1.6 Zielsetzung

Das allgemeine Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Nukleotide einen Einfluß auf die Energietransduktion von Rinder COX haben.
Aufgrund der von Kadenbach et al. (1995) gemessenen Abnahme der Atmungskontrolle in Gegenwart von intraliposomalem ATP sollte zunächst untersucht werden, ob intraliposomale Nukleotide einen Einfluß auf die Protonentranslokation rekonstituierter COX haben. Dazu mußte zuerst eine Methode zur Messung der Protonentranslokation entwickelt werden.
Desweiteren sollten folgende Aspekte untersucht werden:

- Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern sollte die Nukleotid-bindungsstelle, die für die Regulation der Energietransduktion verantwortlich ist, lokalisiert werden.
- Messung der Protonentranslokation von Isozymen der COX und Vergleich mit der Protonentranslokation der Rinderherz COX.
- Untersuchung ob diese Isozyme ebenfalls einer Regulation des Energiemetabolismus unterliegen.
- Untersuchung des Einflusses von Ionenstärke, "second messenger", Entkoppler, pH-Wert, Magnesiumionen und EDTA auf die Protonentranslokation.
- Untersuchung der Wirkung von extraliposomalen Nukleotiden auf die Energietransduktionen, und Lokalisierung der für die Effekte verantwortlichen Nukleotidbindungsstelle durch monoklonale Antikörper.

Abschließend sollte eine Hypothese zur Mitwirkung der COX an der zitterfreien Thermogenese aufgrund der erhaltenen Daten aufgestellt werden.

postuliert, daß es zwei Wege für den Elektronenfluß gibt. Der gekoppelte Elektronenfluß in der COX geht vom Cu_A zum binuklearen Hämzentrum a_3/Cu_B über das Häm a und der entkoppelte Elektronenfluß läuft vom Cu_A direkt zum binuklearen Häm a_3/Cu_B-Zentrum unter Umgehung des Häm a. Dies legt die Vermutung nahe, daß das Häm a an der Protonentranslokation beteiligt ist und diese duch die Umgehung des Häm a abnimmt (Capitanio et al., 1996). Die Abnahme der Effizienz der Energiekopplung in der COX führt ebenfalls zu einem Anstieg der Rate des Elektronenflusses durch das Enzym, welches zu einer Erniedrigung der H^+/e^--Stöchiometrie führt. Diese Mechanismen könnten an der Regulation der zitterfreien Thermogenese beteiligt sein.

1.5 Cytochrom c Oxidase und Thermogenese

Die Regulation des Energiemetabolismus in Mitochondrien ist essentiell für das Überleben von Säugetieren. Die Variation der Arbeitsintensität, der Reaktionsgeschwindigkeit, der Anteil an Thermogenese und die Adaption an den Hungerzustand benötigen alle spezielle Regulierungen für den Grad des Sauerstoffverbrauches und die Effizienz der Energietransduktion in der Atmungskette. Die verschiedenen Aspekte der Regulation des Sauerstoff-verbrauches in Säugetieren wurden von Skulachev (1997) zusammengefasst.

Überall im Tierreich, ohne Rücksicht auf die Phylogenese, erzeugen Muskeln Wärme. Dies geschieht durch körperliche Bewegung, zitternde oder zitterfreie Thermogenese. Obwohl Klarheit besteht über den Mechanismus des Muskels als eine krafterzeugende Zelle ist der physiologische Mechanismus der Thermogenese, die biologische Bedeutung und die evoltutionäre Rolle des Muskels als eine wärmeerzeugende Zelle noch nicht klar definiert. Die Wärmefreisetzung, die von der Kontraktion der Muskeln herrührt (zitternde Thermogenese), ist genau untersucht worden und allgemein akzeptiert. Die Wärmeproduktion hingegen, die auf der zitterfreien Thermogenese beruht, ist noch nicht geklärt. Die Existenz der zitterfreien Thermogenese in vielen Spezies ist ebenfalls noch kontrovers, obwohl es eindeutige Beweise für das Vorkommen der zitterfreien Thermogenese in Fischen, Vögeln und Säugetieren gibt.

Für warmblütige Säugetiere ist die Regulation der Thermogenese von besonderer Bedeutung. Abgesehen von der Thermogenese im braunen Fettgewebe von Nagetieren über das Entkoppler-Protein (Nedergaard and Cannon, 1984; Nicholls and Locke, 1984) ist der grundlegende Mechanismus für die Wärmeerzeugung ohne die Kontraktion der Muskeln bislang noch nicht geklärt (Block, 1994). Eine ausführliche Zusammenfassung der bislang bekannten Tatsachen über die Thermogenese im Muskel findet sich bei Block (1994).

Der Anteil an produzierter Wärme in den Mitochondrien durch die oxidative Phosphorylierung bei einem bestimmten Maß des Sauerstoffverbrauches steigt mit der Abnahme der Effizienz der Energietransduktion (H^+/e^--Stöchiometrie) an. Für Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und Komplex III (Cytochtom c Reduktase) wird eine konstante H^+/e^--Stöchiometrie angenommen (Papa et al., 1991). Im Gegensatz dazu wird eine Abnahme der Protonentranslokation der COX mit ansteigendem Turnover beschrieben (Papa et al., 1991; Capitanio et al. 1991; 1996). Wie unter 1.3 bereits ausführlich erläutert wurde, wird

Experimente an rekonstituierter COX aus Rinderherz und *P. denitrificans* mit intraliposomalen Nukleotiden ergaben einen gegenteiligen Effekt von ATP und ADP auf den K_M-Wert für Cytochrom c für das Enzym aus Rinderherz, nicht aber für das Enzym aus *P. denitrificans* (Hüther and Kadenbach, 1988). Aus diesen Ergebnissen wurde geschloßen, daß Nukleotide mit den kernkodierten Untereinheiten des Enzyms reagieren, da diese dem Bakterienenzym fehlen. Intraliposomale Nukleotide reagieren zudem gewebsspezifisch mit COX aus Rinderherz, aber nicht mit dem Enzym aus Rinderleber (Anthony et al., 1993) und beeinflußen sowohl die Atmungsrate, als auch die Effizienz der Energietransduktion, abhängig vom intraliposomalen ATP/ADP-Verhältnis (Rohdich and Kadenbach, 1993; Kadenbach et al., 1995). Verantwortlich für diese Regulation der COX, scheint die Bindung von ATP oder ADP an die Matrixseite (N-Terminus) der Untereinheit VIa zu sein, wie Experimente mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Untereinheiten VIa-H + VIc der COX zeigten (Anthony et al., 1993). Einen weiteren Beweis für die Regulation der COX durch kernkodierte Untereinheiten lieferten Exprimente von Taanman und Capaldi (1993) und Taanman et al. (1994). Sie konnten zeigen, daß die genetische Entfernung der Untereinheit VIa der Hefe (*Saccharomyces cerevisae)* den Einfluß der Nukleotide auf die Aktivität veränderte.

Markierungsexperimente mit 8-azido-[γ-^{32}P]-ATP (Montecucco et al., 1986;) und mit [γ-^{32}P]-ATP (Bisson et al., 1987) ergaben die Bindung von ATP an die Untereinheiten IV und VII von isolierter Rinderherz COX. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Hüther und Kadenbach (1988), Reimann et al. (1988) und Rieger et al. (1995), die unter denselben Bedingungen eine Markierung der Untereinheiten II, IV, Vab, VIa; VIbc und VIIabc erhielten, was aber als eine unspezifische Markierung interpretiert wurde. Mit 2-azido-[β,γ-^{32}P]-ATP wurde eine spezifische Markierung der Untereinheit VIa von COX aus Hefe (*Saccharomyces cerevisae)* erhalten (Taanman et al., 1994).

Die Bestimmung der Anzahl der Nukleotidbindungsstellen an der COX aus Rinderherz mittels Gleichgewichtsdialyse ergab sieben hochaffine Bindungsstellen für ATP mit einer mittleren K_d von 12,5 µM (Rieger et al., 1995, Napiwotzki et al., 1996) und zehn Bindungsstellen für ADP mit einer mittleren K_d von 28 µM (Napiwotzki et al., 1997). Entsprechende Experimente für das Leberenzym und das Enzym aus *P. denitrificans* ergaben sechs bzw. eine Bindungsstelle für ATP, mit apparenten K_d's von 12 µM bzw. 16 µM.

4. Enzyme, deren Reaktion mit großer Änderung der freien Energie ΔG verbunden ist, die daher eine Schlüsselrolle im Energiemetabolismus spielen, werden fast immer allosterisch reguliert.

Es ist bekannt, daß die COX-Aktivität durch die Verfügbarkeit von Substraten, allosterischen Effektoren (z.B.; Nukleotide), das Membranpotential, und über die Expression gewebsspezifischer Isoformen reguliert wird (Kadenbach and Reimann, 1992).

Erste Hinweise auf eine Regulation der Säugetier-COX durch Nukleotide lieferten kinetische Untersuchungen von Robert und Hess (1977), sowie von Ferguson-Miller et al. (1976). Regulatorische Effekte von extraliposomalem ATP auf die Aktivität der COX wurden auch an isolierten Hefe-Mitochondrien gezeigt (Rigoulet et al., 1987; Taanman et al., 1994; Prieto et al., 1995). Experimente zum Einfluß anderer Anionen auf die Aktivität der COX führten zu der Vermutung, daß es sich um unspezifische ionische Effekte handelt (Ferguson-Miller et al., 1976; Brooks and Nicholls, 1982; Sinjorgo et al., 1986; Kadenbach, 1986; Reimann et al., 1988; Kadenbach et al., 1991). Dieser Schluß liegt aufgrund der elektrostatischen Natur der Wechselwirkung zwischen Cytochrom c und der COX nahe (Koppenol and Margoliash, 1982; Sinjorgo et al., 1986). Einen ersten Beweis, daß es sich um regulatorische Effekte durch eine Bindung der Nukleotide an die COX und nicht durch eine Bindung an Cytochrom c handelt, lieferten die Experimente von Hüther und Kadenbach (1986). Sie konnten ATP durch Photoaffinitätsmarkierung mit 8-Azido-ATP kovalent an die COX binden. Aus kinetischen Untersuchungen am rekonstituierten Enzym folgerten sie, daß eine Bindungsstelle für ATP auf der cytosolischen Seite der COX vorliegt.

Untersuchungen der Änderung des UV-Vis-Spektrums der COX in Gegenwart von Nukleotiden erhärteten die Vermutungen, daß die COX durch Nukleotide reguliert wird (Antonini et al., 1988; Reimann et al., 1988; Konstantinov et al., 1989; Rigoulet et al., 1987). Untersuchungen von Napiwotzki et al. (1997) zeigten, daß die Absorption der γ-Bande der COX in Anwesenheit von ADP um 12% und die der α-Bande um 6% abnimmt. Diese Abnahme ist spezifisch für ADP, da Messungen mit anderen Nukleotiddiphosphaten keine oder nur sehr geringe Absorptionsabnahmen ergaben. Es ist allerdings nicht bekannt, an welcher Untereinheit die Bindungsstelle für ADP lokalisiert ist, welche für die spektralen Änderungen verantwortlich ist.

Der Verlust der Energieumwandlung in der Protonenpumpe der Oxidase durch hohe Atmungsraten (hohe Elektronendrücke) und des transmembranen Protonengradienten ΔpH wird in den Mitochondrien durch zwei Prozesse gemildert:

1. Durch die vektorielle Aufnahme von Protonen die für die Reduktion von O_2 zu H_2O in der COX benötigt werden, und des dadurch entstehenden elektrochemischen Membranpotentials Δp und
2. durch die Protonen gekoppelte Aufnahme von P_i und Atmungsketten-Substraten und den Protoneneinfluß für die ATP Synthese in oxidative Phosphorylierung betreibende Mitochondrien. Dieser Vorgang verhindert den Aufbau eines großen transmembranen Protonengradienten, so daß das Pumpen von Protonen im "steady state", wenigstens teilweise, erhalten bleibt.

1.4 Regulation der Cytochrom c Oxidase durch Nukleotide

Die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch die COX ist ein stark exergonischer Vorgang und damit praktisch irreversibel. Im Gegensatz zu dem sehr hohen "Turnover" von isolierter COX, weist die COX *in vivo* nur eine sehr geringe Aktivität auf (Kadenbach, 1986). Dies deutet auf eine Schlüsselrolle im zellulären Energiemetabolismus hin (Erecinska and Wilson, 1982). Eine Regulierung der Aktivität der COX durch die kernkodierten Untereinheiten, entsprechend den variablen Energieansprüchen der Zelle, scheint demnach sinnvoll. Die Grundlage der Hypothese zur regulatorischen Funktion der kernkodierten Untereinheiten (Kadenbach and Merle, 1981; Kadenbach, 1983, 1986; Merle and Kadenbach, 1982) waren die folgenden Befunde:

1. Mit zunehmender Entwicklungshöhe der Species nimmt die Anzahl der Untereinheiten der COX zu.
2. Die kernkodierten Untereinheiten kommen in multiplen gewebs- und entwicklungsspezifischen Formen vor.
3. Die COX-Aktivität beträgt *in vivo* nur etwa 1% der maximalen Aktivität des isolierten Enzyms (Kabenbach, 1986), d.h. *in vivo* muß das Enzym stark gehemmt sein.

Rich, 1994), und diese könnten ein kooperatives Hilfsmittel sein durch welches Häm a an der Protonenpumpe beteiligt ist, indem es den Elektronentransfer zum binuklearen Zentrum mit der Protonentranslokation von der Matrixseite zu diesem Zentrum koppelt.

Capitanio et al. (1996) vermuten aufgrund ihrer Ergebnisse und den oben erläuterten strukturellen Daten, daß der Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm a_3 –Cu_B -Zentrum über zwei Wege verlaufen kann. Der Erste, über Häm a, hängt mit der Aufnahme von Protonen von der Matrixseite und deren Transfer zum binuklearen Zentrum zusammen (grüne gestrichelte Linie in Fig. 6). Die Redox-Bohr-Effekte von Häm a können auf diese Weise die Kopplung der Protonentranslokation mit der Reduktion des Sauerstoffs und dem Pumpen von Protonen verbinden. Auf diese Weise wird eine maximale H^+/e^--Stöchiometrie von 1 erhalten. Der zweite Weg basiert auf einem direkten Elektronentransfer vom Cu_A zum binuklearen Zentrum. Das Häm a wird auf diesem Weg umgangen, was eine Entkopplung der Protonenpumpe mit einer H^+/e^--Stöchiometrie von 0 zur Folge hat (rote gestrichelte Linie in Fig. 6). Das Vorkommen dieser beiden Elektronentransferwege wird durch die Beobachtung von Capitanio et al. (1996) unterstützt, daß das Reduktionsniveau des Cu_A immer niedriger liegt als das des Häm a und sich durch Erhöhung des Elektronenflusses weniger stark anheben läßt als das des Häm a.

Die tatsächliche H^+/e^--Stöchiometrie in der COX wird durch die Mitwirkung der beiden möglichen Elektronentransferwege bestimmt, und kann von einem Maximum von 1 bis 0 variieren (Papa et al., 1994). Welcher der beiden möglichen Elektronentransferwege an der Elektronenübertragung mitwirkt, kann durch kinetische und thermodynamische Faktoren bestimmt werden (Capitanio et al., 1996). Der kinetische Faktor kann durch den Elektronendruck (Konzentration von Cytochrom c) reguliert werden. bei steigendem Elektronendruck wird der entkoppelte Elektronenweg (rote gestrichelte Linie in Fig. 6) bevorzugt und die H^+/e^--Stöchiometrie nimmt ab.

Der thermodynamische Faktor, der die Mitwirkung der zwei Elektronentransferwege kontrolliert, ist durch das elektrochemische Potential Δp gegeben. Der Anteil des Protonengradienten ΔpH am elektrochemischen Potential Δp hemmt die Elektronenübertragung vom Häm a zum Häm a_3 –Cu_B -Zentrum und dies hat eine Abnahme der H^+/e^--Stöchiometrie zur Folge. Der Anteil des Membranpotentials $\Delta\psi$ am elektrochemischen Potential Δp hingegen hemmt die Elektronenübertragung vom Cytochrom c zum Cu_A (Moroney et al., 1984; Murphy and Brand, 1987; Gregory and Ferguson-Miller, 1989; Nicholls, 1990; Capitanio et al., 1990).

mögliche Wasserstoffbrückenbindungen. Diese befinden sich zwischen dem hochkonservierten Tyr^{19} und einem fixierten Wassermolekül, welches durch Wasserstoffbrücken an die Aminosäuren Asn^{98}, Ser^{101} und Ser^{156} gebunden ist. Findet in der Umgebung des hochkonservierten Tyr^{19} eine Konformationsänderung durch Redoxreaktionen oder Ligandenbindung, verbunden mit einer Änderung des pK-Wertes von mindestens einer Aminosäure, statt, dann kann der Protonentransfer zur cytosolischen Seite mit der Reduktion des Sauerstoffs verbunden sein.

Der zweite Kanal für die gepumpten Protonen ist hauptsächlich zwischen den Helices 11 und 12 der Untereinheit I lokalisiert (Fig 7B). Er enthält am Eingang auf der Matrixseite Asp^{407} und nur eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asn^{451} und Tyr^{443}. Die drei Aminosäurereste am Ausgang des Kanals, Arg^{38}, Asn^{451} und Tyr^{443}, sind hochkonserviert, was auf eine Rolle in der Protonentranslokation, ähnlich wie die des ersten Protonenkanals, schließen läßt. Ein Zweig, der zum Häm a reicht, könnte durch Redox-Änderungen des Häm a den Protonentransfer entlang des Hauptweges kontrollieren (grüne gestrichelte Linie in Fig. 6).

Der dritte Kanal, der von Tsukihara et al. (1996) als Kanal für die chemischen Protonen postuliert wird, wird von den Helices 6 und 8 der Untereinheit I und dem Häm a_3 gebildet (Fig. 7C). Er reicht vom Lys^{265} am Eingang zum Tyr^{244} welches mit His^{240} über eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung verbunden ist. His^{240} bildet einen Liganden zum Cu_B. Aus der Tatsache, daß dieser Kanal am Liganden zum Cu_B endet, folgern Tsukihara et al. (1996), daß er als ein Kanal für die Protonen zur Wasserbildung dient. Sie schließen allerdings eine Beteiligung dieses Kanals an der Protonentranslokation nicht aus. Die oben beschriebenen drei Strukturen formen ein gleichseitiges Dreieck, wenn man von der cytosolischen Seite aus auf das Enzym blickt. Der Protonenkanal, der zur Seite der Sauerstoffreduktion führt, ist gleichweit entfernt von den beiden möglichen Kanälen für die gepumpten Protonen. Das Pumpen von Protonen muß an die Redoxreaktion oder die Bindung von Liganden gekoppelt sein, kann aber entfernt von der Seite der Sauerstoffreduktion erfolgen.

Obwohl die Protonentranslokation hauptsächlich an die Sauerstoff Reduktion am Häm a_3 –Cu_B -Zentrum gekoppelt ist, kann eine Rolle des Häm a in diesem Prozeß nicht ausgeschlossen werden (Babcock and Wikström, 1992). Häm a zeigt Redox-Bohr-Effekte, durch Redox-Vorgänge hervorgerufene pK-Wert Verschiebungen (Wyman, 1968; Dutton and Wilson, 1974; Papa, 1976; Papa et al., 1979,1994; Capitanio et al., 1990; Mitchell and

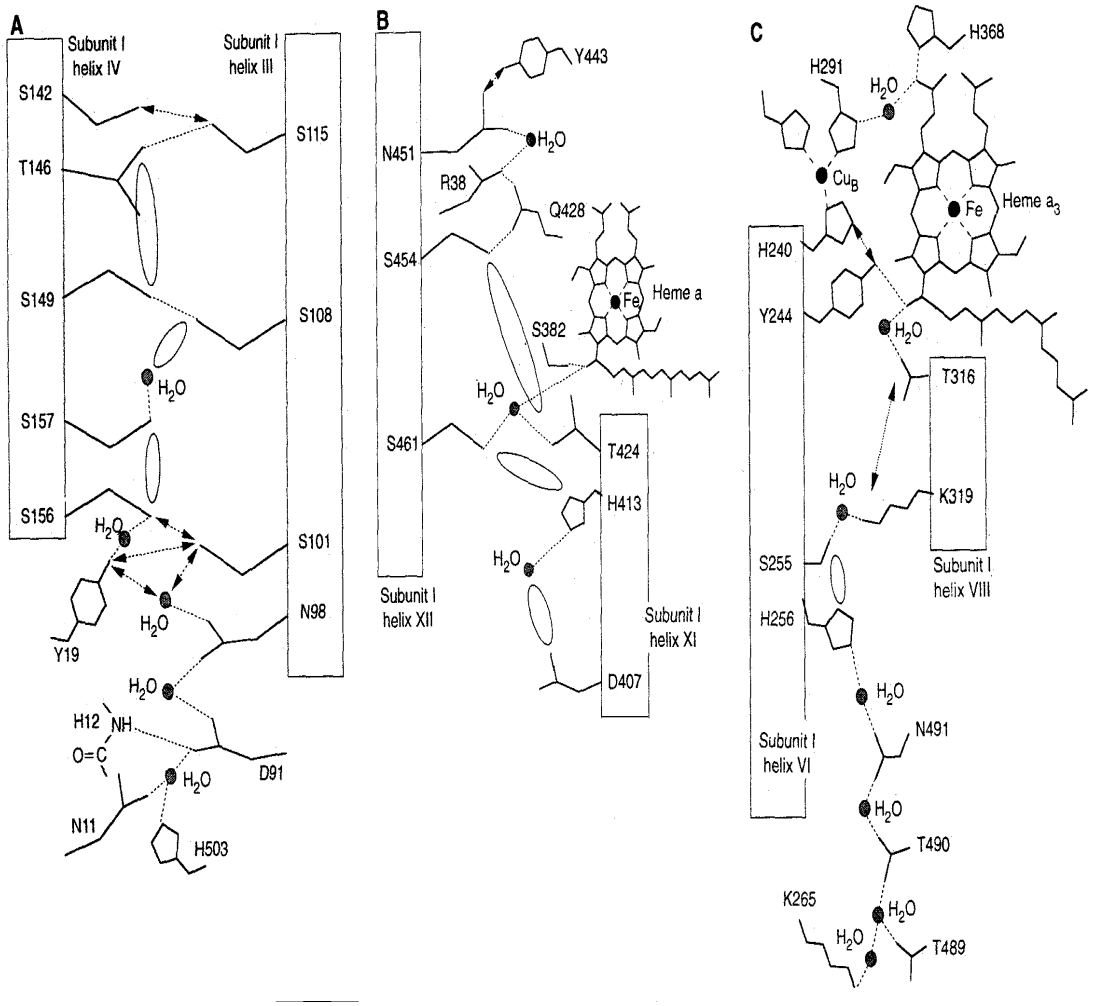

Fig. 7: Schematische Darstellung der möglichen Protonenkanäle. Ovale: Stellen, an denen in der Kristallstruktur keine detektierbare Elektronendichteverteilung auszumachen ist; gepunktete Linien: Wasserstoffbrückenbindungen; gepunktete Pfeile: mögliche Strukturen für eine Wasserstoffbrückenbindung. Jede Figur enthält nur die Struktur vom Eingang des Protonenkanals bis zu dessen Ende. A und B: Mögliche Kanäle für gepumpte Protonen. C: Ein möglicher Kanal für die chemischen Protonen (Protonen zur Wasserbildung). Entnommen aus Tsukihara et al. (1996).

Der erste Protonenkanal für die gepumpten Protonen befindet sich zwischen den Helices 3 und 4 der Untereinheit I (Fig. 7A). Am Eingang dieses Protonenkanals befinden sich His^{503} und Asn^{11} , welche beide an ein fixiertes Wassermolekül gebunden sind. Der Kanal endet mit Ser^{142} welches durch eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung mit Ser^{115} verbunden ist. Das Ser^{115} kann eine neue Wasserstoffbrückenbindung mit dem Thr^{146} formen, sobald eine Protonenfreisetzung von der cytosolischen Seite benötigt wird. Dies verhindert den unerwünschten Rückfluß von Protonen. Der Kanal enthält vier weitere

"loop" 11-12 der Untereinheit I Aminosäurereste entdeckt, welche eine Rolle beim Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm a spielen könnten (Tsukihara et al., 1995; Iwata at al., 1995). Mehrere Reste des 11-12-"loop" stehen in Kontakt mit den Propionat-Gruppen des Häm a. Interessanterweise, befindet sich das Häm a_3 ungefähr im selben Abstand vom unteren Cu_A wie das Häm a (Fig. 6). Die Propionat-Gruppen des Häm a_3 sind ebenfalls dicht zu Resten des 11-12-"loop" lokalisiert (Iwata et al., 1995) sowie zu anderen Resten der Untereinheit I auf dem möglichen Weg zum Cu_A (Tsukihara et al., 1995).

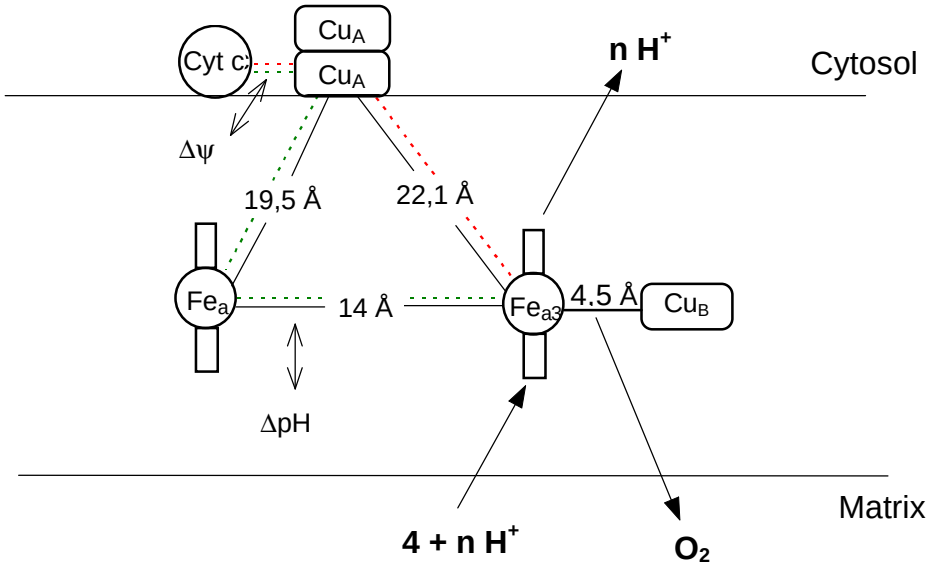

Fig. 6: Lage der Metallzentren in der Membran und Sequenz der Elektronentransfer-Schritte in der COX (nach den Daten von Tsukihara et al., 1995; Babcock and Wikström, 1992; Papa et al., 1994). Der mit dem Pumpen von Protonen gekoppelte Elektronenübertragungsweg ist durch die grüne gestrichelte Linie angedeutet und der entkoppelte Elektronenübertragungsweg ("slip") durch die rote gestrichelte Linie.

Die Funktion der COX, O_2 zu H_2O zu reduzieren und dabei Protonen zu pumpen, läßt auf Kanäle für Protonen, H_2O und O_2 schließen. Mutagenese-experimente deuten auf zwei verschiedene Arten von Protonenkanälen hin, einen für die Protonen der Wasserbildung (chemische Protonen) und einen für die gepumpten Protonen (Thomas et al., 1993; Garcia-Horsman et al., 1995; Fetter et al., 1995). In der Kristallstruktur der Rinderherz COX entdeckten Tsukihara et al. (1996) Strukturen, die auf das Vorhandensein von drei Protonenkanälen schließen lassen, zwei für die gepumpten Protonen und einen für die chemischen Protonen (Fig. 7A, B, C).

sind bedingt durch Elektronen- und/oder Protonen-"slip" (Pietrobon et al., 1983; Papa, 1988a; Papa et al., 1994; Musser and Chan, 1995).
Die H^+/e^--Stöchiometrie der COX wird durch verschiedene direkte oder indirekte Herangehensweisen untersucht. Zum einen, wird die "steady-state"-Beziehung zwischen der Atmungsrate und dem elektrochemischen Potential Δp unter verschiedenen Bedingungen untersucht (Murphy, 1989). Die dabei beobachtete Nichtlinearität dieser Beziehung (Nicholls, 1974; Pietrobon et al., 1983; Brown and Brand, 1986) wird von einigen Autoren als Beweis für "slip" in der Protonenpumpe gesehen (Pietrobon et al., 1983; Luvisetto et al., 1991). Andere Autoren hingegen sehen dies als Ursache von einem nicht-ohm'schen Anstieg der Protonenleitfähigkeit der Membran bei hohen Potentialen Δp ("proton-leak"; Brown and Brand, 1986; Brown, 1989).
Zum anderen wird die Protonentranslokation mit zwei unterschiedlichen Methoden gemessen:

1. Der Sauerstoff-"pulse"- oder der "reductant-pulse"-Methode (Mitchell et al., 1979) und
2. Der "rate"-Methode (Rejnarfarje et al.,1979; Papa et al., 1973; Murphy and Brand, 1988).

Papa et al. (1991) konnten mit der "rate"-Methode zeigen, daß die H^+/e^--Stöchiometrie der COX sowohl in Mitochondrien als auch mit in Liposomen rekonstituierter COX (Capitanio et al., 1991) mit der Rate des Elektronenflusses variiert.

Es wird vermutet, daß der Elektronenfluß in der COX, um mit dem Pumpen von Protonen gekoppelt zu sein, der Sequenz Cyt c $\rightarrow$ Cu_A $\rightarrow$ Häm a $\rightarrow$ Häm a_3 –Cu_B $\rightarrow$ O_2 folgt (Babcock and Wikström, 1992) (Fig. 6, grüne gestrichelte Linie). Das binukleare Zentrum ist die Seite, an der die Sauerstoff-reduktion stattfindet und dieser Prozeß ist normalerweise streng gekoppelt mit dem Pumpen von Protonen. Mutationsanalysen (Hosler et al., 1993, 1994; Thomas et al., 1993) und Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al.,1995), konnten zeigen, daß das Häm a und das Häm a_3 –Cu_B -Zentrum in der Untereinheit I an Histidinreste der transmembranen Helices 2, 10, 6 und 7, in Regionen die sich in Richtung der Matrixseite befinden, gebunden sind. Diese Helices kommen dort durch den 11-12-"loop" mit dem C-Terminus der Untereinheit II, welche die beiden Cu_A-Atome enthält, in Kontakt (Iwata et al., 1995). In den Kristallstrukturen von Rinderherz und *P. denitrificans* wurden zudem in den Untereinheiten II und dem

1.3 Protonentranslokation der Cytochrom c Oxidase

Die von Wikström (1977) und Wikström und Krab (1978) veröffentlichten Befunde, daß die COX eine Protonenpumpe ist, wurden lange Zeit von Mitchell nicht akzeptiert (Moyle and Mitchell, 1978; Mitchell, 1979; Mitchell, 1983). Aufgrund seiner chemiosmotischen Hypothese (Mitchell, 1961,1972) war er der Meinung, daß die COX keine Protonenpumpe sein könne. Er revidierte diese Meinung allerdings in einer späteren Puplikation (Mitchell et al., 1985). Die von Papa et al. (1983) aufgestellte Hypothese, daß die von ihm gemessenen pH-Änderungen auf Redox-Bohr-Effekte zurückzuführen sind, wurde von ihm vier Jahre später ebenfalls widerlegt (Papa et al., 1987). Inzwischen ist es bewiesen, daß die COX eine Protonenpumpe ist. Die Protonenpumpaktivität wurde sowohl an isolierten Mitochondrien (Wikström and Saari, 1977; Wikström, 1977), als auch an rekonstituierter COX (Krab and Wikström, 1978; Casey et al., 1979a; Sigel and Carafoli, 1980; Papa et al., 1987), sowie an bakteriellen Enzymen gezeigt (Solioz et al., 1982; Casey and Azzi, 1983; Sone and Hinkel, 1982; Peschek, 1984).

Während die H^+/e^--Stöchiometrie für die Cytochrom c Reduktase schon seit langem mit 2 angegeben wird (Papa et al., 1988b; Wikström and Saraste, 1984), war die H^+/e^--Stöchiometrie der COX lange Gegenstand der Diskussion. Einige Autoren haben invariable H^+/e^--Stöchiometrien von 1 für die COX gemessen (Wikström and Saraste, 1984; Wikström, 1987; Mitchell, 1987b), andere hingegen H^+/e^--Stöchiometrien kleiner 1 (Papa, 1988a; Papa et al.,1988b) oder sogar H^+/e^--Stöchiometrien größer als 1 (Azzone et al., 1979; Rejnarfarje et al., 1982). Es ist mittlerweile aber wohl allgemein akzeptiert, daß die H^+/e^--Stöchiometrien variabel sind, und zwischen 0 und 1 liegen.

Modelle zur Erklärung des Mechanismus der Protonentranslokation in der COX, die auf einem Protonentransport durch ein und dasselbe Oxidations- wie Reduktionsintermediat beruhen, sagen im Prinzip alle eine invariable H^+/e^--Stöchiometrie von 1 vorraus (Mitchell, 1987b). Diese Stöchiometrie kann jedoch abnehmen, wenn ein Teil der Elektronen durch einen sogenannten entkoppelten Redoxweg fließt. Durch Modelle, die auf Kooperativität (Papa, 1976) und/oder kinetischer Verbindung (Blair et al., 1986; Malmström, 1985, 1989) zwischen dem Elektronentransfer an den Metallzentren und dem Protonentransfer durch protonierbare Gruppen im Enzym basieren, lassen sich variable H^+/e^--Stöchiometrien erklären. Diese variablen H^+/e^--Stöchiometrien

verbunden. In der Untereinheit Vb konnte ein Zinkatom lokalisiert werden, dessen Funktion noch nicht geklärt ist. Die letzte der drei extramembranen Untereinheiten ist die Untereinheit VIb, welche als einzige auf der cytosolischen Seite des Enzymkomplexes angeordnet ist. Sie ist mit den Untereinheiten II und III assoziiert, und steht in Kontakt mit der korrespondierenden Untereinheit VIb des anderen Monomers. Diese Struktur, sowie die zehn Reste des N-Terminus der Untereinheit VIa die, wie oben erläutert, ebenfalls mit dem anderen Monomer in Kontakt stehen, scheinen den dimeren Zustand des Enzyms zu stabilisieren. Die Kristallstruktur läßt vermuten, daß die COX unter physiologischen Bedingungen als Dimer arbeitet und die beiden "Brückenproteine" (Untereinheit VIa und VIb) vom Kerngenom kodiert werden. Diese Gründe mögen die Ursache dafür sein, daß das Bakterienenzym nicht als Dimer kristallisiert, da ihm diese Untereinheiten fehlen (Iwata et al., 1995).

Die Struktur der COX besitzt eine konkave Oberfläche, die durch die Untereinheiten II, VIa und VIb, die auf dem obersten Ende der Untereinheit I lokalisiert sind, gebildet wird (Fig. 1 und 2). Diese Oberfläche bietet sich als Bindungsstelle für das Substrat Cytochrom c an. Es sind mehrere saure Aminosäurereste in dieser Region vorhanden, um einen Enzym-Substrat Komplex bilden zu können.

Sämtliche N-terminalen Domänen der transmembranen kernkodierten Untereinheiten enden auf der Matrixseite und sämtliche C-terminalen Domänen auf der cytosolischen Seite. Die Anordnungen stimmen mit denen, die durch "crosslinking"-Experimente vorrausgesagt wurden, überein (Jarausch and Kadenbach, 1985a, 1985b; Capaldi, 1990). Dieses strukturelle Merkmal legt die Vermutung nahe, daß diese Untereinheiten mit ihrem N-Terminus voran in die Mitochondrienmembran eingeschleust werden.

Eine Zusammenfassung der bis 1995 bekannten Funktionen der kernkodierten Untereinheiten findet sich in Grossman und Lomax (1997).

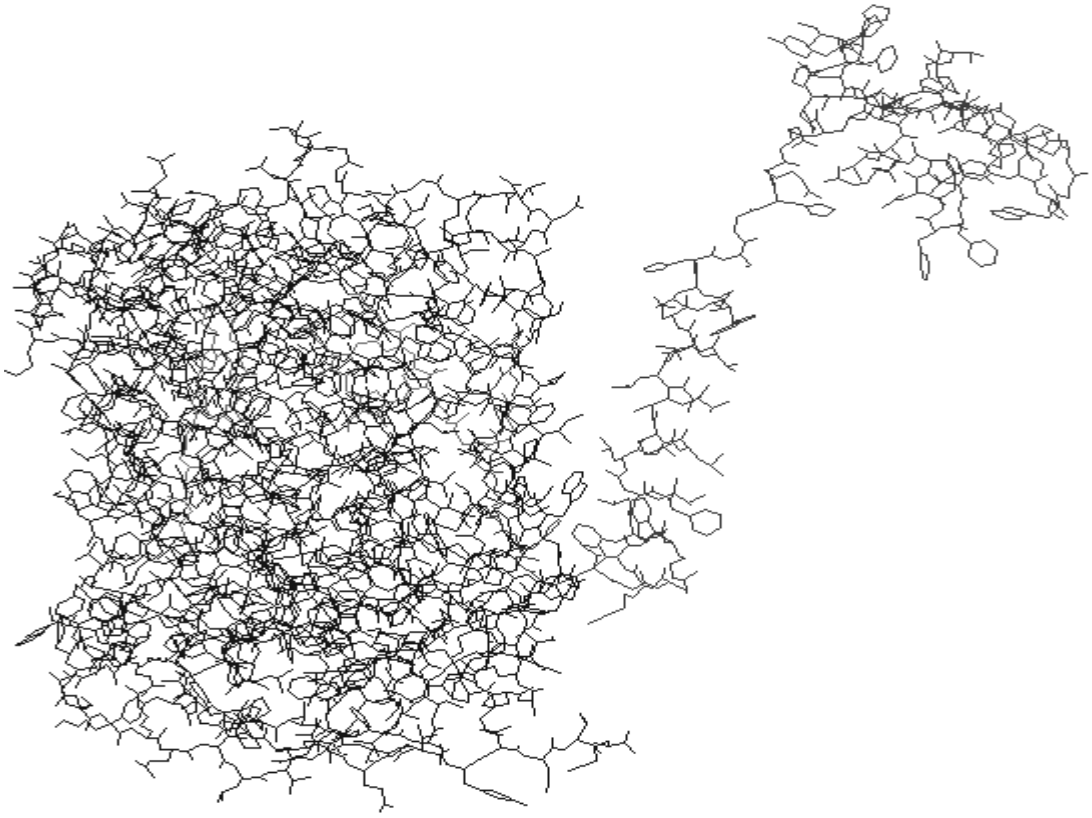

Fig. 5:. Darstellung des Kontaktpunktes des N-Terminus der Untereinheit VIa (rot) mit der Untereinheit I des anderen Monomers (blau). In grün sind die in der Untereinheit I lokalisierten Hämzentren dargestellt. Nach Tsukihara et al. (1996).

Die meisten der transmembranen Helices sind nicht vertikal zur Membranebene und gewöhnlich nicht parallel zueinander angeordnet. Die Helices, die benachbart zueinander sind, bilden Helix-Helix Wechselwirkungen in einem Winkel von 0°, 20° oder 50° aus. Diese Anordnung trägt zur Stabilität des Enzyms bei.

Zusätzlich zu den bislang besprochenen sieben transmembranen kernkodierten Untereinheiten, gibt es in der COX noch drei weitere kernkodierte Untereinheiten, die aber extramembran angeordnet sind. Die erste extramembrane Untereinheit ist die Untereinheit Va, welche auf der Matrixseite unterhalb der Untereinheit I lokalisiert ist. Sie wird ohne jeglichen direkten Kontakt zur Untereinheit I durch die Matrixdomäne der Untereinheit IV und dem extramembranen Segment der Untereinheit VIc an ihrem Platz gehalten (Fig. 2). Die zweite extramembrane Untereinheit ist die Untereinheit Vb, welche unterhalb der Untereinheiten I und III benachbart zur Untereinheit Va und zur Untereinheit IV hin lokalisiert ist. Sie hat keinen direkten Kontakt zu der Untereinheit IV und ist fest mit der Oberfläche der Untereinheiten I und III

Kernkodierte Untereinheiten: Die Untereinheit IV hat die Form einer Hantel, mit der transmembranen Helix in der Mitte und den zwei extramembranen Domänen an beiden Enden (Fig. 2). Sie steht diagonal (50°) mit den Helices 11 und 12 der Untereinheit I in Kontakt. Zusätzlich ist sie mit den Untereinheiten VIIb und VIII assoziiert (Fig. 4). Die Untereinheit VIIb liegt größtenteils auf der cytosolischen Seite und besitzt keine zusätzliche Domäne auf der Matrixseite. Parallel zur transmembranen Domäne der Untereinheit IV liegt die Untereinheit VIII, deren N-Terminus nur zu einem kleinen Teil in die Matrixseite ragt. Benachbart zur Untereinheit VIII auf der Oberfläche der Untereinheit I befindet sich die Untereinheit VIIc, mit einem ebenfalls nur wenig in die Matrixseite hineinragenden N-Terminus, der zudem noch eine ungewöhnliche Konformation besitzt. Betrachtet man das Enzym von der Seite, dann sind die Untereinheiten VIIb, IV, VIII und VIIc Seite an Seite in dieser Reihenfoge angeordnet, mit der cytosolischen Seite oben und der Untereinheit III auf der rechten Seite. Rechts von der Untereinheit VIIc befindet sich die Untereinheit VIIa, die eine extramembrane Region auf der Matrixseite der Oberfläche von Untereinheit III aufweist. Identisch mit der Untereinheit IV, weist auch die Untereinheit VIc eine hantelförmige Struktur auf, mit einer transmembranen Helix, die Kontakt zur Helix 1 der Untereinheit II hat. 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. Zusätzlich hat die Untereinheit VIa Kontakt zum anderen Monomer. Dieser Kontakt entsteht über die zehn Reste des N-Terminus, der in der transmembranen Domäne zwischen den beiden Monomeren lokalisiert ist. Der N-Terminus berührt dort die Helices 5 und 7 der Untereinheit I des anderen Monomers. Dieser Berührungspunkt ist sehr wahrscheinlich für die Stabilität des Dimers verantwortlich (Fig. 5).

Ebenfalls in der Untereinheit I lokalisiert ist das Cu_B -Zentrum. Es befindet sich ca. 13 Å von der cytosolischen Seite entfernt. Zwischen der Untereinheit I und der Untereinheit II, in der Nähe des Cu_A -Zentrums, liegt das Magnesiumzentrum.

Die Untereinheiten II und III sind mit der transmembranen Region der Untereinheit I assoziiert, haben aber keinen direkten Kontakt zueinander (Fig. 4). Die zwei transmembranen Helices 1 und 2 der Untereinheit II befinden sich jeweils nahe den Helices 9 und 8 der Untereinheit I. Die große extramembrane Domäne der Untereinheit II liegt über dem cytosolischen Teil der Untereinheit I und besitzt eine β-Faltblatt Struktur, die das Cu_A-Zentrum enthält. Wie bei der Untereinheit I, liegen auch bei der Untereinheit II der N- und C-Terminus auf der cytosolischen Seite.

Der Kontakt zwischen der Untereinheit I und der Untereinheit III kommt durch die Helices 3 und 4 der Untereinheit I mit der Helix 1 der Untereinheit III sowie durch die Helices 4 und 5 der Untereinheit I mit der Helix 3 der Untereinheit III zustande (Fig. 4). Die Untereinheit III enthält sieben transmembrane Helices, die keine extramembranen Domänen besitzen (Fig. 3). Der N-Terminus befindet sich auf der Matrixseite.

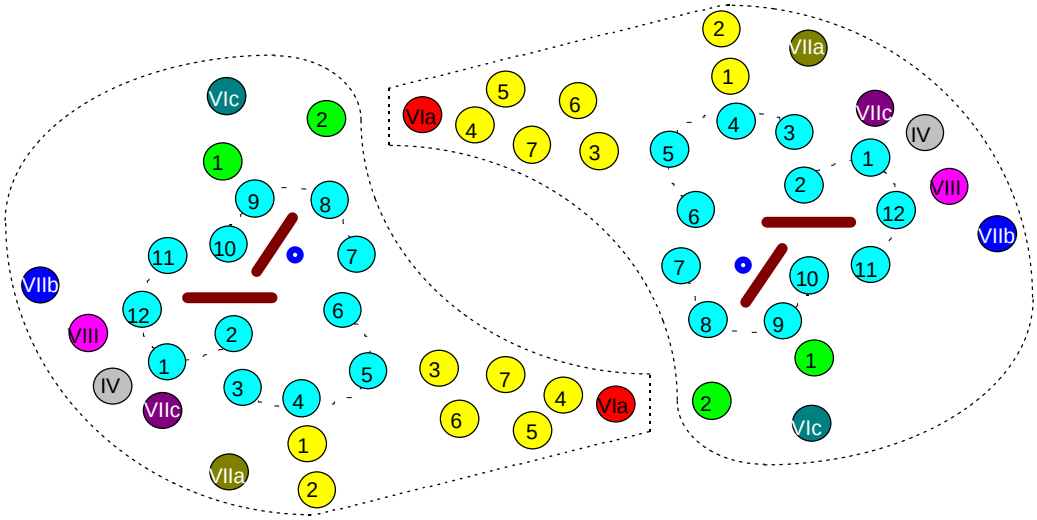

Fig. 4: Schematische Repräsentation der Lokalisierung der transmembranen Helices von der cytosolischen Seite aus betrachtet. Die dunkelroten Balken und der kleine blaue Punkt stellen die Hämzentren und das Cu_B dar. Die arabischen Ziffern in den hellblauen, gelben und hellgrünen Kreisen stellen die Nummern der transmembranen Helices dar (hellblau: Untereinheit I; hellgrün: Untereinheit II; gelb: Untereinheit III). Die römischen Ziffern in den anderen Kreisen stehen für die kernkodierten Untereinheiten. Die molekulare Oberfläche von jedem Monomer ist durch die gepunktete Linie dargestellt. Die gestrichelte Linie, die die blauen Kreise verbindet, stellt die porenbildenden Halbkreise dar, die in der Helixanordung der Untereinheit I beobachtet wurden. Nach Tsukihara et al. (1996).

Mitochondrialkodierte Untereinheiten: Die Untereinheiten I, II und III stellen das katalytische Zentrum der COX dar (Fig. 3). Die Untereinheit I, die hauptsächlich in der transmembranen Region lokalisiert ist, besteht aus zwölf transmembranen Helices (Fig. 4), ohne einen größeren extramembranen Bereich. Sowohl der N- als auch der C-Terminus der Untereinheit I befinden sich auf der Matrixseite. Die Untereinheit I besitzt die Form eines Zylinders und ist senkrecht zur Membranebene angeordnet. Die Anordnung der zwölf transmembranen Helices der Untereinheit I besitzt eine interessante Struktur. Jeweils vier der zwölf Helices bilden einen Halbkreis, welcher eine Pore mit einer Helix des nächsten Halbkreises bildet. Die drei Poren besitzen auf diese Art und Weise eine dreifache Rotationssymmetrie (Fig. 4). Zwei der drei Halbkreise enthalten Häm a und Häm a_3, welche senkrecht zur Membranebene angeordnet sind. Die Hydroxyethylfarnesyl-Seitenkette des Häm a_3 schließt die Pore zum Cytoplasma. Diese Strukturen sind analog denen des Bakterien-enzyms (Iwata et al., 1995).

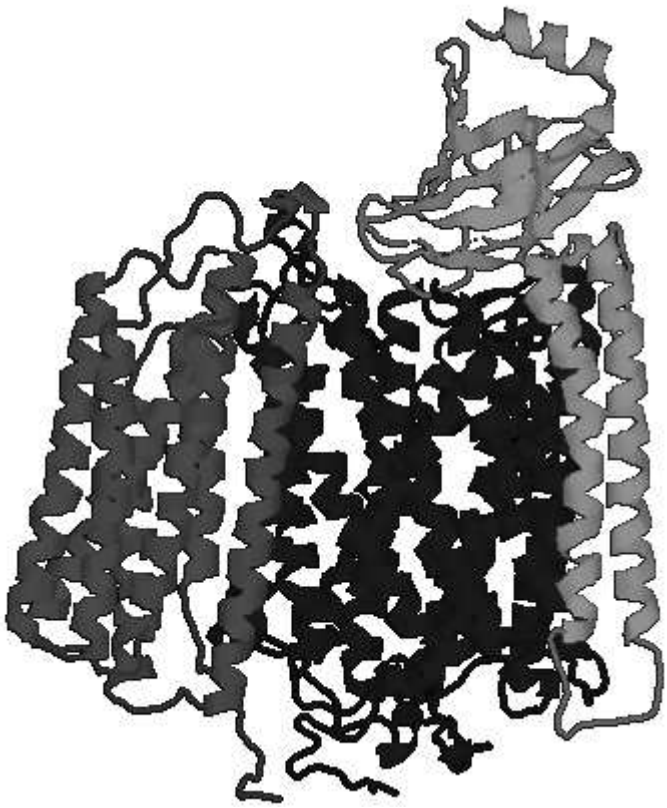

Fig. 3: Kristallstruktur des "core-proteins" der COX aus Rinderherz (Tsukihara et al., 1996), bestehend aus den Untereinheiten I (blau), II (grün) und III (rot).

Fig. 1: Struktur des dimeren Cytochrom c Oxidase-Komplexes aus Rinderherz (Tsukihara et al., 1996). Blick auf die transmembrane Oberfläche. Dargestellt sind die α-Helices und die β-Faltblatt Strukturen der einzelnen Untereinheiten. Die Auflösung beträgt 2,8 Å.

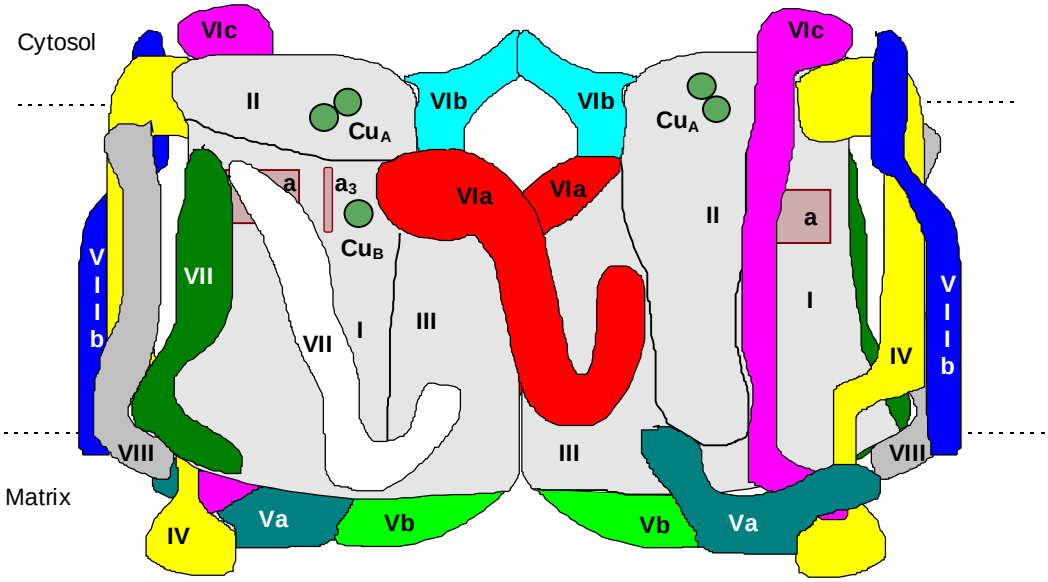

Fig. 2: Schema des dimeren Cytochrom c Oxidase Komplexes, basierend auf der Kristallstruktur des Rinderherz Enzyms (Tsukihara et al., 1996). Die Membran ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Die obere Seite repräsentiert die cytosolische Seite und die untere die Matrixseite. Die Hämzentren a und a_3 sind senkrecht zueinander angeordnet und durch dunkelrote Vierecke bzw. Balken dargestellt. Die zwei Kupfer Atome des Cu_A und das Kupferatom des Cu_B sind durch dunkelgrüne Kreise gekennzeichnet.

einer Cu-Cu-Bindung in der COX. Die molare Masse des Monomers beträgt 204,005 Da. Von den 3606 Aminosäureresten des Dimers konnten 3560 zu einer sinnvollen Struktur in die Elektronendichteverteilung eingepasst werden (Tsukihara et al., 1996). Zusätzlich zu diesen Komponenten wurden acht Lipide (fünf Phosphatidylethanolamine und drei Phosphatidylglycerine) sowie zehn Cholatmoleküle (Napiwotzki et al., 1997) in der Elektronendichteverteilung ausgemacht. Die im Enzym vorkommenden polaren Aminosäurereste befinden sich hauptsächlich an der Ober- und Unterseite des Moleküls. Dies ist ein Indiz dafür, daß der mittlere Teil des Moleküls, der aus 28 α-Helices pro Monomer besteht, den transmembranen Teil des Enzyms darstellt. Bei einem Blick von der cytosolischen Seite auf das Enzym ist zu erkennen, daß die beiden Monomere sich um eine quasi-zweifache Symmetrieachse anorden (Fig. 4). Die dem anderen Monomer zugewandte Oberfläche des jeweiligen Monomers ist konkav und formt somit eine große Öffung zwischen den Monomeren.

Sämtliche sich in der transmembranen Region befindlichen Peptide, ausgenommen die zehn Aminosäurereste des N-Terminus der Untereinheit VIa und zwei Segmente der Interhelix-Region (Gly^{121} bis Tyr^{129} und Val^{287} bis Met^{292}) der Untereinheit I, liegen in der α-Helix Konformation vor. Die Anwesenheit von transmembranen α-Helices wurde erfolgreich durch die Analyse der Lokation der N- und C-Termini der kernkodierten Untereinheiten vorhergesagt. Demnach sollten sieben von zehn kernkodierten Untereinheiten transmembrane Regionen besitzen (Capaldi, 1990).

1.2 Struktur der Cytochrom c Oxidase

Die COX ist aufgrund der von ihr katalysierten Reaktion, der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, essentiell für das Leben von höher entwickelten Lebewesen auf der Erde. Dieser Prozeß läuft ohne die Bildung von reaktiven Zwischenstufen ab und konserviert die freigesetzte Energie. Das von Otto Warburg (1924,1932) entdeckte "Atmungsferment" hatte schon Keilin (1925) als Cytochrom aa_3 beschrieben. In der folgenden Zeit wurde dieses Enzym als Cytochrom c Oxidase (Ferrocytochrom c: Sauerstoff-Oxidoreduktase, E.C.1.9.3.1.) bezeichnet. Die COX katalysiert folgende Reaktion:

$$4 \text{ Cytochrom } c^{2+} + O_2 + (4+n)\, H^+_{Matrix} \rightarrow 4 \text{ Cytochrom } c^{3+} + 2\, H_2O + nH^+_{Cytosol}$$

$$(n \leq 4)$$

Die Aufklärung der Kristallstrukturen von COX aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995) und aus Rinderherz (Tsukihara et al., 1996) ergab, daß die beiden membrangebundenenen Proteine in ihrem katalytischen Zentrum ("core-Protein") große Ähnlichkeiten aufweisen. Die drei großen Untereinheiten I-III sind in *Paracoccus* und Rinderherz strukturell quasi identisch. Ein wesentlicher Unterschied dieser beiden Enzyme besteht aber in der Anzahl der zusätzlichen kernkodierten Untereinheiten. Während das Enzym aus *Paracoccus denitrificans* nur eine weitere Untereinheit besitzt, besitzt das Rinderherzenzym zehn kernkodierte Untereinheiten. Hier soll nun in der Hauptsache auf die Struktur des Rinderherzenzyms eingegangen werden, da mit diesem in dieser Dissertation gearbeitet wurde.

Gesamtproteinstruktur: Das als Dimer kristallisierende Enzym besteht aus 13 verschiedenen Untereinheiten pro Monomer (Kadenbach and Merle, 1981; Kadenbach et al., 1983), von denen drei mitochondrial- und zehn kernkodiert sind (Fig. 1). Es besitzt zwei Eisenzentren und zwei Kupferzentren (Fe_a ,Fe_{a3}, Cu_A und Cu_B) zusätzlich zu einem Zink- und Magnesiumzentrum (Malmström, 1990; Babcock and Wikström 1992). Das Cu_A-Zentrum besteht im Gegensatz zum Cu_B-Zentrum aus zwei Kupferatomen (Tsukihara et al., 1995). Diese Tatsache führte zu der Spekulation einer Cu-Cu-Bindung in einem Biomolekül (Bertagnolli and Kaim, 1995). Die von Wallace-Williams et al. (1996) mittels Resonanz-Raman-Spektroskopie erhaltenen Daten unterstützen die Theorie

1 Einleitung

1.1 Energietransduktion in biologischen Membranen

Jeder der drei protonenpumpenden Enzymkomplexe der Atmungskette der Mitochondrien, NADH-Dehydrogenase, Cytochrom c Reduktase und Cytochrom c Oxidase, wandelt die bei den Redoxprozessen freiwerdende Energie in das transmembrane elektrochemische Potential Δp um (Mitchell, 1966, 1987; Papa, 1976; Boyer et al., 1977; Wikström and Saraste, 1984; Malmström, 1989; Rich, 1991). Der Elektronenfluß durch die Atmungskette führt dazu, daß Protonen aus der Mitochondrienmatrix herausgepumpt werden, wodurch das elektrochemische Potential gebildet wird. Anschließend fließen die Protonen zur Bildung von ATP durch die ATP-Synthase in die Matrix zurück.

Die Cytochrom c Oxidase (COX), der terminale Enzymkomplex der mitochondrialen Atmungskette, gehört zur Superfamilie der Häm-Kupfer Oxidasen (Saraste, 1990; Calhoun et al., 1994). Diese Enzyme katalysieren den Transfer von Elektronen vom Cytochrom c oder Ubichinol (in manchen Oxidasen von Prokaryoten) zu molekularem Sauerstoff. Der Elektronenfluß in Häm-Kupfer-Oxidasen resultiert in der Bildung eines elektrochemischen Potentials Δp (Mitchell, 1966; Papa, 1988a; Babcock and Wikström, 1992). Dies leitet sich in erster Linie von der vektoriellen Aufnahme von Protonen, die bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser benötigt werden, ab. Die Elektronen stammen dabei vom Cytochrom c (oder Ubichinol) auf der cytosolischen Seite der Membran und die entstehenden Protonen werden von der Matrixseite aufgenommen. Der Elektronenfluß ist zusätzlich mit dem Pumpen von Protonen aus den Mitochondrien auf die cytosolische Seite verbunden (Wikström et al., 1981).

Um die Protonenpumpaktivität der Häm-Kupfer-Oxidasen zu erklären, wurden direkte (Mitchell, 1987b) und indirekte Modelle (Malmström, 1985; Gelles et al., 1986) vorgeschlagen (Papa et al., 1994). Ein wichtiger Schritt bezüglich der Aufklärung des Mechanismus der Protonenpumpe waren Mutationsanalysen an prokaryotischen Oxidasen, sowie die Aufklärung der Kristallstruktur bei 2,8 Å von COX aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995) und aus Rinderherz (Tsukihara et al., 1995 und 1996).