

**Regulation der Cytochrom c Oxidase Aktivität
durch reversible cAMP-abhängige
Phosphorylierung**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Elisabeth Bender
aus Bielefeld

Marburg/Lahn 1999

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
03. 12. 1999 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. B. Kadenbach

Zweitgutachter. Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am : 15. 12. 1999

1.	Einleitung	1
1.1	Die Mitochondrien	1
1.1.1	Konservierung der Energie im Mitochondrium	1
1.1.2	Die chemiosmotische Hypothese	3
1.1.3	Die Kontrolle der Atmung von Mitochondrien	4
1.1.3.1	Kontrolle durch das Membranpotential	4
1.1.3.2	Kontrolle der Atmung durch das ATP/ADP-Verhältnis	5
1.2	Cytochrom c Oxidase	6
1.2.1	Der Reaktionszyklus der Cytochrom c Oxidase	6
1.2.2	Die Struktur der Cytochrom c Oxidase	8
1.2.3	Die Isoformen der kernkodierten Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase	9
1.2.4	Regulation der Cytochrom c Oxidase	10
1.2.4.1	An der Regulation beteiligte Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase	11
1.3	Die Reversible Proteinphosphorylierung	13
1.3.1	Proteinkinasen	14
1.3.1.1	cAMP-abhängige Proteinkinasen	15
1.3.2	Proteinphosphatasen	17
2.	Zielsetzung	18
3.	Material	19
4.	Methoden	21
4.1	Isolierung der Cytochrom c Oxidase	21
4.1.1	Präparation von Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz nach Yoshikawa	21
4.1.2	Bestimmung der Cytochrom c Oxidase-Konzentration	23

4.1.3	Proteinbestimmung mit Biuret	24
4.1.4	Nachweis der kernkodierte Untereinheiten der COX mit HPLC	25
4.2	Isolierung von Rinderlebermitochondrien	26
4.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	27
4.3.1	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE	27
4.3.2	SDS-PAGE nach Kadenbach	27
4.3.3	SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow	29
4.3.4	2D-Blue Native-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
4.3.5	Coomassie-Blue Färbung	35
4.3.6	Autoradiographie	35
4.4	Rekonstitution der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz in Proteoliposomen	36
4.5	Vorbehandlung zur Untersuchung des Effekts von cAMP und Proteinkinase A auf die Cytochrom c Oxidase	38
4.5.1	Vorbehandlung isolierter Cytochrom c Oxidase	38
4.5.2	Vorbehandlung rekonstituierter Cytochrom c Oxidase	39
4.5.3	cAMP-abhängige Markierung von Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz mit Proteinkinase A und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	39
4.6	Vorbehandlung der intakten Mitochondrien zur Untersuchung des Effekts von cAMP auf die COX-Aktivität	40
4.6.1	cAMP-abhängige Markierung von Cytochrom c Oxidase in Rinderleber Mitochondrien mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	40
4.6.2	Solubilisierung der Mitochondrien	41
4.7	Polarographischer Enzymtest	42
4.7.1	Bestimmung der COX-Aktivität in solubilierten Mitochondrien	43
4.7.2	Bestimmung der Aktivität der rekonstituierten Cytochrom c Oxidase	43
4.7.3	Bestimmung der Aktivität der gelösten Cytochrom c Oxidase	43

4.7.4	Messung der Atmungskontrolle	43
5.	Ergebnisse	44
5.1	Charakterisierung der isolierten Rinderherz Cytochrom c Oxidase	44
5.2	Einfluß der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit cAMP auf die Aktivität der Cytochrom c Oxidase	46
5.2.1	Abhängigkeit der COX-Aktivität von der Dauer der Regenerierung des ATP bei 0° C nach der Inkubation der Mitochondrien	48
5.2.2	Variation der Konzentration des cAMP bei der Inkubation der Mitochondrien bei 25° C	50
5.2.3	Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur bei der Inkubation der Mitochondrien	51
5.2.4	Der Einfluß von Kaliumfluorid während der Vorinkubation von Mitochondrien mit cAMP auf die COX-Aktivität	53
5.2.5	Variation der Konzentration von cAMP bei der Inkubation von Mitochondrien bei 4° C	55
5.2.6	Zeitabhängige Inkubation der Mitochondrien mit cAMP	58
5.2.7	Effekt der Vorinkubation der Mitochondrien mit cGMP auf die COX-Aktivität	60
5.2.8	Einfluß der Vorinkubation von Mitochondrien mit Calcium auf die allosterische ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase	61
5.2.9	cAMP-abhängige Markierung intakter Rinderleber-mitochondrien mit [γ - ³² P]-ATP	63
5.3	Untersuchungen an isolierter Rinderherz Cytochrom c Oxidase	65
5.3.1	Einfluß der Vorinkubation von gelöster Cytochrom c Oxidase mit cAMP-abhängiger Proteinkinase A, ATP und cAMP auf die Aktivität	65

5.3.2	Einfluß von Cardiolipin auf die ATP-Inhibierung der Atmung gelöster Cytochrom c Oxidase	68
5.3.3	Abhängigkeit der ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase vom Ausmaß der cAMP-abhängigen Phosphorylierung	69
5.3.4	Dephosphorylierung cAMP-abhängig phosphorylierter Cytochrom c Oxidase mit der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1	71
5.3.5	Einfluß von Ca^{2+} auf die Aktivität gelöster Cytochrom c Oxidase	73
5.3.6	Nachweis der cAMP-abhängig mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ phosphorylierten Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz	74
5.4	Untersuchungen an rekonstituierter Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz	78
5.4.1	Effekt von Proteinkinase A und cAMP	78
5.4.2	Extraliposomale Markierung rekonstituierter Rinderherz Cytochrom c Oxidase mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	81
6.	Diskussion	83
6.1	Induktion der ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase durch Phosphorylierung.	83
6.2	Nachgewiesene cAMP-abhängige Phosphorylierungsstellen der Cytochrom c Oxidase	88
6.3	Hypothese über die physiologische Bedeutung der cAMP- abhängigen Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase	91
6.3.1	Kontrolle der Atmung durch Hormonsignale	94
6.3.1.1	Anschalten der ATP-Inhibierung durch Phosphorylierung	94
6.3.1.2	Ausschalten der ATP-Inhibierung durch Dephosphorylierung	96
6.3.2	Konsequenzen des Verlustes der Atmungskontrolle durch das ATP/ADP-Verhältnis	97
7.	Zusammenfassung	101

8.	Literaturverzeichnis	103
9.	Abkürzungen	120
10.	Danksagung	122

1. Einleitung

1.1 Die Mitochondrien

Die eukaryontische Zelle ist in diverse Kompartimente unterteilt, in denen Stoffwechselprozesse differenziert ablaufen.

Mitochondrien sind Zellorganellen mit eigener DNA und einer zweifachen Membran, der für viele Stoffe leicht durchlässigen äußeren und der stark gefalteten, für die meisten Ionen undurchlässigen inneren Membran. Diese umgeben den Intermembranraum und die Matrix. Mitochondrien erzeugen in der eukaryontischen Zelle den größten Teil der zum Leben benötigten Energie. Dies geschieht primär durch die oxidative Phosphorylierung, einem Prozeß in dem Wasserstoff bzw. Elektronen über eine Serie von Redox-Molekülen und Enzymen, genannt die Elektronentransportkette, befördert werden. Die Reduktionsäquivalente werden von den reduzierenden Substraten NADH und $FADH_2$, welche durch Oxidation von Kohlehydraten wie Glukose entstehen, geliefert und letztendlich auf molekularen Sauerstoff übertragen.

1.1.1 Konservierung der Energie im Mitochondrium

Die Elektronentransportkette besteht aus den folgenden vier Enzymkomplexen: der NADH Dehydrogenase (Komplex I), der Succinat Dehydrogenase (Komplex II), dem Cytochrom bc₁ Komplex (Komplex III) und der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV), die alle in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind.

Das Cytochrom c ist dabei ein an der inneren Membran im Intermembranraum der Mitochondrien assoziierter Elektronenüberträger, der zwischen den Enzymkomplexen III und IV Elektronen überträgt.

Während die Elektronen von Komplex I der Elektronentransportkette über die Komplexe II, III und IV bis zu O_2 transferiert werden, sinkt das Reduktionspotential auf jeder Stufe ab. Der Verlust der chemischen Energie wird teilweise in elektrochemische Energie umgewandelt, indem ein Protonengradient über die innere Membran der Mitochondrien durch die Protonenpumpaktivität der Komplexe I, III und IV der Atmungskette aufgebaut wird. Die Translokation von Protonen und Elektronen ist dabei ein miteinander gekoppelter Prozeß; Komplex I pumpt vier Protonen, Komplex III zwei und Komplex IV ein bis zwei Protonen, sowie zwei Ladungsäquivalente pro zwei übertragenen Elektronen (Frank & Kadenbach, 1996).

Diese protonenmotorische Kraft Δp treibt die ATP-Synthase, den Komplex V der Atmungskette an (von Jagow & Engel, 1980). Dies ermöglicht die Umwandlung der Energie in die Produktion von ATP-Molekülen aus ADP und Phosphat. Dieser Prozeß ist neben der Photosynthese die effektivste Form der Energiegewinnung in der Natur. Er erreicht einen Wirkungsgrad von 74% (Erecinska & Wilson, 1992).

1.1.2 Die chemiosmotische Hypothese

Das Prinzip der Energiekonservierung mittels eines Ionengradienten über einer Membran wurde von Mitchell 1961 erstmals erkannt und ist heute als die „chemiosmotische Hypothese“ allgemein akzeptiert. Experimente, die hierzu an Bakterien (Ramos & Kaback, 1977) durchgeführt wurden, unterstützen diese Hypothese.

Mitchell definierte die protonenmotorische Kraft Δp als die Summe aus dem Membranpotential $\Delta\Psi$, das von dem Ladungsunterschied zwischen der Matrixseite und dem Intermembranraum der Membran herrührt, und einer elektroosmotischen Komponente $(2,3 \cdot R \cdot T \cdot \Delta pH)$, die durch das elektrochemische Potential der Protonen ($\Delta\mu_{H^+}$) über der Membran verursacht wird. In der folgenden Gleichung ist dieser Zusammenhang zwischen der protonenmotorischen Kraft, dem Membranpotential und dem elektrochemischen Potential dargestellt:

$$\Delta p = \Delta\mu_{H^+} / F = \Delta\Psi - (2,3 \cdot R \cdot T / F) \cdot \Delta pH$$

Dieser durch Translokation der Protonen erzeugte thermodynamische Ungleichgewichtszustand kann von den Komplexen der Elektronentransportkette nur bis zu einem bestimmten Wert der protonenmotorischen Kraft Δp erzeugt werden. Mit dem Anstieg des Konzentrationsgefälles der Protonen (ΔpH) über die Membran und dem elektrischen Membranpotential ($\Delta\Psi$) wird die Translokation der Protonen thermodynamisch erschwert.

1.1.3 Die Kontrolle der Atmung von Mitochondrien

Bei jeder biochemischen Reaktion kontrolliert zunächst die Verfügbarkeit der Substrate die Umsatzrate der Enzyme, bis die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Hier sind es die Konzentrationen von NADH, Sauerstoff und FADH₂, welche die Aktivität der Komplexe der Elektronentransportkette kontrollieren. Sind die Substrate in ausreichender Konzentration vorhanden, so greifen weitere Regulationsmechanismen, die im Anschluß vorgestellt werden.

1.1.3.1 Kontrolle durch das Membranpotential

Da die Atmung der Mitochondrien mit einer Protonentranslokationsaktivität eng gekoppelt ist, ist nach der Mitchell-Hypothese (chemiosmotische Hypothese) die mitochondriale Atmung ebenfalls von der protonenmotorischen Kraft kontrolliert.

In isolierten, atmenden Mitochondrien beträgt das Membranpotential $\Delta\Psi$ bei 25° C zwischen 170 und 200 mV (Nicholls & Ferguson, 1992), während *in vivo* das mitochondriale Membranpotential allerdings mit etwa 110-130 mV wesentlich niedriger als in isolierten Mitochondrien liegt (Wan *et al.*, 1993).

Die Stimulation des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien durch ADP (aktivierte Atmung, *state 3*), wird in Übereinstimmung mit der chemiosmotischen Hypothese durch die Aufnahme von ADP in die Mitochondrien und Stimulierung der ATP-Synthase erklärt. Die Aktivierung der ATP-Synthase ist begleitet von einer Abnahme der protonenmotorischen Kraft Δp , welche die Aktivität der drei Protonenpumpen der Atmungskette erhöht, und damit die mitochondriale Atmung stimuliert (Nicholls & Ferguson, 1992). Diesem Prozeß folgt eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs (kontrolliert, *state 4*), nachdem ADP in ATP umgewandelt ist.

Das Verhältnis des Verbrauchs des Sauerstoffs im *state 3* (aktivierte Atmung) und *state 4* (kontrollierte Atmung) wird als die „Atmungskontrolle“ oder Akzeptorkontrollrate bezeichnet. Sie ist von der engen Kopplung zwischen Elektronentransfer und Energiekonservierung abhängig (Boveris *et al.*, 1999).

In der Vergangenheit konnten verschiedene Ergebnisse, besonders an Mitochondrien, nicht mit der Mitchell-Hypothese erklärt werden (Slater, 1987). So wurde die Atmung in Rattenlebermitochondrien bei gleichbleibendem $\Delta\mu_{H^+}$ in *state 3* und *state 4* um das 3,5-fache erhöht (Padan & Rottenberg, 1973). Die Autoren interpretierten ihre Beobachtungen als nicht vereinbar mit der Mitchell-Hypothese.

1.1.3.2. Kontrolle der Atmung durch das ATP/ADP-Verhältnis

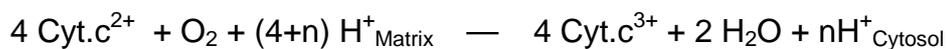
Vor kurzem wurde ein zweiter Mechanismus der Atmungskontrolle entdeckt, welcher unabhängig von Δp ist und auf dem intramitochondrialen ATP/ADP-Verhältnis basiert (Arnold & Kadenbach, 1997). Die Nukleotide binden dabei an die Cytochrom c Oxidase. Ein hohes ATP/ADP-Verhältnis induziert eine Hemmung der Cytochrom c Oxidase Aktivität in solubilisierten Mitochondrien, Dabei wurde eine sigmoide Substrat/Aktivitäts-Kinetik der Cytochrom c Oxidase Aktivität erhalten. Es wurde eine vollständige Inhibition der Aktivität durch ATP bei 1-6 μM Cytochrom c beobachtet. Der Grund für die variable Cytochrom c Konzentration, bei welcher die vollständige Inhibition beobachtet werden konnte, war nicht klar.

1.1. Cytochrom c Oxidase

Die Cytochrom c Oxidase (COX) ist ein Enzym der Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Saraste, 1990). Bei Prokaryonten setzt sich die Cytochrom c Oxidase aus maximal vier Untereinheiten zusammen, während das Enzym in Eukaryonten zwischen sieben (*Dictyostelium discoideum*) (Bisson & Schiavo, 1986) und dreizehn Untereinheiten (Säugetiere) besitzt (Kadenbach *et al.*, 1983). Die Untereinheiten I und II, welche die katalytischen Zentren Cu_A, Cu_B, Häm a und Häm a₃ beinhalten, sowie Untereinheit III, deren Funktion unbekannt ist, werden vom Genom der Mitochondrien kodiert. Die restlichen zehn kleineren regulatorischen Untereinheiten sind kernkodiert.

1.2.1 Der Reaktionszyklus der Cytochrom c Oxidase

Die COX überträgt als terminaler Enzymkomplex der Elektronentransportkette Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff, verbunden mit dem Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten. Der gesamte Prozeß läßt sich durch folgende Gleichung beschreiben :



Der reduzierte Sauerstoff bildet mit vier vektorialen Protonen von der Matrixseite des Enzyms Wasser.

Ein vollständiger Reaktionszyklus umfaßt zwei Phasen; in der oxidativen Phase werden vier Elektronen von dem katalytischen Zentrum Cu_B -Häm a_3 auf das Sauerstoffmolekül übertragen, das Enzym wird vollständig oxidiert. In der reduktiven Phase wird das Enzym durch Aufnahme von vier Elektronen aus Ferro-Cytochrom c am Cu_A -Zentrum reduziert. Bisher wurde angenommen, daß die Translokation der Protonen über die Membran mit der oxidativen Phase gekoppelt ist (Wikstöm, 1989). Michel (1998) stellte ein Modell vor, in dem er vorschlug, daß bereits in der reduktiven Phase, vor Reaktion des Enzyms mit dem Sauerstoff, ein Proton transloziert wird. Ein Jahr später wurde durch Experimente an rekonstituierter Cytochrom c Oxidase bestätigt, daß am Ende der oxidativen Phase die Translokation der Ladung unvollständig ist (Verkhovsky *et al.*, 1999). Die verbleibende Ladung wird jedoch nur vollständig übertragen, wenn auf der oxidativen sofort die reduktive Phase folgt.

1.2.2 Die Struktur der Cytochrom c Oxidase

Die Kristallstrukturen der oxidierten Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* (Iwato *et al.*, 1995) und aus Rinderherz (Tsukihara, 1996) sind aufgeklärt.

Das Enzym von *Paracoccus denitrificans* besteht aus vier Untereinheiten (UE). Zwei Protonenkanäle, bei dem der erste für die Wasserbildungsreaktion und der zweite für die Protonenpumpaktivität zuständig ist, konnten in der Untereinheit I lokalisiert werden.

Die Zusammensetzung der Rinderherz Cytochrom c Oxidase aus dreizehn Untereinheiten wurde durch die Kristallstruktur bestätigt. Es wurden zusätzlich die Zink- und Magnesiumbindungsstellen lokalisiert. Das Enzym liegt im Kristall als Dimeres vor, und zehn der dreizehn Untereinheiten haben transmembrane Domänen. Nur die beiden Untereinheiten Va und Vb, welche beide an der Matrixseite lokalisiert sind, und die Untereinheit VIb, lokalisiert an der Cytosolseite, bilden eine Ausnahme. Die Struktur des Drei-Untereinheiten-Core-Enzyms (Untereinheit I-III) mit der Cytochrom c Bindungsstelle (Untereinheit II), den Redoxzentren Cu_A , Häm a und dem Sauerstoff bindenden Häm a_3-Cu_B Zentrum (Untereinheit I), sind in den Strukturen des Rinderherzenzyms und des Enzyms aus *Paracoccus denitrificans* sehr ähnlich. Allerdings sind bei höherer Auflösung der Kristallstrukturen im Aufbau der Protonenkanäle der beiden Enzyme einige Unterschiede gefunden worden (Yoshikawa *et al.*, 1998).

In der Kristallstruktur des Rinderherzenzyms wurden zwei spezifisch gebundene Cholatmoleküle gefunden. Davon bildet eines eine Salzbrücke zwischen seiner Carboxylgruppe und Arg 14 der Untereinheit VIa. Da die Größe und Form von Cholat und ADP ähnlich sind, wird vermutet, daß die Cholat bindenden Aminosäurereste, die physiologische Funktion haben ADP bzw. ATP zu binden (Rieger *et al.*, 1995 ; Napiwotzki *et al.*, 1998).

1.2.3 Die Isoformen der kernkodierten Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase

Die Untereinheiten IV-VIII des Rinderenzym sind im Genom des Zellkerns kodiert.

Von den Untereinheiten VIa, VIIa, und VIII sind zwei gewebsspezifische Isoformen in verschiedenen Säugetieren identifiziert worden: (Capaldi, 1990; Kadenbach *et al.*, 1987). So wird im Rind eine Isoform der Untereinheit VIa im Herzen sowie Skelettmuskel (VIaH) und die andere in Leber und allen anderen Geweben exprimiert (VIaL). Die Untereinheit VIa von Rind ist an der Regulation der Stöchiometrie der Protonentranslokation beteiligt (Frank & Kadenbach, 1996). Während die H^+/e^- -Stöchiometrie bei der Rinderherz-Isoform abhängig vom ATP/ADP-Verhältnis zwischen 1 und 0,5 liegt, zeigt die Leber-Isoform immer eine H^+/e^- -Stöchiometrie von 0,5 (Hüttemann *et al.*, 1999).

Die Annahme von Kadenbach (1983), daß an die kernkodierten Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase gebundene allosterische Effektoren die Aktivität des Enzyms beeinflussen, wurde durch die Arbeit von Anthony *et al.* (1993) bestätigt. Hier wurde gezeigt, daß nach Vorinkubation mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch mit dem N-Terminus der Untereinheit VIaH (Herzisoform) reagiert, die Aktivitätssteigerung der Cytochrom c Oxidase durch ADP nicht mehr beobachtet werden konnte. Daraus wurde geschlossen, daß die Regulation durch Wechselwirkung von ADP mit dem N-terminalen (matrixorientierten) Bereich der Herzisoform von Untereinheit VIa vermittelt wird.

Die Herzisoform der Untereinheit VIIa (VIIaH) wird im Herz- und Skelettmuskel exprimiert, alle anderen Gewebe besitzen die Leberisoform VIIaL. Die Isozyme der Cytochrom c Oxidase unterscheiden sich in ihrer Aktivität, worin eine regulatorische Wirkung der kerncodierten Untereinheiten begründet sein kann (Kadenbach, 1992).

1.2.4 Regulation der Cytochrom c Oxidase

Die Wirkung von Nukleotiden auf Cytochrom c Oxidase ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Erste Hinweise auf eine Regulation der Säugetier Cytochrom c Oxidase durch ATP lieferten kinetische Studien von Ferguson-Miller *et al.* (1976):

Antonini *et al.* (1988), Konstantinov *et al.* (1989) und Reimann *et al.* (1988) zeigten spektroskopisch, daß ATP und ADP zu konformativen Änderungen des Enzyms führen. In einer Arbeit von Rohdich *et al.* (1993) konnte gezeigt werden, daß es schon bei mikromolaren intraliposomalen Nukleotidkonzentrationen zu einer Aktivierung der Atmung von rekonstituierter Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz kommt. Dabei war die Aktivierung bereits bei 100 µM Nukleotidkonzentration maximal. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß auch das ATP/ADP-Verhältnis einen Einfluß auf die Atmungsaktivität ausübt.

Zwei Bindungsstellen für TNP-ATP an Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz wurden von Reimann & Kadenbach gefunden (1992). Schließlich konnten von Rieger *et al.* (1995) sieben ATP-Bindungsstellen an Rinderherz Cytochrom c Oxidase durch Gleichgewichtsdialyse mit [³⁵S]ATPαS nachgewiesen werden. In Cytochrom c Oxidase aus Rinderleber wurden dagegen sechs hochaffine ATP-Bindungsstellen nachgewiesen. In dem Zwei-Untereinheiten Enzym aus *Paracoccus denitrificans* wurde nur eine ATP-Bindungsstelle gefunden (Rieger *et al.*, 1995). In den Kristallen von Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz wurden insgesamt zehn fest gebundene Cholatmoleküle radiochemisch nachgewiesen (Napiwotzki *et al.*, 1997), die offenbar während der Isolierung des Enzyms mit Cholat zehn ADP-Bindungsstellen besetzen, da die Raumstruktur von ADP und Cholat sehr ähnlich ist. Sieben der zehn ADP-Bindungsstellen können auch von ATP besetzt werden. Die Cholatmoleküle können langsam durch einen Überschuß von ATP oder ADP wieder aus den Bindungsstellen verdrängt werden (Napiwotzki *et al.*, 1997).

1.2.4.1 An der Regulation beteiligte Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase

Markierungsexperimente mit 8-Azido-ATP hatte man zunächst als unspezifisch interpretiert (Reimann *et al.*, 1988), da bei diesen Versuchen die meisten Untereinheiten markiert wurden. Statt dessen beschrieben Montecucco *et al.* (1986) unter den gleichen Bedingungen die Markierung der Untereinheiten IV und VII (Gemisch aus VIIa,b,c). Bisson *et al.* (1987) zeigten in Photomarkierungsexperimenten, daß ATP spezifisch an die Untereinheiten IV und VII (Gemisch aus VIIa,b,c) bindet. Es konnte gezeigt werden, daß ATP eine konformative Änderung innerhalb der Cytochrom c Oxidase induziert und so als allosterischer Effektor wirkt.

Die Untereinheit IV besitzt auf beiden Seiten der Membran eine hoch-affine Bindungsstelle für ATP oder ADP. Die ATP/ADP-Bindungsstelle auf der cytosolischen Seite beeinflusst den K_M für Cytochrom c (Napiwotzki & Kadenbach, 1998). Das ATP/ADP-Verhältnis hat einen entscheidenden Einfluß auf die Kontrolle der Atmung (vergl. Kap. 1.1.3.2). Dabei binden die Nukleotide an die Matrixdomäne von Untereinheit IV der eukaryontischen Cytochrom c Oxidase (Napiwotzki *et al.*, 1997) und ändern bei hohem ATP/ADP-Verhältnis die hyperbolische Kinetik in eine sigmoidale, mit halbmaximaler Hemmung der Aktivität bei einem ATP/ADP-Verhältnis von 28 (Arnold & Kadenbach, 1999). Diese allosterische Hemmung der Cytochrom c Oxidase Aktivität bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen wird auch in Hefe gefunden, aber nicht in Bakterien (Follmann *et al.*, 1998), denen die entsprechenden Untereinheit IV fehlt.

Die Beteiligung der Untereinheit VIa an der Regulation der H^+/e^- -Stöchiometrie durch das ATP/ADP-Verhältnis und an der Aktivitätssteigerung durch ADP wurde bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben.

Bisher konnte für die Untereinheit VIb keine regulatorische Funktion nachgewiesen werden. Die Kristallstruktur des Rinderherzenzyms weist allerdings deutlich darauf hin, daß die Untereinheit VIb neben den Untereinheiten III, Vb und VIa eine Kontaktstelle zwischen den beiden Monomeren herstellt. Daher wird vermutet, daß diese Untereinheit an der Kooperativität des Enzyms bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen beteiligt ist (Arnold & Kadenbach, 1997).

Der „zweite Mechanismus der Atmungskontrolle“ durch die Cytochrom c Oxidase wird in Gegenwart von verschiedenen Substanzen wie Laurylmaltosid oder TMPD aufgehoben. Geringe Konzentrationen von 3,5-Diod-L-Thyronin (3,5-T₂) heben die allosterische ATP-Inhibierung durch Bindung an die Untereinheit Va der Cytochrom c Oxidase auf (Arnold *et al.*, 1998).

1.3. Die Reversible Proteinphosphorylierung

Eine Säugetierzelle enthält Tausende von Proteinen (Enzymen). Die Zelle kann nur durch die komplexe Regulation der Enzyme wachsen, überleben und differenzierte Aufgaben im Gesamtorganismus erfüllen. Dazu gehören sowohl die Kontraktion von Muskelzellen, die Mobilisation von Glukose aus Glykogen in Leber- oder Muskelzellen, der Signaltransfer von Hormonen sowie die Regulation der DNA-Synthese und der Zellteilung (Krebs, 1993).

Einer der Mechanismen zur Regulation der Enzymaktivität ist die reversible Proteinphosphorylierung. Zunächst wird durch die Proteinkinase eine Phosphatgruppe des energiereichen ATP auf das zu regulierende Enzym übertragen. Durch Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten der Zielenzyme wird deren Konformation und demzufolge die biologischen Eigenschaften verändert, so daß diese aktiviert oder auch inhibiert werden (Krebs, & Beavo, 1979). Die Aktivität eines Enzyms kann dabei um den Faktor 1000 erhöht werden.

Um aber ein Enzym durch Phosphorylierung zu regulieren, muß gewährleistet sein, daß die kovalent gebundene Phosphatgruppe des Phosphoproteins wieder abgespalten werden kann. Dies wird durch ein weiteres Enzym, eine Proteinphosphatase, die der Aktivität der Proteinkinase entgegenwirkt, erreicht. Ob ein Protein im phosphorylierten oder dephosphorylierten Zustand vorliegt, hängt vom Gleichgewicht zwischen Proteinkinase und Proteinphosphatase ab (Cohen, 1989). Dieses Gleichgewicht bedarf selbst einer Kontrolle. Da sowohl Proteinkinasen als auch Proteinphosphatasen selbst durch reversible Phosphorylierung reguliert werden können, kann sich eine Kaskade von reversiblen Proteinphosphorylierungen ausbilden, die zum Beispiel die Signalwirkung eines Hormons um den Faktor eine Million oder mehr amplifizieren kann.

Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Serin-/Threoninresten wird von einer jeweils anderen Gruppe von Proteinkinasen/Proteinphosphatasen

übernommen als die von Tyrosinresten (Brautigam & Shriver, 1988). Über 99% der Phosphorylierungsreaktionen finden an Serin oder Threonin statt. Etwa ein Prozent aller in der Eukaryontenzelle vorhandenen Proteine sind Proteinkinasen und diesen stehen etwa die halbe Menge an Proteinphosphatasen gegenüber (Hunter, 1990).

Fischer und Krebs charakterisierten 1956 erstmals ein Protein, das der Regulation durch reversible Phosphorylierung unterliegt (Fischer & Krebs, 1956). Die Charakterisierung der Phosphorylase, der Phosphorylasekinase und der Proteinkinase, die dessen Phosphorylierung vermittelt, stellte einen entscheidenden Durchbruch der Entdeckung der reversiblen Proteinphosphorylierung als einen biologischen Regulationsmechanismus dar. Für ihre Arbeit auf diesem Gebiet erhielten Fischer und Krebs 1993 den Nobelpreis für Medizin (Krebs, 1993).

1.3.1 Proteinkinasen

Sequenzvergleiche der bekannten Proteinkinasen haben gezeigt, daß alle Proteinkinasen ähnliche Strukturen haben. Es wurden konservierte Motive in insgesamt zwölf Unterdomänen aller Proteinkinasen gefunden. Diese Regionen beinhalten Aminosäurereste, die essentiell für die Struktur und Funktion der Enzyme sind (Johnson *et al.*, 1996).

Die Mechanismen, welche die Aktivität der Proteinkinasen kontrollieren, können sehr unterschiedlich sein. Bekannt ist die Kontrolle durch regulatorische Untereinheiten, die durch *second messenger* wie cAMP oder Ca²⁺/Calmodulin gesteuert werden. Möglich ist auch die Kontrolle durch Untereinheiten, deren Expression durch den funktionellen Status des Zellzyklus gesteuert werden. Durch Anlagerung spezifischer Domänen regulatorischer Untereinheiten an Zellmembranen wird die katalytische Untereinheit in verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert. Desweiteren sind autoregulatorische Prozesse wie Autophosphorylierung bekannt. Das *activation segment* spielt hierbei eine wichtige Rolle (Steinberg *et al.*, 1993). Hierbei handelt es sich um eine Region konservierter Aminosäuresequenzen in der Nähe des katalytischen

Zentrums vieler Proteinkinasen, welches Aminosäuren beinhaltet, die der Autophosphorylierung unterliegen. Die Phosphorylierung einer Aminosäure im *activation segment* verändert die räumliche Anordnung des katalytischen Zentrum so, daß die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf das Substrat erleichtert wird (Johnson *et al.*, 1996).

1.3.1.1 cAMP-abhängige Proteinkinasen

Die cAMP-abhängigen Proteinkinasen (cAPK) spielen eine Schlüsselrolle in vielen Signalübertragungsprozessen. Diese Multisubstrat-Enzyme regulieren durch Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten die Aktivität von Proteinen, die an ganz verschiedenen Prozessen in der Zelle, wie z.B. Signalübertragung, Energiemetabolismus, Zellproliferation oder Differenzierung, beteiligt sind (Taylor *et al.*, 1990).

Die Aktivierung eines Hormonrezeptors führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase und somit zu einer Erhöhung der Konzentration des *second messenger* cAMP. Die Bindung von cAMP an inaktive cAPK Holoenzyme aktiviert diese, indem eine Dissoziation der katalytischen und der regulatorischen Untereinheiten induziert wird. Die freien katalytischen Untereinheiten sind nun in der Lage, Enzyme zu phosphorylieren.

In cAMP-abhängigen Proteinkinasen sind diverse Isoformen für die katalytische (C_α , C_β , C_γ) sowie für die regulatorische (RI_α , RI_β , RII_α , RII_β) Untereinheit gefunden worden (Faux & Scott, 1996a). Dies läßt eine spezifische Funktion der Isoformen erwarten. (Doskeland *et al.*, 1993).

C_α ist generell die dominante Isoform, die C_β und C_γ Untereinheit ist bisher nur in wenigen Geweben gefunden worden. (Beebe *et al.*, 1993)

Die regulatorische Untereinheit RI wird hauptsächlich im Cytoplasma gefunden, RII hingegen kann hochaffin an ein Proteinkinase A-anchoring Protein binden und wird in Assoziation mit Membranorganellen oder dem Cytoskelett gefunden (Faux & Scott, 1996b). Die RII Untereinheit besitzt ein Serin in der autoinhibitorischen Region; die Phosphorylierung dieses Restes erniedrigt die Reassoziationsrate der phosphorylierten RII Untereinheit mit der freien katalytischen Untereinheit um das fünffache (Rangel-Alado & Rosen, 1976).

Diese erniedrigte Affinität begünstigt die Aktivierung der katalytischen Untereinheit bis zur Dephosphorylierung der RII (Taylor *et al.*, 1990).

Die cAMP-abhängige Modifikation von mitochondrialen Proteinen scheint nur sehr kurzlebig zu sein (Müller & Bandlow, 1987b).

In Hefemitochondrien wurden vier verschiedene Proteinkinasen identifiziert. Davon ist eine cAMP-abhängig und im Intermembranraum lokalisiert (Müller & Bandlow, 1987a). cAMP-abhängige Proteinkinasen wurden sowohl in Rinderherzmitochondrien (Burgess & Yamada, 1987) und Mitochondrien aus Schweineovarien (Dimino *et al.*, 1981) nachgewiesen. Weiterhin wurden sie auch in verschiedenen Rattengeweben (Schwoch *et al.*, 1990) sowie in *crustacean Artemia franciscana* (Vallejo *et al.*, 1997) gefunden. Eine cAMP-abhängige Phosphorylierung von an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten mitochondrialen Proteinen wurde bereits an der 18 kDa Untereinheit der NADH-Dehydrogenase in Rinderherzmitochondrien identifiziert (Papa *et al.*, 1996).

1.3.2 Proteinphosphatasen

Alle bisher bekannten Proteinphosphatasen können in drei Klassen unterteilt werden (Barford, 1996; Faumann & Saper, 1996). Neben der Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen werden die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen in zwei Klassen unterteilt. Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen von Typ-1 (PP1) werden durch hitzebeständige Proteine, genannt Inhibitor1 und Inhibitor 2, inhibiert, während Proteinphosphatasen von Typ-2 unempfindlich gegen diese Inhibitoren sind (Ingebritsen & Cohen, 1983).

Typ-2 Phosphatasen können weiter in die Gruppen der spontan aktiven (PP2A), Ca^{2+} -abhängigen (PP2B) und Mg^{2+} -abhängigen (PP2C) Phosphatasen unterteilt werden (Cohen, 1994). Einige der Mg^{2+} -abhängigen Phosphatasen haben sich inzwischen in Gegenwart von Fettsäuren als Ca^{2+} -abhängig erwiesen (Klump *et al.*, 1998). Alle Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen werden von EDTA und Fluorid inhibiert (Brautigan & Shriner, 1989).

Mitochondriale Proteinphosphatasen, die in ihren Sequenzen mit der PP2C-Gruppe Übereinstimmungen aufweisen, sind bereits beschrieben worden (Wera & Hemmings, 1995).

Die katalytische Untereinheit der PP1 besitzt zwei Metallionen, entweder Fe^{2+} und Mn^{2+} oder Fe^{2+} und Zn^{2+} , in der aktiven Region. Für PP1 wurden 15 regulatorische Untereinheiten im Säugetier identifiziert (Egloff *et al.*, 1997). Jede regulatorische Untereinheit scheint in einer spezifischen Region der Zelle zu binden und somit die katalytische Untereinheit dort zu lokalisieren. Weiter werden durch die regulatorischen Untereinheiten sowohl die Regulation der Substratspezifität als auch die Regulation durch extrazelluläre Signale ermöglicht (Hubbard & Cohen, 1993).

Die katalytische Untereinheit der PP2 besitzt eine Domäne mit einer langen carboxyterminalen Verlängerung, die inhibierend auf das Holoenzym wirkt. Interaktion dieser carboxyterminalen Verlängerung mit einer Calcium bindenden regulatorischen Untereinheit hebt die Inhibierung auf (Cohen, 1997)

2. Zielsetzung

Verschiedene Befunde der Phosphorylierung mitochondrialer Proteine, einschließlich der Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase (Steenart & Shore, 1997), ließen die Frage nach der physiologischen Funktion unbeantwortet (Sardinelli *et al.*, 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß der Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase auf die Ascorbatatmung zu untersuchen.

Dabei sollte insbesondere die Wirkung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung auf die allosterische ATP-Inhibierung des Enzyms untersucht werden. Es sollte sowohl der Einfluß von cAMP auf intakte Mitochondrien, als auch auf das isolierte Enzym in Gegenwart von Proteinkinase untersucht werden.

Am isolierten Enzym sollten die cAMP-abhängig phosphorylierten Untereinheiten identifiziert werden.

Abschließend sollte die Reversibilität der Phosphorylierung untersucht werden.

3. Material

Geräte:

Ölpumpe	Leybold-Heraeus
Gelelektrophorese-Apparatur	Institutswerkstatt, Marburg
Zweistrahlspektrophotometer, Uvikon 940	Kontron, Offenbach
Quarzküvetten, einfach	Hellma, Mühlheim
HPLC-Aparatur	Beckman
Polarographische Meßapparatur	Institutswerkstatt, Marburg

Zentrifugen und Zubehör:

Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Heraeus-Minifuge RF	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge RC2-B	Sorvall, Stuttgart
GSA-Rotor	Sorvall, Stuttgart
SS34-Rotor	Sorvall, Stuttgart
Zentrifugenbecher JA-10	Nalge, Rochester
Zentrifugenbecher JA-20	Nalge, Rochester

Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
cAMP	Sigma, Deisenhofen
ATP, Na-Salz	Sigma, Deisenhofen
ADP, Na-Salz	Boehringer, Mannheim
EDTA, Na-Salz	Riedel-de Haen, Seelze
Glycerin (87 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe

Dodecylmaltosid	Sigma, Deisenhofen
Proteinkinase A, cAMP-abhängig	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase-1, C _α Untereinheit	Sigma, Deisenhofen
Phosphoenolpyruvat	Sigma, Deisenhofen
Pyruvatkinase	Sigma, Deisenhofen
[γ ³² P]-ATP (800 Ci/mmol)	ICN
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Serva, Heidelberg
Cholat, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Coomassie brilliant blue R250	Serva, Heidelberg
Coomassie brilliant blue G250	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Sonstiges:

Rinderherz, Rinderleber

Schlachthof, Marburg

Alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. und wurden über das Institut von den Firmen Merck, Darmstadt und Riedel-de Haen, Seelze bezogen.

4. Methoden

4.1 Isolierung der Cytochrom c Oxidase

4.1.1 Präparation von Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz nach Yoshikawa

(Yoshikawa *et al.*, 1977; 1988)

800 g frischer Rinderherzmuskel wurde mit einem Fleischwolf zerkleinert und in sechs Portionen aufgeteilt je 10 min im „Waring Blendor“ mit 750 mL Eiswasser (mit möglichst viel Eis, um die Erwärmung des Homogenats zu vermeiden) und 100 mL 0,2 M Natriumphosphat, pH 7,4 homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 4500rpm (Zentrifugenbecher JA-20; SS34 Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals 10 min mit 1500 mL 20 mM Natriumphosphat, pH 7,4 homogenisiert und erneut zentrifugiert.

Die vereinten Überstände wurden mit 30 %iger Essigsäure auf pH 5,20-5,15 eingestellt und 25 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 L bidest. Wasser aufgenommen und 20 min bei 5500 rpm zentrifugiert.

Das Pellet wurde bis zu einer Konzentration von 30 mg/ml Protein in 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4 aufgenommen. Es ergibt sich bei 800 g Fleisch in der Regel ein Volumen von etwa 575 mL.

Zu 575 mL der Mitochondrienpartikelsuspension wurden 50 mL 40 %iges Natriumcholat (in 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4) gegeben und möglichst schnell festes Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 33 % Sättigung zugegeben. Dabei wurde der pH-Wert mit einer pH-Elektrode ständig kontrolliert und durch Zugabe von Natronlauge zwischen pH 7,2 und 7,4 gehalten.

Die Suspension wurde 30 min gerührt und 25 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Zum Überstand wurden bis zu einer Sättigung von 50 % festes Ammoniumsulfat zugegeben. Die Suspension wurde 25 min bei 11000 rpm zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 2 % Natriumcholat; 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4 aufgenommen (Gesamtvolumen: 200 mL) und bis zu einer Sättigung von 25 % festes Ammoniumsulfat zugegeben. Die Suspension wurde 30 min gerührt und 10 min bei 19000 rpm zentrifugiert.

Zum Überstand wurden bis zu einer Sättigung von 35 % festes Ammoniumsulfat zugegeben. Die Suspension wurde 10 min bei 19000 rpm zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 0,5 % Natriumcholat, 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4 aufgenommen (Gesamtvolumen: 200 mL) und bis zu einer Sättigung von 25 % festes Ammoniumsulfat zugegeben.

Die Suspension wurde 30 min gerührt und 10 min bei 19000 rpm zentrifugiert. Zum Überstand wurden bis zu einer Konzentration von 35 % festes Ammoniumsulfat zugegeben. Die Suspension wurde 10 min bei 19000 rpm zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 0,5 % Natriumcholat, 0,1 M Natriumphosphat aufgenommen (Gesamtvolumen: 135 mL) und anschließend erneut eine 25 %ige und 35 %ige Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Das Pellet der zweiten Fällung wurde in 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4, 0,34 % Brij 35 aufgenommen (Gesamtvolumen: 200 mL) und anschließend erneut eine 25 %ige und 35 %ige Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Das Pellet der vierten Fällung wurde in 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4, 0,21 % Brij 35 aufgenommen (Gesamtvolumen: 200 mL) und anschließend nochmals eine 25 %ige und 35 %ige Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Das Pellet der sechsten Fällung wurde in 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,4, 0,21 % Brij 35 aufgenommen (Gesamtvolumen: 135 mL) und anschließend eine 25 %ige und 35 %ige Ammoniumsulfatfällung erneut durchgeführt. Das Pellet der achten Fällung wurde in einem minimalen Volumen von 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4 (ohne Detergenz) aufgenommen und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Lösung wurde ein letztes Mal 20 min bei 19000 rpm zentrifugiert. Das so gereinigte Enzym wurde aliquotiert und bei -80° C gelagert.

4.1.2. Bestimmung der Cytochrom c Oxidase-Konzentration

Die Konzentration der COX wurde photometrisch am Zweistrahlenspektrophotometer bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung von verunreinigten Lösungen wurde ein Differenzspektrum von 500 bis 650 nm zwischen luftoxidierten und dithionitreduzierten Proben aufgenommen. Ein Aliquot der Probe wurde mit 200 mM Kaliumphosphat, pH 7,2; 5 % Triton X-100 verdünnt. Die verdünnte Probe wurde vor der Messung in der Tischzentrifuge 5 s bei 14000 rpm zentrifugiert, um Schwebeteilchen zu entfernen. Die Extinktion bei 605 nm und 630 nm wurde aus dem Spektrum entnommen und die Konzentration nach der Formel(1) bestimmt.

$$\text{Formel(1): } [c] = \frac{E_{605} - E_{630}}{\epsilon_{605-630}} \cdot M_r \cdot V$$

[c] = COX-Konzentration (Gramm Häm aa₃)

M_r = Molekulargewicht der COX

V = Verdünnung der Probe

ε₆₀₅₋₆₃₀ = Extinktionskoeffizient

Der verwendete Extinktionskoeffizient für das Differenzspektrum (Redox) von Cytochrom aa₃ beträgt:

$$\epsilon_{605-630} = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (von Jagow und Klingenberg, 1972).}$$

Die Reinheit des gereinigten Enzyms wurde durch ein Absolutspektrum in Cholatpuffer (2 % Natriumcholat, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 200 mM Kaliumphosphat, pH 7,2) ermittelt. Die Probe wurde luftoxidiert gegen Puffer vermessen. Die Extinktionswerte bei 280 nm (Gesamtprotein) und 420 nm (COX) wurden aus dem Spektrum entnommen und das Verhältnis E₂₈₀/E₄₂₀ bestimmt. Es sollte nicht höher als 2,6-2,8 sein.

Anschließend wurde die Probe dithionitreduziert gegen Puffer vermessen. Die Extinktionswerte bei 443, 490, 605 und 650 nm wurden aus dem Spektrum entnommen und die Konzentration analog nach der Formel (1) bestimmt.

Es wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten für das Absolutspektrum des reduzierten Enzyms verwendet:

$$\epsilon_{605-630} = 40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1},$$

$$\epsilon_{443-490} = 204 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

4.1.3 Proteinbestimmung mit Biuret

Die Proteinkonzentrationen wurden bei der COX-Präparation gemäß einer modifizierten Biuret-Methode bestimmt (Kadenbach, 1966).

Das Biuret-Reagenz wurde lichtgeschützt aufbewahrt.

Biuret-Reagenz :	1,5 g	Kupfersulfat
	4,5 g	Kaliumnatriumtartrat
	4,0 g	Natriumhydroxid
	2,5 g	Kaliumiodid
	Mit bidest. Wasser auf 500 mL auffüllen	

100 μL Mitochondriensuspension wurden mit 200 μL 3 M Trichloressigsäure und 1900 μL Wasser vermischt. Das Gemisch wurde 30 min stehengelassen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; zum Pellet wurden 2 mL Biuret-Reagenz gegeben, 15 min stehengelassen und mit 2 mL bidest. Wasser verdünnt. Die Mischung wurde bei 546 nm gegen Luft vermessen (Schichtdicke der Küvette: 2 cm, Eppendorf-Photometer). Anschließend wurden ca. 50 mg festes Kaliumcyanid zugegeben und nach 5 min nochmals bei 546 nm gegen Luft gemessen, um nach Zersetzung des Farbkomplexes die unspezifische Trübung zu bestimmen. Der Proteingehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[(E_{\text{ohne KCN}} - E_{\text{mit KCN}}) - 0,075] \cdot 7 = \text{mg Protein/Probe}$$

4.1.4 Nachweis der kernkodierte Untereinheiten der COX mit HPLC

Der chromatographische Nachweis der zehn kernkodierte Untereinheiten der Rinderherz COX wurde nach einer modifizierten Methode von Liu *et al.* (1995) durchgeführt.

Es wurden für die Probenvorbereitung und die Laufmittel hochreine Chemikalien verwendet.

Das isolierte Enzym (1 mg) wurde in 1000 μ L 10 mM Tris-Cl, pH 7,4, 0,5 % Tween 20, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen und mit 250 μ L Acetonitril versetzt. Die Lösung wurde über einen 4 μ m Membranfilter (Cellulose Acetat) gegeben und 100 μ L analysiert.

Es wurde ein HPLC-Apparatur von Beckman verwendet, als stationäre Phase wurde eine *C18-reverse phase column* von Vydac (Korngröße 5 μ m, Porengröße 300 Å) eingesetzt.

Das Laufmittelsystem bestand aus:

A: 0,05 % TFA, 0,05 % Triethylamin, in Wasser.

B: 0,05 % TFA, 0,05 % Triethylamin, in Acetonitril

Die Lösungen wurden vor der Benutzung entgast.

Die Auftrennung des Enzyms erfolgte mit einer Serie von linearen Gradienten.

Gradientensystem:

0-5 min: Gradient 0-40 % B

5-15 min: Gradient 40-45 % B

15-35 min: Gradient 45-55 % B

35-50 min: Gradient 55-0 % B

Die Durchflußrate betrug 1 mL/min bei einer Detektionswellenlänge von 220 nm.

4.2 Isolierung von Rinderlebermitochondrien

30 g Rinderleber wurden in 270 mL 250 M Sucrose, 20 M Tris-Cl, pH7,6, 2 mM EDTA mit einer Schere klein geschnitten, zügig in 30 mL Portionen bei 300 rpm homogenisiert und die Zelltrümmer bei 2500 rpm in einem SS-34 Rotor abgetrennt. Der Überstand wurde abdekantiert und bei 8000 rpm erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in Isolationsmedium aufgenommen, homogenisiert und bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde in möglichst wenig Isolationsmedium aufgenommen und vorsichtig homogenisiert. Die Mitochondrien wurden auf Eis gelagert und innerhalb von 4 h verbraucht.

4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

4.3.1 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Um die COX in ihre Untereinheiten zu dissoziieren, wurde sie mit 0,3 M Trichloressigsäure gefällt und in Probenpuffer für mindestens 90 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Probenpuffer:	62,5	mM	Tris-Cl, pH 6,8
	20	%	Glycerin
	2 bis 8	%	SDS
	0.01	%	Bromphenolblau
	5	%	Mercaptoethanol

4.3.2 SDS-PAGE nach Kadenbach

Das von Kadenbach *et al.* (1983) entwickelte System bedient sich eines hohen Harnstoffanteils, sowie eines besonders langen Trenngels, wodurch das Gel über Nacht laufen kann. Das führt zur besseren Trennung der Untereinheiten und zur Erhöhung der Trennschärfe.

Lösungen :

Sammelgel-Puffer:	0,125 M	Tris-Cl, pH 6,8
	0,125 %	SDS

Trenngel-Puffer:	0,75 %	Tris-Cl, pH 8,46
	7,2 M	Harnstoff
	0,2 %	SDS

Acrylamid-Lösung:	50 %	Acrylamid
	1,56 %	N,N'-Methylenbisacrylamid

Elektrodenpuffer:	25	mM	Tris-Cl, pH 8,45
	192	mM	Glycin
	0,1	%	SDS

Ammoniumperoxodisulfat-Lsg. (APS):

10	%	Ammoniumperoxodisulfat in bidest. Wasser
----	---	---

Gele:

Trenngel:	2,9	g	Harnstoff
	11,3	g	Trenngel-Puffer
	7,8	g	Acrylamid-Lösung
	10	µL	TEMED
	50	µL	APS.
Sammelgel:	4	ml	Sammelgel-Puffer
	1	mL	Acrylamid-Lösung
	5	µL	TEMED
	25	µL	APS

Die Bestandteile der Gele wurden unmittelbar vor dem Gießen zusammengegeben, gut vermischt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und Ammoniumperoxodisulfat gestartet. Das noch flüssige Trenngel wurde in der Gelkammer direkt mit dem Sammelgel überschichtet und der Kamm eingesteckt. Nach 2 Stunden wurde der Abstandhalter am Boden der Kammer entfernt und die Kammer in die Apparatur eingespannt. Der Elektrodenpuffer wurde in die Apparatur gefüllt, der Kamm entfernt und die Probenaschen gründlich mit Elektrodenpuffer gespült.

Die Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese 1 h bei 100 Volt gestartet. Die Trennung erfolgte über Nacht bei 235 Volt.

4.3.3 SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow (1987)

Dieses Gelsystem enthält keinen Harnstoff und statt Glycin wurde Tricin verwendet. Bei diesem System wurde zwischen Trenngel und Sammelgel ein „Spacergel“ polymerisiert.

Lösungen:

Acrylamid-Lösung A:	48	%	Acrylamid
	1,5	%	N,N'-Methylenbisacrylamid
Acrylamid-Lösung B:	46,5	%	Acrylamid
	3	%	N,N'-Methylenbisacrylamid
Ammoniumperoxodisulfat-Lsg. (APS):			
	10	%	Ammoniumperoxodisulfat in bidest. Wasser
Gelpuffer:	3	M	Tris-Cl, pH 8,45
	0,3	%	SDS
Anodenpuffer	0,2	M	Tris-Cl, pH 8,9
Kathodenpuffer:	0,1	M	Tris
	0,1	M	Tricin
	0,1	%	SDS

Gele:

Trenngel:	6	ml	Acrylamid-Lösung B
	6	mL	Gelpuffer
	2,4	g	Glycerin (87%)
	60	µl	APS
	6	µL	TEMED
	3,6	mL	bidest. Wasser
Spacergel:	0,61	mL	Acrylamid-Lösung A
	1	mL	Gelpuffer
	1,39	mL	bidest. Wasser
	10	µL	APS
	1	µL	TEMED
Sammelgel:	0,4	mL	Acrylamid-Lösung A
	1,34	mL	Gelpuffer
	2,78	mL	bidest. Wasser
	40	µL	APS.
	4	µL	TEMED

Das Gel wurde mit folgenden Abweichungen, wie unter 4.3.2 beschrieben, gegossen. Trenngel und Spacergel wurden direkt übereinander geschichtet und polymerisiert. Das Spacergel wurde in dieser Zeit mit Butanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Auspolymerisieren wurde es mit Sammelgel überschichtet. Das Einlaufen der Proben erfolgte 1 h bei 40 Volt und die Trennung über Nacht bei 200 Volt.

4.3.4 2D-Blue Native-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Schägger & von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994)

Die Methode der nativen Elektrophorese wurde von Schägger & von Jagow zur Isolierung von Membranproteinkomplexen aus biologischen Membranen entwickelt. In Kombination mit einer SDS-PAGE erhält man eine analytische Methode zum Nachweis u.a. der Verhältnisse der Membranproteinkomplexe und der Untereinheiten untereinander.

Probenvorbereitung:

nativer Probenpuffer:

750 mM	6-Aminocaprinsäure
50 mM	Bis-Tris-Cl, pH 7,0

Isolierte, sedimentierte Rinderlebermitochondrien (400 µg Gesamtprotein) wurden in 40 µL nativen Probenpuffer und 4-8 µL 10%igem Laurylmaltosid gelöst und 45 min bei 15000 rpm zentrifugiert um mitochondriale DNA und ungelöste Proteine abzutrennen. Kurz vor Auftragung auf ein natives Gel wurden 2-4 µL einer 5 %igen Serva Blue G 250 Lösung zur Probe zugegeben.

Erste Dimension: Blue Native Elektrophorese:

In der ersten Dimension werden die Komplexe der Atmungskette als Monomere über ein Acrylamidgradientengel getrennt.

Kathodenpuffer A:

50 mM	Tricin
15 mM	Bis-Tris-Cl, pH 7.0
0,02 %	Serva Blue G

Kathodenpuffer B:

50 mM	Tricin
15 mM	Bis-Tris-Cl, pH 7.0
0,002 %	Serva Blue G

Anodenpuffer:

50 mM	Bis-Tris-Cl, pH 7,0
-------	---------------------

Gelpuffer(3x):

1,5 M	6-Aminocapronsäure
150 mM	Bis-Tris-Cl, pH 7.0

Acrylamidlösung:

48 %	Acrylamid
1,5 %	N,N'-Methylenbisacrylamid

Zusammensetzung der Gellösungen:

Sammelgel:	0,6 mL	Acrylamidlösung
	0,6 mL	Acrylamidlg.
	2,5 mL	Gelpuffer
	60 µL	APS (10 %)
	6 µL	TEMED
	4,3 mL	Wasser (bidest.)

5 %-Trenngel:	2,5 mL	Acrylamidsg.
	7 mL	Gelpuffer
	90 µL	APS (10 %)
	9 µL	TEMED
	11,4 mL	Wasser (bidest.)
13 %-Trenngel	4,7 mL	Acrylamidsg.
	6 mL	Gelpuffer
	3 g	Glycerin
	60 µL	APS (10 %)
	6 µL	TEMED
	3,6 mL	Wasser (bidest.)

Die beiden Trenngelgemische wurden in einem Gradientenmischer gegeben mit den angegebenen Mengen APS und TEMED versetzt und der Gradient mit abnehmender Acrylamidkonzentration bei 4° C in eine Gelkammer gegossen. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Sammelgel bei Raumtemperatur über das Trenngel gegossen und auspolymerisiert. Das Gel wurde bis zum Einsatz bei 4° C gelagert.

Es wurden 200-400µg Protein pro Spur auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100V gestartet und nach 30 bis 60 min bei konstant 15 mA sowie höchstens 500 V 3-4 h elektrophoretisiert. Nach etwa einer Stunde bei 15 mA Stromstärke wurde Kathodenpuffer A gegen Kathodenpuffer B ausgetauscht.

Zweite denaturierende Dimension:

Die anschließende denaturierende Analyse der Komplexe der Atmungskette wurde mit einem dem SDS-PAGE in Abschnitt 4.3.2. verwandten Gelsystem durchgeführt. Die hier verwendeten Lösungen sind im Abschnitt 4.3.2 aufgeführt.

Zusammensetzung der Gellösungen:

Gel 2:	3 mL	Acrylamidsg. A
	1,5 g	Glycerin
	150 µL	20 % SDS (w/v)
	5 mL	Gelpuffer3x, nativ
	75 µL	APS(10 %)
	7,5 µL	TEMED
	7 mL	Wasser (bidest.)
Trenngel 1:	6,1 mL	Acrylamidsg. A
	10 mL	Gelpuffer
	4 g	Glycerin
	150 µL	APS (10 %)
	15 µL	TEMED
	11 mL	Wasser (bidest.)
Trenngel 2:	10 mL	Acrylamidsg. B
	10 mL	Gelpuffer
	10,8 g	Harnstoff
	150 µL	APS (10 %)
	15 µL	TEMED
	1 mL	Wasser (bidest.)

Die gewünschten Gelspuren des nativen Gels wurden ausgeschnitten und 2 h in 1 % Mercaptoethanol, 5 % SDS eingeweicht.

Die vorbehandelten Gelstreifen wurden auf eine Glasplatte an die Stelle des Sammelgels gelegt, die Gelkammer zusammengebaut und das denaturierende 16 % Acrylamid enthaltende Trenngel 1 bis 2 cm unter den Gelstreifen gegossen. Anschließend wurde 1,5 cm hoch ein 10%iges Acrylamid Trenngel (Trenngel 2) überschichtet. Der Gelstreifen wurde mit Gel 2 umgeben.

4.3.5 Coomassie-Blue Färbung

Die Anfärbung wurde, wie von Hunkapillar *et al.* (1983) beschrieben, durchgeführt. Es wurden folgende Lösungen benötigt:

Färbelösung:	10	%	Eisessig
	30	%	iso-Propanol
	0,5	%	Coomassie brillant Blue R 250
Entfärber	5	%	Ethanol
	7,5	%	Essigsäure (98%)

Die Gele wurden unmittelbar nach Beenden des Trennlaufs in die Färbelösung gelegt. Nach 60 bis 90 min wurden die Gele mit bidest. Wasser gründlich abgespült und in Entfärber gelegt. Nach mehrmaligen Auswechseln des Entfärbers sind die Proteinbanden gut zu erkennen.

4.3.6 Autoradiographie

Die Gele wurden auf eine doppelte Lage Whatman Papier gelegt und je nach Größe 2-5 h bei 56-75 °C in einer Vakuum-Apparatur getrocknet. Auf die getrockneten Gele wurde Röntgenfilm gelegt und dieser 2-5 Tage bei -80° C belichtet. Anschließend wurden die Filme entwickelt.

4.4 Rekonstitution der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz in Proteoliposomen

Beschallpuffer: 10 mM K-Hepes, pH 7,4
 40 mM KCl
 1,5 % Na-Cholat (w/v)

Dialysepuffer: 10 mM K-Hepes, pH7,4
 40 mM KCl

Herstellung von Proteoliposomen

Die Rekonstitution der COX aus Rinderherz in Proteoliposomen erfolgte nach der hydrophoben Adsorptionsmethode. Zunächst wurden 0,6 mg Cardiolipin (0,5 % der Lipidgesamtkonzentration) im Stickstoffstrom von Lösungsmittel befreit. Dazu wurden 120 mg Asolektin gegeben und das Lipidgemisch in 3 mL Beschallpuffer durch dreimaliges Beschallen bei 20 %iger Leistung (Branson Sonifier) für jeweils 2 min suspendiert.

Nach Zugabe der COX in einer Konzentration von 3 μ M und 5 mM Nukleotid wurde das Gemisch über 50 mg/mL XAD-2 bei 4° C 24 h geschüttelt, um das Cholat zu entfernen (Shechter & Bloch, 1971). Anschließend wurde 4 h und 20 h jeweils gegen das 200-fache Volumen Dialysepuffer dialysiert.

Reinigung von Asolektin

Zur Entfernung von Oxidationsprodukten wurde das Asolektin (L-Phosphatidylcholin, Typ II, Sigma) nach der Vorschrift von Kagawa und Racker (1971) gereinigt. Dazu wurden 5 g Asolektin in 100 mL Aceton (reinst.) bei 4° C 48h gerührt und anschließend über eine Glasfritte filtriert. Der unlösliche Rückstand wurde mit Aceton gewaschen, in 20 mL Diethlyether aufgenommen, nicht gelöster Feststoff abgetrennt und das klare Filtrat am Rotorvapor bis zur Trockene von Lösungsmittel befreit. Das gereinigte Asolektin wurde bei -20° C in Argonatmosphäre gelagert.

Reinigung von XAD-2 (Müller *et al.*, 1986)

5 g XAD-2 (Amberlite® XAD-2, Serva, Heidelberg) wurden 15 min in 10 mM NaCl, 100 mM Na₂CO₃ langsam gerührt. Anschließend wurde das Harz abfiltriert, mit 500 mL bidest. Wasser gewaschen und das Harz nochmals 10 min in Methanol gerührt. Um das Methanol vollständig zu entfernen, wurde mit einer Fritte abfiltriert und mit 1,5 L Wasser (bidest.) gewaschen. Das so gereinigte Adsorberharz wurde unter Wasser bei 4° C gelagert.

4.5 Vorbehandlung zur Untersuchung des Effekts von cAMP und Proteinkinase A auf die Cytochrom c Oxidase

4.5.1 Vorbehandlung isolierter Cytochrom c Oxidase

Cytochrom c Oxidase (COX) aus Rinderherz wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung aus mitochondrialen Partikeln in Anwesenheit von Natriumcholat als Detergenz isoliert. Um während der Isolierung gebundenes Cholat aus den Nukleotidbindungsstellen mit ATP zu verdrängen, wurde das Enzym immer zunächst 24 h in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 % Tween 20, 5 mM ATP inkubiert.

Um den Einfluß von Cardiolipin zu prüfen, wurden zusätzlich 0 bis 200 µM Cardiolipin dem Puffer zugegeben.

Für die Untersuchung des Effekts der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der COX aus Rinderherz auf die Aktivität des Enzyms wurde die gelöste COX (5 µM Endkonzentration) mit 5 mM ATP und 200 µM Cardiolipin wie oben beschrieben 24 h vorinkubiert. Zur Phosphorylierung wurde das Enzym anschließend mit 200 U/ml Proteinkinase A (PKA) und 5 µM bis 1 mM cAMP unter Zusatz des ATP-regenerierenden Systems (10 mM Phosphoenolpyruvat (PEP), 2 U/mL Pyruvatkinase (PK), 5 mM MgSO₄) 20 min bei 30° C inkubiert.

Zur Dephosphorylierung der cAMP-abhängig phosphorylierten COX wurde wie vorhergehend beschrieben gelöste COX (5 µM) in Gegenwart von 50 µM cAMP inkubiert. Anschließend wurde die Probe (COX Endkonzentration: 2,5 µM) unter Zusatz von 500 U/mL katalytischer Untereinheit C_α der Proteinphosphatase-1 (*rabbit, recombinant expressed in E. coli*) und 100 µM Mangandichlorid 10-40 min bei 30° C inkubiert.

Zur Untersuchung des Effekts von Ca²⁺ auf phosphorylierte COX wurde nach der Phosphorylierung mit Proteinkinase A und cAMP die Probe (COX Endkonzentration: 5 µM) 20 min bei 30° C mit 100 µM Calciumchlorid inkubiert.

4.5.2 Vorbehandlung rekonstituierter Cytochrom c Oxidase

Zur Untersuchung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der COX wurde in Gegenwart von ATP rekonstituierte COX (3 μM) extraliposomal mit 5 mM ATP, 10 mM Phosphoenolpyruvat (PEP), 2 U/mL Pyruvatkinase (PK), 5 mM MgSO_4 , 200 U/ml Proteinkinase A (PKA) und 50 μM cAMP 20 min bei 30° C inkubiert. Zum Vergleich wurde das Enzym (3 μM) vor der Rekonstitution 20 min bei 30° C in Rekonstitutionspuffer mit 40 mg/mL Asolektin und 0,5 % Cardiolipin in Gegenwart von 5 mM ATP, ATP regenerierendem System (10 mM PEP, 2 U/mL PK, 5 mM MgSO_4), 200 U/mL Proteinkinase A oder 50 μM cAMP inkubiert. Anschließend wurden die Proben über XAD-2 rekonstituiert.

4.5.3 cAMP-abhängige Markierung von Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz mit Proteinkinase A und [γ - ^{32}P]-ATP

Gelöste COX aus Rinderherz

Zum Nachweis der durch cAMP-abhängige Phosphorylierung markierten Untereinheiten solubilisierter COX wurde das Enzym (150 μM) in 50 μL Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 % Tween 20) 20 min bei 30°C mit [γ - ^{32}P]-ATP (1 μCi , 800 Ci/mmol) und weiterem Zusatz von 5 mM MgSO_4 , 200 U/mL Proteinkinase A und 5 μM bis 50 μM cAMP inkubiert. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel gefärbt und autoradiographiert.

Extraliposomale Markierung der COX

Das Enzym (3 μM) wurde ohne Nukleotide rekonstituiert und anschließend mit 200 U/mL Proteinkinase A, [γ - ^{32}P]-ATP (1 μCi , 800 Ci/mmol) und 0 bis 60 μM cAMP 20 min bei 30° C inkubiert. Die Proben wurden mit Natriumcholat versetzt und sofort mit dem gleichen Volumen kaltgesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt. Nach 1 h wurde das Enzym durch Zentrifugation abgetrennt, zweimal mit Kaliumphosphat, pH 4,5 gewaschen und in Probenpuffer gelöst. Das denaturierte Protein wurde mit einem SDS-PAGE nach Kadenbach analysiert. Das Gel wurde mit Coomassie Blue angefärbt und autoradiographiert.

4.6 Vorbehandlung der intakten Mitochondrien zur Untersuchung des Effekts von cAMP auf die COX-Aktivität

Für die Untersuchung der COX-Aktivität solubilisierter Mitochondrien wurden die frisch isolierten Mitochondrien (0,5 mM Häm aa₃) unter ständigem Schütteln im offenen 10 mL Erlenmeyerkolben in Isolationsmedium mit den unten näher angegebenen Zusätzen von Nukleotiden und Salzen inkubiert. Anschließend wurden die Mitochondriensuspensionen bei -70° C schockgefroren und bei -20° C gelagert. Der Zeitraum zwischen Abschluß der Isolierung und Einfrieren der Mitochondrien war immer kleiner als 4 h.

Das Isolationsmedium hatte einen pH-Wert von 7,4 - 7,6. Die Inkubationstemperatur betrug in der Regel 4° C, es wurden aber anfänglich auch Versuche bei 25° C durchgeführt. Die Dauer der Inkubation betrug zwischen 1 min und 60 min.

ATP wurde während der Inkubation immer 5 mM und mit dem ATP-regenerierenden System, 10 mM Phosphoenolpyruvat, 20 U/mL Pyruvatkinase, 5 mM MgSO₄ eingesetzt. Kaliumfluorid wurde während der Inkubation in der Konzentration von 20 mM zugesetzt, cAMP wurde in den Konzentrationen von 5 µM bis 1 mM zugegeben.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ca²⁺ auf die COX-Aktivität der mit cAMP vorinkubierten Mitochondrien wurde die Mitochondriensuspension nach Vorinkubation mit cAMP nochmals mit 100 µM CaCl₂ 20 min bei 4° C inkubiert.

4.6.1 cAMP-abhängige Markierung von Cytochrom c Oxidase in Rinderleber Mitochondrien mit [γ -³²P]-ATP

Zum Nachweis der durch cAMP-abhängige Phosphorylierung modifizierten Untereinheiten der COX wurden die Mitochondrien (500 µM) in Isolationspuffer 10 min bei 4° C mit [γ -³²P]-ATP (40 µCi, 4000 Ci/mmol) und weiterem Zusatz von 20 mM KF, 5 mM MgSO₄ 5 µM bis 50 µM cAMP inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit der 2D-Blue Native SDS-PAGE (Schägger *et al.*, 1994) analysiert, das Gel gefärbt und autoradiographiert.

4.6.2 Solubilisierung der Mitochondrien

Die vorinkubierten und anschließend schockgefrorenen Mitochondrien wurden bei 0°C vorsichtig aufgetaut und in Solubilisierungspuffer (50mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 5 mM MgSO₄, 1 % Tween 20 (w/v)) zu der Konzentration von 50 nM Häm aa₃ verdünnt und im Eisbad 5-15 min in Gegenwart von 5 mM ATP, 10 mM Phosphoenolpyruvat, 20 U/mL Pyruvatkinase oder 5 mM ADP inkubiert.

4.7. Polarographischer Enzymtest

Die Enzymaktivität der gelösten oder rekonstituierten COX sowie der solubilisierten Mitochondrien wurde polarographisch ermittelt. Diese Methode ermöglicht es die Aktivität der COX im Fließgleichgewicht (*steady state*), d.h. bei konstanter Ferrocytochrom c Konzentration zu detektieren (Kielly, 1963; Ferguson-Miller *et al.*, 1976, 1978).

Als Meßgröße diente dabei der Verbrauch des Sauerstoffs im Meßmedium. In einer weitestgehend gegen Luft abgeschlossenen thermostatisierten Meßzelle wird mit einer Clark-Sauerstoffelektrode potentiometrisch die Sauerstoffkonzentration im Meßmedium ermittelt. Durch Anlegen einer Spannung von 780 mV an die Elektrode wurde eine Reduktion des molekularen Sauerstoffs erzwungen. Die Rate der reduzierten Sauerstoffmoleküle ist von der Sauerstoffkonzentration in der Meßzelle abhängig und kann über den fließenden Diffusionsgrenzstrom amperometrisch gemessen werden.

Zur Eichung der Elektrode wurde die Meßzelle mit bidestillierten, luftgesättigten auf 25° C thermostiertem Wasser gefüllt. Die Berechnung des Sauerstoffgehaltes in Wasser erfolgte nach Gmelin (1958); die des Meßpuffers wurde durch Korrelation der Stromstärken in Wasser und Meßpuffer ermittelt.

Für den Enzymtest wurde die Änderung der Stromstärke in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Die Wechselzahl (turnover number, TN) wurde berechnet als:

$$\text{TN} = \text{verbrauchter Sauerstoff } (^{1/4} \text{O}_2) [\mu\text{M}] / (\text{Konzentration COX } [\mu\text{M}] \cdot \text{Zeit } [\text{s}^{-1}])$$

Die Menge des verbrauchten Sauerstoff ($^{1/4} \text{O}_2$), entspricht den vom Enzym umgesetzten Elektronen bzw. dem umgesetzten Cytochrom c.

Die Aktivität der COX wurde als TN in der Maßeinheit [mol Cytochrom c • mol Häm aa₃⁻¹ • s⁻¹] angegeben. Nach Berechnung der Wechselzahl wurden die Daten graphisch gegen die Cytochrom c Konzentration aufgetragen.

4.7.1 Bestimmung der COX-Aktivität in solubilisierten Mitochondrien

Die COX-Aktivität der zuvor in Gegenwart von 5 mM ADP oder 5 mM ATP und ATP-regenerierendem System solubilisierten Mitochondrien wurde polarographisch bei einer Häm aa₃ Konzentration von 50 nM bei 25° C in Gegenwart von 18,5 mM Ascorbat und steigenden Cytochrom c Konzentrationen (0,22-25 µM) in Solubilisierungspuffer gemessen.

4.7.2 Bestimmung der Aktivität der rekonstituierten Cytochrom c Oxidase

Für die Messung der Aktivität der rekonstituierten COX wurde die auf 25° C thermostatierte Meßzelle mit dem Meßpuffer (10 mM K-Hepes, pH 7,4, 40 mM KCl) gefüllt und Proteoliposomen in einer Endkonzentration von 20 nM COX zugegeben. Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart von 18,5 mM Ascorbat mit steigender Cytochrom c Konzentration (0.2-25 µM) gemessen.

4.7.3 Bestimmung der Aktivität der gelösten Cytochrom c Oxidase

Für die Messung der Aktivität der solubilisierten COX wurde die auf 25° C thermostatierte Meßzelle mit dem Meßpuffer (50 mM KPi, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 % Tween 20) gefüllt und das Enzym in einer Endkonzentration von 40 nM COX zugegeben. Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart von 18,5 mM Ascorbat mit steigender Cytochrom c Konzentration (0-25 µM) gemessen.

4.7.4 Messung der Atmungskontrolle

Verwendet wurden die unter 3.7.1 verwendeten Meßbedingungen. Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart von 60 µM Cytochrom c vor und nach Zugabe des K⁺-Ionophors Valinomycin und des Protonophors Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) bestimmt. Der RCR (respiratory control ratio) ist definiert als Quotient aus der Valomycin/CCCP-entkoppelten Atmung und der gekoppelten Atmung .

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der isolierten Rinderherz Cytochrom c Oxidase

Nach Isolierung der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz wurde zur Überprüfung der Reinheit des Enzyms neben der üblichen spektroskopischen Bestimmung des Reinheitsquotienten eine Analyse der Untereinheiten mit einer SDS-PAGE nach Kadenbach *et al.* (1983) durchgeführt. Dabei wurde das Enzym in seine 13 Untereinheiten aufgetrennt (Bender, 1996). Die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie Blue weist Proteinmengen von mindestens 0,2 µg nach. Die Reinheit der Cytochrom c Oxidase wurde zusätzlich mittels HPLC mit einer Methode nach Liu *et al.* (1995) chromatographisch nachgewiesen. Mit einer C18 *reverse phase* Säule und einem Wasser/Acetonitril Laufmittelsystem war es möglich, das Enzym in seine zehn kerncodierten Untereinheiten aufzutrennen (Abb. 1). Die drei größten, mitochondrial kodierten Untereinheiten wurden vor der Chromatographie durch Fällung in 30 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure abgetrennt, da diese während der Analyse zu Aggregation auf der Säule neigen. Im Chromatogramm ist deutlich zu erkennen, daß neben den Untereinheiten IV bis VIII keine weiteren Verunreinigungen mit diesem System zu detektieren sind. Die Peaks wurden nach Liu *et al.* (1995) den Untereinheiten zugeordnet.

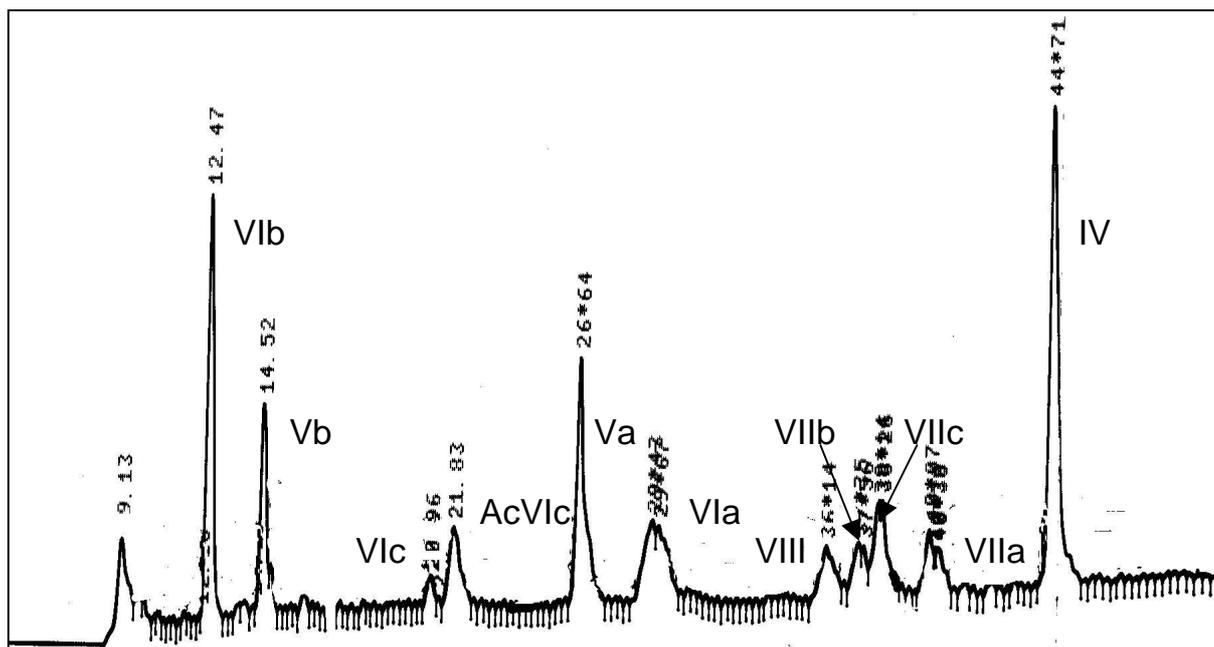


Abb.1: Auftrennung der zehn kerncodierten Cytochrom c Oxidase Untereinheiten mit C18 *reverse phase* HPLC. Das Enzym (0,1 mg) wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit 0,1 % Trifluoressigsäure und 30 % Acetonitril versetzt und über einem 4 μ m Filter von den präzipitierten Untereinheiten I-III abgetrennt. Das verwendete HPLC-System ist im Methodenteil beschrieben.

5.2 Einfluß der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit cAMP auf die Aktivität der Cytochrom c Oxidase

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie die Zugabe von cAMP zu intakten Rinderlebermitochondrien auf die Aktivität der Cytochrom c Oxidase (COX) in anschließend solubilisierten Mitochondrien wirkt. Der *second messenger* cAMP aktiviert in den intakten Mitochondrien die cAMP-abhängigen endogenen Proteinkinasen. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß die cAMP-abhängige Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase in den Mitochondrien auf die Kinetik des Enzyms hat. Dabei sollte die Aktivität der Cytochrom c Oxidase in Gegenwart von ADP als auch auf die allosterische Hemmung des Enzyms bei hohem ATP/ADP-Verhältnis untersucht werden.

Zunächst wurde geprüft, ob die Aktivität der Cytochrom c Oxidase (COX-Aktivität) von solubilisierten Mitochondrien durch eine Inkubation der intakten Mitochondrien mit Nukleotiden bei 25°C beeinflusst wird. Die jeweiligen Vorinkubationen wurden 20 min bei 25°C unter Schütteln der Proben vorgenommen. Variiert wurde der Zusatz von Nukleotiden.

In Abb 2 ist die COX-Aktivität von unterschiedlich behandelten Mitochondrien gegen die Cytochrom c Konzentration aufgetragen. Nicht vorbehandelte, solubilierte Mitochondrien in Gegenwart von ADP (Dreiecke) oder ATP (Rhomben), zeigen einen hyperbolischen Kurvenverlauf der Kinetik. Dies stimmt mit vorherigen Ergebnissen überein, die ebenfalls Kinetiken nach Michaelis-Menten ergaben. Allerdings zeigen die solubilisierten Mitochondrien in Gegenwart von ATP und dem ATP-regenerierenden System aus PEP, PK und Mg^{2+} ebenfalls eine hyperbolische Kinetik (Kreise). Die vormals von Arnold *et al.* (1997) beobachtete allosterische ATP-Inhibierung konnte an der hier verwendeten Mitochondrienpräparation nicht gezeigt werden.

Auch die mit ATP und ATP-regenerierenden System vorinkubierten und solubilisierten Mitochondrien (Quadrate) zeigen ebenfalls eine hyperbolische Abhängigkeit der COX-Aktivität von der Substratkonzentration. Die Aktivität ist relativ zu den nicht vorinkubierten Mitochondrien erniedrigt. Das kann durch die mit der Inkubationszeit geschaffene Möglichkeit der ATP Regeneration erklärt werden.

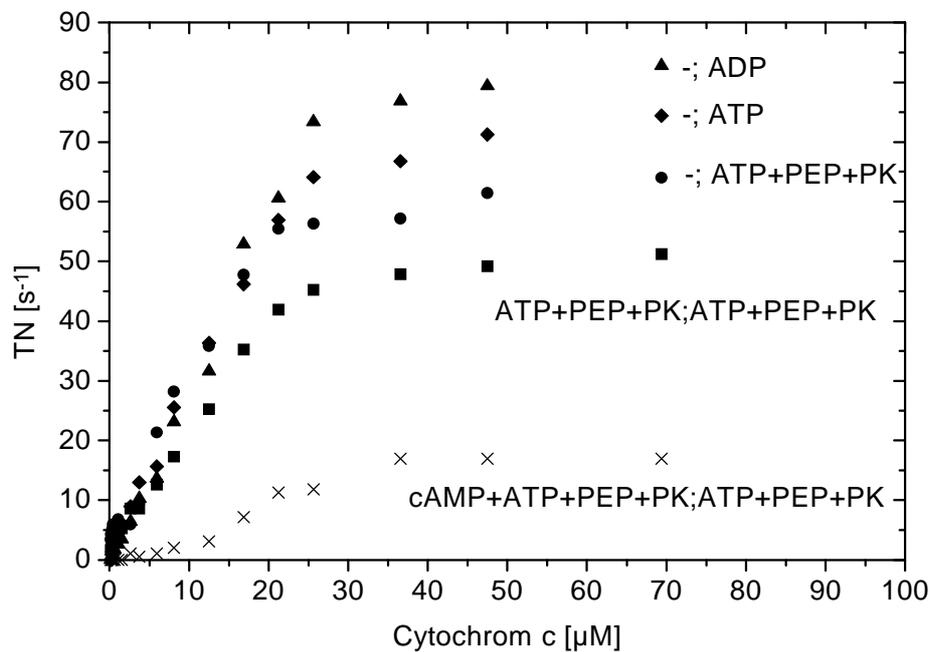


Abb.2: COX-Aktivität solubilisierter Mitochondrien. Intakte Mitochondrien wurden in Gegenwart von 5 mM ADP (Dreiecke), 5 mM ATP (Rhomben), oder 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK (Kreise) in 50 mM KP_i , 1 % Tween, 5 mM $MgSO_4$ solubilisiert. Weitere intakte Mitochondrien wurden vor der Solubilisierung (in Gegenwart von ATP, 10 mM PEP, 20 U/ml PK) 20 min bei 25° C mit 5mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/ml PK, 5 mM $MgSO_4$ (Quadrate), und zusätzlich 500 μM cAMP (Kreuze) vorinkubiert. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 0-70 μM Cytochrom c und 18 mM Ascorbat gemessen. Die Aktivität ist als turnover number (mol Cytochrom c \cdot [mol Häm aa_3^{-1}] \cdot s $^{-1}$) aufgetragen. Vor dem Semikolon sind die Inkubationsbedingungen, danach die Meßbedingungen angegeben.

Die Vorinkubation mit cAMP, ATP und ATP-regenerierendem System (Kreuze), führt zu einer deutlichen Inhibierung der COX-Aktivität in Gegenwart vom ATP-regenerierenden System. Die maximale Aktivität beträgt 24 % der Aktivität von nicht vorbehandelten Mitochondrien (Kreise). Die COX-Aktivität der cAMP inkubierten Mitochondrien zeigt nun einen sigmoiden Verlauf der Kinetik ($[S]/v$ -Kurve) mit einer vollständigen ATP-Inhibierung der Atmung bis 1,5 μM Cytochrom c.

Das Auftreten der allosterischen ATP-Inhibierung nach Behandlung der Mitochondrien mit cAMP weist auf eine biochemische Modifikation der COX, z.B. Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes, hin.

Dieser Effekt sollte in den folgenden Versuchen systematisch untersucht werden.

5.2.1 Abhängigkeit der COX-Aktivität von der Dauer der Regenerierung des ATP bei 0° C nach der Inkubation der Mitochondrien

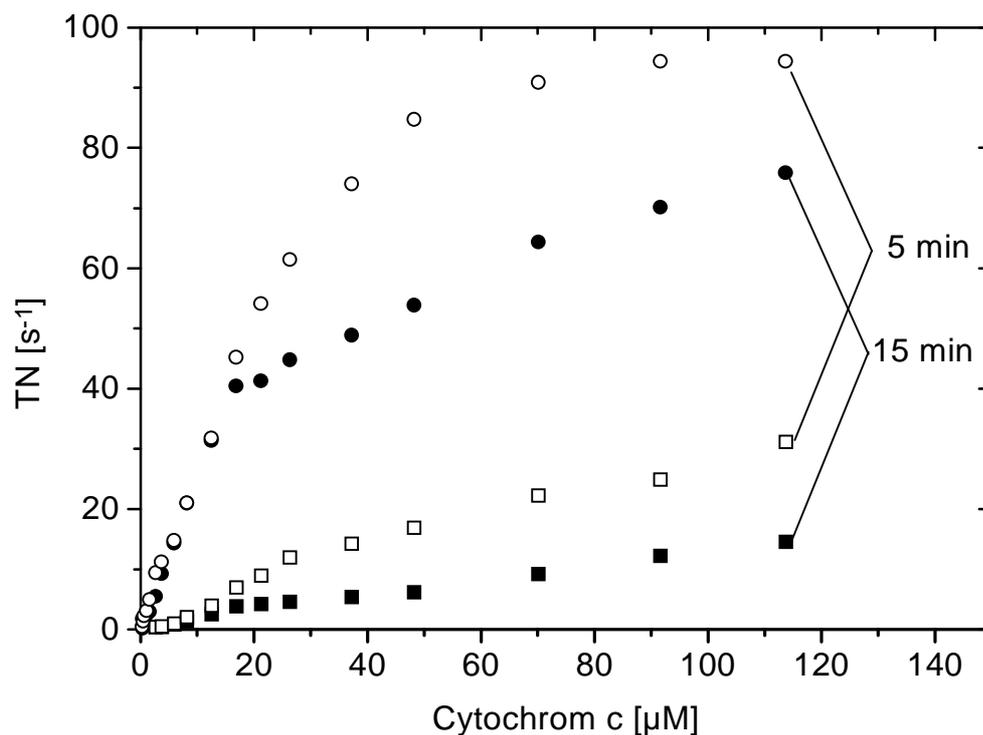


Abb. 3: Die Dauer der Solubilisierung hat einen Einfluß auf die COX-Aktivität der Mitochondrien in Gegenwart von ATP. Mitochondrien wurden bei 25° C mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/ml PK in Gegenwart (Quadrate) und Abwesenheit (Kreise) von 500 μM cAMP vorinkubiert. Anschließend wurde die gleich Probe 5 min (offene Symbole) bzw. 15 min (geschlossene Symbole) bei 0° C in Gegenwart von ATP und ATP-regenerierendem System in 1% Tween 20, 50 mM KPi, pH 7,4 solubilisiert. Die COX-Aktivität wurde polarographisch bei 25° C mit 0-113 μM Cytochrom c und 18 mM Ascorbat gemessen. Die Aktivität ist als turnover number ($\text{mol Cytochrom c} \cdot [\text{mol Häm aa}_3^{-1}] \cdot \text{s}^{-1}$) dargestellt.

Wie im vorstehenden Versuch gezeigt wurde, bewirkt die Inkubation von intakten Mitochondrien mit cAMP eine dramatische Erniedrigung der COX-Aktivität in Gegenwart von ATP und die sonst auftretende hyperbolische Sättigungskinetik wird sigmoid.

In Abb. 3 ist gezeigt, wie die Dauer der Solubilisierung bei 0° C die absoluten Werte der COX-Aktivität beeinflusst. Die in gleicher Weise inkubierten Proben wurden 5 min oder 15 min bei 0° C mit ATP, ATP-regenerierendem System in 1 % Tween 20 solubilisiert und anschließend die COX-Aktivität gemessen.

Beide mit cAMP vorinkubierte Proben (Quadrate) zeigen eine sigmoide Kinetik mit einer vollständigen Hemmung der Aktivität bis 1,5 µM Cytochrom c. Allerdings ist die COX-Aktivität der Probe nach 5 min Solubilisierung (Dreiecke) bei 113 µM Cytochrom c doppelt so hoch wie nach 15 min Solubilisierung (geschlossene Quadrate). Zum Vergleich sind auch die Kinetiken einer ohne cAMP vorinkubierten und 5 min bzw. 15 min solubilierten Probe dargestellt (Kreise). Auch hier ist eine Erniedrigung der Aktivität nach 15 min Solubilisierung zu erkennen.

Bei der Solubilisierung wird die Konzentration der ATPase 20-fach verdünnt, die der Pyruvatkinase aber konstant gehalten. Dadurch könnte das ATP/ADP-Verhältnis durch längere Inkubation nach der Solubilisierung erhöht werden. Die allosterische ATP-Inhibierung ist halbmaximal bei $ATP/ADP = 28$. (Kadenbach & Arnold, 1999)

5.2.2 Variation der Konzentration des cAMP bei der Inkubation der Mitochondrien bei 25° C

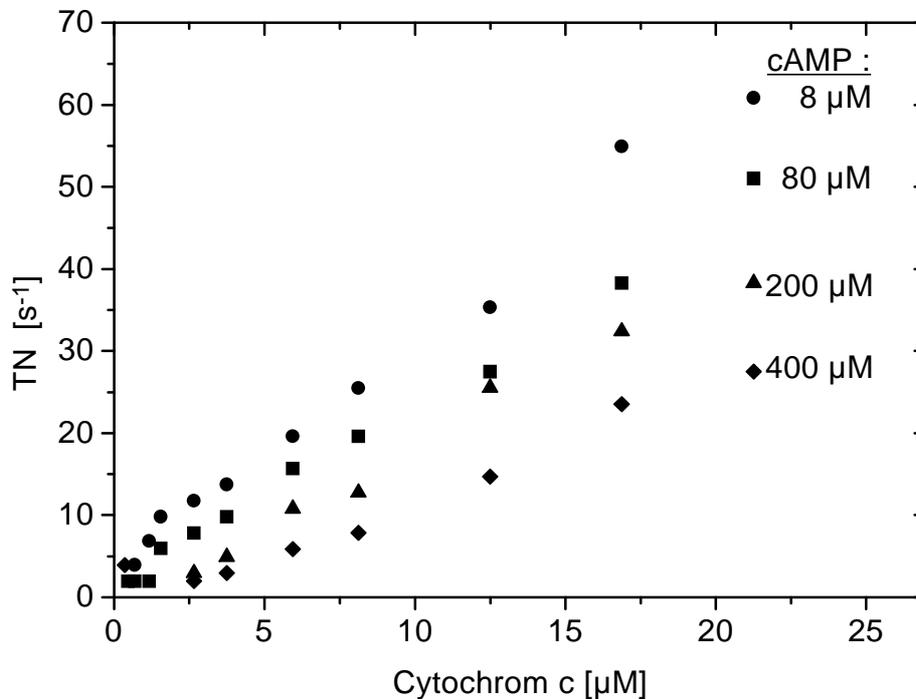


Abb. 4: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von cAMP auf die COX-Aktivität von Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden 30 min bei 25° C mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK und 8 µM (Kreise), 80 µM (Quadrate), 200 µM (Dreiecke) oder 400 µM (Rhomben) cAMP inkubiert. Die Solubilisierung erfolgte bei 0° C 15min in Gegenwart von ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK in 50 mM KPi, 1 % Tween 20, 5 mM MgSO₄. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 0-21 µM Cytochrom c und 18 mM Ascorbat gemessen. Die Aktivität ist als turnover number (TN) dargestellt.

Wie in vorhergehenden Experiment gezeigt wurde, sind zur Regeneration des ATP's mit dem ATP-regenerierenden System 15 min während der Solubilisierung bei 0° C erforderlich. Nachdem dieser Parameter für die Solubilisierung festgesetzt war, wurde untersucht, wie die Variation der zugesetzten cAMP Konzentration das Auftreten einer vollständigen Hemmung der COX-Aktivität in Gegenwart von ATP beeinflusst.

Dabei ist die Aktivität im Bereich niedriger Cytochrom c Konzentrationen von besonderem Interesse. Daher wurden die Titrations in kleinen Schritten von 0,21-21 µM Cytochrom c vorgenommen.

Eine potentielle Phosphorylierung der COX benötigt ATP. Deshalb wurde in Gegenwart von 5 mM ATP mit einem ATP-regenerierenden System (10 mM PEP, 20 U/mL PK) gearbeitet. Jede Probe wurde 30 min bei 25° C vorinkubiert. Die Variation der Konzentration von 8 bis 400 μ M cAMP zeigte, daß den Mitochondrien mindestens 200 μ M cAMP zugesetzt werden muß, um eine vollständige Hemmung bis 2 μ M Cytochrom c beobachten zu können (Abb. 4).

5.2.3 Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur bei der Inkubation der Mitochondrien

Im vorhergehenden Experiment hat sich bereits angedeutet, daß Inkubation bei 25° C das ATP/ADP-Verhältnis soweit senkt, daß die allosterische ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase nicht mehr beobachtet werden kann (vergl. Abb. 3).

Daher wurde untersucht, ob die Inkubation bei 4° C den Effekt der durch cAMP induzierten ATP-Inhibierung der COX-Aktivität begünstigt (Abb. 5). Bei Zugabe von ATP während der Inkubation und Solubilisierung wurde auch immer das ATP-regenerierende System zugesetzt, um die ATP Konzentration möglichst hoch zu halten.

In Abb.5 sind die COX-Kinetiken von Mitochondrien, die mit ATP und cAMP bei unterschiedlichen Temperaturen für 30 min inkubiert und anschließend solubilisiert wurden, gezeigt. Die Solubilisierung erfolgte immer in Gegenwart von ATP und dem ATP-regenerierenden System. Die Proben der nicht vorinkubierten Mitochondrien (Kreuze) und der bei 4° C mit ATP/ATP-regenerierendem System inkubierten Mitochondrien (offene Quadrate) zeigen in Gegenwart von ATP die gleiche Kinetik. Dies zeigt, daß Inkubation bei 4° C mit ATP keinen Einfluß auf die COX-Aktivität der Mitochondrien hat.

Die Inkubation ohne cAMP bei 25 ° C erhöht die COX-Aktivität in Gegenwart von ATP (geschlossene Quadrate). Dies könnte auf einer Verschiebung des Phosphorylierungsstatus der COX zugunsten der Dephosphorylierung beruhen.

Die COX-Aktivität der bei 4° C mit cAMP inkubierten Mitochondrien ist bei 21 μ M Cytochrom c auf 55% erniedrigt. Die vollständige Hemmung der COX-Aktivität

der mit cAMP inkubierten Mitochondrien ist bei beiden Inkubationstemperaturen gleich stark (bis $1,7 \mu\text{M}$ Cytochrom c) ausgeprägt. Die Konzentration von Cytochrom c bis zu der eine vollständige Hemmung der COX-Aktivität in Gegenwart von ATP gemessen wird, wird im folgendem als „Lagphase“ bezeichnet.

Die Inkubation bei 4°C ohne Zusatz von Nukleotiden hat keinen Einfluß auf die Aktivität der solubilisierten Mitochondrien (Daten nicht gezeigt).

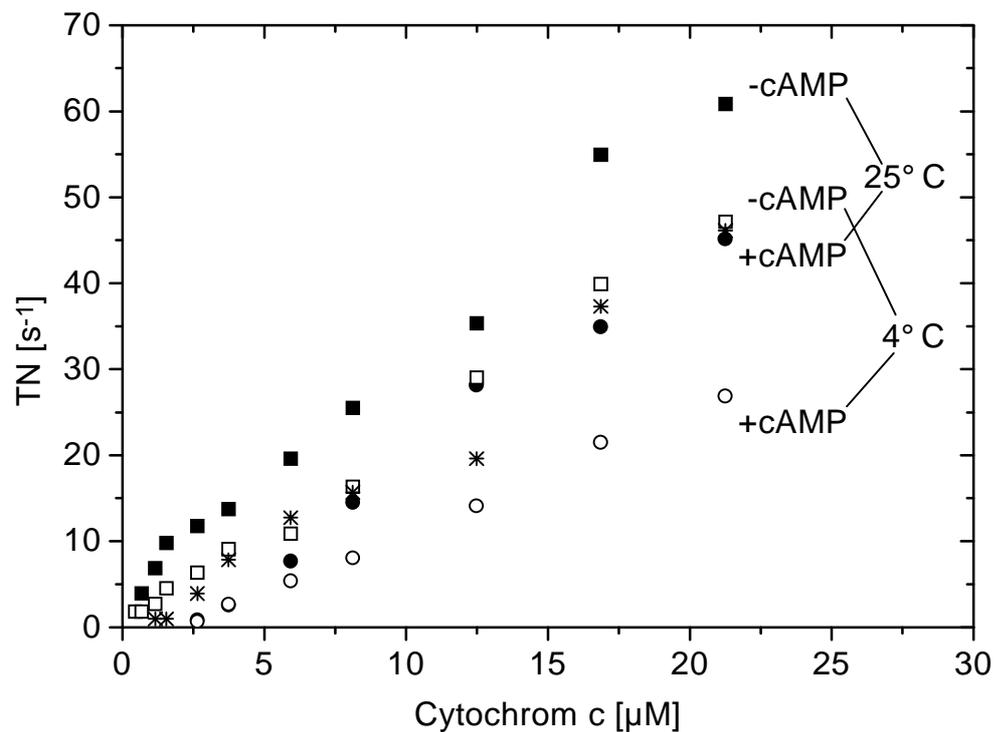


Abb. 5: Vergleich der ATP-gehemmten COX-Aktivität der bei 25°C und 4°C inkubierten Mitochondrien. Die intakten Mitochondrien wurden in Isolationsmedium mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK (Quadrate) und zusätzlich $500 \mu\text{M}$ cAMP (Kreise) 30 min bei 25°C (geschlossene Symbole) oder 4°C (offene Symbole) inkubiert. Anschließend wurde bei 0°C in Gegenwart von 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK solubilisiert und die COX-Aktivität bei 25°C gemessen. (Kreuze): nicht vorinkubierte Mitochondrien

5.2.4 Der Einfluß von Kaliumfluorid während der Vorinkubation von Mitochondrien mit cAMP auf die COX-Aktivität

Kaliumfluorid ist als unspezifischer Inhibitor von Serin/Threonin-Proteinphosphatasen, die Gegenspieler der Proteinkinasen, bekannt (Brautigan & Shriner, 1988).

Wie in Abb. 6 zu sehen ist, hat die Zugabe von Fluorid während der Vorinkubation der Mitochondrien keinen Einfluß auf die COX-Aktivität in Gegenwart von ADP (geschlossene Kreise). Die Substrat/Aktivität-Kurven, gemessen in Gegenwart von ADP verlaufen oberhalb von 2 μ M Cytochrom c in einer Gerade. In Gegenwart von ATP (offene Dreiecke) ist ein geringer Einfluß von Kaliumfluorid zu beobachten (offene Kreise). Die Inkubation mit 1 mM cAMP und ATP (Quadrate) führt zu einer leicht erniedrigten Aktivität, die „Lagphase“ wird bis 1,5 μ M Cytochrom c beobachtet.

Die vollständige Inhibierung der COX-Aktivität bis 7 μ M Cytochrom c („Lagphase“) wird bei der Vorinkubation der Mitochondrien mit ATP, ATP-regenerierendem System, Kaliumfluorid und 1 mM cAMP beobachtet (offene Rhomben), die Aktivität bei der höchsten Cytochrom c Konzentration beträgt 7 % der COX-Aktivität in Gegenwart von ADP. Das Ergebnis deutet auf ein Gleichgewicht zwischen phosphorylierter und dephosphorylierter Cytochrom c Oxidase in den Mitochondrien hin, das durch Hemmung der Proteinphosphatase durch Kaliumfluorid zugunsten des phosphorylierten Enzyms verschoben wird.

Da die Zugabe von Kaliumfluorid während der Inkubation die „Lagphase“ der ATP-Inhibierung verlängert, wurde in den folgenden Experimenten immer 20 mM KF zu den Mitochondrien zugegeben. Die Zugabe von KF zum Isolationsmedium beim letzten Waschschrift der Mitochondrien hatte keinen weiteren signifikanten Einfluß auf die allosterische ATP-Hemmung.

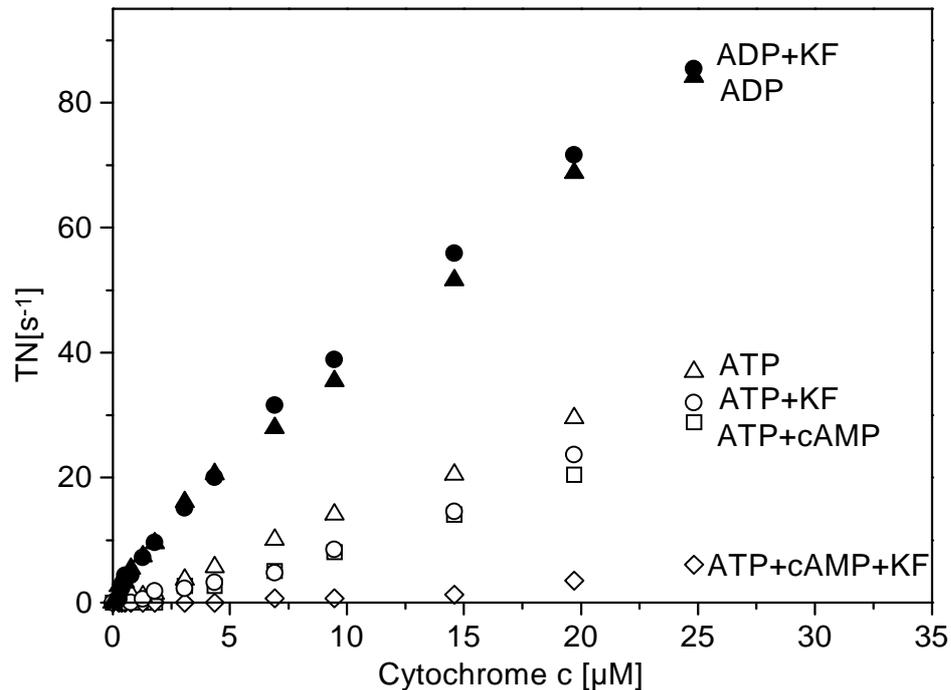


Abb.6: Einfluß der Inkubation intakter Rinderlebermitochondrien mit Kaliumfluorid auf die COX-Aktivität nach Solubilisierung. Rinderlebermitochondrien wurden für 30 min bei 4° C mit Zusatz von 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK, 5 mM MgSO₄ (offene Dreiecke) in Gegenwart von 1 mM cAMP (Quadrate) oder 1 mM cAMP plus 20 mM KF (Rhomben) oder 20 mM KF (Kreise) oder nur mit 5 mM ADP (geschlossene Dreiecke) und 20 mM KF (geschlossene Kreise) vorinkubiert. Die Mitochondrien wurden 15 min bei 0° C in 1 % Tween 20, 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 5 mM MgSO₄ mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK (offene Symbole) oder mit 5 mM ADP (geschlossene Symbole) solubilisiert. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 0-25 µM Cytochrom c und 18 mM Ascorbat gemessen.

5.2.5 Variation der Konzentration von cAMP bei der Inkubation von Mitochondrien bei 4° C

Die Konzentration von cAMP in der Zelle *in vivo* liegt zwischen 10^{-4} und 10^{-6} M. Um zu untersuchen in wie weit die COX-Aktivität der Mitochondrien durch die Konzentration des cAMP's während der Inkubation in Gegenwart von ATP beeinflusst wird, wurden intakte Mitochondrien mit cAMP-Konzentrationen von 1 μ M bis 1 mM, ATP und ATP-regenerierendem System vorinkubiert und die COX-Aktivität der Mitochondrien nach der Solubilisierung untersucht.

In Abb.7 ist die ATP-gehemmte COX-Aktivität der vorinkubierten und solubilisierten Mitochondrien gezeigt. Zum Vergleich ist auch die ATP-gehemmte COX-Aktivität nicht vorbehandelter Mitochondrien (geschlossene Spitzdreiecke) und die Aktivität in Gegenwart von ADP inkubierter Mitochondrien (geschlossene Quadrate) gezeigt. Mit steigender cAMP Konzentration wird die allosterische Hemmung der COX-Aktivität in Gegenwart von ATP verstärkt. Die cAMP Konzentration von 50 μ M bewirkt eine vollständige Hemmung („Lagphase“) bis 6 μ M Cytochrom c; dies wird durch Erhöhung auf 1000 μ M cAMP nicht weiter verstärkt. Vorinkubation mit 500 μ M cAMP vermindert die COX-Aktivität in Gegenwart von ATP bei 26 μ M Cytochrom c auf 13 %.

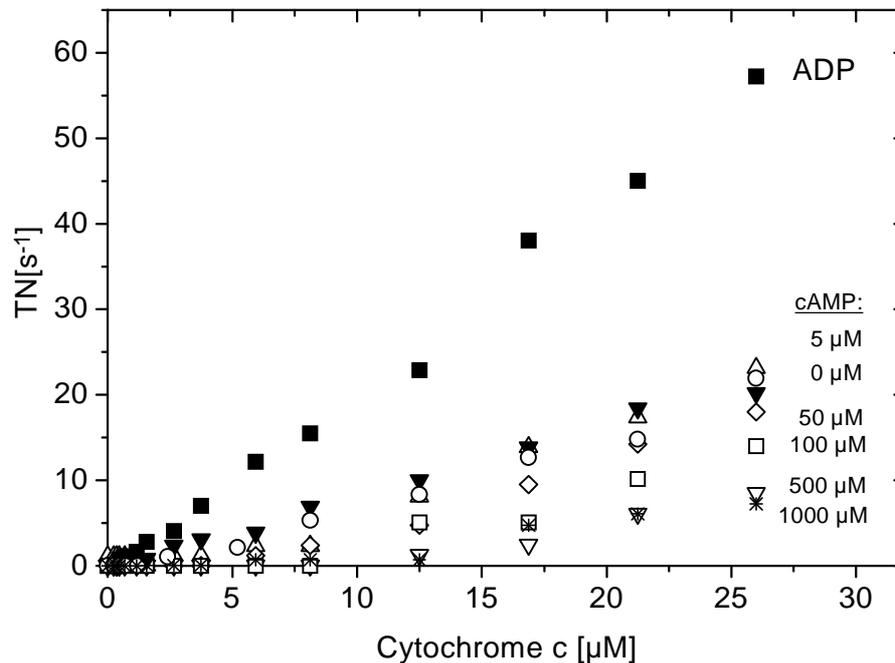


Abb. 7: COX-Aktivität solubilisierter, mit zunehmender cAMP Konzentration bei 4° C vorinkubierter Mitochondrien. Geschlossene Dreiecke: nicht vorinkubierte Mitochondrien. Die Vorinkubation der Mitochondrien erfolgte in Gegenwart von 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK, 5 mM MgSO₄, 20 mM KF und 0 μM (Kreise), 5 μM (Basisdreiecke), 50 μM (Rhomben), 100 μM (Quadrate), 500 μM (Spitzdreiecke), 1000 μM (Kreuze) cAMP oder nur mit 5 mM ADP (geschlossene Quadrate) bei 4° C für 20 min. Die Mitochondrien wurden 15 min bei 0° C in 1% Tween 20, 50 mM KP_i, pH 7,4, 5 mM MgSO₄ mit 5 mM ADP (geschlossene Quadrate) oder 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK solubilisiert. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 0-25 μM Cytochrom c gemessen dargestellt.

In Abb. 8 ist die COX-Aktivität der mit ATP und cAMP vorinkubierten Mitochondrien, die nach Solubilisierung in Gegenwart von ADP gemessen wurde, gezeigt. Mit erhöhter cAMP Konzentration wird die Aktivität in Gegenwart von ADP bis auf 70 % (100 μM cAMP) erniedrigt (Quadrate). Eine Konzentrationsabhängigkeit ist jedoch nicht zu erkennen.

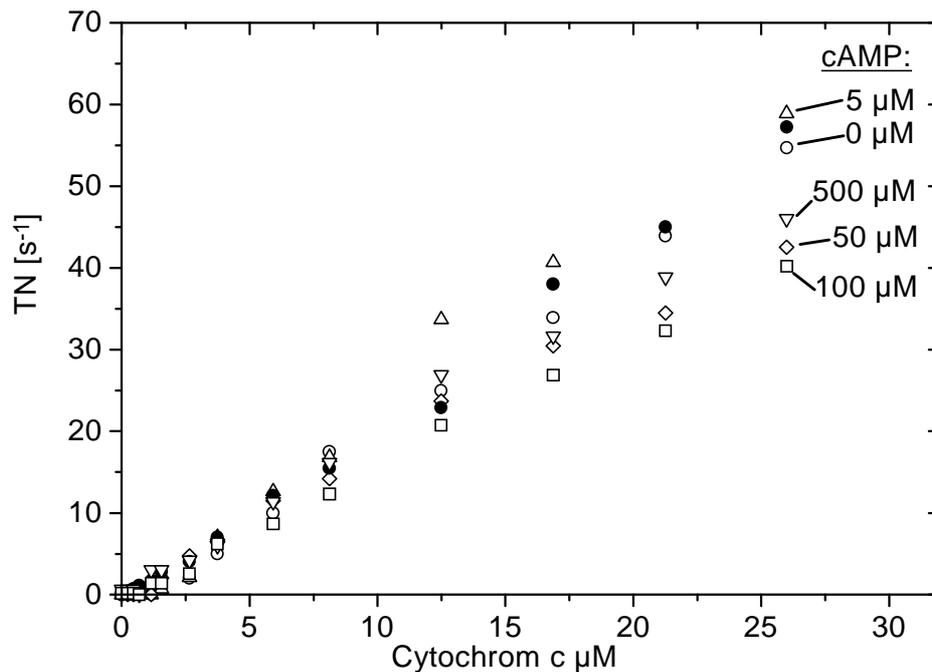


Abb. 8: COX-Aktivität in Gegenwart von ADP der solubilisierten Mitochondrien nach Vorinkubation mit cAMP. Die Vorinkubation der Rinderlebermitochondrien erfolgte bei 4° C für 20min mit Zusatz von 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK, 5 mM MgSO_4 , 20 mM KF und 0 μM (offene Kreise), 5 μM (Basisdreiecke), 50 μM (Rhomben), 100 μM (Quadrate), 500 μM (Spitzdreiecke) cAMP oder nur mit 5 mM ATP (geschlossene Kreise). Die Mitochondrien wurden 15 min bei 0° C in Solubilisierungspuffer mit 5mM ADP solubilisiert. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 0-26 μM Cytochrom c und 18 mM Ascorbat gemessen. Die Aktivität ist als turnover number (TN) dargestellt.

Werden intakte Mitochondrien in Gegenwart von ADP, statt ATP, mit cAMP inkubiert, so wird kein Einfluß auf die ATP-gehemmte COX-Aktivität oder ADP aktivierte COX-Aktivität festgestellt (Daten nicht gezeigt).

5.2.6 Zeitabhängige Inkubation der Mitochondrien mit cAMP

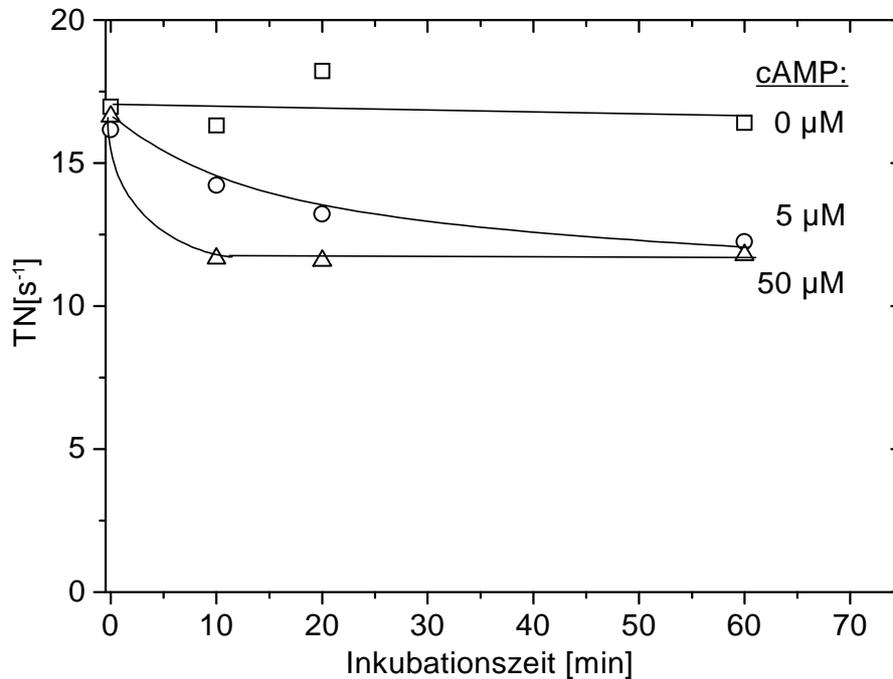


Abb. 9: Zeitabhängigkeit der Verstärkung der ATP-Inhibierung der COX-Aktivität durch cAMP in Rinderlebermitochondrien. Mitochondrien wurden bei 4° C mit Zusatz von 5mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK, 5 mM MgSO₄, 20 mM KF und 0 μM (Quadrate), 5 μM (Kreise) oder 50 μM (Dreiecke) cAMP für die angegebene Zeit vorinkubiert. Die Mitochondrien wurden (50 nM Häm aa₃) in Solubilisierungspuffer 15 min bei 0° C mit 5 mM ATP, 10mM PEP, 20 U/mL PK solubiliert. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 21 μM Cytochrom c und 18 mM Ascorbat gemessen.

Nachdem die Abhängigkeit der Stärke der ATP-Inhibierung der COX-Aktivität von der cAMP Konzentration während der Inkubation festgestellt wurde, sollte der Einfluß der Inkubationszeit auf die COX-Aktivität der Mitochondrien untersucht werden.

Intakte Mitochondrien wurden in Isolationsmedium mit ATP, ATP-regenerierendem System, Kaliumfluorid und 0 bis 50 μM cAMP zwischen 1-60 min bei 4° C inkubiert.

In Abb.9 ist die ATP-gehemmte COX-Aktivität solubilisierter Mitochondrien zeitabhängig bei 21 μM Cytochrom c gezeigt. Ohne cAMP ist keine Veränderung der Aktivität zu beobachten. In Anwesenheit von 50 μM cAMP während der Inkubation wird bereits nach 10 min die maximale ATP-Inhibierung der COX-Aktivität beobachtet. Mit 5 μM cAMP wird die mit 50 μM cAMP bereits nach 10 min beobachtete ATP-Inhibierung der Aktivität erst nach 60 min erreicht.

5.2.7 Effekt der Vorinkubation der Mitochondrien mit cGMP auf die COX-Aktivität

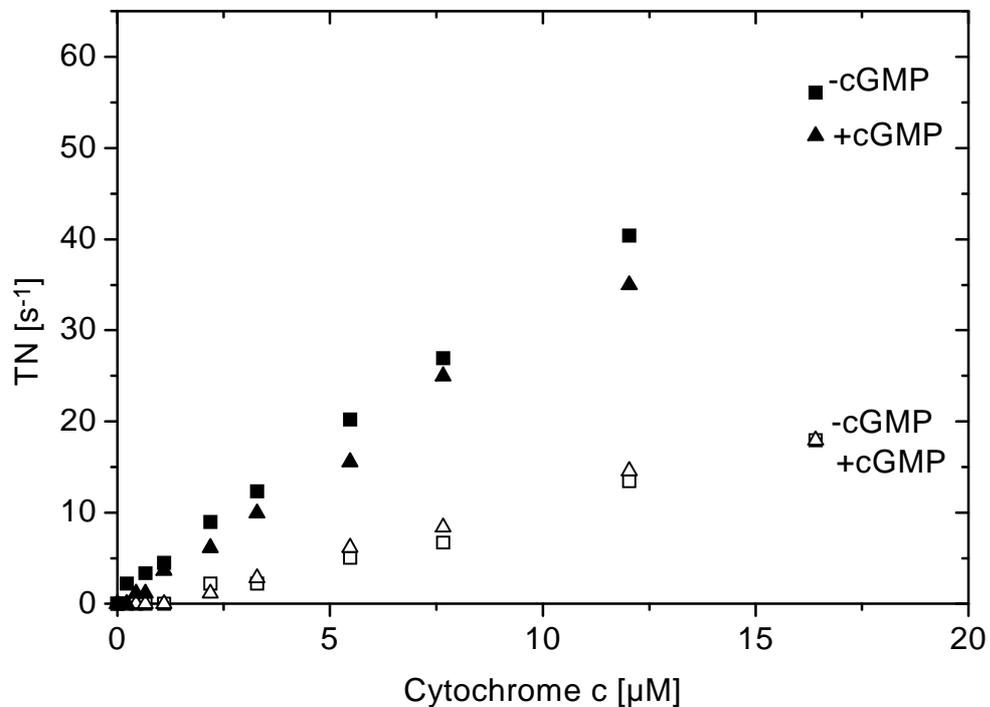


Abb. 10: Effekt der Vorinkubation intakter Mitochondrien mit cGMP auf die COX-Aktivität. Intakte Rinderlebermitochondrien wurden in Isolationsmedium mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK, 5 mM MgSO₄ (Quadrate) und zusätzlich 500 μM cGMP (Dreiecke) 60 min bei 4°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden in Solubilisierungspuffer 15 min bei 0°C mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK solubilisiert. Die Aktivität wurde polarographisch bei 25°C mit 0- 25 μM Cytochromc und 18 mM Ascorbat gemessen.

Um zu überprüfen, wie spezifisch der Effekt von cAMP auf die COX-Aktivität der Mitochondrien ist, wurden Mitochondrien mit cGMP, ebenfalls ein *second messenger* und cAMP strukturell ähnlich, unter analogen Bedingungen inkubiert und solubilisiert.

Die intakten Mitochondrien wurden in Gegenwart von 500 μM cGMP, ATP-regenerierendem System 60 min bei 4°C vorinkubiert und anschließend solubilisiert (Abb.10). Zwischen den COX-Aktivitäten der mit oder ohne cGMP inkubierten Mitochondrien ist weder in Gegenwart von ADP, noch von ATP/ATP-regenerierendem System ein Unterschied zu erkennen. cGMP wirkt auf die COX-Aktivität unter den gegebenen Bedingungen nicht spezifisch ein.

5.2.8 Einfluß der Vorinkubation von Mitochondrien mit Calcium auf die allosterische ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase

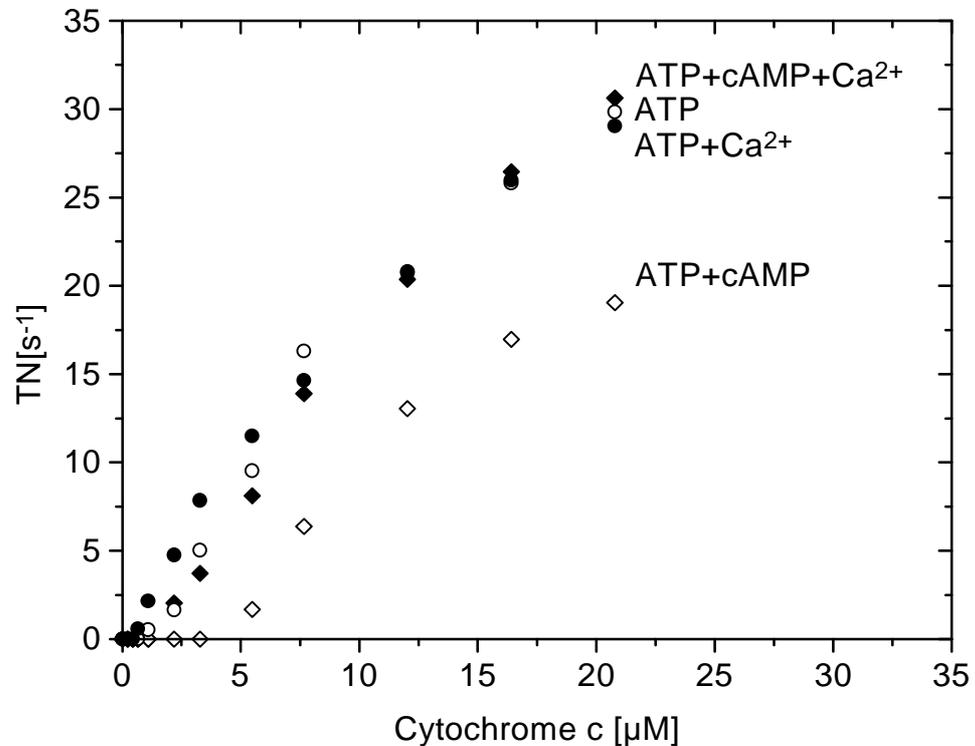


Abb. 11: Wirkung von Calciumionen auf die allosterische ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase solubilisierter Mitochondrien. Intakte Mitochondrien wurden mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK, 5 mM MgSO₄ und 0 µM (Kreise) oder 50 µM (Rhomben) cAMP bei 4° C für 20 min vorinkubiert. Ein Teil der Proben wurde anschließend mit 1 mM CaCl₂ 20 min inkubiert (geschlossene Symbole). Die Mitochondrien wurden 15 min bei 0°C in Solubilisierungspuffer mit 5 mM ATP, 10 mM PEP, 20 U/mL PK solubilisiert. Die COX-Aktivität wurde polarographisch bei 25° C gemessen.

Viele Proteinphosphatasen, die cAMP-abhängig phosphorylierte Aminosäurereste wieder dephosphorylieren, sind Calcium abhängig. Daher wurde untersucht, ob die durch cAMP erzeugte ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase solubilisierter Mitochondrien durch Behandlung mit Calcium wieder aufgehoben werden kann. Dazu wurden Mitochondrien zunächst 20 min mit $\pm 50 \mu\text{M}$ cAMP, ATP und ATP-regenerierendem System vorinkubiert. Anschließend wurde zu einem Teil der Probe 1 mM Calciumchlorid gegeben und weitere 20 min inkubiert. Die COX-Aktivitäten der solubilisierten Mitochondrien in Gegenwart von ATP sind in Abb. 11 gegen die Cytochrom c Konzentration aufgetragen. Die alleinige Zugabe von Calcium (geschlossene Kreise) beeinflusst die ATP-gehemmt COX-Aktivität nicht. Nach 20 min Vorinkubation mit cAMP (offene Rhomben) bewirkt die weitere Inkubation mit Calcium (geschlossene Rhomben) eine Aufhebung der zuvor beobachteten allosterischen ATP-Inhibierung der COX-Aktivität von den solubilisierten Mitochondrien.

5.2.9 cAMP-abhängige Markierung intakter Rinderlebermitochondrien mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

Die isolierten Rinderlebermitochondrien wurden mit 50 μM cAMP, Kaliumfluorid und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (4000 Ci/mmol) 10 min bei 4°C analog zur Vorinkubation für die polarographische Messungen der COX-Aktivität behandelt. Anschließend wurden die Proben mit einer 2D-Blue Native-SDS-PAGE analysiert. Das Gel wurde mit Coomassie blue angefärbt, getrocknet und autoradiographiert (Abb. 12). Bei der analysierten Probe, die mit cAMP behandelt wurde, sind radioaktive Markierungen im hochmolekularen Bereich aller Enzymkomplexe zu sehen. Der Komplex IV (COX) weist drei weitere Markierungen auf, die keiner Untereinheit mit Sicherheit zugeordnet werden können. Im Migrationsbereich des Komplexes II ist ebenfalls eine Markierung zu erkennen. Das Gel der ohne cAMP vorinkubierten Mitochondrien weist nur sehr schwache radioaktive Markierungen am oberen Gelrand auf (Abb. 13).

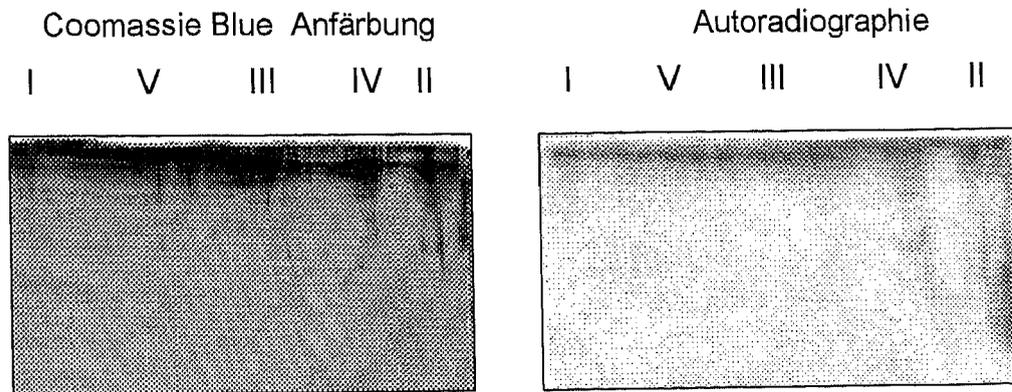


Abb. 12: cAMP-abhängige radioaktive Markierung der Atmungskettenkomplexe I-V von Rinderlebermitochondrien. Frisch isolierte Mitochondrien wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und cAMP inkubiert und anschließend einer 2D-Blue Native-SDS-PAGE unterworfen.

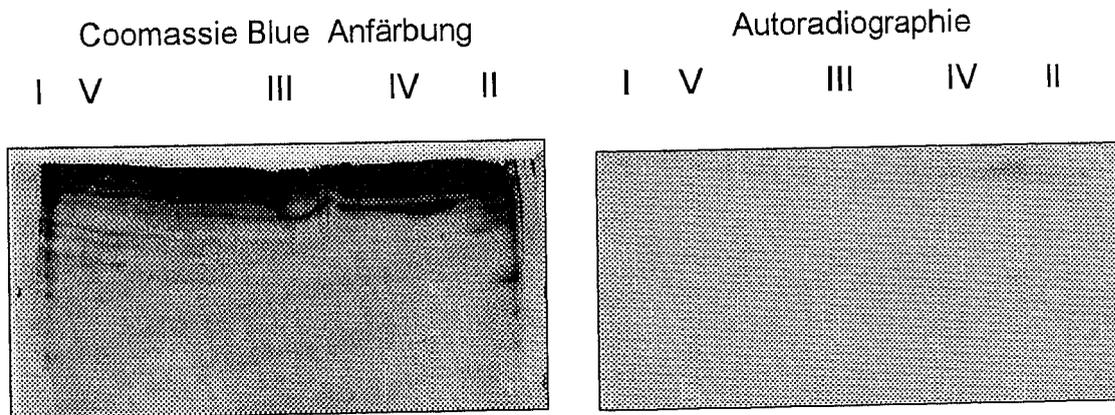


Abb. 13: Radioaktive Markierung der Atmungskettenkomplexe I-V von Rinderlebermitochondrien. Frisch isolierte Mitochondrien wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und anschließend einer 2D-Blue Native-SDS-PAGE unterworfen.

5.3 Untersuchungen an isolierter Rinderherz Cytochrom c Oxidase

Intakte Mitochondrien enthalten neben der Cytochrom c Oxidase (COX), deren Aktivität in den vorangegangenen Experimenten untersucht worden ist, viele andere Enzyme und Substanzen. Es ist somit nicht auszuschließen, daß der gezeigte Effekt des *second messenger* cAMP nicht durch Phosphorylierung einer Untereinheit der COX verursacht wird.

Daher wurde ein einfacheres System zur Untersuchung des an Mitochondrien beobachteten Effekts von cAMP auf die Aktivität der COX gesucht. Es wurde ein System aus gelöster Rinderherz COX, ATP, cAMP und einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A gewählt.

Lösliche COX, die in Gegenwart von Cholat als Detergenz isoliert wurde, hat Cholat an verschiedenen ATP-Bindungsstellen gebunden. Dies kann langsam durch ATP oder ADP ausgetauscht werden, und dauert bei 4° C etwa 20-24 Stunden (Napiwotzki *et al.*, 1997). Die in den folgenden Experimenten verwendete COX wurde immer mit ATP vorinkubiert. Der Austausch von ATP gegen ADP und umgekehrt verläuft innerhalb kürzester Zeit (Napiwotzki & Kadenbach, 1998).

5.3.1 Einfluß der Vorinkubation von gelöster Cytochrom c Oxidase mit cAMP-abhängiger Proteinkinase A, ATP und cAMP auf die Aktivität

Um den Einfluß einer cAMP-abhängigen Phosphorylierung der COX auf die Aktivität des Enzyms zu untersuchen, wurde isolierte COX (5 µM) in Gegenwart von 1 % Tween 20, 50 mM KP_i , pH 7,4 zunächst mit Cardiolipin und 5 mM ATP 24 h vorinkubiert. Anschließend wurde das Enzym mit cAMP und cAMP-abhängiger Proteinkinase A (PKA) in Gegenwart des ATP-regenerierenden Systems bei 30° C 20min inkubiert und die Aktivität in Gegenwart von ATP (offene Symbole) bzw. ADP (geschlossene Symbole) gemessen (Abb. 14).

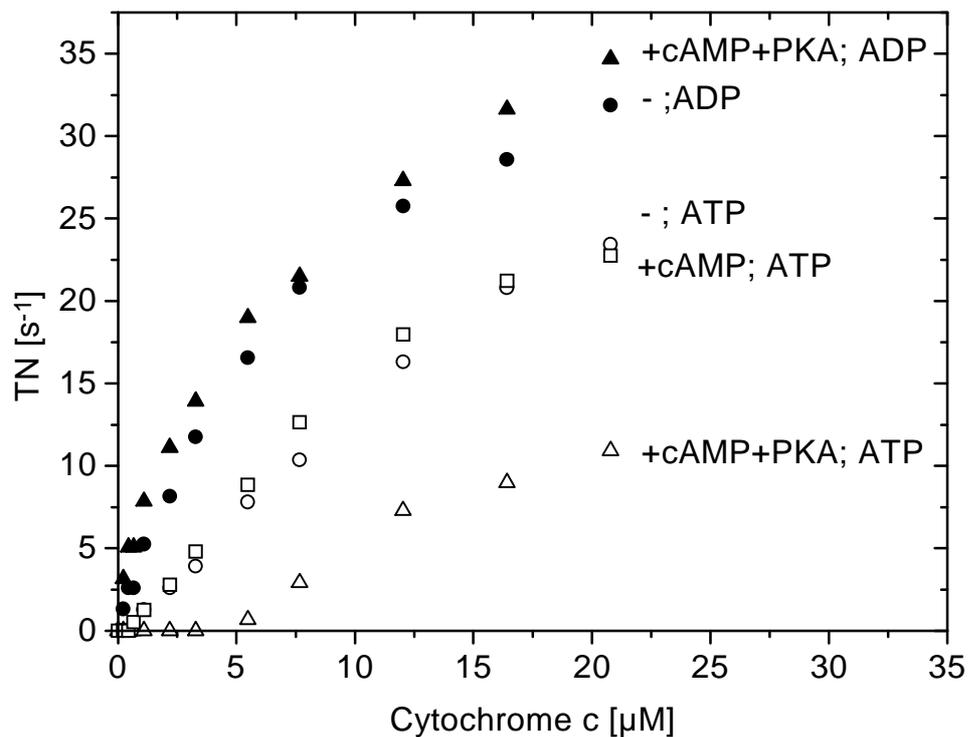


Abb.14: Einfluß der Inkubation mit ATP, Proteinkinase A und cAMP auf die Aktivität von isolierter COX aus Rinderherz. COX (5 μM) wurde 24 h in Gegenwart von 5 mM ATP und 200 μM Cardiolipin vorinkubiert. Die Inkubation mit ATP, ATP-regenerierendem System (Kreise) und 50 μM cAMP (Quadrate) und zusätzlich 200 U/mL Proteinkinase A (Dreiecke) erfolgte 20 min bei 30° C. Die Atmung wurde polarographisch bei 25° C mit 5mM ATP (offene Symbole) oder 5 mM ADP (geschlossene Symbole), 18 mM Ascorbat und steigender Konzentration Cytochrom c (0-21 μM) gemessen.

In Gegenwart von ADP wird unter den gegebenen Inkubationsbedingungen immer ein hyperbolischer Verlauf der Substrat/Aktivität-Kurve beobachtet. Nach Inkubation mit ATP, ATP-regenerierendem System, cAMP und Proteinkinase A (geschlossene Dreiecke) ist die hyperbolische Substrat/Aktivität-Kurve etwas höher, als nach Inkubation mit ATP und ATP-regenerierendem System allein (geschlossene Kreise). Dies schließt einen inhibierenden Effekt von cAMP auf das Enzym aus. In Gegenwart von ATP ist für die gleiche Probe (offene Dreiecke) eine sigmoide Kinetik mit „Lagphase“ bis 5 μM Cytochrom c zu beobachten. Die COX-Aktivität sinkt bei 21 μM Cytochrom c auf 34 % ab. Ohne Zusatz von cAMP und Proteinkinase A beträgt die Aktivität in Gegenwart von ATP 87 % (offene Kreise). Oxidase, inkubiert mit ATP und ATP-regenerierendem System zeigt in der Gegenwart von ATP nur eine vollständige

Hemmung bis 1 μM Cytochrom c. Dies kann mit einer bereits teilweisen Phosphorylierung des isolierten Enzyms erklärt werden. Mit ATP, ATP-regenerierendem System und cAMP allein ist kein sigmoider Verlauf der Kurve zu erkennen (offene Quadrate). Die Kinetik unterscheidet sich auch nicht wesentlich von der nur mit ATP und ATP-regenerierendem System inkubierter und in ATP gemessener COX. Dies zeigt, daß die ATP-Inhibierung von COX abhängig von einer cAMP-abhängigen Phosphorylierung des Enzyms ist.

5.3.2 Einfluß von Cardiolipin auf die ATP-Inhibierung der Atmung der gelösten Cytochrom c Oxidase

Wie zuvor gezeigt wurde, ist die Zugabe von Cardiolipin zu Proteoliposomen mit rekonstituierter COX für die allosterische ATP-Inhibierung essentiell (Arnold & Kadenbach, 1997). Daher wurde die solubilisierte Oxidase mit Enzym-Cardiolipin-Verhältnissen von 1:0 bis 1: 40 und 5 mM ATP vorinkubiert, um neben dem Cholat/ATP-Austausch auch eine Sättigung des Enzyms mit dem Phospholipid zu ermöglichen.

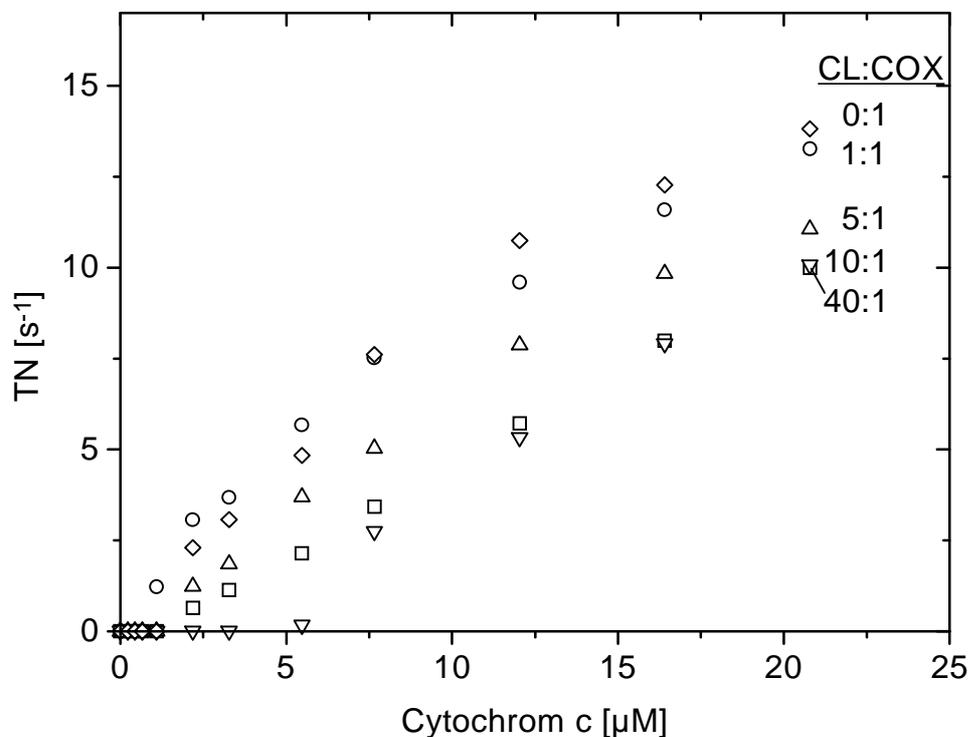


Abb.15: Aktivität gelöster Rinderherz COX nach Vorinkubation mit zunehmender Cardiolipin Konzentration. 5 µM COX wurde 24 h in Gegenwart von 5 mM ATP und 0 µM (Rhomben), 5 µM (Kreise), 25 µM (Spitzdreiecke), 50 µM (Quadrate) oder 200 µM (Basisdreiecke) Cardiolipin (CL) vorinkubiert. Die Inkubation mit 200 U/mL Proteinkinase A, 50 µM cAMP und ATP-regenerierendem System erfolgte 20 min bei 30° C. Die COX-Aktivität wurde polarographisch bei 25° C mit 5mM ATP, 18 mM Ascorbat und steigender Konzentration Cytochrom c (0-21 µM) gemessen.

Die COX-Aktivität von so vorbehandeltem Enzym nach Inkubation mit ATP-regenerierendem System, cAMP und Proteinkinase A in Gegenwart von ATP ist in Abb. 15 gezeigt. Erst bei einem zehnfachen Überschuß von Cardiolipin zeigt sich eine schwache ATP-Inhibierung, die sich mit einem 40-fachen Cardiolipin Überschuß zu einer vollständigen Inhibierung der Aktivität bis zu 5,3 μM Cytochrom c steigern läßt. Die gleiche Kinetik wurde mit einem 80-fachen Überschuß gemessen (Daten nicht gezeigt). Wird die COX nach der Vorinkubation mit Cardiolipin nur mit ATP oder ADP behandelt, so ist nur eine geringe Steigerung der Aktivität durch Cardiolipin-Zugaben zu beobachten (nicht gezeigt).

5.3.3 Abhängigkeit der ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase vom Ausmaß der cAMP-abhängigen Phosphorylierung

Die Spezifität der Proteinkinasen ist *in vivo* auf die Vielzahl der vorhandenen regulatorischen Untereinheiten zurückzuführen. Diese sind unter anderem für die Substratspezifität verantwortlich. Durch Zugabe von cAMP zur cAMP-abhängigen Proteinkinase A werden die katalytischen Untereinheiten von den regulatorischen Untereinheiten abgelöst. Die Dissoziation von katalytischer und regulatorischer Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase führt zur vollen Phosphorylierungsaktivität der Proteinkinase A. Dieser Prozeß ist von der cAMP Konzentration abhängig.

In Abb.16 ist gezeigt, wie sich die Variation der cAMP Konzentration während der Inkubation mit Proteinkinase A und ATP (plus ATP-regenerierendes System) auf die COX-Aktivität auswirkt. Es sind die gleichen Inkubationsbedingungen wie in Abschnitt 5.3.1 gewählt worden. Ohne Zugabe von cAMP ist eine Substrat/Aktivität-Kurve mit geringem sigmoiden Verlauf zu beobachten (Quadrate). Inkubation mit 5 μM cAMP induziert eine sigmoide Kinetik mit vollständiger ATP-Inhibierung bis etwa 1 μM Cytochrom c (Dreiecke). Die vollständige Inhibierung wird durch Erhöhung der cAMP-Konzentration auf 50 μM bis zu 5 μM Cytochrom c verstärkt. Bei Zugabe von

1 mM cAMP wird keine weitere Verstärkung, sondern eine minimal höhere Atmung beobachtet.

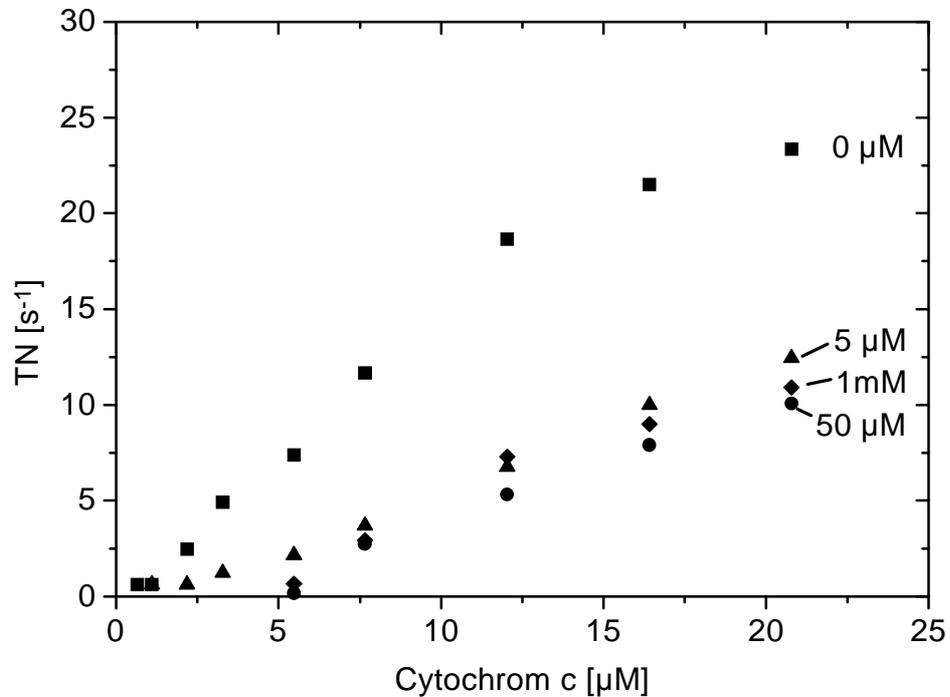


Abb. 16: Die ATP-Inhibierung der COX-Aktivität ist von der cAMP-Konzentration abhängig. Die COX (5 μM) wurde 24 h in Gegenwart von 5 mM ATP und 200 μM Cardiolipin vorinkubiert. Die Inkubation mit 5 mM ATP, ATP-regenerierendem System, 200 U/mL Proteinkinase A (Quadrate) sowie zusätzlich 5 μM (Dreiecke), 50 μM (Kreise) oder 1000 μM cAMP (Rhomben) erfolgte 20 min bei 30° C. Die Aktivität wurde polarographisch bei 25° C mit 5 mM ATP, 18 mM Ascorbat und steigender Konzentration Cytochrom c (0-21 μM) gemessen.

5.3.4 Dephosphorylierung cAMP-abhängig phosphorylierter Cytochrom c Oxidase mit der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob durch eine Proteinphosphatase die cAMP-abhängige Phosphorylierung der COX wieder aufgehoben werden kann. Das solubilisierte Enzym wurde mit ATP und Cardiolipin vorinkubiert und dann bei 30° C mit cAMP, ATP-regenerierendem System und Proteinkinase A phosphoryliert. Anschließend wurde die COX 10-40 min mit der katalytischen Untereinheit C_{α} der Proteinphosphatase 1 (PP1- C_{α}) und Mn^{2+} bei 30° C inkubiert. Die Proben wurden in Gegenwart von ATP und ATP-regenerierendem System solubilisiert und die Atmung gemessen. Die in der Abb. 17 mit 0 min bezeichnete Kurve entspricht der nicht mit Proteinphosphatase behandelten COX (Rhomben). Mit der Inkubationszeit der PP1- C_{α} nimmt die Aktivität der COX in Gegenwart von ATP zu. Die „Lagphase“ der COX-Aktivität verschwindet nach 40 min vollständig (offene Kreise) und die Aktivität entspricht annähernd der nur mit ATP und ATP-regenerierenden System vorinkubierten solubilierten COX (geschlossene Spitzdreiecke). Die zur allosterischen ATP-Inhibierung des Enzyms führende Phosphorylierung kann also durch eine Proteinphosphatase rückgängig gemacht werden.

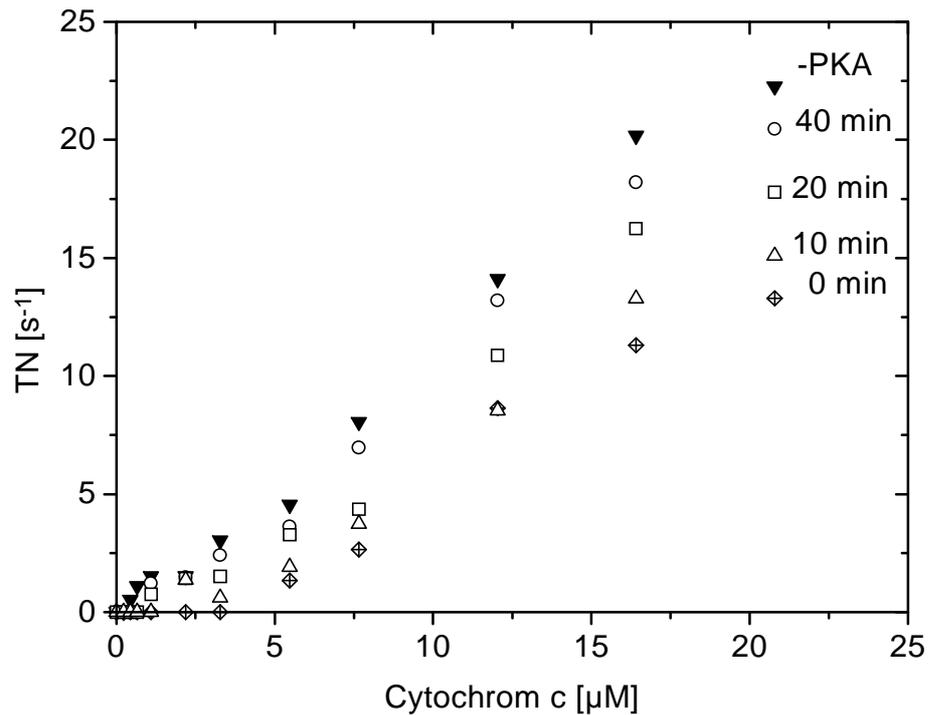


Abb.17: Dephosphorylierung der Rinderherz COX mit Proteinphosphatase 1. Die mit ATP und Cardiolipin vorinkubierte COX wurde mit 5 mM ATP, ATP-regenerierendem System 200 U/mL PKA und 50 μM cAMP 20 min bei 30° C inkubiert und im Anschluß mit 500 U/mL Proteinphosphatase 1 (C_α Untereinheit) und 100 μM MnCl₂ 10-40 min inkubiert. Die Aktivität wurde polarographisch bei 25° C in Gegenwart von ATP gemessen.

5.3.5 Einfluß von Ca^{2+} auf die Aktivität gelöster Cytochrom c Oxidase

Im Kapitel 5.2 konnte die cAMP-abhängige ATP-Inhibierung der COX-Aktivität von solubilisierten Mitochondrien durch Inkubation mit Calciumchlorid aufgehoben werden. Daher wurde untersucht, wie Ca^{2+} auf die Aktivität der cAMP-abhängig phosphorylierten COX wirkt. Die mit Proteinkinase A, ATP und cAMP vorinkubierte gelöste COX wurde im Anschluß mit $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 für 20 min bei 30°C inkubiert. In Abb.18 ist die Aktivität der mit (Dreiecke) und ohne (Quadrate) CaCl_2 behandelten COX dargestellt. Die beiden Sättigungskinetiken zeigten keinen Einfluß von Ca^{2+} auf die ATP-Inhibierung der gelösten COX.

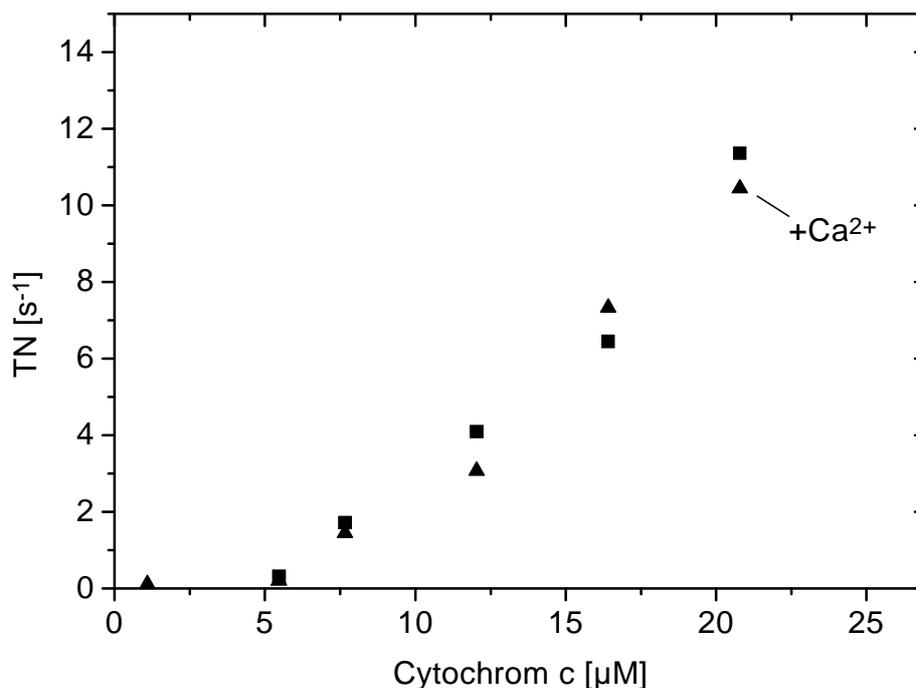


Abb.18: Einfluß von CaCl_2 auf die ATP-gehemmte Aktivität cAMP-abhängig phosphorylierter COX. Das Enzym wurde mit 5 mM ATP und $200 \mu\text{M}$ Cardiolipin 24 h vorinkubiert und mit $50 \mu\text{M}$ cAMP und Proteinkinase A phosphoryliert (Quadrate). Anschließend wurde 20 min in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ CaCl_2 nochmals inkubiert (Dreiecke). Die Atmung wurde polarographisch bei 25°C mit 5 mM ATP, 18 mM Ascorbat und steigender Konzentration Cytochrom c (0-21 μM) gemessen.

5.3.6 Nachweis der cAMP-abhängig mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ phosphorylierten Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz

Markierung gelöster COX

Isolierte COX aus Rinderherz wurde mit Proteinkinase A, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und 0 bis 50 μM cAMP inkubiert. Die Proben wurden in Probenpuffer gelöst und durch SDS-PAGE nach Schagger & von Jagow (1987) in seine Untereinheiten aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie blue angefärbt, getrocknet und autoradiographiert (Abb. 19). In Spur 1 des Gels wurde die Proteinkinase A rein aufgetragen. Hier sind im hochmolekularen Bereich viele Banden zu erkennen, die von den verschiedenen regulatorischen Untereinheiten und der katalytischen Untereinheit herrühren. In der Autoradiographie sind diese Banden stark markiert (Spur 4,6,8). Dies ist durch Autophosphorylierung der Proteinkinase zu erklären (Pearson & Kemp, 1991). Die Autoradiographie zeigt eine deutliche cAMP-abhängige Markierung der Untereinheit Vb und in kleinerem Ausmaß der Untereinheit II/III. Die Markierung der beiden Banden ist in Anwesenheit von 5 μM cAMP (Spur 8) weniger stark als in Anwesenheit von 50 μM cAMP (Spur 4). Die cAMP-abhängige Markierung im Bereich der Untereinheit I kann nicht eindeutig zugeordnet werden, da auch die Proteinkinase A in diesem Bereich migriert.

Legende zu Abb.19 (nächste Seite):

cAMP-abhängige Markierung der COX Untereinheiten II/III und Vb durch Proteinkinase A und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Solubilisierte Rinderherz COX wurde mit 200 U/mL Proteinkinase A (PKA), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und cAMP 20 min bei 30° C wie in der Tabelle angegeben inkubiert. Zur SDS-PAGE Analyse wurde ein Gelsystem nach Schagger angewandt und mit Coomassie Blue angefärbt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert.

5.4 Untersuchungen an rekonstituierte Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz

5.4.1 Effekt von Proteinkinase A und cAMP

In dem vorhergehenden Kapitel wurde eine cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheiten II (und/oder III) und Vb der COX durch radioaktive Markierung nachgewiesen. Die Untereinheit II hat zwei transmembrane Helices und eine cytosolische Domäne. Die Untereinheit Vb ist auf der Matrixseite lokalisiert. Durch Rekonstituieren des Enzyms in Phospholipidvesikel erzeugt man ein System mit dem unterschieden werden kann, auf welcher Seite des Enzyms (Matrix oder Cytosol) der Effektor, in diesem Falle die cAMP-abhängige Proteinkinase, angreift.

In der folgenden Abb. 21A ist die Aktivität der mit ATP, ATP-regenerierendem System und cAMP-abhängiger Proteinkinase vorinkubierten und anschließend rekonstituierten COX aus Rinderherz gezeigt. Die Behandlung mit ADP führt zu einer hyperbolischen Aktivitätskurve (Basisdreiecke). In Gegenwart von ATP und ATP-regenerierendem System wird eine ebenfalls hyperbolische Kurve mit auf 36 % verminderter COX-Aktivität beobachtet (Rhomben). Zusätzliches cAMP hat keine Wirkung auf die Aktivität der COX (Spitzdreiecke). Inkubation in Gegenwart von ATP, ATP-regenerierendem System, cAMP und Proteinkinase A bewirkt eine sigmoidale Kinetik der ATP-gehemmten COX-Aktivität. Die Aktivität ist auf 19 % erniedrigt und zeigt eine „Lagphase“ bis 5 μ M Cytochrom c (geschlossene Quadrate). Diese Änderung des Charakters der S/v-Abhängigkeit wird in Gegenwart von ADP nicht beobachtet (geschlossene Kreise).

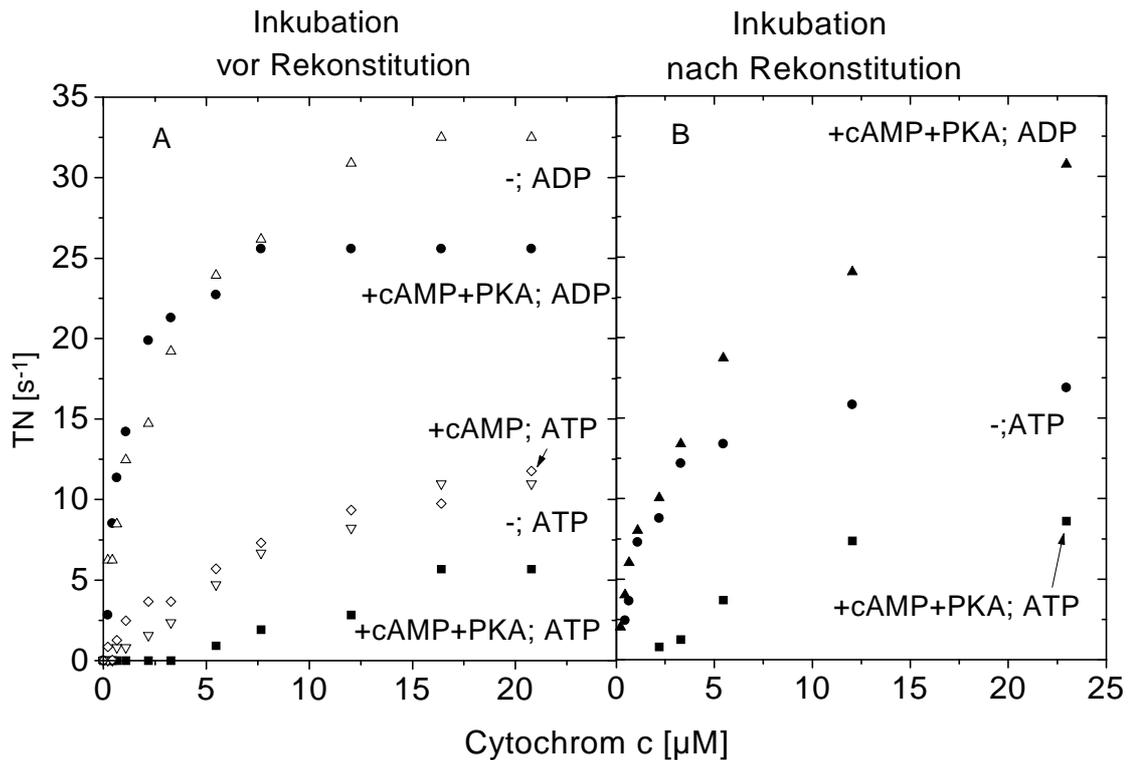


Abb. 21: Einfluß der Phosphorylierung von rekonstituierter Rinderherz COX mit cAMP-abhängiger Proteinkinase A auf die Atmung des Enzyms. A: Isolierte Rinderherz COX wurde in Rekonstitutionspuffer mit Asolektin und Cardiolipin in Gegenwart von 5 mM ADP (Basisdreiecke) oder 5 mM ATP und ATP-regenerierenden System (Rhomben), sowie 50 μM cAMP (Spitzdreiecke) und 32 U Proteinkinase A (geschlossene Symbole) 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben rekonstituiert. Die Messung der Atmung erfolgte polarographisch in Gegenwart von ATP (Quadrante, Spitzdreiecke, Rhomben) oder ADP (Basisdreiecke, Kreise) bei zunehmenden Konzentration von Cytochrom c (0-21 μM). B: Die COX wurde mit 5 mM ATP, Asolektin und Cardiolipin über XAD-2 rekonstituiert. Anschließend wurde in Gegenwart von 5 mM ATP, ATP-regenerierenden System (Kreise) sowie 50 μM cAMP und 32 U Proteinkinase A (Quadrante, Dreiecke) 20 min bei 30°C inkubiert. Die Messung der COX-Atmung erfolgte polarographisch in Gegenwart von ATP (Kreise, Quadrante) oder ADP (Dreiecke). Vor dem Semikolon sind die Inkubationsbedingungen, danach die Meßbedingungen angegeben.

Wird in Gegenwart von ATP rekonstituierte COX nur extraliposomal mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase in Gegenwart des ATP-regenerierenden Systems behandelt, so wird die vollständige ATP-Inhibierung nur bis 2,0 μ M Cytochrom c beobachtet (Abb. 21B). Die Aktivität der COX ist in diesem Falle um 50 % höher als bei Inkubation vor der Rekonstitution der COX. Dies könnte auf einer Hydrolyse des ATP in den Liposomen beruhen.

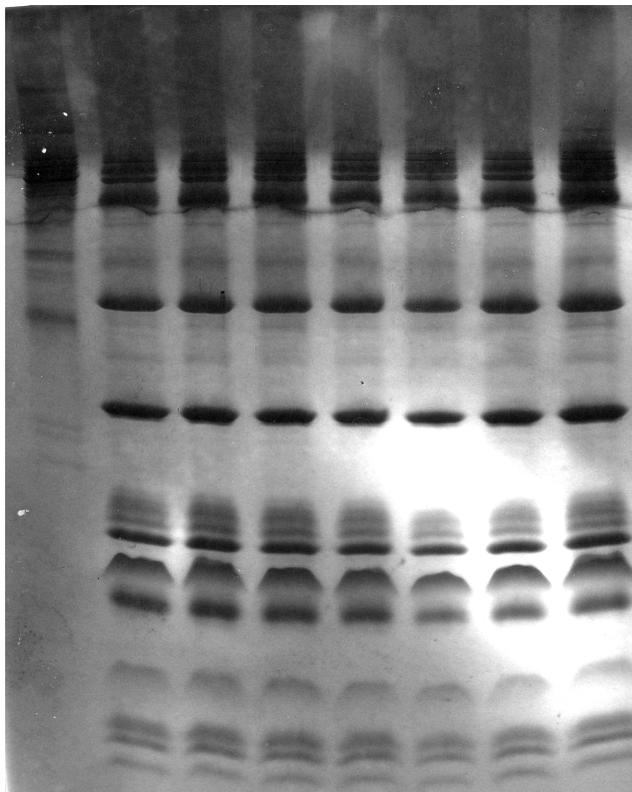
Das Verhältnis zwischen der Aktivität der mit bzw. ohne cAMP-abhängiger Kinase inkubierter COX ist nach der extraliposomalen Inkubation oder der intraliposomalen Inkubation gleich .

Die extraliposomale Einwirkung von cAMP und Proteinkinase A auf die rekonstituierte COX führt zu geringerer ATP-Inhibierung als die Einwirkung von beiden Seiten (Inkubation vor der Rekonstitution). Dies könnte auf verschiedene Phosphorylierungsstellen auf beiden Seiten der Membran beruhen, deren Wirkung auf die ATP-Inhibierung additiv ist.

Coomassie Blue Anfärbung

Autoradiographie

PKA	+		+	+	+	+		+		+		+		+			+	
cAMP	0	0	50	50	0	0	5	5	μM	0	0	50	50	0	0	5	5	μM
ATP			+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	
COX		+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8	



PKA I

II+III

IV

Vb

VIb

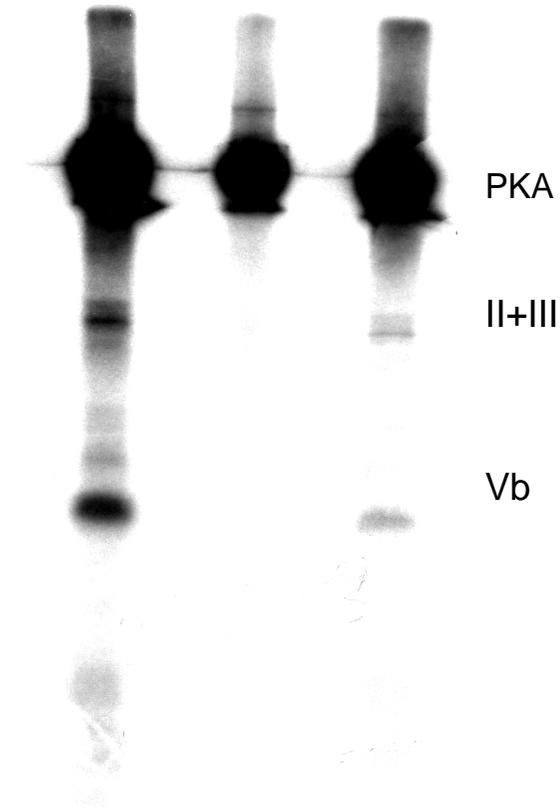
Va

VIc

VIa

VIIabc

VIII



PKA

II+III

Vb

6. Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die bereits beschriebene allosterische ATP-Inhibierung (Arnold & Kadenbach, 1997) der COX Aktivität durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Enzyms induziert wird.

6.1 Induktion der ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase durch Phosphorylierung.

Die Vorinkubation von intakten Mitochondrien mit cAMP in Gegenwart von hohen ATP/ADP-Verhältnissen (in den Experimenten durch den Zusatz eines ATP-regenerierenden System gewährleistet) erniedrigt die COX-Aktivität der solubilisierten Mitochondrien in Gegenwart von ATP und verwandelt den hyperbolischen Verlauf der Cytochrom c/Aktivitäts-Kurve in eine sigmoide Kinetik (vergl. Abb. 1). Die COX-Aktivität der Mitochondrien in Gegenwart von ADP wird durch Inkubation mit cAMP nur um 30 % reduziert und ist von der zugesetzten cAMP Konzentration unabhängig. Eine Änderung des Charakters der Sättigungskurve ist hierbei nicht zu beobachten.

Nach 15 min Solubilisierung/Inkubation bei 0°C mit dem ATP-regenerierenden System ist die Aktivität der bei 25°C mit ATP und ATP-regenerierendem System inkubierten Mitochondrien in Gegenwart von ATP um 38 % höher als von nicht vorbehandelten Mitochondrien. Arnold & Kadenbach (1999) fanden bereits ab 2 % intraliposomalem ADP (ATP+ADP= 5 mM) eine Steigerung der Aktivität bei rekonstituierter COX. Mit mehr als 20 % ADP wurde eine vollständig aktivierte Atmung der COX beschrieben. Vermutlich ist bei der Inkubationstemperatur von 25°C nicht genügend O₂ in der Mitochondriensuspension vorhanden und die mitochondriale ATP-Synthese ist gehemmt. In diesem Falle könnte z.B. die ATPase das ATP/ADP-Verhältnis in den Mitochondrien stark senken. Dadurch sinkt der Anteil des ATP in der Probe mit zunehmender Inkubationszeit stark ab.

Bei 4°C ist die Aktivität aller Enzyme stark vermindert und das ATP/ADP-Verhältnis bleibt hoch. Die Inkubationstemperatur von 4°C begünstigt somit den cAMP-abhängigen Effekt auf die ATP-Inhibierung der COX.

Die sigmoiden Sättigungskinetiken der COX von mit cAMP bei 4°C vorinkubierten intakten Mitochondrien, die im Anschluß bei hohem ATP/ADP-Verhältnissen solubilisiert wurden, weisen eine „Lagphase“ bis 1,7 µM Cytochrom c auf (Abb. 6). Dieser Effekt konnte durch Kaliumfluorid, ein Inhibitor von Serin/Threonin Proteinphosphatasen, während der Inkubation auf 6 µM Cytochrom c erhöht werden.

Die Verminderung der COX-Aktivität in Gegenwart von ATP ist von der Konzentration des zugesetzten cAMP und der Dauer der Inkubation abhängig. Wurde bei 4°C inkubiert, so reichten 50 µM cAMP aus, um den maximalen Effekt auf die „Lagphase“ der Aktivität der COX zu erreichen. Die COX-Aktivität der solubilierten Mitochondrien bei Substratkonzentrationen > 6 µM konnte durch Erhöhung der cAMP Konzentration (bis zu 500 µM) noch weiter erniedrigt werden.

In Gegenwart von 50 µM cAMP wird nach 10 min keine weitere Änderung der COX-Aktivität beobachtet. Wurde nur mit einem zehntel der Menge cAMP inkubiert, so war nach 60 min noch eine Erniedrigung der Aktivität zu beobachten. Die Aktivität entsprach dann annähernd der erniedrigten Atmung bei Inkubation mit 50 µM cAMP. Die Reaktion, hier die cAMP-abhängige Phosphorylierung der COX durch eine endogene Proteinkinase, ist in Gegenwart von 50 µM cAMP somit nach 10 min abgeschlossen.

Die beobachtete allosterische ATP-Inhibierung tritt nur nach einer Behandlung der Mitochondrien mit cAMP auf. Versuche mit cGMP, ein weiterer *second messenger*, zeigten keinen Effekt auf die Ascorbatatmung solubilisierter Mitochondrien. Die Phosphorylierung der COX ist somit auf eine cAMP-abhängige endogene Proteinkinase zurückzuführen.

In der Vergangenheit sind verschiedene mitochondriale cAMP-abhängige Proteinkinasen beschrieben worden, deren Zielmolekül die COX sein könnte. Von Burgess & Yamada (1987) ist in Rinderherz Mitochondrien die Aktivität

einer cAMP-abhängigen, mitochondrialen Proteinkinase nachgewiesen worden. Des Weiteren ist in immunologischen und enzymatischen Studien der Nachweis für eine cAMP-abhängige Proteinkinase A in der Innenmembran/Matrix von Rattenleber- und Rattenherzmitochondrien erbracht worden. Die Immunoblots wiesen neben der regulatorischen Untereinheit, welche an die Membran gebunden ist, auch die katalytische Untereinheit nach (Schwoch *et al.*, 1990).

Die durch Phosphorylierung bewirkte ATP-Inhibierung der COX in solubilisierten Mitochondrien kann durch Inkubation der Mitochondrien mit Ca^{2+} aufgehoben werden. Calciumionen sind Aktivatoren verschiedener Proteinphosphatasen, wie z.B. der Proteinphosphatase 2B. Die Protein-phosphatase 2B ist dafür bekannt Proteinphosphatase 1 durch Dephosphorylierung von Inhibitor-I zu aktivieren und so die Wirkung von cAMP in der Zelle zu schwächen (Cohen, 1989).

Obwohl bereits eine Ca^{2+} Bindungsstelle in der Kristallstruktur der Oxidase gefunden wurde, ist ein direkter Einfluß von Calciumionen auf die COX nicht bekannt (Kirchenko *et al.* 1998). Der hier gezeigte Versuch an isolierter COX (Abb.18) zeigt, daß Calcium keinen direkten Einfluß auf die allosterische ATP-Inhibierung hat. Es kann somit angenommen werden, daß in Mitochondrien durch Ca^{2+} -Ionen Proteinphosphatasen aktiviert werden. Das Verhältnis zwischen phosphoryliertem und dephosphoryliertem Zustand der Oxidase wird dann zugunsten des dephosphorylierten Enzyms verschoben. Als Folge der Verschiebung des Gleichgewichts geht die sigmoide Kinetik auch bei hohem ATP/ADP-Spiegel in eine hyperbolische über.

Mit Hilfe cAMP-abhängiger Proteinkinase A aus Rinderherz konnte an inkubierter Rinderherz COX cAMP-abhängig eine allosterische ATP-Inhibierung mit einer „Lagphase“ bis 5 μM Cytochrom c erzeugt werden. Dies entspricht der bei Mitochondrien durch Vorinkubation mit cAMP erreichten „Lagphase“ von 5-6 μM Cytochrom c. Durch Verminderung der Konzentration des Proteinkinase aktivierenden cAMP auf 5 μM konnte die Ausprägung der Sigmoidität erniedrigt werden. Konzentrationen von über 50 μM cAMP bewirkten keine Verstärkung der „Lagphase“.

Die ADP-Atmung der isolierten COX wird durch Vorinkubation mit ATP, PKA und cAMP nicht beeinflusst, im Gegensatz zur COX-Aktivität inkubierter Mitochondrien, die um 30 % gehemmt wurde (Abb. 8). Die Modifikation der Oxidase durch die cAMP-abhängige Proteinkinase inhibiert nur die Aktivität bei hohen ATP/ADP-Verhältnissen, also im Falle eines geringen Energiebedarfs der Zelle.

Die Erniedrigung der COX-Aktivität von vorinkubierten solubilisierten Mitochondrien in Gegenwart von ADP ist somit nicht mit einer cAMP-abhängigen Modifikation der COX zu begründen. Möglich wäre eine cAMP-unabhängige Phosphorylierung der Oxidase in den Mitochondrien wie Steenaart & Shore (1997) gefunden haben.

Analoge Beobachtungen wurden an Proteoliposomen mit vor der Rekonstitution phosphorylierter COX gemacht. Die extraliposomale Inkubation rekonstituierter COX mit Proteinkinase A und cAMP bewirkt eine sigmoide ATP-Inhibierung, allerdings ist die „Lagphase“ wesentlich kürzer als bei COX, die von beiden Seiten inkubiert wurde. Das Verhältnis der Aktivitäten von mit bzw. ohne cAMP-abhängiger Proteinkinase inkubierter COX ist nach der extraliposomalen oder extra-/intraliposomalen Inkubation gleich. Offenbar beeinflusst extraliposomale Phosphorylierung die von Napiwotzki & Kadenbach (1998) bei hohem ATP/ADP-Spiegel beobachtete ATP-Bindungsstelle an der cytosolische Domäne der Untereinheit IV und die damit verbundene Änderung des K_M für Cytochrom c.

Eine zusätzliche Phosphorylierung an der Matrixdomäne der COX bewirkt die Verstärkung der „Lagphase“, vermutlich durch Beeinflussung der ATP-Bindungsstelle die für die sigmoide Kinetik der COX verantwortlich ist (Arnold & Kadenbach, 1997). Diese Argumente werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen der radioaktiven Markierung der COX ausführlicher diskutiert.

Die Variation der zugesetzten Cardiolipinkonzentration zur solubilisierten COX zeigt, daß dieses Phospholipid benötigt wird, um eine sigmoide Kinetik am gelösten Enzym zu beobachten.

In dem isolierten Rinderherz-Enzym sind drei Moleküle Cardiolipin gefunden worden (Gomez & Robinson, 1999). Diese sind fest an den Enzymkomplex gebunden und essentiell für den maximalen Elektronentransport. Cardiolipin ist

nicht direkt an der Cytochrom c Bindung beteiligt, doch ist nicht auszuschließen, daß es die Konformation oder konformative Flexibilität der Oxidase beeinflusst (Robinson, 1993). Rattenherz Mitochondrien zeigten eine Reduktion der COX Aktivität nach Peroxidation der Membranlipide mit t-BuOOH/Cu²⁺ wobei insbesondere Cardiolipin peroxidiert wurde (Paradies *et al.*, 1998). Peroxidiertes Cardiolipin ist nicht in der Lage, mit COX zu interagieren (Robinson *et al.*, 1990).

Gemäß dem Symmetrie-Modell der Kooperativität (Bisswanger, 1979) wird eine sigmoide Sättigungskurve nur dann beobachtet, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- die Anzahl der Bindungsstellen des Substrats an dem Komplex ist größer als eins.
- das Gleichgewicht zwischen dem gespannten (T-Zustand) und dem entspannten Zustand (R-Zustand) des ligandfreien Komplexes liegt mehr auf der Seite des gespannten Zustands.
- der Ligand bindet wesentlich besser an den entspannten Zustand und stabilisiert diesen.

Die Funktion des Cardiolipins könnte demnach die Begünstigung des T-Zustandes des ligandfreien Komplexes sein. Ist das gebundene Cardiolipin durch Lagerung der COX oxidiert, so kann es nicht mit dem Enzym interagieren und die postulierte Funktion erfüllen. Der Zusatz von intaktem Cardiolipin ermöglicht den Austausch und somit die Regeneration der COX

Die durch Phosphorylierung mit Proteinkinase A beobachtete sigmoide Sättigungskinetik gelöster COX konnte durch Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1 aufgehoben werden. Die Phosphorylierung der COX ist somit reversibel, wie alle bekannten Phosphorylierungen die der Regulation eines Enzyms dienen (Krebs, 1993).

Die Daten der kinetischen Studien an Mitochondrien legen die Vermutung nahe, daß unter Standardbedingungen der Isolierung der Mitochondrien die allosterische ATP-Inhibierung der COX verloren geht. Dies könnte durch spontane Dephosphorylierung oder durch endogene Proteinphosphatasen

geschehen. Das erklärt warum der Effekt der allosterischen ATP-Inhibierung der COX vor 1997 nicht gefunden wurde.

6.2 Nachgewiesene cAMP-abhängige Phosphorylierungsstellen der Cytochrom c Oxidase

Die radioaktive Markierung von gelöster COX mit cAMP-abhängiger Proteinkinase A und [γ - ^{32}P]-ATP zeigt an den Untereinheiten Vb, II (und/oder III) cAMP-abhängige spezifische Markierungen und wahrscheinlich an der Untereinheit I eine cAMP-unabhängige spezifische Markierung.

Der Zusammenhang zwischen cAMP-abhängiger radioaktiver Markierung der Untereinheiten II + Vb und die Erhöhung der allosterischen ATP-Inhibierung der Aktivität der COX läßt auf eine Beteiligung dieser Untereinheiten an der allosterischen Inhibition schließen. Die allosterische ATP-Inhibierung wird durch die Bindung von ATP an die Matrixdomäne der Untereinheit IV verursacht (Arnold & Kadenbach, 1997). Die Untereinheit Vb ist der Matrixdomäne der IV benachbart und könnte durch Änderung der Konformation die Bindung von ATP an die IV beeinflussen.

Die Markierung der Untereinheit Vb steht im Einklang mit der Beobachtung von Yang *et al.* (1998), daß eine regulatorische Untereinheit der PKA an der Untereinheit Vb der COX assoziiert vorliegt. Eine Phosphorylierung ist in dieser Region also durchaus zu erwarten. Studien von Papa *et al.* (1999) bestätigen den Befund einer cAMP-abhängigen Proteinkinase an der Matrixseite der Innenmembran. Aufgrund von vergleichenden Experimenten mit cAMP und butyr-cAMP postulieren die Autoren zusätzlich eine cAMP Bindungsstelle der regulatorischen Untereinheit auf der cytosolischen Seite der Innenmembran.

Die Kristallstruktur der Rinderherz COX wurde von mir nach cAMP-abhängigen Phosphorylierungssequenzen an zugänglichen Stellen der radioaktiv markierten Untereinheiten abgesucht. In der Abb. 23 ist ein Ausschnitt der Kristallstruktur der COX mit der Untereinheit Vb (hellgrün) gezeigt. Die Serinreste 40 und 84 einer möglichen Phosphorylierungssequenz (RXXS₈₄ [cAMP-abhängig] oder

KXXS₄₀ [cGMP-abhängig]) sind rot dargestellt. Sie sind von der Matrixseite des Enzymkomplexes durch eine Proteinkinase leicht angreifbar. Das Ser84 liegt innerhalb der Sequenz des Zinkfingermotivs, neben einem der vier Zn²⁺-koordinierenden Cysteine (Abb. 23, orange). Die Konformation dieses Motivs deutet allerdings nicht auf eine Funktion als Zinkfinger hin (Tsukihara *et al.*, 1996), die physiologische Funktion ist bisher unbekannt.

Die Massenspektroskopische Analyse der Untereinheit Vb fand im N-terminalen tryptischen Fragment (Aminosäure1 bis 18) eine Phosphatgruppe (Lottspeich, persönliche Mitteilung). Dieses Fragment beinhaltet die Reste Ser2, Thr8 und Thr14 (Abb. 23, gelb). Keine dieser Aminosäuren ist jedoch nicht in ein bekanntes Phosphorylierungsmotiv der cAMP-abhängigen Proteinkinase eingebunden.

Wie die Markierungsexperimente mit Liposomen gezeigt haben, wird die Untereinheit II auf der cytosolischen Seite des Enzyms phosphoryliert. Proteinkinase A-Isozyme werden in dieser Region ebenfalls durch regulatorische Untereinheiten lokalisiert. Ein Proteinkinase A-Anker-Protein ist an der Cytoplasmaseite der Mitochondrienmembran nachgewiesen worden. Seine Expression wird vom Thyroid stimulierenden Hormon (TSH) und von cAMP reguliert, und verstärkt die Sensitivität der Proteinkinase A gegenüber cAMP (Felicciello *et al.*, 1998).

Eine Phosphorylierungssequenz (KXS₂₂₃XS₂₂₅) an der Untereinheit II liegt an einer sehr exponierten Stelle auf der cytosolischen Seite (Abb. 24, Ser225 und Ser223: rot) in einer frei zugänglichen α -Helix. Diese Helix ist in der Nachbarschaft zum C-terminalen Ende der Untereinheit IV (hellblau) und könnte daher die dort postulierte ADP/ATP-Bindungsstelle (Napiwotzki & Kadenbach., 1998) beeinflussen.

Das Phosphorylierungsmotiv RXXS₁₅₅ der Untereinheit II (Abb. 24, Ser155: rot) liegt ebenfalls auf der Cytosolseite in der Nähe der Untereinheit VIb (grün). Der postulierte Mechanismus der allosterischen ATP-Inhibierung, vermittelt durch die Kooperativität der zwei Bindungsstellen für Cytochrom c in den zwei Monomeren des Enzyms über Untereinheit VIb (Tsukihara *et al.*, 1996, Arnold &

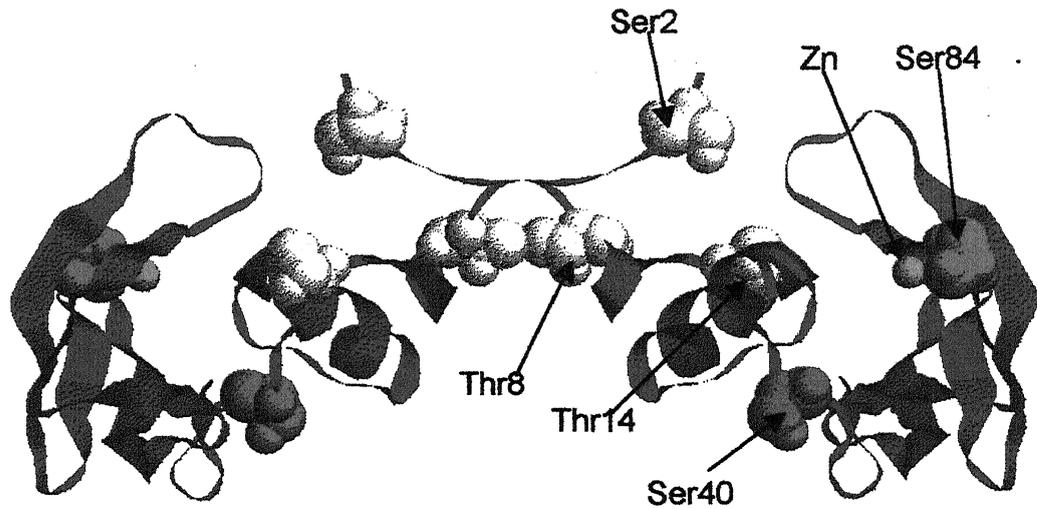


Abb. 23: Darstellung der Struktur der Untereinheit Vb im Dimer der Rinderherz Cytochrom c Oxidase (Tsukihara *et al.*, 1996). Die beiden Untereinheiten Vb sind in der seitlichen Ansicht gezeigt. Das Zinkatom ist orange, die Aminosäurereste in einem cAMP/cGMP-abhängigen Phosphorylierungsmotiv sind rot dargestellt. Die möglichen phosphorylierten Aminosäuren im N-terminalen tryptischen Fragment sind gelb dargestellt.

Kadenbach, 1997), benötigt möglicherweise auch die Phosphorylierung dieses Ser155 der Untereinheit II. Wie die oben bereits diskutierten kinetischen Studien an extraliposomal phosphorylierter COX zeigten, bewirkt die Phosphorylierung der Untereinheit II nur zum Teil die allosterische ATP-Inhibierung der COX. Es ist eher anzunehmen, daß der K_M des Cytochrom c bei hohem ATP/ADP-Verhältnis verändert wird. Dies ist durchaus denkbar, da Ser155 sich im Bereich der Cytochrom c Bindungsstelle befindet und auch in diesem Bereich eine ATP/ADP Bindungsstelle vermutet wird, die den K_M für Cytochrom c beeinflußt.

Die in der Untereinheit I gefundenen cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle Ser441 (Abb.24, rot) des Phosphorylierungsmotivs (RRXS₄₄₁) liegt an der cytosolischen Seite in der Nachbarschaft zur Untereinheit II (Abb. 24 und 25). In der Untereinheit III wird ein cAMP-abhängiges Phosphorylierungsmotiv (RXS₆₅) an der Matrixseite des Enzyms gefunden (Abb. 25). Der Serinrest liegt jedoch im Inneren des Enzyms, so daß ein Angriff durch eine Proteinkinase unwahrscheinlich ist.

Die cAMP-abhängige Inkubation mit [γ -³²P]-ATP und anschließende 2D-Blue-Native-SDS-PAGE-Analyse intakter Rinderleber Mitochondrien ergab im Bereich der COX drei radioaktive Markierungen. Mit Hilfe der 2D-Blue Native-SDS-PAGE gelang es Papa *et al* (1996), die cAMP-abhängige Phosphorylierung der 18 kDa Untereinheit des Komplexes I, jedoch nicht des Komplexes IV, unter Verwendung der Innenmembranfraktion von Rinderherz Mitochondrien nachzuweisen. Dieses Protein ist auf der Matrixseite lokalisiert. In aus mit Glucagon behandelten Hepatocyten isolierten Mitochondrien wurde ein ³²P-markiertes Protein der Innenmembran isoliert und als die Untereinheit IV der COX angenommen (Soboll, 1998), jedoch weist die Untereinheit IV keine Konsensussequenz für eine cAMP-abhängige Phosphorylierung auf. Die verwendeten unterschiedlichen Versuchsbedingungen führen vermutlich zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen.

Ein erschwerender Umstand beim Nachweis von phosphorylierten mitochondrialen Proteinen und der Untersuchung ihrer Funktion, ist die Kurzlebigkeit der Phosphorylierung (Müller & Bandlow, 1987b).

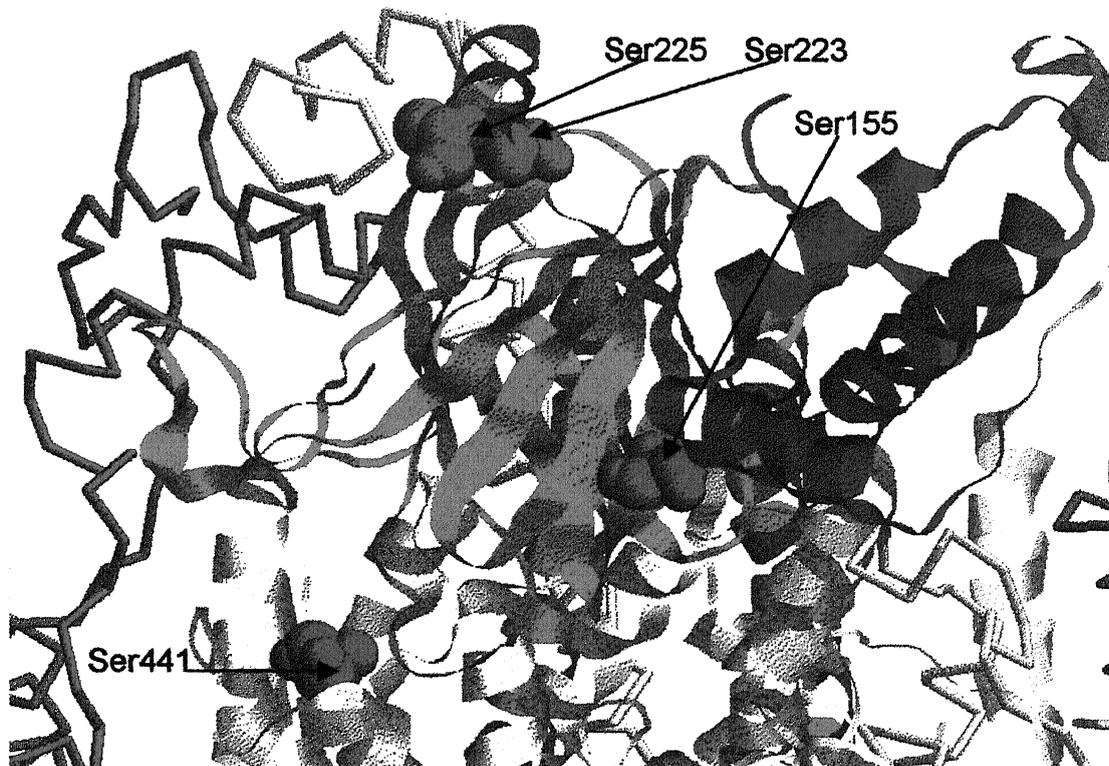


Abb. 24: Ausschnitt aus der Struktur des dimeren Komplexes der Rinderherz Cytochrom c Oxidase (Tsukihara *et al.*, 1996). Die Untereinheit II ist orange, Untereinheit I gelb, Untereinheit VIb grün und Untereinheit IV hellblau dargestellt. Die übrigen dargestellten Untereinheiten sind grau. Die *van der Waals* Radien der möglichen cAMP/cGMP-abhängig phosphorylierten Serine der Untereinheiten I und II sind rot dargestellt.

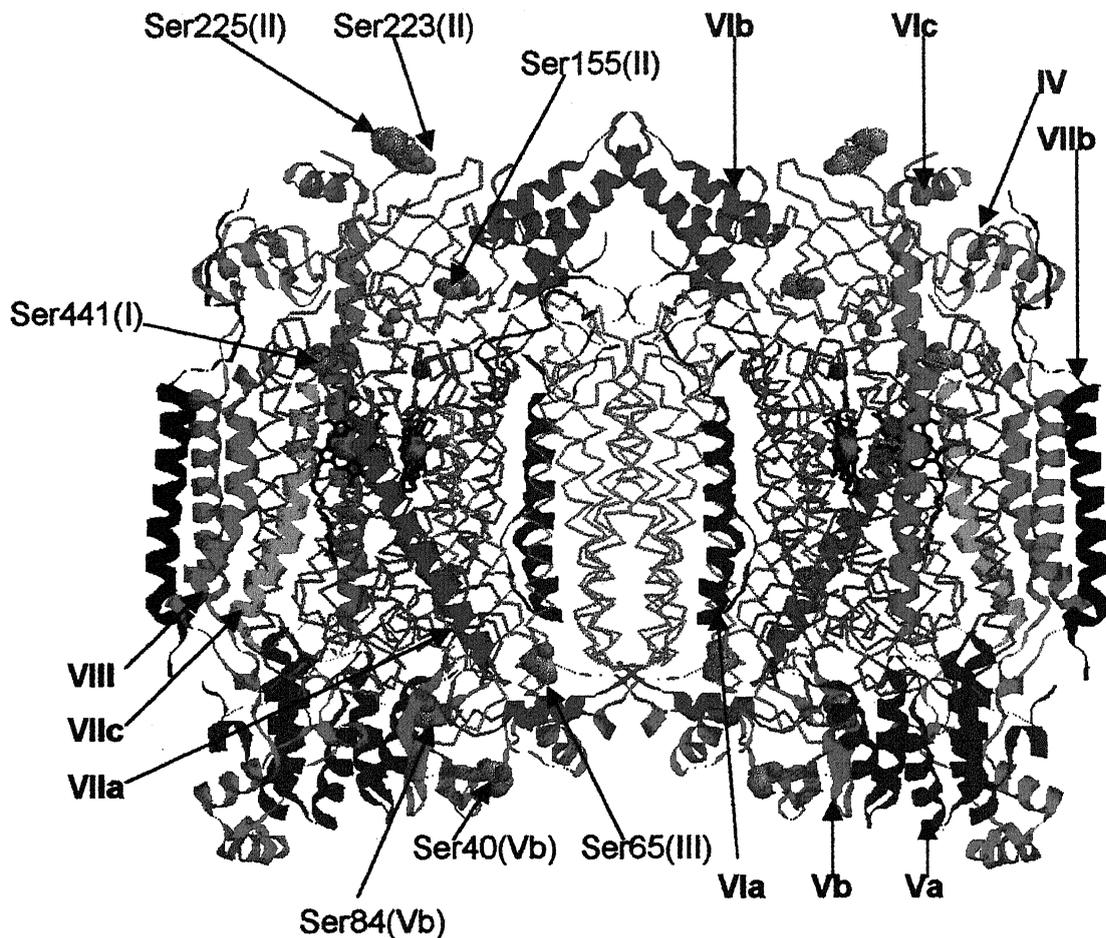


Abb. 25: Struktur des dimeren Komplexes der Rinderherz Cytochrom c Oxidase (Tsukihara *et al.*, 1996). Die möglichen cGMP/cAMP-abhängig phosphorylierten Aminosäuren sind in *van der Waals* Radien dargestellt. Die kernkodierte Untereinheiten sind als α -Helices und β -Faltblattstrukturen dargestellt. Von den mitochondrial kodierten Untereinheiten ist nur das Aminosäure-Rückgrat gezeigt. Die Häm-Gruppen sind schwarz mit roten Eisenatomen, die Kupferatome sind hellblau und die Zinkatome gelb dargestellt. Untereinheiten I und III: grau □, Untereinheit II: gelb ■, Untereinheit IV: hellblau ■, Untereinheit Va: violett ■, Untereinheit Vb: rot ■, Untereinheit VIa: dunkelgrün ■, Untereinheit Vlb: grün ■, Untereinheit Vlc: pink ■, Untereinheit VIIa: grün ■, Untereinheit VIIb: schwarz ■, Untereinheit VIIc: orange ■, Untereinheit VIII: rotorange ■.

6.3 Hypothese über die physiologische Bedeutung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase

Die COX hat als terminales Enzym der Elektronentransportkette eine besondere Stellung in dem Energiemetabolismus, da sie :

-Die Reaktion mit der größten freien Enthalpie der Atmungskette katalysiert ($\Delta G^\circ = -110 \text{ kJ/mol}$).

-Sauerstoff in einer irreversiblen Reaktion reduziert, dessen Konzentration *in vivo* 5 bis 25 μM beträgt. (Boveris et al., 1999). Der K_M der COX für O_2 ist jedoch klein (10^{-6} - 10^{-7}).

6.3.1 Kontrolle der Atmung durch Hormonsignale

6.3.1.1 Anschalten der ATP-Inhibierung durch Phosphorylierung

Im Gegensatz zur prokaryontischen Zelle, deren Metabolismus und Vermehrungsrate hauptsächlich von dem Substratangebot abhängt, ist es für die eukaryontische Zelle der Säugetiere sinnvoller, keine der vom Organismus aufgenommene Nahrung zu verschwenden. Der Energiemetabolismus von Säugetieren muß sich daher auf den äußerst variablen Energiebedarf des Organismus in kurzer Zeit einstellen können, wie z.B. durch Kopplung der mitochondrialen Atmung mit dem ATP-Verbrauch der Zelle oder durch erhöhte Thermogenese bei niedrigen Temperaturen. Auch eine effiziente Verwertung von Nahrung bei Hunger, Abbau von überschüssig aufgenommener Nahrung und die Stimulation der ATP Synthese unter Streßbedingungen müssen von der Zelle bewältigt werden. Zwischen den beiden extremen Zuständen des Organismus, einerseits in Ruhe (wenig Energiebedarf der Zellen) und andererseits bei Reaktion auf Streß (z.B. bei Flucht: maximale Arbeit des Muskels), die eine schnelle Bereitstellung von Energie fordert, müssen die energieliefernden Enzymkomplexe schnell und effizient umschalten können. Das ATP/ADP-Verhältnis ist eine Größe, die den aktuellen Energiebedarf der Zelle signalisiert.

Die Regulation der Elektronentransportkettenkomplexe (neben der ATP-Synthase) durch den ATP-Spiegel erscheint somit als sinnvoll, da dann das System schneller auf neue Bedingungen reagieren kann.

Neben der Kontrolle der mitochondrialen Atmung und Synthese von ATP durch das Angebot an Substraten war bisher nur die Kontrolle durch das Membranpotential bekannt (chemiosmotische Hypothese).

Ein zweiter Mechanismus der Atmungskontrolle, die allosterische Inhibierung der COX bei hohen ATP/ADP Verhältnissen, wurde in der Arbeitsgruppe postuliert (Kadenbach & Arnold, 1999).

Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse wird postuliert, daß *in vivo* COX (und wahrscheinlich auch die anderen Komplexe der Atmungskette) von mitochondrialen cAMP-abhängigen Proteinkinasen phosphoryliert wird, welches die allosterische ATP-Inhibierung der COX anschaltet. Unter diesen Bedingungen ist die mitochondriale Atmung von der COX kontrolliert und das mitochondriale Membranpotential ist niedrig, wie an perfundierten Herzen beobachtet (100-130 mV) (Wan *et al.*, 1993). In diesem Falle sollte die Effizienz der Ernergieerzeugung hoch sein, da der unspezifische *leak* von Protonen über die mitochondriale Membran gering ist (O'Shea *et al.*, 1984), und kein *slip* in COX bei niedrigem Membranpotential (Murphy, 1989) auftritt.

3,5-Diiodo-L-thyronin kann die ATP-Inhibierung aufheben, indem es an die Untereinheit Va bindet (Arnold *et al.*, 1998).

Was ist der physiologische Sinn solch einer fast vollständigen Hemmung der COX? Wenn die Umgebung einen hohen ATP/ADP-Spiegel aufweist, so bedeutet dies, daß genug Energieträger (ATP) der Zelle zur Verfügung stehen, eine weitere Produktion von ATP ist nicht nötig. Daher ist es auch ineffektiv für die Zelle, wenn weiter Protonen über die Innenmembran der Mitochondrien gepumpt werden, da die im Protonengradient gespeicherte Energie bei hohem Membranpotential durch *leak* verloren geht.

6.3.1.2 Ausschalten der ATP-Inhibierung durch Dephosphorylierung

Extrazelluläre Signale, z.B. Hormone, erhöhen die Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien. Dies aktiviert mitochondriale Ca^{2+} -abhängige Proteinphosphatasen, mit der Folge einer Dephosphorylierung der COX. Wie an Mitochondrien durch Ca^{2+} Zugabe gezeigt wurde, hebt Dephosphorylierung der COX die Atmungskontrolle durch das intramitochondriale Nukleotidverhältnis auf. Die Atmung ist nun durch die protonenmotorische Kraft Δp kontrolliert. Dies ermöglicht eine erhöhte Atmung und ein erhöhtes Membranpotential der Mitochondrien. In isolierten Mitochondrien wurde auch ein erhöhtes Potential von 180-200 mV gefunden (Hafner et al., 1988, Nicholls & Ferguson, 1992). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, verlieren isolierte Mitochondrien normalerweise die allosterische ATP-Inhibierung der COX-Aktivität während der Isolierung. Das erhöhte Potential begünstigt slip (erniedrigte H^+/e^- Stöchiometrie) in der COX und die Erhöhung der freien Energie der Reaktion ΔG° , dies erhöht die COX-Aktivität. Die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus könnte eine Erhöhung der Gesamtrate der ATP Synthese unter Streßbedingungen und/oder die Erhöhung der Thermogenese sein.

6.3.2 Konsequenzen des Verlustes der Atmungskontrolle durch das ATP/ADP-Verhältnis

Ein für die Zelle nachteiliger Effekt des erhöhten Membranpotentials ist die vermehrte Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) in den Mitochondrien (Kadenbach *et al.*, 1999). ROS greifen Biomoleküle wie Proteine, DNA oder Lipide an und zerstören/mutieren diese durch Oxidation (Wallace, 1999). Dabei sind die mitochondrialen Enzyme und die mitochondriale DNA (mtDNA) besonders betroffen, da sie dem Entstehungsort der ROS sehr nahe sind. Die deletierende Mutation der mtDNA ist ein wichtiger Faktor des Alterungsprozesses (Kadenbach & Müller-Höcker, 1990).

Die 4977 bp Deletion („common deletion“) der mtDNA, erstmals charakterisiert in Patienten mit dem Kearns-Sayre-Syndrom (Schon *et al.*, 1989), war die erste mtDNA Deletion die mit dem Alterungsprozeß in Verbindung gebracht wurde (Cortopassi & Arnheim, 1990).

Es ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Zunahme dieser 4977bp Deletion und der Abnahme der COX-Aktivität isolierter Mitochondrien im Menschen gefunden worden (Gadaleta *et al.*, 1998). Nach der mitochondrialen Theorie des Alterns neigen postmitotische Zellen mit steigendem Alter dazu, mtDNA Mutationen anzusammeln (Lui, *et al.*, 1998, Zhang *et al.* 1998), De Grey (1998) postulierte, daß in Mitochondrien mit mutierter mtDNA die Atmungskettenenzyme weniger aktiv sind und dadurch weniger ROS in diesen Mitochondrien entstehen. Diese Mitochondrien sind der Zerstörung durch freie Sauerstoffradikale (ROS) weniger ausgesetzt und erleiden seltener einen lysosomalen Abbau. Dadurch ist die Erhöhung des Anteils der mutierten Mitochondrien in der Zelle möglich.

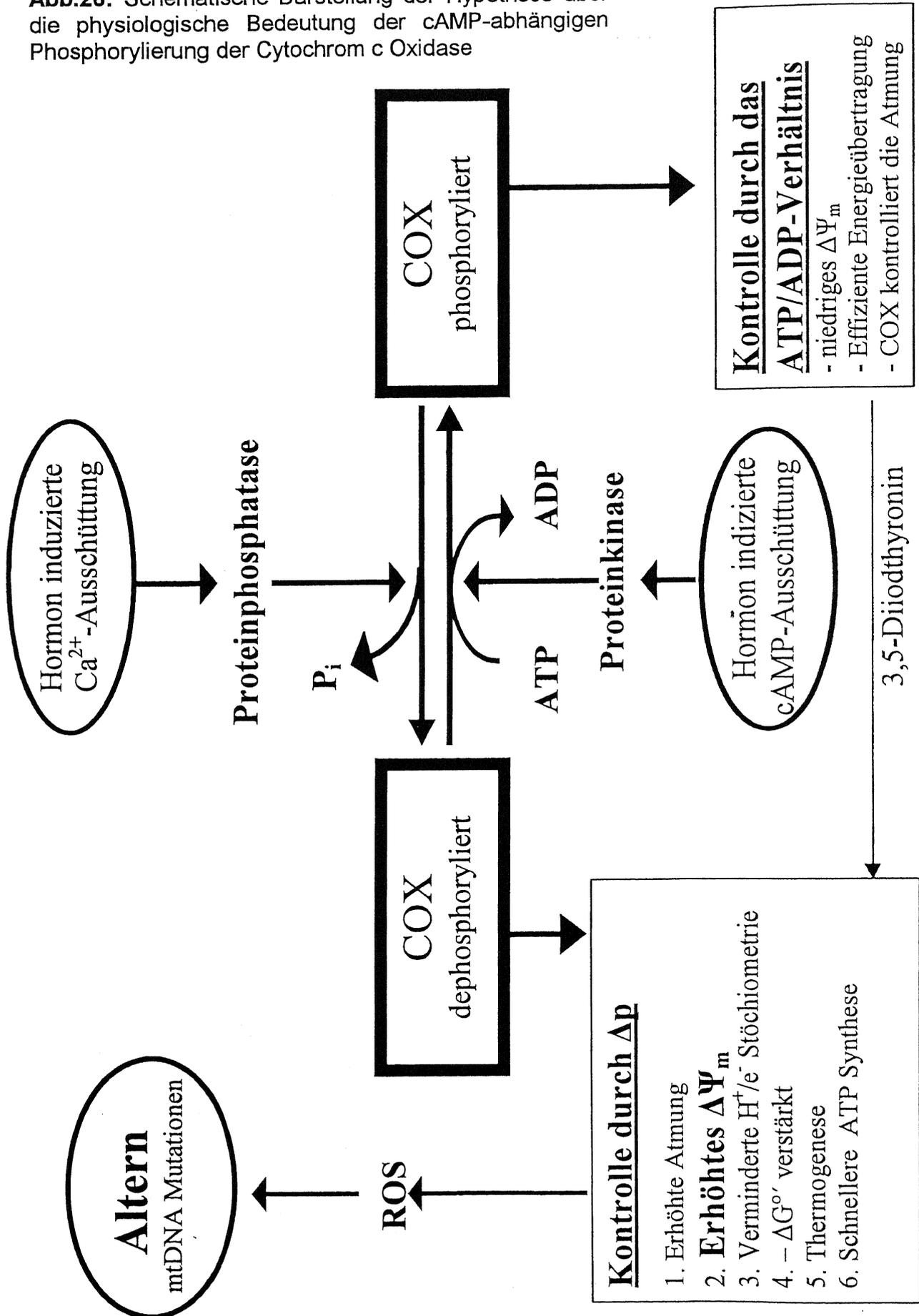
Akuter Streß durch ROS steht in Verdacht den kontrollierten Zelltod (Apoptose) auszulösen (Lenaz *et al.*, 1999). Die beiden Apoptose auslösenden Faktoren Ca^{2+} und ROS stehen unter bestimmten Bedingungen in direkter Beziehung: ROS stimulieren eine spezifische Ca^{2+} Ausschüttung von Mitochondrien und dies erhöht die ROS Produktion (Richter *et al.*, 1996).

Exzessive intrazelluläre Calciumionen-Konzentrationen tragen zu cytotoxischen Ereignissen bei, die zur Produktion von ROS, Apoptose oder Nekrose führen

(Richter, 1998). Zu diesen Ereignissen gehört auch die Überaktivierung von Proteinphosphatasen.

Die auf der nächsten Seite folgende Abb. 26 verdeutlicht die diskutierte Hypothese über die physiologische Bedeutung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der COX nochmals schematisch.

Abb.26: Schematische Darstellung der Hypothese über die physiologische Bedeutung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase



7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, daß die allosterische ATP-Inhibierung der Cytochrom c Oxidase (COX) durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Enzyms induziert wird.

Die Vorinkubation von intakten Rinderlebermitochondrien mit cAMP in Gegenwart von hohen ATP/ADP-Verhältnissen erniedrigt die ATP-gehemmte COX-Aktivität nach Solubilisierung bis zu 7 %. Die Inkubation mit cAMP verwandelt den hyperbolischen Verlauf der S/v-Kurve in eine sigmoide Kinetik mit einer vollständigen Hemmung der COX-Aktivität („Lagphase“) bis 6 μM Cytochrom c.

Die COX-Aktivität der Mitochondrien in Gegenwart von ADP wird durch Inkubation mit cAMP nur um 30 % reduziert. An gelöster COX wurde hingegen keine Verminderung der Aktivität in Gegenwart von ADP nach Inkubation mit ATP, Proteinkinase und cAMP gefunden.

Der Vergleich der ATP-gehemmten Aktivitäten rekonstituierter COX zeigten, daß die Phosphorylierung an der cytosolischen Domäne der COX eine geringe allosterische ATP-Inhibierung indiziert, die durch Phosphorylierung an der Matrixdomäne additiv verstärkt wird.

Die allosterische ATP-Inhibierung der COX war bei Inkubation der Mitochondrien bei 4°C stärker als bei 25°C. Der Zusatz von Kaliumfluorid, einem unspezifischen Inhibitor von Serin-/Threonin-Proteinphosphatasen, während der Inkubation der Mitochondrien führt zu einer signifikanten Verstärkung der vollständigen ATP-Inhibierung der COX-Aktivität.

Der an Mitochondrien gezeigte Effekt der ATP-Inhibierung der COX-Aktivität nach Inkubation mit cAMP ist spezifisch für cAMP. Inkubation mit cGMP hatte keinen Einfluß auf die COX-Aktivität der solubilisierten Mitochondrien.

Der Effekt von cAMP auf die ATP-gehemmte COX-Aktivität in Mitochondrien wird durch Inkubation der Mitochondrien mit Ca^{2+} wieder aufgehoben. Die COX-Aktivität in Gegenwart von ADP wird durch Ca^{2+} nicht beeinflusst. Die Inkubation von gelöster phosphorylierter COX mit Ca^{2+} hat keinen Einfluß auf die ATP-gehemmte COX-Aktivität

Die Vorinkubation von isolierter COX mit Proteinkinase A und cAMP in Gegenwart vom ATP-regenerierenden Systems vermindert die ATP-gehemmte COX-Aktivität

auf 34 %. Die Kinetik der ATP-gehemmten COX-Aktivität ist sigmoid und zeigt eine „Lagphase“ bis 4,5 μM Cytochrom c.

Die kinetischen Untersuchungen an gelöster COX haben gezeigt, daß die ATP-Inhibierung cAMP-abhängig phosphorylierte COX durch Inkubation mit der C_a Untereinheit der Proteinphosphatase 1 aufgehoben wird. Die Phosphorylierung der COX ist somit reversibel.

Experimente mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und cAMP-abhängiger Proteinkinase A an isolierter COX haben eine cAMP-abhängige spezifische Markierung der Untereinheiten II (und/oder III) und Vb ergeben. Die extraliposomale Phosphorylierung rekonstituierter COX zeigt, daß die Untereinheit II (und/oder III) an der cytosolischen Domäne phosphoryliert wird. Sequenzvergleiche ergaben eine cAMP-abhängige Konsensussequenz in der Untereinheit Vb (RXXS₈₄) und eine in der Untereinheit III (RXXS₆₅) die allerdings auf der Matrixdomäne liegt. Zwei Konsensussequenzen sind auf der Untereinheit II (KXXS₂₂₅ und RXXXS₁₅₅), die beide auf der cytosolischen Domäne liegen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird die Hypothese aufgestellt, daß *in vivo* die COX von mitochondrialen cAMP-abhängigen Proteinkinasen phosphoryliert wird. Dadurch wird die allosterische ATP-Inhibierung der COX angeschaltet, und die mitochondriale Atmung ist von der COX kontrolliert. Des weiteren wird postuliert, daß *in vivo* erhöhte Ca^{2+} Konzentrationen die Dephosphorylierung der COX induzieren. Dadurch wird die Kontrolle der mitochondrialen Atmung durch das ATP/ADP-Verhältnis aufgehoben. In diesem Falle wird ein erhöhtes Membranpotential ermöglicht. Dies hat eine vermehrte Produktion von ROS (*reactive oxygen species*) zur Folge, welche durch Mutation der mtDNA den Prozeß des Alterns vorantreiben.

8. Literaturverzeichnis

Arnold, S. & Kadenbach, B. (1997)

Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome c oxidase.

Eur. J. Biochem. 249, 350-354.

Arnold, S., Golgia, F. & Kadenbach, B. (1998)

3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP.

Eur. J. Biochem. 252, 325-330.

Arnold, S. & Kadenbach, B. (1999)

Intramitochondrial ATP/ADP-ratios control cytochrome c oxidase activity allosterically.

FEBS Lett. 443, 105-108.

Anthony, G., Reimann, A. & Kadenbach (1993)

Tissue-specific regulation of bovine heart cytochrome c oxidase activity by ADP via interaction with subunit VIa.

Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 1652-1656.

Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P., Vallone, B. & Brunori, M. (1988)

ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase.

Biochem. J. 256, 835-840.

Barford, D. (1996)

Molecular mechanism of the protein serine/threonine phosphatases.

Trends Biochem. Sci. 21, 407-412.

Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M., Froyso, A., Hansson, V. & Jahnsen, T. (1990)

Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase from human testis-representing a third form isoform for the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase.

Mol. Endocrinol. 4, 465-475.

Bender (1996)

Nachweis von Nukleotidbindungsstellen an der Cytochrom c Oxidase durch Adenosinphosphopyridoxal.

Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg.

Bisson, R. & Schiavo (1986)

Two different forms of cytochrome c oxidase can be purified from the slime mold *Dictyostelium discoideum*.

J. Biol. Chem. 261, 4373-4376.

Bisson, R., Schiavo, G. & Montecucco, C. (1987)

ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase.

J. Biol. Chem. 262, 5992-5998.

Bisswanger, H. (1979)

Theorie und Methoden der Enzymkinetik.

Verlag Chemie, Basel, S. 35-43.

Boveris, A., Costa, L.E., Cadenas, E. & Poderoso, J.J. (1999)

Regulation of Mitochondrial Respiration by Adenosine Diphosphate, Oxygen, and Nitric Oxide.

Methods Enzymol. 272, 188-198.

Brautigan, D. L. & Shriner, C. L. (1988)

Methods to distinguish various types of Protein Phosphatase activity.

Methods Enzymol. 159, 399-346.

Burgess, J.W. & Yamada, E. W. (1987)

cAMP-dependent Protein Kinase isozymes with preference for histone H2B as substrate in mitochondria of bovine heart.

Biochem. Cell Biol. 65, 137-143.

Capaldi, R.A. (1990).

Structure and function of cytochrome c oxidase.

Ann. Rev. Biochem. 59, 569-596.

Capitano, N., Capitano, G., Demariiniss, D.A., De Nitto, E., Massari, S. & Papa, S. (1996)

Factors affecting the H^+/e^- Stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: Influence of the rate of electron flow and transmembrane ΔpH .

Biochemistry 35, 10800-10806.

Cavazzoni, M., Barogi, S., Baracca, A., Castelli, G.P. & Lenaz, G. (1999)

The effect of aging and an oxidative stress on peroxide levels and the mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes.

FEBS Lett. 449, 53-56.

Cohen, P. (1989)

The structure and regulation of protein phosphatases.

Annu. Rev. Biochem. 58, 453-508.

Cohen, P. (1994)

The discovery of protein phosphatases: From chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease.

BioEssay 16(8), 583-588.

Cohen, P. T. W. (1997)

Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life.

Trends Biochem. Sci. 22, 245-251.

- Cortopassi, G.A. & Arnheim, N. (1990)
Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans.
Nucleic Acids Res. 18 6927-6933.
- DeGrey, A.D. (1997)
A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging.
BioEssays 19, 161-166.
- Dimino, M.J., Bieszczad, R.R. & Rowe, M.J. (1981)
Cyclic AMP-dependent Protein Kinase in Mitochondria and Cytosol from
Different-sized Follicles and Corpora Lutea of Porcine Ovaries.
J. Biol. Chem. 256 (21),10876-10882.
- Doskeland, S. O., Maronde, E. & Gjertsen, B. T. (1993)
The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase – functionally different
or redundant?
Biochim. Biophys. Acta 1178, 249-258.
- Dreusicke, D., Karplus, P.A. & Schulz, G.E. (1988)
Refined structure of porcine cytosolic adenylate kinase at 2,8 Å resolution.
J. Mol. Biol. 199, 359-371.
- Egloff, M. P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P..T.W., Cohen, P. &
Barford, D. (1997)
Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit
of protein phosphatase 1.
EMBO J. 16, 1876-1887.
- Erecinska, M. & Wilson, D.F. (1982)
Regulation of cellular energy metabolism.
J. Membr. Biol. 70, 1-14.

Fauman, E. B. & Saper, M. A. (1996)

Structure and function of the protein tyrosine phosphatases.

Trends Biochem. Sci. 21, 413-417.

Faux, M. C. & Scott, J. D. (1996a)

More on target with Protein Phosphorylation: conferring specificity by lokalisation.

Trends Biochem. Sci. 21(8), 312-315.

Faux, M. C. & Scott, J. D. (1996b)

Kinase anchoring and scaffold Proteins.

Cell 85, 9-12.

Feliciello, A., Rubin, C., Avvedimento, E.V., Gottesmann, M.E. (1998)

Expression of a kinase anchor protein 121 is regulated by hormones in thyroid and testicular germ cells .

J. Biol. Chem. 273, 36, 23361-23366.

Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E. (1976)

Correlation of the kinetics of elektron transfer activity of various eukaryotic cytochromes c with binding to mitochondrial cytochrome c oxidase.

J. Biol. Chem. 251, 1104-1115.

Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E. (1978)

Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification

III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochrome c with cytochrome c oxidase.

J. Biol. Chem. 253, 149-159.

Follmann, K., Arnold, S., Ferguson-Miller S., Kadenbach, B. (1998)

Cytochrom c oxidase from eucaryotes but not from procaryotes is allosterically inhibited by ATP.

Biochem. Mol. Biol. Intern. 45, 1047-1055.

Frank, V. & Kadenbach, B. (1996)

Regulation of the H^+/e^- stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios.

FEBS Lett. 382, 121-124.

Fuller, S.D., Capaldi, R., Henderson, R. (1979)

Structure of Cytochrome c Oxidase in Desoxycholate-drives two-dimensional crystals.

J. Mol. Biol. 134, 305-327.

Gadaleta, M.N., Cormio, A., Pesce, V., Lezza, A.M.S. & Cantatore, P. (1998)

Aging and mitochondria.

Biochimie 80, 863-870.

Gmelin (1958)

Gmelin's Handbuch der anorganischen Chemie.

Verlag Chemie GmbH, S. 460.

Gomez, B.Jr. & Robinson, N.C. (1999)

Quantitative determination of cardiolipin in mitochondrial electron transferring complexes by silicic acid high-performance liquid chromatography.

Anal. Biochem. 267, 212-216.

Hafner, R.P., Nobes, C.D., McGown, A.D., Brand, M.D. (1988)

Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status.

Eur. J. Biochem. 178, 511-518.

Hubbard, M. J & Cohen, P. (1993)

On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation.

Trends Biochem. Sci. 18, 172-177.

- Hunkapiller, M. W., Lujan, E., Ostrander, F. and Hood, L.E. (1983)
Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis.
Method. Enzymol., 91, 227-236.
- Hunter, T. (1995)
Protein Kinases and Phosphatases: The Ying and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling.
Cell 80, 225-236.
- Hüttemann, M., Frank, V. & Kadenbach, B. (1999)
The possible role of isoforms of cytochrome c oxidase subunit VIa in mammalian thermogenesis.
Cell. Mol. Life Sci. 55, 1482-1490.
- Ingebritsen, T.S. & Cohen, P. (1983)
The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities.
Eur. J. Biochem 132, 255-261.
- Iwato S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H., 1995
Structure at 2,8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *paracoccus denitrificans*.
Nature, 376, 660-669.
- von Jagow, G. & Klingenberg, M. (1972)
Close correlation between antimycin titer and cytochrome bc₁ content mitochondria of chloramphenicol treated *Neurospora crassa*.
FEBS Lett. 24, 278-282.
- von Jagow, G. & Engel, E. D. (1980)
Struktur und Funktion des energieumwandelnden Systems der Mitochondrien.
Angew. Chem. 92, 684-700.

Johnson, L.N., Noble, M.E.M. & Owen, D.J. (1996).
Active and inactive protein kinases: Structural Basis for Regulation.
Cell 85, 149-158.

Kadenbach, B., (1966)
Der Einfluß von Thyreoidhormonen in vivo auf die oxidative Phosphorylierung
und Enzymaktivität in Mitochondrien.
Biochem. Z., 344, 49-75.

Kadenbach, B., (1983)
Structure and evolution of the „atmungsferment“ cytochrome c oxidase.
Angew. Chem. 22, 275-282.

Kadenbach, B., Jaraus, J., Hartmann, R. & Merle, P. (1983)
Seperation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a
sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure.
Anal. Biochem., 129, 517-521.

Kadenbach, B., (1986)
Mini review: regulation of respiration and ATP-synthesis in higher organism:
hypothesis.
J. Bioenerg. Biomembr. 18, 39-54.

Kadenbach, B., Stroh, A., Unigbauer, M., Kuhn-Nentwig, L., Büge, U. &
Jaraus, J. (1986)
Isozymes of cytochrome c oxidase: Characterization and isolation from
different tissues.
Methods Enzymol. 126,32-45.

Kadenbach, B., Kuhn-Netwig, L. & Büge, U. (1987)
Evolution of a regulatory enzyme : cytochrome c oxidase (complex IV).
Curr. Top. Bioenerg. 15, 113-161.

- Kadenbach, B. & Müller-Höcker, J. (1990)
Mutations of mitochondrial DNA and human death.
Naturwissenschaften, 77, 221-225.
- Kadenbach, B. & Reimann, A. (1992)
Cytochrome c oxidase: Tissue-specific expression of isoforms and regulation of activity.
In: Molecular mechanisms in bioenergetics (L. Ernster, Eds.), Elsevier Science Publishers, 241-263.
- Kadenbach, B. & Arnold, S. (1999)
A second mechanism of respiratory control.
FEBS Lett. 447, 131-134.
- Kadenbach, B., Bender, E., Reith, A., Becker, A., Hammerschmidt, S., Lee, I., Arnold, S., Hüttemann, M. (1999)
Possible influence of metabolic activity on aging.
J. Anti-Aging Med. 2, 1-10.
- Kagawa, Y. & Racker, E. (1971).
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation.
J. Biol. Chem. 246, 5477-54887.
- Kielly W. W. (1963)
Preparation and assay of phosphorylating submitochondrial particles: sonicated mitochondria.
Meth. Enzymol. 6, 273-277.
- Kirchenko, A., Vygodina, T., Mkrtchyan, H.M. & Konstantinov, A. (1998)
Specific cation binding site in mammalian cytochrome oxidase.
FEBS Lett. 423, 329-333.

- Klumpp, S. Selke, D. & Hermesmeier, J. (1998)
Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg^{2+} : stimulation by unsaturated fatty acids.
FEBS Lett. 437, 229-232.
- Konstantinov, A., Vygodina, T., Popova, E., Berka, V. & Musatov, A. (1989)
Spectral shifts of cytochrome c oxidase induced by complexons.
FEBS Lett. 245, 39-42.
- Krebs, E. G., & Beavo, J. A., (1979)
Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.
Annu. Rev. Biochem. 48, 923-959.
- Krebs, E.G. (1993)
Protein-Phosphorylierung und Zellregulation I.
Angew. Chem. 105, 1173-1180.
- Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G. & Castelli, G.P. (1999)
Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences.
Acta Biochim. Pol. 46 (1), 1-21.
- Liu, Y.C., Sowdal, L.H. & Robinson, N.C. (1995)
Separation and quantitation of cytochrome c oxidase subunits by mono-Q fast protein chromatography and C18 reverse-phase high performance liquid chromatography.
Arch. Biochem. Biophys. 324, 135-142.
- Liu, V.W.S., Zhang, C., Pang, C.Y., Lee, H.c., Lu, C.Y., Wei, Y.H. & Nagley, P. (1998)
Independent occurrence of somatic mutations in mitochondrial DNA of human skin from subjects of various ages.
Hum. Mutat. 11, 191-196.

Michel, H., (1998)

The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12819-12824.

Mitchell, P. (1961)

Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.

Nature 191, 144-148.

Montecucco, C., Schiavo, G. & Bisson, R: (1986)

ATP binding to bovine heart cytochrome c oxidase. A photoaffinity labeling study.

Biochem. J. 234, 241-243.

Müller, M., Thelen, M., O'Shea, P. & Azzi, A. (1986)

Functional Reconstitution of Proton Pumping Cytochrome c Oxidase in Phospholipid Vesicles.

Methods Enzymol. 126, 78-87.

Müller, G. & Bandlow, W. (1987a)

Protein phosphorylation in yeast mitochondria: cAMP-dependance, submitochondrial localisation and substrates or mitochondrial protein kinases.

Yeast 3, 161-174.

Müller, G. & Bandlow, W. (1987b)

CAMP- dependent Protein kinase activity in yeast mitochondria.

Z. Naturforsch. 42, 1291-1302.

Murphey, M.P. (1989)

Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation.

Biochim. Biophys. Acta 977, 123-141.

Murphey, M.P. & Brand, M.D. (1988)

The stoichiometry of charge translokation by cytochrome oxidase and the cytochrome bc₁ complex of mitochondria at high membrane potential.

Eur. J. Biochem. 173, 645-651.

Napiwotzki, J., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. & Kadenbach, B. (1997)

ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity.

Biol. Chem. 378, 1013-1021.

Napiwotzki, J. & Kadenbach, B. (1998)

Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV.

Biol. Chem. 379, 335-339.

Nicolls, D.G. & Ferguson, S.J. (1992)

Bioenergetics 2.

Academic Press Limited, London, 82-87.

O`Shea, P.S., Petrone, G., Casey, R.P. & Azzi, A. (1984)

The current-voltage relationships of liposomes and mitochondria.

Biochem. J. 219, 719-726.

Padan, E. & Rottenberg, H. (1973)

Respiratory control and the proton electrochemical gradient in mitochondria.

Eur. J. Biochem. 40, 431-437.

Papa, S., Sardanelli, A.M., Cocco, T., Speranza, F., Scacco, S.C. & Technikova-Dobrova, Z. (1996)

The nuclear encoded 18 kDa (IP) AQRQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent Protein kinase.

FEBS Lett. 379, 299-301.

Papa, S., Sardanelli, A.M., Scacco, S.C. & Technikova-Dobrova, Z. (1999)
cAMP-dependent protein kinase and phosphoproteins in mammalian mitochondria. An extension of the cAMP-mediated intracellular signal transduction.

FEBS Lett. 444, 245-249.

Paradies, G., Ruggerio, F.M., Petrosillo & G., Quagliariello, E. (1998)
Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome c oxidase and cardiolipin alterations.

FEBS Lett. 424, 155-159.

Ramos, S. & Kaback, H.R. (1977)

The Electrochemical Proton Gradient in *Escherichia coli* Membrane Vesicles.

Biochemistry 16, 848-854.

Rangel-Alado, R. & Rosen, O. M. (1976)

Dissociation and reassociation of the phosphorylated and nonphosphorylated forms of adenosin-3,5-monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle.

J. Biol. Chem. 251, 3375-3380.

Reimann, A., Hüther, F.J., Berden, J.A. & Kadenbach, B. (1988)

Anions induce conformational changes and influence the activity and photoaffinity labeling by 8-azido-ATP of isolated cytochrome c oxidase.

Biochem. J., 254, 723-730.

Reimann, A. & Kadenbach, B., (1992)

Stoichiometric binding of 2'(or3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate to bovine heart cytochrome c oxidase.

FEBS Lett. 307, 294-296.

Richter, C., Scheizer, M., Cossarizza, A. & Francesci, C. (1996)

Control of apoptosis by cellular ATP levels.

FEBS Lett. 378, 107-110.

Richter, C. (1998)

Oxidative stress, Mitochondria and Apoptosis.

Restorative Neurology & Neuroscience 12, 59-62.

Rieger, T., Napiwotzki, J., Hüther, F.J. and Kadenbach, B. (1995)

The number of nucleotide binding sites in cytochrome c oxidase.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 217, 34-40.

Robinson, N.C., Zborowski, J. & Talbert, L.H. (1990)

Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives.

Biochemistry 29, 8962-8969.

Robinson, N.C. (1993)

Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase.

J. Bioenerg. Biomem. 25, 153-163.

Rohdrich, F. & Kadenbach, B. (1993)

Tissue-specific Regulation of Cytochrome c Oxidase efficiency by Nucleotides.

Biochemistry, 32, 8499-8503.

Saraste, M. (1990)

Structural features of cytochrome oxidase.

Quart. Rev. Biophys. 23,331-366.

Saraste, M. (1999)

Oxidative Phosphorylation at the *fin de siècle*.

Science 283,1488-1493.

Sardinelli, A.M., Technikova-Dobrova, Z., Scacco, S.C., Speranza, F & Papa, S. (1995).

Characterization of proteins phosphorylated by the cAMP-dependent protein kinase of bovine heart mitochondria.

FEBS Lett. 377, 470-474.

Schägger, H., & von Jagow, G., (1987)

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

Anal. Biochem., 166, 368-397.

Schägger, H., & von Jagow, G., (1991)

Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form.

Anal. Biochem., 199, 223-231.

Schon, E.,A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M. & Di Mauro, S. (1989)

A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA.

Science 244, 346-349.

Schwoch, G., Trinczek, B. & Bode, C. (1990).

Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic-AMP-dependent Protein kinases in mitochondria from various rat tissues.

Biochem. J. 270, 181-188.

Shechter, J. & Bloch, K. (1971).

Solubilization and Purification of trans-Farnesyl Pyrophosphate Squalene Synthetase.

J. Biol. Chem. 246, 7690-7696.

Slater, E.C. (1987)

The mechanism of the conservation of energy of biological oxidation.

Eur, J. Biochem. 166, 489-504.

Smith, A.L., (1967)

Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria, slaughterhouse material, small-scale.

Methods Enzymol. 10, 81-86

- Soboll, S. Kallus, B., Immler, D. & Meyer, H. (1998)
cAMP-dependent phosphorylation of cytochrome c oxidase in rat liver.
Abstract in: International Colloquium „Molecular basis of cell respiration“,
10.-13. Sept. 1998, Rauschholzhausen, S. 33.
- Steenart, N.A.E. & Shore, G. (1997)
Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an
endogenous kinase.
FEBS Lett. 415, 2294-298.
- Steinberg, R.A., Cauthron, R.D., Symcox, M.M. & Shuntoh, H. (1993).
Autoactivation of catalytic (C α) subunit of cyclic-AMP dependent protein kinase
by phosphorylation of threonine 197.
Mol. Cell. Biol. 13, 2332-2341.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. & Yonemoto, W. (1990)
cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory
enzymes.
Annu. Rev. Biochem. 59, 971-1005.
- Technikova-Dobrova, Z., Sardinelli, A.M., Stanca, M.R. & Papa, S. (1994)
cAMP-dependent protein phosphorylation in mitochondria of bovine heart.
FEBS Lett. 350, 187-191.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H.,
Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996)
The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å.
Science 272, 1136-1144.
- Vallejo, C.G., Seguido, A.M. & Fernandez-Renart, M. (1997).
Protein kinases in mitochondria of the invertebrate *Artemia franciscana*.
Arch. Biochem. Biophys. 339, 9-16.

Verhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verhovskaya, M. L., Morgan, J. E. & Wikström, M. (1999)

Protonen translocation by cytochrom c oxidase.

Nature 400, 480- 483.

Villani, G. & Attardi, G. (1997)

In vivo control of respiration by cytochrom c oxidase in wildtype and mitochondrial DNA mutation.carrying human cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 94,1166-1171.

Wallace, D.C. (1999)

Mitochondrial Diseases in Man and Mouse.

Science 283, 1482-1487

Wan, B., Doumen, C., Duszynski, J., Salama, G., Vary, T.C. & LaNoue, K.F. (1993)

Effects of cardiac work on electrical potential gradient across mitochondrial membrane in peerfused rat hearts.

Am. J. Pysiol. 265, 453-460.

Wera, S. & Hemmings, A. (1995)

Serine/threonine protein phosphatases.

Biochem. J. 331, 17-29.

Wikstöm, M., Krab, K.& Saraste, M. (1981)

Cytochrome c Oxidase:A Synthesis.

In: Cytochrome c Oxidase, Academie Press,New York, USA.

Wikström, M. (1989)

Identification of the electron transfer in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping.

Nature 338, 776-778.

- Yang, W.L., Iacono, L., Tang, W.M. & Chin, K.V. (1998)
Novel function of the regulatory subunit of protein kinase A: Regulation of cytochrome c oxidase activity and cytochrome c release.
Biochemistry 37, 14175-14180.
- Yoshikawa, S.; Choc, M.G.; O'Toole, M.C. & Caughey, W.S. (1977).
An infrared study of CO binding to heart cytochrome c oxidase and hemoglobin A.
J. Biol. Chem. 252, 5498-5508.
- Yoshikawa, S.; Tera, T.; Takahashi, Y & Tsukihara, T. (1988)
Crystalline Cytochrome c Oxidase of Bovine heart mitochondrial membrane: composition and X-ray diffraction studies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1354-1358.
- Yoshikawa, S, Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M.J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T. (1998)
Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrom c oxidase.
Science 280, 1723-1729.
- Zhang, C., Liu, V.W.S., Addessi, C.L., Sheffield, D.A., Linnane, A.W. & Nagley, P. (1998)
Differential occurrence of mutations in mitochondrial DNA of human skeletal muscle during aging.
Hum. Muta. 11, 360-371.

9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
cAMP	cyclo-3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclo-3',5'-Guanosinmonophosphat
CL	Cardiolipin
COX	Cytochrom c Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
KP _i	Kaliumphosphat
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
Lsg.	Lösung
h	Stunde
L	Liter
M	molar
min	Minute
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PP 1	Proteinphosphatase 1
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
V	Volt
$\Delta\mu$	elektrochemisches Potential
Δp	protonenmotorische Kraft
$\Delta\psi$	Membranpotential

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach danke ich für die interessante Themenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und für die Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit.

Bei Kara Follmann und Thorsten Rohde bedanke ich mich für die Durchsicht meines Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Annette Reith, Kara Follmann und Jörg Napiwotzki für ihre Freundschaft, ihre stete Hilfsbereitschaft und die immer gute Zusammenarbeit im Labor. Den anderen Mitgliedern danke ich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Meike Laucht möchte ich für ihre technische Assistenz bei Teilen dieser Arbeit und das gute Arbeitsklima danken.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Sundermeyer danke ich für die gute Nachbarschaft.

Meinen Eltern möchte ich herzlich für ihre Unterstützung jeglicher Art während meines Studiums danken.