung von Mitochondrien aus Rinderherz, Rinderleber und Rinderniere 24
2.3 Isolierung der Cytochrom c Oxidase aus Mitochondrien nach der Triton-Methode 25
2.4 Isolierung von Cytochrom c Oxidase nach Yoshikawa (Yoshikawa et al., 1977 und 1988) 28
2.5 Biuret-Proteinbestimmung 31
2.6 Bestimmung von Cytochrom-Konzentrationen 31
2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 32
2.8 Rekonstitution der Cytochrom c Oxidase 34
2.9 Messung der Orientierung der Cytochrom c Oxidase in Proteo-liposomen 36
2.10 Herstellung von Ferri- und Ferrocytochrom c-Lösungen 37
2.11 Messung der Enzymaktivität 37
2.12 Messung der Protonentranslokation 38

Immunologische Methoden
2.13 ELISA 40
2.14 Westernblot 41

Zellkulturmethoden
2.15 Hybridomazellen 44
2.16 Herstellung von Medium 44
2.17 Einfrieren und Auftauen von Zellen 45
2.18 Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern 46