

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. Sies)

**„cAMP-abhängige Phosphorylierung
der Cytochrom c Oxidase in Rattenhepatozyten“**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Beate Kallus

2001

Referent: Frau Prof. Dr. Sibylle Soboll

Korreferent: Herr Prof. Dr. Heinrich Strotmann

Teile der vorliegenden Arbeit wurden am internationalen Kolloquium „**Molecular Basis of Cell Respiration**“ (Schloß Rauschholzhausen/Marburg, September 1998) vorgestellt:

„cAMP-dependent phosphorylation of subunit IV of cytochrome c oxidase in rat liver“

Die Arbeit wurde von der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gefördert.

1.0	Einleitung	1
1.1	Die Interkonversion	1
1.2	Glukagon	2
1.3	Proteinkinasen	3
1.3.1	Cyklisch AMP abhängige Proteinkinase	4
1.3.2	Proteinkinase C	5
1.4	Die Elektrontransportkette	6
1.5	Die Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen	8
1.6	Cytochrom c Oxidase	8
1.6.1	Die Funktion der mitochondrial kodierten Untereinheiten	12
1.6.2	Die Funktion der kernkodierten Untereinheiten	13
1.6.3	Isoformen der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase	16
1.7	Zielsetzung	17
2.0	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien, Enzyme, Materialien	18
2.2	Geräte	19
2.3	Hepatozytenisolierung	20
2.4	Bestimmung der freigesetzten Glukose nach Glukagonstimulation	22
2.5	Beladung der Hepatozyten mit ^{32}P -Phosphat und Stimulation mit Glukagon bzw. TPA	23
2.5.1	Fraktionierung der Mitochondrien aus Hepatozyten	24
2.6	Fraktionierung der inneren Mitochondrienmembran aus Rattenleber	24
2.6.1	Fraktionierung der Mitochondrien aus Rattenleber	25
2.6.2	Reinigung der Mitochondrien über einen Percoll-Gradienten	25
2.6.3	Gewinnung der inneren Mitochondrienmembran	26
2.6.4	Schema der gesamten Fraktionierung der inneren Mitochondrienmembran aus Rattenleber	27
2.7	Fraktionierung der Mitochondrien aus Rattenherz	28
2.7.1	Schema der gesamten Fraktionierung von Herzmitochondrien	28
2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.9	Bestimmung des Atmungskontrollquotienten und des P/O-Quotienten an isolierten Mitochondrien	29

2.10	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.10.1	2D-Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung der Komplexe der Atmungskette	30
2.10.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.10.3	Zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten	33
2.10.3.1	Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH Gradienten	33
2.10.3.2	Vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.10.4	Coomassie-Blue Färbung	35
2.10.5	Kolloidale Coomassie-Blue Färbung	36
2.10.6	Silberfärbung	36
2.11	Elution der Komplexe der Atmungskette	37
2.12	In vitro Phosphorylierung der Komplexe der Atmungskette	37
2.13	Autoradiographie	38
2.14	Western-Blot-Verfahren	38
2.15	Massenspektrometrische Untersuchungen an Cytochrom c Oxidase	39
2.15.1	In-Gel-Verdau für MALDI-MS und μ HPLC	39
2.15.2	Probenvorbereitung für MALDI-MS	40
2.15.3	MALDI-MS	40
2.15.4	Datenbankrecherchen	40
3.0	Ergebnisse	41
3.1	Glukosefreisetzung aus Hepatozyten nach Glukagonstimulation	41
3.2	In vitro Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase	42
3.2.1	Unterschiedliche Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase Untereinheiten durch Proteinkinase A in vitro unter verschiedenen Bedingungen	43
3.2.2	In vitro Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase durch verschiedene Proteinkinasen	44
3.3	In vitro Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe durch Proteinkinase A	45
3.4	In vitro Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe durch Proteinkinase C	47
3.5	In vivo Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase	48
3.5.1	Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase isoliert aus Hepatozyten, die mit 32 P-Phosphat inkubiert und mit Glukagon stimuliert wurden	48
3.5.2	Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase isoliert aus	

	Hepatozyten, die mit ^{32}P -Phosphat inkubiert und mit TPA stimuliert wurden	49
3.5.3	Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe isoliert aus Hepatozyten, die mit ^{32}P -Phosphat inkubiert und mit Glukagon/TPA stimuliert wurde.	50
3.6	Identifizierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase	52
3.6.1	Immunologische Identifizierung der Untereinheit IV	52
3.6.2	Massenspektrometrische Identifizierung der Untereinheit III	53
3.6.3	Massenspektrometrische Identifizierung der Untereinheit IV	57
3.6.4	Massenspektrometrische Identifizierung der Untereinheit VIc	61
3.7	Einfluss des cyklischen AMP auf den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette	62
3.7.1	Ergebnisse der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Mitochondrien isoliert aus Rattenleber	63
3.7.2	Ergebnisse der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Mitochondrien isoliert aus Rattenherz	64
3.7.3	Vergleich der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Mitochondrien isoliert aus Rattenleber und Rattenherz	65
3.7.4	Einfluss des Proteinkinase A-Inhibitors H-89 auf die Aktivität der Atmungskette	66
4.0	Diskussion	68
4.1	In vitro Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase durch Caseinkinase II	68
4.2	In vitro und in vivo Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase durch Proteinkinase A	69
4.2.1	Die Phosphorylierung der Untereinheit III	71
4.2.2	Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b	78
4.3	In vitro und in vivo Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase durch Proteinkinase C	79
4.3.1	Die Phosphorylierung der Untereinheit II und/oder III	80
4.3.2	Die Phosphorylierung der Untereinheit IV	81
4.3.3	Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b	82
4.4	Vergleich der in vitro und in vivo Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase	82
4.5	Einfluss des cyklischen AMP auf die mitochondriale Atmung	83
5.0	Zusammenfassung	87
6.0	Literaturverzeichnis	88

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(-Aminoethyl)-phenylsulfonylfluorid-HCl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis-[2-Hydroxyethyl]-imino-Tris-[hydroxymethyl]-methan
Brij	Polyoxyethylenlaurylether
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
Chaps	3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-Bis-(2-Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
H-89	N-[2-((3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl)-amino)ethyl]-5-isoquinolinsulfonamid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH Gradient
M	Molarität
MALDI-MS	Matrixunterstützte Laserionisations-Massenspektrometrie
MBq	Mega Becquerel
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nikotinsäureamidadeninukleotidphosphat red.
NADP ⁺	Nikotinsäureamidadeninukleotidphosphat
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PKA	Proteinkinase A (katalytische Untereinheit)
PKC	Proteinkinase C (katalytische Untereinheit)
PKG	Proteinkinase G
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
SDS	Dodecylsulfat Na-Salz
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TPA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Trap	Triethanolaminhydrochlorid-Puffer
Tricin	N-tris(Hydroxymethyl)Methylglycin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Puffer
Tween	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
B	Asx	Asparagin(-säure)	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Thryonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	Z	Glx	Glutamin(-säure)

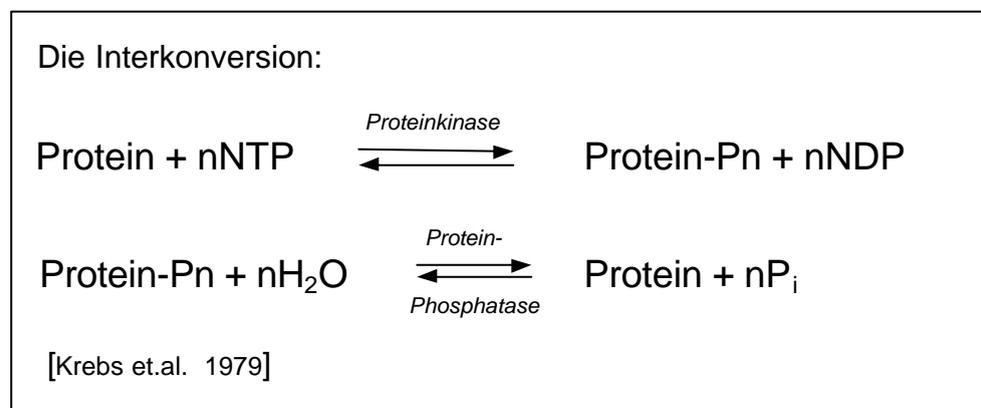
1.0 Einleitung

1.1 Die Interkonversion

Ein weitverbreiteter Mechanismus zur Regulation von Enzymaktivitäten ist die Interkonversion, d.h. die kovalente Modifikation durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung. Sie hat ihre überragende Bedeutung vor allem in den Signalübertragungswegen von Eukaryonten. Des Weiteren findet sie ihre Anwendung bei Membrantransport, Sekretion, Transkription, Translation, Kontraktilität, Zellteilung, sowie Oncogenese.

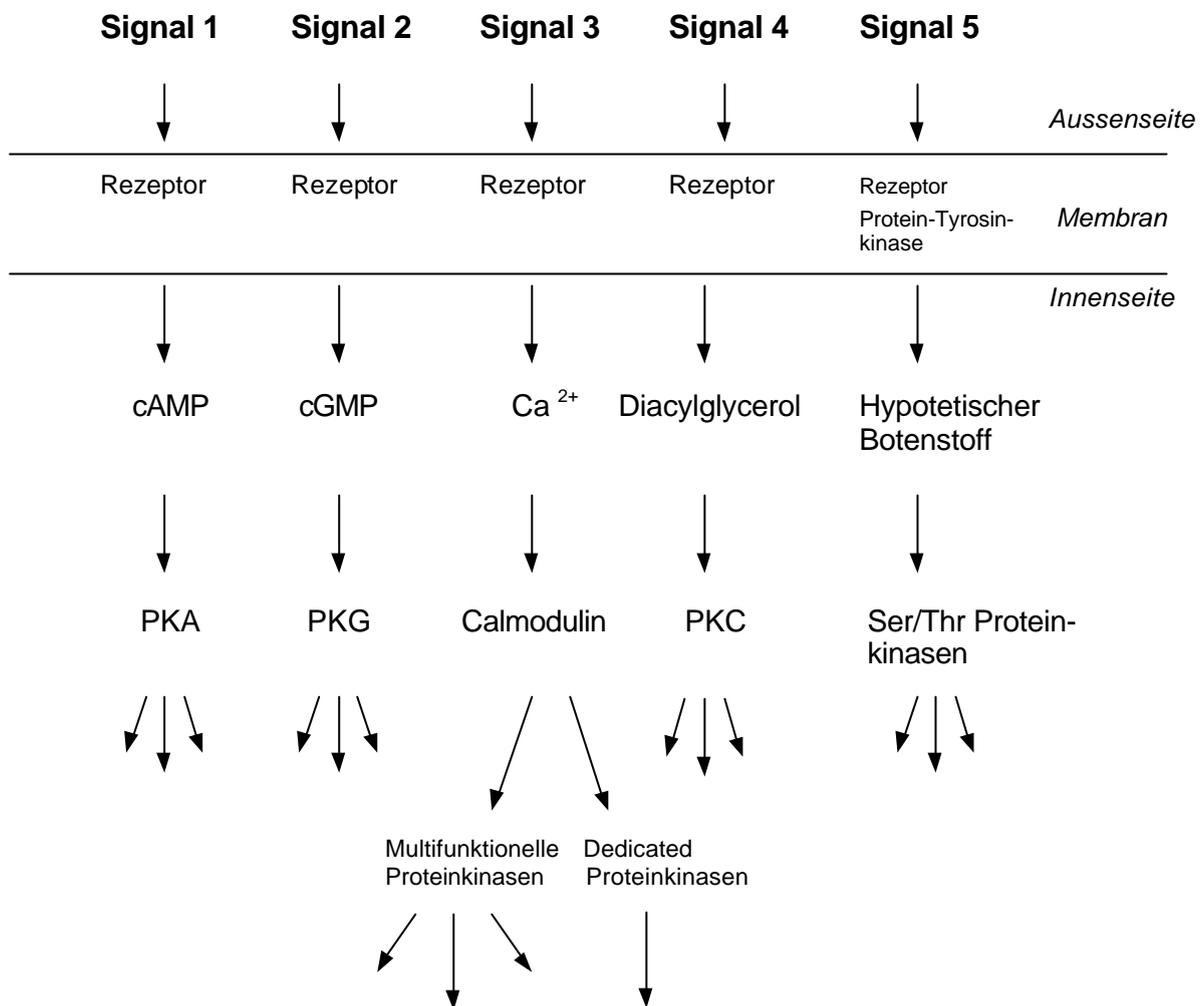
Die Regulation der Enzyme durch Proteinphosphorylierung konnte zum ersten Mal bereits Mitte der fünfziger Jahre von Edwin Krebs und seinen Mitarbeitern an Glykogen-Phosphorylase gezeigt werden [Krebs et.al. 1956][Krebs,1983]. Die Erforschung des Glykogenstoffwechsels machte deutlich, welche enorme regulatorische Potenzial die reversible, kovalente Modifikation mit sich bringt.

Im Jahre 1992 wurde Edwin G. Krebs und Edmond H. Fischer in Anerkennung für ihre bahnbrechende Entdeckung der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen.



Die Phosphorylierung von Substratproteinen durch spezifische Proteinkinasen bewirkt eine bleibende Veränderung ihrer biologischen Eigenschaften, die durch die Wirkung der Protein-Phosphatasen wieder aufgehoben wird. Proteinkinasen und Protein-Phosphatasen sind elementare Bestandteile von Signalwegen. Die Phosphorylierung findet überwiegend an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten der Zielproteine statt. Seltener werden auch Asparagin-, Lysin- und Histidin-Reste phosphoryliert, letztere vor allem in den prokaryontischen Signalübertragungswegen

[Hunter, 1991] [Krauss, 1997]. Cohen [Cohen, 1992] formulierte fünf prinzipielle Signalwege, die in eukaryontischen Zellen wirksam sind:



An dem Aufbau der äußerst komplexen Signalwege sind beteiligt:

- externe Signale (chemische Botenstoffe, elektrische und optische Reize)
- membrangebundene und intrazellulär lokalisierte Rezeptoren
- Adaptorproteine
- hydrophile, cytosolische Botenstoffe (cAMP, cGMP, Inositol-Phosphat, Ca^{2+}) und hydrophobe, membranassoziierte Botenstoffe (Diacylglycerol, Phosphatidyl-Inositol-Phosphat)
- Proteinkinasen und Protein-Phosphatasen [Krauss, 1997].

1.2 Glukagon

Glukagon ist ein Peptidhormon aus 29 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 3 485 Da. Es wird in den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas als

Präpro-Glukagon (MG 18 kDa) synthetisiert. Die sukzessive proteolytische Prozessierung führt zur Freisetzung von Glukagon und anderen Spaltprodukten; letztere werden aber in den α -Zellen proteolytisch zerstört [Löffler et.al. 1998].

Das wichtigste Zielorgan für Glukagon ist die Leber, an die das Hormon nach seiner Sekretion zuerst und in höchster Konzentration gelangt, wo es die Glykogenolyse, die Glukoneogenese, sowie die Lipolyse auslöst und die Synthese verschiedener Enzyme induziert [Zahlten et.al. 1972]. Darüberhinaus verursacht Glukagon die Hydrolyse von Inositol-Phospholipiden, sowie eine Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration [Jelinek et.al. 1993].

Sutherland und seine Mitarbeiter zeigten, dass die Effekte des Glukagons über das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), gebildet durch die glukagonaktivierte Adenylatcyklase der Plasmamembran, vermittelt werden. Während der Erforschung der Glukagonfunktionen beobachtete Zahlten [Zahlten et.al. 1972], dass dieses Hormon die Phosphorylierung mitochondrialer, microsomalier und lysosomaler Membranen aus Rattenleber induziert. Zahlten schloss daraus, dass die Phosphorylierung der Membranproteine ein allgemein verbreiteter Mechanismus zur Vermittlung der Glukagonwirkung sein könnte [Zahlten et.al. 1972].

1.3 Proteinkinasen

Proteinkinasen repräsentieren eine große und sehr komplexe Familie von Enzymen, die sich hinsichtlich ihrer Grösse, Struktur der Untereinheiten, der subzellulären Lokalisation, sowie des Aktivierungs- und Regulationsmechanismus voneinander unterscheiden [Taylor et.al. 1991].

Die Proteinkinasen lassen sich anhand ihrer Aminosäurespezifität in vier Klassen unterteilen [Krauss, 1997]:

- Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen
- Tyrosin spezifische Proteinkinasen
- Histidin spezifische Proteinkinasen (diese phosphorylieren auch Lysin- und Arginin-Reste)
- Aspartat und Glutamat spezifische Proteinkinasen.

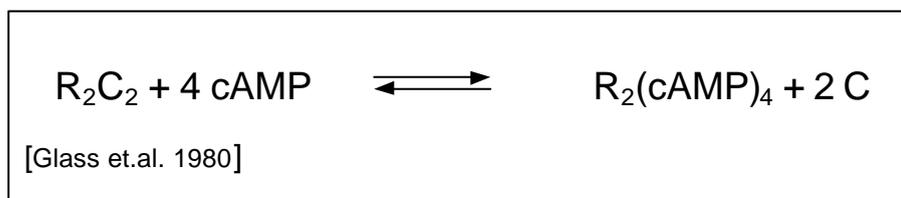
Eine Subklassifizierung der Proteinkinasen kann anhand ihres Regulationsmechanismus [Hunter, 1991] oder anhand von Homologievergleichen der Sequenz der katalytischen Domäne stattfinden [Hanks et.al. 1988].

Die Serin/Threonin und Tyrosin spezifischen Proteinkinasen gehören zu den am besten charakterisierten Proteinkinasen, während über die Struktur und Funktion der Histidin, Aspartat und Glutamat spezifischen Proteinkinasen wenig bekannt ist.

1.3.1 Cyklisch AMP abhängige Proteinkinase

Die cAMP abhängige Proteinkinase (auch Proteinkinase A genannt; E.C. 2.7.1.37), 1968 isoliert und beschrieben [Walsh et.al. 1968], gehört zu den einfachsten und am besten untersuchten Proteinkinasen. Ihre phylogenetische Verteilung reicht von der Hefe bis zu den Säugetieren, scheint jedoch bei den Prokaryonten und den höheren Pflanzen zu fehlen [Edelman et.al. 1987].

Die typische Proteinkinase A Konzentration in der Zelle liegt zwischen 0,2 μM und 2 μM . Die Proteinkinase A wird überwiegend vom zyklischen AMP kontrolliert. In Abwesenheit von cAMP liegt das Holoenzym in Form eines inaktiven Tetramers R_2C_2 vor, bestehend aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten. Die Bindung von jeweils zwei cAMP Molekülen pro regulatorische Untereinheit führt zu einer Erniedrigung der Affinität zwischen der regulatorischen und der katalytischen Untereinheit um den Faktor 10^4 - 10^5 , was eine Dissoziation des Holoenzym, in das Dimer $\text{R}_2(\text{cAMP})_4$ und zwei freie katalytische Untereinheiten, zur Folge hat, die Phosphotransferase Aktivität besitzen [Taylor et.al. 1991] [Glass et.al. 1980] [Francis et.al. 1994].



Die regulatorische Untereinheit kommt in zwei Isoformen RI und RII vor, die weiter in $\text{RI}\alpha$, $\text{RI}\beta$, $\text{RII}\alpha$ und $\text{RII}\beta$ unterteilt werden. Die katalytische Untereinheit kommt in drei Isoformen $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta_{1,2}$ und $\text{C}\gamma$ vor [Francis et.al. 1994].

Die Proteinkinase A ist, neben der Kontrolle durch cAMP, noch weiteren möglichen Regulationsmechanismen unterworfen, wie z.B. die Autophosphorylierung der katalytischen wie auch der regulatorischen Untereinheiten [Taylor et.al. 1991][Taylor et.al. 1994], subzelluläre Lokalisation; die RI- bzw. RII-Untereinheiten sind über Proteinkinase-Ankerproteine (AKAP) mit Cytoskelett und Golgi Apparat assoziiert [Rubin, 1994]

[Huang et.al. 1997]. Die Regulation durch Kreuzaktivierung mittels cGMP, sowie durch die Aktivierung der Phosphodiesterase werden ebenfalls diskutiert [Francis et.al. 1994]. Es wurden vier Konsensussequenzen der Phosphorylierung von Zielproteinen durch die Proteinkinase A formuliert, wobei die Serin-Reste bevorzugt phosphoryliert werden im Gegensatz zu den Threonin-Resten [Pearson et.al. 1991][Kenelly et.al. 1991]:

- **RXS*/T***
- **RR/KXS*/T***
- **RXXS***
- **KRXXS***

R = Arginin, K = Lysin, S=Serin, T=Threonin, X=beliebige Aminosäure, *=Phosphorylierungsstelle.

1.3.2 Proteinkinase C

Proteinkinase C ist eine Serin/Threonin spezifische Proteinkinase, bestehend aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 77-83 kDa, die eine N-terminale, regulatorische und eine C-terminale, katalytische Domäne aufweist [Azzi et.al. 1992].

Die Mitglieder der Proteinkinase C Familie werden aufgrund der Primärstruktur und der enzymatischen Eigenschaften in drei Subfamilien mit insgesamt 12 Isoenzymen unterteilt:

- der Ca^{2+} abhängigen oder konventionellen Proteinkinase C Subfamillie (cPKCs) gehören die α -, β_I -, β_{II} - und χ -Isoenzyme an
- der Ca^{2+} unabhängigen oder sog. „neuen“ Proteinkinase C Subfamillie (nPKCs) gehören die δ -, ϵ -, η -, θ - und μ -Isoenzyme an
- der „atypischen“ Proteinkinase C Subfamilie gehören die ζ -, λ - und L-Isoenzyme an [Asaoka et.al. 1992] [Dekker et.al. 1994] [Hug et.al. 1993].

Zur Aktivierung der Proteinkinase C werden als Cofaktoren Ca^{2+} , Phospholipide (z.B. Phosphatidylcholin) und Diacylglycerol benötigt. Auch freie, ungesättigten Fettsäuren, wie z.B. der Arachidonsäure, wird eine Rolle bei der Aktivierung der Proteinkinase C zugesprochen [Houweling et.al.1989].

Die Proteinkinase C wird über zwei Signalwege stimuliert, der erste geht von den Tyrosinkinase-Rezeptoren aus, der zweite von G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren [Dekker et.al. 1994].

Die katalytische und regulatorische Domäne der Proteinkinase C unterliegen der Autophosphorylierung, deren Bedeutung kontrovers diskutiert wird [Hug et.al. 1993]. Es wurden fünf Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung der Substratproteine mit Proteinkinase C formuliert [Pearson et.al. 1991][Kennelly et.al.1991]:

- **S*/T***XK/R
- K/RXX**S*/T***
- K/RXX**S*/T***XK/R
- K/RX**S*/T***
- K/RX**S*/T***XK/R.

K=Lysin, R=Arginin, S=Serin, T=Threonin, X=beliebige Aminosäure, *=Phosphorylierungsstelle.

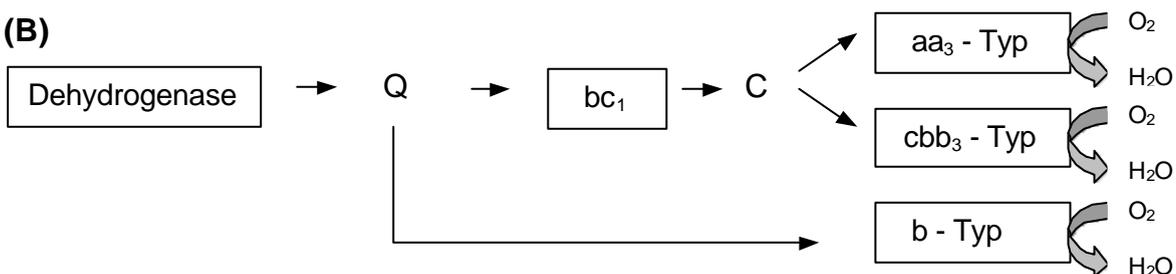
1.4 Die Elektronentransportkette

Die Elektronentransportkette (Atmungskette) dient bei aeroben Organismen (Bakterien, Archaeabakterien, Eukaryonten) der ATP Gewinnung. Sie zeigt bei Prokaryonten einen wesentlich komplexeren Aufbau als die Atmungskette der Eukaryonten. Das manifestiert sich durch die Zahl und Art der Elektronenüberträger sowie der terminalen Oxidasen.

(A)



(B)



(C)

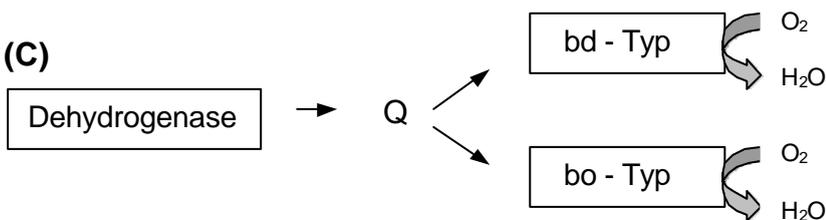


Abb. 1 Schematische Darstellung der Elektronentransportkette bei Säugern **(A)**, *R. sphaeroides* **(B)** und *E.coli* **(C)**. Q=Chinol, C=Cytochrom c [Trumpower et.al. 1994] [Garcia-Horsman et.al. 1994].

Die Atmungskette des gramm-negativen Bakteriums *Escherichia coli* enthält keine Cytochrom c Reduktase (bc_1 -Komplex), kein Cytochrom c, sowie Cytochrom c Oxidase. Die Substrate, wie $NADH/H^+$ oder Succinat, werden durch spezifische Dehydrogenasen oxidiert, welche dann den Chinon-Pool innerhalb der Cytoplasmamembran reduzieren. Die Elektronen gelangen dann von dem resultierenden Chinol in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen (O_2 Gehalt) entweder auf die bd -Chinol-Oxidase oder die bo_3 -Chinol-Oxidase [Gohlke et.al. 1997][Garcia-Horsman et.al. 1994]. Das Purpurbakterium *Rhodobakter sphaeroides*, das unter aeroben, anaeroben und phototrophen Bedingungen wächst, enthält drei verschiedene Oxidasen, von denen zwei Cytochrom c und die dritte Chinol als Substrat nutzen. Der aa_3 -Typ der Oxidase dominiert, wenn das Bakterium aerob wächst. Die alternative, cbb_3 -Typ Oxidase, ist unter microaerophilen Bedingungen und wenn das Bakterium phototroph wächst, aktiv. Die Chinol-Oxidase dient der Unterstützung des aeroben Wachstums bei Bakterienlinien, bei denen der bc_1 -Komplex fehlt [Garcia-Horsman et.al. 1994].

Bei Eukaryonten besteht die Elektronentransportkette im Prinzip aus vier Proteinkomplexen (Komplex I-IV):

Komplex I: NADH-Dehydrogenase (E.C. 1.6.5.3)

Komplex II: Succinat-Dehydrogenase (E.C. 1.3.5.1)

Komplex III: Ubichinol-Cytochrom c Reduktase (E.C. 1.10.2.2)

Komplex IV: Cytochrom c Oxidase (E.C. 1.9.3.1)

Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* fehlt der Komplex I und die anderen Komplexe bestehen aus weniger Untereinheiten. Bei den höheren Pflanzen tritt neben der Cytochrom c Oxidase zusätzlich eine cyanidresistente, „alternative“ Oxidase auf. Der Elektronenfluss durch diese zwei Atmungswege wird durch die Umweltbedingungen (Stress, Verletzung, pathogener Befall) reguliert [McIntosh et.al. 1998]. Die Komponenten der Atmungskette und die ATP-Synthase sind bei den Prokaryonten in der Plasmamembran lokalisiert, während sie bei den Eukaryonten ein integraler Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran sind [Calhoun et.al. 1994].

Trotz der beträchtlichen Unterschiede ist allen Elektronentransportketten gemeinsam, dass sie die Elektronen in einer Kettenreaktion von $NADH/H^+$ und reduziertem Flavoprotein auf molekularen Sauerstoff übertragen, der zu Wasser reduziert wird. An den exergonen Elektronentransport ist ein Protonentransport durch die Membran gekoppelt. Der dadurch entstandene Protonengradient wird durch die membran-

ständige ATP-Synthase ausgenutzt, um ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) zu synthetisieren [Trumpower et.al. 1994].

1.5 Die Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen

Die Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen wird anhand von zwei Kriterien definiert. Zum einen durch einen hohen Grad an Aminosäuresequenz-Homologie innerhalb der grössten Untereinheit (Untereinheit I). Zum anderen durch das katalytische Häm-Kupfer-Zentrum, an dem der molekulare Sauerstoff zu Wasser reduziert wird [Calhoun et.al. 1994].

Innerhalb dieser Superfamilie gibt es beträchtliche Unterschiede bezüglich der Substratnutzung, Sauerstoffaffinität sowie der Häm- und Kupfer-Komponenten der einzelnen Oxidasen.

Anhand der Substratspezifität wird die Superfamilie in zwei Subfamilien unterteilt:

- 1) Die mitochondrialen Oxidasen und einige bakteriellen Oxidasen nutzen das Cytochrom c als Substrat und werden daher als Cytochrom c Oxidasen bezeichnet.
- 2) Manche Bakterien enthalten Oxidasen, die das membrangebundene Chinol als Substrat verwenden und werden deshalb Chinol-Oxidasen genannt [Castresana et.al. 1994] [Calhoun et.al. 1994] [Garcia-Horsman et.al. 1994] [Iwata, 1998].

Eine Übersicht der verschiedenen Oxidase-Typen bei Prokaryonten ist bei Garcia-Horsman zu finden [Garcia-Horsman et.al. 1994].

Evolutionäre Untersuchungen ergaben, dass die Untereinheit I der Häm-Kupfer-Oxidasen gewisse Übereinstimmungen mit den Untereinheiten der NO-Reduktase sowie der N_2O -Reduktase der denitrifizierenden Prokaryonten zeigt, was auf eine Präsenz dieser Superfamilie vor der Entstehung der sauerstoffhaltigen Atmosphäre hindeutet [Iwata, 1998].

1.6 Cytochrom c Oxidase

Die Cytochrom c Oxidase (E.C. 1.9.3.1.), das von Otto Warburg 1924 entdeckte „Atmungsferment“, katalysiert in einer irreversiblen Reaktion die Elektronenübertragung vom Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff, der mit vier Protonen aus der Matrix zu Wasser reagiert. Gleichzeitig pumpt der Enzymkomplex vier weitere Protonen durch die Mitochondrienmembran [Capaldi et.al. 1990] [Trumpower et.al. 1994] [Michel, 1999].



Die Anzahl der von Cytochrom c Oxidase transportierten Protonen pro umgesetztes Elektron ist bei Prokaryonten konstant $1\text{H}^+/\text{e}^-$, während das Verhältnis bei den Säugetieren variabel ist.

Die Anzahl der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase stieg im Laufe der Evolution mit der Entwicklungsstufe der Organismen an.

Bei Prokaryonten besteht dieser Enzymkomplex aus zwei bis vier Untereinheiten und gehört zu dem am besten charakterisierten Oxidasekomplex.

Bei Archaeobakterien weist der Oxidasekomplex eine unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten auf. Alle Oxidasen enthalten die Untereinheit I, aber bei manchen fehlt die Untereinheit II oder III, die durch andere Typen von Untereinheiten ersetzt werden [Castresana et.al. 1994] [Grossman et.al.1997].

Das Bakterium *Bradyrhizobium japonicum* nutzt, wenn es als Stickstoff fixierendes Endosymbiont lebt, einen alternativen Oxidasekomplex (cbb₃-Typ), mit einer sehr hohen Affinität zum Sauerstoff. Der Oxidasekomplex enthält drei membranverankerte Untereinheiten: Untereinheit I und zwei Cytochrom c Proteine. Die Untereinheiten II und III sind nicht präsent in diesem Komplex. Die Untereinheit I zeigt beträchtliche Unterschiede zu den entsprechenden Untereinheiten bei den anderen Oxidasen, jedoch alle wichtigen, metallbindenden Aminosäurereste sind erhalten und liegen in der gleichen Position wie bei den anderen Oxidasen [Castresana et.al. 1994].

Bei *Parococcus denitrificans* besteht die Cytochrom c Oxidase aus vier Untereinheiten. Die Untereinheit I besteht aus zwölf transmembranen Helices und enthält die katalytischen Zentren Häm a sowie Häm a₃ - Cu_B. Die Untereinheit II enthält drei Segmente: eine N-terminale Schleife, zwei transmembrane Helices, sowie eine C-terminale globuläre Domäne, welche das Cu_A-Zentrum enthält. Die Untereinheit III besitzt sieben transmembrane Helices. Ihr wird eine Rolle bei der Zusammensetzung des Enzymkomplexes zugesprochen. Ferner verhindert sie die Blockierung des Eingangs zum Sauerstoffkanal durch andere Proteine. Die Untereinheit IV enthält nur eine transmembrane Helix, mit dem N-Terminus auf der cytosolischen Seite. Trotz ihrer kleinen Größe steht sie mit den übrigen

Untereinheiten im Kontakt. Bis hierige Untersuchungen deuten darauf hin, dass sie für die Stabilität des Cu_B-Zentrums in Untereinheit I von Bedeutung ist [Iwata et.al. 1995][Iwata, 1998].

Bei Eukaryonten variiert die Anzahl der Cytochrom c Oxidase Untereinheiten zwischen 7 und 13. Bei den niederen Eukaryonten (*Dictyostelium discoideum*) besteht der Enzymkomplex aus 7 Untereinheiten. Die Untereinheit VII, die der Untereinheit VIc bei den Säugern entspricht, wird, entsprechend dem Sauerstoffangebot, in zwei Isoformen VIIe und VIIs exprimiert [Bisson et.al. 1986] [Bisson et.al. 1997][Grossman et.al. 1997]. Der einzellige Parasit *Crithidia fasciculata* enthält einen Oxidasekomplex bestehend aus zehn Untereinheiten [Speijer et.al. 1996].

Die Cytochrom c Oxidase aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) besteht aus 12 Untereinheiten. Die Untereinheit V, die der Untereinheit IV der Säugetiere entspricht, wird ebenfalls wie bei *D. discoideum* in zwei Isoformen exprimiert. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen steigt die Expression der Untereinheit Vb im Verhältnis zu Va an [Freund et.al. 1994] [Grossman et.al. 1997].

Bereits Anfang der achtziger Jahre gelang es mit Hilfe der elektrophoretischen Trennverfahren die gereinigte Cytochrom c Oxidase von Säugetieren in 13 verschiedene Untereinheiten zu trennen [Merle et.al. 1982][Kadenbach et.al. 1983] [Kadenbach, 1983]. Die Aufklärung der Kristallstruktur der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz bestätigte diese Ergebnisse, sowie den Befund, dass der Enzymkomplex bei Säugern als Dimer vorliegt [Tsukihara et.al. 1996]. Bei den Fischen besteht der Oxidasekomplex ebenfalls aus 13 Untereinheiten [Arnold et.al. 1997].

Die drei großen Untereinheiten in Eukaryonten, die homolog zu den drei großen Untereinheiten bei Prokaryonten sind, werden vom mitochondrialen Genom kodiert, während die zehn kleineren Untereinheiten vom Zellkern kodiert und in die Mitochondrien transportiert werden. Im Folgenden wird auf die Struktur der Cytochrom c Oxidase aus Säugetieren eingegangen, weil in dieser Dissertation mit dem Oxidasekomplex aus Leber der Ratte gearbeitet wurde.

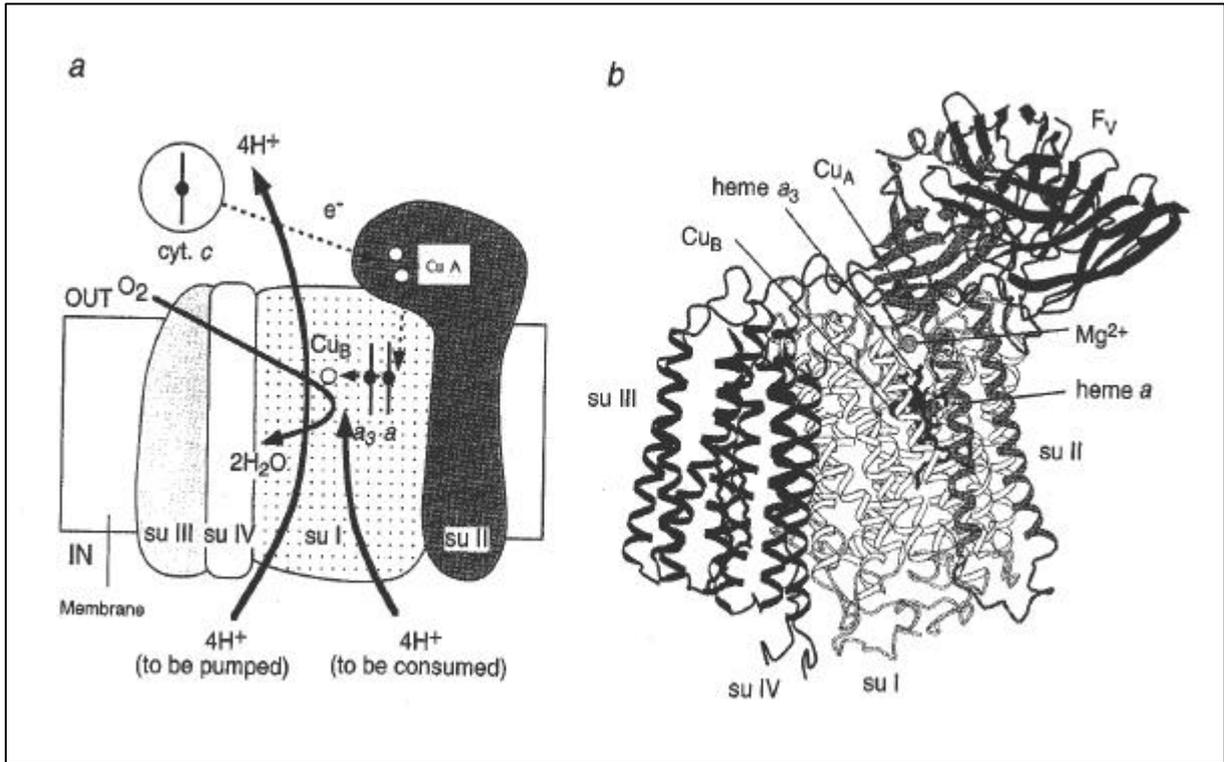


Abb.2 A: Schematische Darstellung der Untereinheiten I, II, III und IV sowie der Metallzentren des Cytochrom c Oxidase-Komplexes aus *P. denitrificans*. **B:** Die vollständige Cytochrom c Oxidase aus *P. denitrificans*, die mit dem Antikörperfragment (F_v) komplexiert ist [Iwata, 1998].

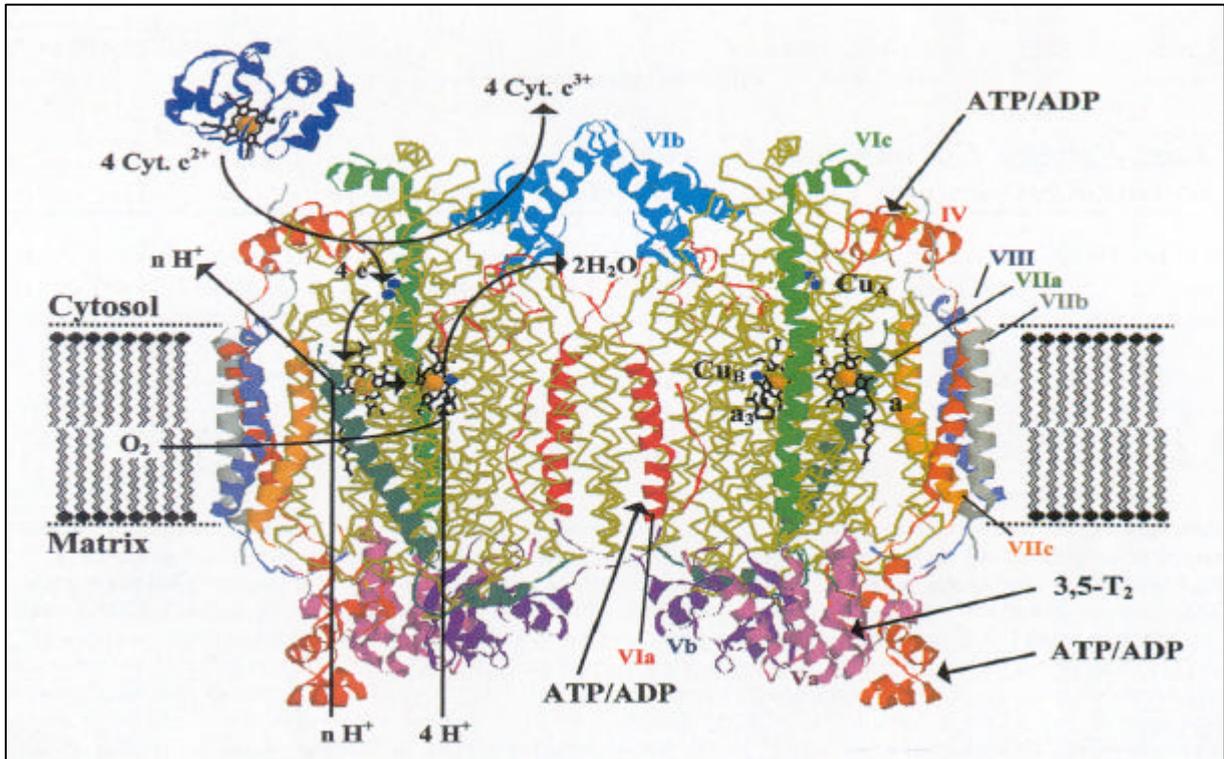


Abb. 3 Die Kristallstruktur der dimeren Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz. An der cytosolischen Seite ist die Kristallstruktur des Cytochroms c (Cyt. c) dargestellt. Das linke Monomer zeigt die katalysierte Reaktion. Das rechte Monomer zeigt die gekennzeichneten, kernkodierte Untereinheiten sowie die Bindungsstellen für die regulatorischen Komponenten (ATP, ADP, 3,5-T₂) [Kadenbach et.al. 2000].

1.6.1 Die Funktion der mitochondrial kodierten Untereinheiten

Die Untereinheit I besteht aus 12 transmembranen Helices, ohne einen grossen extramembranen Bereich. Diese Untereinheit hat eine zylindrische Form und ist senkrecht zur Membranoberfläche orientiert. Sie enthält die katalytischen Zentren Häm a, Häm a₃ - Cu_B, sowie eine Magnesium- und Zinkbindungsstelle. Häm a und Häm a₃ liegen senkrecht zur Membranoberfläche in jeweils einem der drei Halbkreise, die von jeweils vier Helices gebildet werden. Zusätzlich enthält die Untereinheit I den skalaren Protonenkanal, der die Protonen, die an den Sauerstoff gebunden werden, transportiert, sowie die vektoriellen Protonenkanäle, die Protonen über die Membran zur Ausbildung des Protonengradienten übertragen. Das C- und N-terminale Ende befindet sich auf der Matrixseite [Tsukihara et.al.1996].

Die Untereinheiten II und III assoziieren mit der transmembranen Region der Untereinheit I, ohne einen direkten Kontakt zueinander. Die zwei transmembranen Helices 1 und 2 der Untereinheit II liegen in der Nähe der Helices 9 und 8 der Untereinheit I. Die große, extramembrane Domäne der Untereinheit II liegt über dem cytosolischen Teil der Untereinheit I und weist eine ausgeprägte β -Faltblattstruktur auf. Hier ist das Cu_A-Zentrum, sowie die Bindungsstelle für Cytochrom c lokalisiert. Das Cu_A-Zentrum besteht, im Gegensatz zu Cu_B-Zentrum, aus zwei Kupferatomen (Cu²⁺-Cu⁺). Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus liegen auf der cytosolischen Membranseite. Darüber hinaus könnte die Untereinheit II an der Ausbildung des Wasserkanals beteiligt sein, der sich möglicherweise zwischen den Untereinheiten I und II befindet. Durch diesen Kanal tritt das am Häm a₃-Zentrum gebildete Wasser auf der cytosolischen Seite aus dem Enzymkomplex heraus [Tsukihara et.al.1996].

Die für die katalytischen Reaktionen der Cytochrom c Oxidase benötigten Zentren sind auf den Untereinheiten I und II lokalisiert.

Der Kontakt zwischen der Untereinheit I und der Untereinheit III wird durch Helices 3 und 4 der Untereinheit I mit der Helix 1 der Untereinheit III, sowie Helices 4 und 5 der Untereinheit I mit Helix 3 der Untereinheit III hergestellt [Tsukihara et.al. 1996]. Die Untereinheit III ist ein hydrophobes Membranprotein, welches keine katalytischen Zentren enthält und daher keine direkte Rolle beim Elektronentransfer spielt. Sie enthält sieben transmembrane Helices, die keine extramembrane Domäne ausbilden. Der N-Terminus befindet sich auf der Matrixseite. Es wird vermutet, dass die Untereinheit III bei der Zusammensetzung und der Stabilisierung des Enzymdimers

bei Säugetieren verantwortlich ist, da es gezeigt werden konnte, dass das Fehlen dieser Untereinheit zur Monomerisierung des dimeren Komplexes führt [Finel et.al. 1988]. Darüberhinaus beeinflusst sie die Effizienz der Protonentrans-lokation, die Sauerstoff- und Protonenleitung, sowie die katalytische Aktivität des Oxidase-Komplexes [Bratton et.al. 1999].

1.6.2 Die Funktion der kernkodierte Untereinheiten

Die kernkodierte Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase sind wesentlich kleiner als die mitochondrial kodierten Untereinheiten. Sieben der zehn, kernkodierte Untereinheiten (IV, VIa, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII) weisen transmembrane Helices auf, wobei die Untereinheiten Va, Vb und VIb extramembran lokalisiert sind. Bei allen transmembranen Untereinheiten weist der N-Terminus auf die Matrixseite, so dass über einen N-terminalen Transport dieser Untereinheiten in die Mitochondrien diskutiert wird [Tsukihara et.al. 1996].

Die Untereinheit IV mit ihrem Molekulargewicht von 19 514 Da ist die größte kernkodierte Untereinheit. Sie hat die Form einer Hantel mit einer transmembranen Helix und zwei extramembranen Domänen an beiden Enden. Der N-Terminus ragt auf die Matrixseite, dagegen der C-Terminus auf die cytosolische Seite heraus. Die transmembrane Helix steht diagonal (50°) mit den Helices 11 und 12 der Untereinheit I in Kontakt. Außerdem ist die transmembrane Helix mit Untereinheit VIIb und VIII assoziiert. Die Untereinheit IV wirkt also als Bindeglied zwischen den Untereinheiten VIIb und VIII sowie der Untereinheit I [Tsukihara et.al. 1996]. Capitanio [Capitanio et.al. 1994] konnte zeigen, dass das N-terminale Ende der Untereinheit IV den Protonen den Zugang in den Protonenkanal vermittelt. Die beiden extramembranen Domänen der Untereinheit IV weisen jeweils eine hochaffine Nukleotidbindungsstelle auf. Es wird diskutiert, dass die nahe Lokalisation der cytosolischen Domäne zur Cytochrom c Bindungsstelle in der Untereinheit II darauf hindeutet, dass der Austausch von ADP durch ATP einen Einfluss auf den K_m Wert für Cytochrom c haben könnte. Die Bindung von ATP an die Matrixdomäne führt zu einer Änderung der hyperbolischen Kinetik der Cytochrom c Oxidase in eine sigmoidale, mit einer halbmaximalen Hemmung der Aktivität bei einem ATP/ADP-Verhältnis von 28 [Arnold et.al. 1997] [Arnold et.al. 1999].

Darüber hinaus spielt die Untereinheit IV eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung des Enzymkomplexes [Nijtmans et.al. 1998].

Untereinheit Va ist eine extramembrane Untereinheit, die auf der Matrixseite unterhalb der Untereinheit I lokalisiert ist. Sie wird ohne direkten Kontakt mit der Untereinheit I durch die Matrixdomäne der Untereinheit IV und den extramembranen Segment der Untereinheit VIc in ihrer Position gehalten [Tsukihara et.al. 1996]. Sie weist eine Bindungsstelle für 3,5-Diod-L-Thyronin (3,5,-T₂) auf. Es wurde gezeigt, dass bereits geringe Konzentrationen von 3,5,-T₂ zur Aufhebung der allosterischen ATP-Hemmung führen [Arnold et.al. 1998].

Untereinheit Vb ist die zweite extramembrane Untereinheit, die sich unterhalb der Untereinheiten I und III befindet, mit denen sie fest verbunden ist. Außerdem liegt sie in der Nachbarschaft zur Untereinheit Va und gegenüber der extramembranen Matrixdomäne der Untereinheit IV, ohne einen direkten Kontakt zu diesen beiden Untereinheiten. Die Untereinheit Vb besitzt ein Zinkatom, das durch vier Cysteinreste fixiert ist, sowie ein Zinkfingermotiv zwischen den Aminosäuren Cys⁶⁰ und Cys⁸⁵, dessen physiologische Funktion noch unklar ist [Tsukihara et.al. 1996].

Untereinheit VIa ist über ihre einzige, transmembrane Helix mit der Helix 4 der Untereinheit III assoziiert, gegenüber dem Berührungspunkt zwischen den Untereinheiten I und III. Die zehn Aminosäuren des N-Terminus stehen mit den Helices 5 und 7 der Untereinheit I in Kontakt, der für die Stabilisierung des Dimers von Bedeutung zu sein scheint [Tsukihara et.al. 1996]. Die Untereinheit VIa kommt in zwei gewebespezifischen Isoformen VIa-L (Leber-Typ) und VIa-H (Herz-Typ) vor. Die VIa-H Isoform enthält in ihrer N-terminalen Domäne eine hochaffine ADP bzw. ATP Bindungsstelle [Frank et.al. 1996]. Es wird postuliert, dass die Untereinheiten VIa-L und VIa-H an der zitterfreien Thermogenese bei Säugetieren durch die Änderung des H⁺/e⁻-Verhältnisses der Isoenzyme beteiligt sein könnten, begleitet von einer Zunahme der Atmung und der Wärmeproduktion [Hüttemann et.al. 1999]. Ferner werden dieser Untereinheit regulatorische Funktionen zugeschrieben. Aus den Mutageneseexperimenten, die an den Hefemutanten (VIa-) durchgeführt wurden, geht hervor, dass diese Untereinheit eine aktivitätsmindernde Funktion hat, da in Abwesenheit dieser Untereinheit die Aktivität des Oxidase-Komplexes wesentlich höher war, als bei der Wildtyp-Hefe. Die Untereinheit VIa aus Hefe enthält ebenfalls eine TNP-ATP Bindungsstelle [Taanman et.al. 1994].

Untereinheit VIb ist die dritte extramembrane Untereinheit der Cytochrom c Oxidase, die aber im Gegensatz zu den Untereinheiten Va und Vb an der cytosolischen Seite des Enzymkomplexes lokalisiert ist. Sie hat Kontakt zu den Untereinheiten II und III.

Sie enthält zwei Disulfidbrücken, die zwischen den Aminosäuren Cys²⁹ und Cys⁶⁴ sowie Cys³⁹ und Cys⁵³ ausgebildet werden. Die zweite Disulfidbrücke steht mit dem korrespondierenden Segment des anderen Monomers in Kontakt. Diese Struktur (wie der N-Terminus der Untereinheit VIa) scheint ebenfalls an der Stabilisierung des Enzymdimers beteiligt zu sein [Tsukihara et.al. 1996].

Die Struktur der Cytochrom c Oxidase suggeriert, dass der Enzymkomplex unter physiologischen Bedingungen als Dimer arbeitet und dass die zwei „Brückenpeptide“ (Untereinheit VIa und VIb) vom Kerngenom kodiert werden. Dies mag auch ein Grund dafür sein, dass bei Prokaryonten der dimere Zustand nicht erreicht werden kann, da diese Untereinheiten fehlen [Tsukihara et.al. 1996].

Dieser Untereinheit werden außerdem bei Säugetieren regulatorische Funktionen zugeschrieben. Anhand der Experimente am Oxidasekomplex aus Rinderherz wurde gezeigt, dass das selektive Entfernen dieser Untereinheit aus dem Enzymkomplex mittels Gelfiltration zu einer Zunahme der Enzymaktivität führt [Weishaupt et.al. 1992]. Die Untereinheit VIb spielt anscheinend bei der Assemblierung des voll aktiven Enzymkomplexes eine Rolle, da bei den Hefemutanten, denen diese Untereinheit fehlte, nur 5-15 % der Enzymaktivität im Vergleich zur Wildtyp-Hefe gemessen wurden [Grossman et.al. 1997].

Untereinheit VIc hat die Form einer Hantel. Ihre transmembrane Helix hat Kontakt zur Helix 1 der Untereinheit II. Sie weist ein ausgedehntes Peptidsegment auf der Matrixseite, sowie eine aus vier Windungen bestehende α -Helix auf der cytosolischen Seite auf, die parallel zur Membranoberfläche liegt.

Die transmembrane Helix der Untereinheit VIIa ist gegenüber der Untereinheit III lokalisiert. Der C-Terminus liegt auf der cytosolischen Seite in der Nachbarschaft zu dem C-Terminus der Untereinheit VIIc. Zwischen der extramembranen Matrixdomäne und den Helices 1 und 2 der Untereinheit III besteht eine Kreuzwechselwirkung [Tsukihara et.al. 1996]. Die Untereinheit VIIa wird in gewebespezifischen Isoformen exprimiert, ihre Funktion innerhalb des Enzymkomplexes ist unklar.

Untereinheit VIIb charakterisiert sich durch eine ausgedehnte, extramembrane Struktur an der cytosolischen Seite, aber durch keine besondere Domäne an der Matrixseite. Ihre transmembrane Helix liegt in der Nähe der transmembranen Helix der Untereinheit IV [Tsukihara et.al. 1996].

Zwischen den Untereinheiten VIIa und VIIb, ähnlich wie zwischen den Untereinheiten VIa und VIc, besteht eine evolutionäre Verwandtschaft, da mittels der immuno-

logischen Experimente gezeigt wurde, dass die monoklonalen Antikörper sowohl an die Untereinheit VIa und VIc bzw. VIIa und VIIb binden [Schneyder et.al. 1991].

Untereinheit VIc grenzt an die Untereinheit VIII sowie an die äußere Oberfläche der Untereinheit I an. Ferner ist sie über eine geschlossene, diagonale Manschette an Helices 1 und 12 der Untereinheit I plaziert. Ihr kurzer N-Terminus bildet eine irreguläre, extramembrane Konformation [Tsukihara et.al. 1996].

Untereinheit VIII liegt, wie bereits erwähnt, nahe der Untereinheit VIc, sowie parallel zu der transmembranen Helix der Untereinheit IV. Es besteht zudem ein Kontakt mit den Helices 1 und 12 der Untereinheit I. Ein Teil des N-terminalen Segments, von Thr² bis Lys⁴, bildet eine antiparallele β -Struktur mit den Aminosäuren Glu⁴⁸¹ und Thr⁴⁸⁴ des C-terminalen Segments der Untereinheit I [Tsukihara et.al. 1996]. Die Untereinheit VIII kommt ebenfalls in gewebsspezifischen Isoformen vor [Rizzuto et.al. 1989] [Scheja et.al. 1992].

1.6.3 Isoformen der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase

Die Untereinheiten VIa, VIIa und VIII der Cytochrom c Oxidase kommen in zwei gewebespezifischen Isoformen (Leber-Typ und Herz-Typ) vor. Dies konnte anhand elektrophoretischer, immunologischer und kinetischer Eigenschaften, sowie der Aminosäuresequenzanalyse zwischen den korrespondierenden, kernkodierten Untereinheiten aus den verschiedenen Tierspezies und -geweben, demonstriert werden [Merle et.al. 1982] [Bonne et.al. 1993] [Freund et.al. 1994] [Schägger et.al. 1995] [Arnold et.al. 1997]. Diese Entdeckung wurde durch das Klonen und die Sequenzanalyse der cDNA für Untereinheit VIa aus der Ratte [Schlerft et.al. 1988], sowie die Untereinheiten VIIa und VIII aus Rind bestätigt [Seelan et.al.1991] [Lightowlers et.al. 1990]. Die historische Grundlage für die Bezeichnung der Untereinheiten als L-Isoform und H-Isoform waren die Unterschiede in dem N-Terminus. Die L- und H-Isoformen sind Produkte verschiedener Gene [Grossman et.al. 1997].

Die Zahl, sowie das Muster der gewebespezifischen Isoformen scheint nicht bei allen Säugetieren gleich zu sein. Bei der Ratte findet sich nur eine Isoform der Untereinheit VIIa. Bei dem Menschen, dem Schaf und dem Kaninchen wurde nur eine Isoform der Untereinheit VIII bestimmt. Für Untereinheit VIa wurden bei allen Säugetieren gewebespezifische Isoformen beobachtet. Der Herz-Typ (VIa-H) wird nur im Herz und Skelettmuskulatur, aber nicht in glatter Muskulatur, exprimiert. Die Expression der Herz-Typ-Gene für die Untereinheiten VIa und teilweise für die Untereinheit VIIa

wird entwicklungspezifisch reguliert. Bei dem Menschen wechselt ihre Expression von dem Leber-Typ im fötalen Herz, sowie Skelettmuskulatur in den Herz-Typ nach der Geburt [Bonne et.al. 1993]. Ein Wechsel der Isoformexpression für Untereinheit VIa wurde auch während der Muskelentwicklung bei Rind [Ewart et.al. 1991] und während der Differenzierung der menschlichen Myogenzellen gezeigt [Taanman et.al. 1992]. Die gewebespezifische Transkription der Gene der Untereinheit VIIa- Isoformen scheint weniger streng zu sein, als bei den Untereinheit VIa-Isoformen, da eine co-Expression der menschlichen VIIa-L- und VIIa-H-Isoformen in den Skelettmuskeln und Myogenzellen beschrieben wurde [Taanman et.al. 1992]. Die Gene für die Untereinheiten VIa-L und VIIa-L werden in allen anderen Geweben exprimiert und es wird angenommen, dass sie sog. „house keeping“ Gene repräsentieren [Smith et.al. 1993].

	Untereinheit VIa				Untereinheit VIIa				Untereinheit VIII			
	Leber	Herz	GM	BF	Leber	Herz	GM	BF	Leber	Herz	GM	BF
Mensch	L	L+H	-	-	L	L+H	-	-	L	L	-	-
Rind	L	H	L	-	L	H	H	-	L	H	L+H	H
Schaf	L	H	-	-	L+H	L+H	-	-	H	H	-	-
Hund	L	H	-	-	L	H	-	-	L	H	-	-
Kaninchen	L	L+H	-	-	L	L+H	-	-	H	H	-	-
Ratte	L	L+H	-	L	L	L	-	-	L	H	-	H
Huhn	?	?	-	-	L+H	H	-	-	L	H	-	-
Forelle	-	-	-	-	L	H	-	-	H	H	-	-

Verteilung der Isoformen der Cytochrom c Oxidase in verschiedenen Spezies und Geweben [Kadenbach et.al. 1995] [Grossma et.al.1997]; GM = glatte Muskulatur, BF = braunes Fettgewebe.

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung ob und welche der 13 Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase sowohl *in vitro* (mittels Proteinkinase A) als auch *in vivo* (mittels Glukagon) cAMP-abhängig phosphoryliert werden. Mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden wurde des Weiteren versucht, die Konsensussequenzen der phosphorylierten Untereinheiten zu ermitteln. Schließlich sollte die

Relevanz der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase für den Energiestoffwechsel untersucht werden.

2.0 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Materialien

Carbogen	Linde	Düsseldorf
Liquemin (Heparin-Na)	Hoffman-La Roche	Grenzach-W.
Nembutal (Pentobarbital-Na)	Ceva	Düsseldorf
Collagenase	Sigma	Steinheim
Glukagon	Sigma	Steinheim
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	Calbiochem	Bad Soden
Natriumfluorid	Merck	Darmstadt
Pefabloc SC (AEBSF)	Boehringer	Mannheim
cAMP-abhängige Proteinkinase A (katalytische Untereinheit)	Promega	Heidelberg
Proteinkinase C (katalytische Untereinheit)	Calbiochem	Bad Soden
α P-Phosphorsäure und γ - α P-ATP	Hartmann Analytic	Braunschweig
Röntgenfilm (DEF-2)	Kodak	Stuttgart
Acrylamid-Bis-Premix 40% oder 30% (w/v) (29:1)	Serva	Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethyläthylen- diamin (Temed)	Fluka	Neu-Ulm
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck	Darmstadt
SDS-PAGE-Standard	BioRad	München
Niedermolekularer SDS-PAGE- Standard	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
IPG Streifen pH 4-7 bzw. pH 3-10 13 oder 18 cm lang	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
IPG Puffer pH 4-7, pH 3-10	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Ampholine pH 3,5-10 für IEF	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Bis-Tris (bis[2-Hydroxyethyl]imino- tris[hydroxymethyl]methan)	Sigma	Steinheim
Tris (tris[Hydroxymethyl]aminomethan)	Sigma	Steinheim
Tricine (N-tris[Hydroxymethyl]methyl- glycin;N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxy- methyl)ethyl]-glycin)	Sigma	Steinheim
ϵ -Amino-n-Caprinsäure (6-Amino-n-Hexansäure)	Sigma	Steinheim

Harnstoff	Merck	Darmstadt
Titriplex III (Ethylendinitrilotetra-essigsäure Dinitriumsalz-Dihydrat)	Merck	Darmstadt
EGTA (Ethylen-Glycol bis(2-Amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Serva	Heidelberg
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-amino]-Propansulfat)	Sigma	Steinheim
Hepes	Boehringer	Mannheim
SDS (Dodecylsulfat *Na-Salz)	Serva	Heidelberg
DTT (1.4-Dithiothreitol)	Boehringer	Mannheim
Iodoacetamid	Sigma	Steinheim
Brilliant Blau G	Sigma	Steinheim
Centricon YM-30, 30 000 MW	Millipore	Eschborn
Anti-Maus IgG Peroxidase Conjugat (sekundärer Antikörper)	Dianova	Hamburg
Percoll	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Sigma	Steinheim

2.2 Geräte

Spectralphotometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Filterphotometer	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge RC-5B (Rotor SS 34 und SM 24)	Sorvall	Bad Homburg
Ultrazentrifuge L7-55 (Rotor Ti 50)	Beckmann	München
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Platin Elektrode (PO ₂ Analysator)	Bachofer	Reutlingen
Schreiber: Servogor 320	BBC Goerz	Nürnberg
Thermobad	Haake FS	Karlsruhe
Pumpe: Vario-Pumpsystem	Isamtec	Zürich
Teflon-Oxygenator	nach Scholz & Schallweg	(nicht veröffentlicht)
Elektrophoreseeinheit PROTEAN II xi Cell	BioRad	München
Semi-Dry Transfer Cell Model Trans-Blot SD	BioRad	München
Semi-Dry Power Supply Model 200/2.0	BioRad	München
Geltrockner Model 583	BioRad	München

Hydro Tech Vacuum Pumpe	BioRad	München
Elektrophoresestromversorgungs- gerät Model 1000/500	BioRad	München
Elektrophoreseeinheit Multiphor II	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Hoefler Elektrophoreseeinheit SE 600	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Elektrophoresestromversorgungs- gerät EPS 3500 XL	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
Kühlbad Multi Temp III	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg

2.3 Hepatozytenisolierung

Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer [Krebs&Henseleit, 1932]

115	mM	NaCl
25	mM	NaHCO ₃
5,9	mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
1,24	mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
1,2	mM	Na ₂ SO ₄
1,25	mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O

Perfusionmedium A (1Liter, 37°C, pH 7,4)

Krebs-Henseleit Lösung ohne 1,25 mM CaCl₂ x 2H₂O

10	mM	Glukose
0,5	mM	EGTA

Perfusionsmedium B (100 ml, 37°C, pH 7,4)

Krebs-Henseleit Lösung mit 2,5 mM CaCl₂ x 2H₂O

10	mM	Glukose
4300	U	Collagenase

Waschmedium (500 ml, 4°C, pH 7,4)

Krebs-Henseleit Bicarbonatpuffer mit 0,2 mM NaH₂PO₄ x H₂O; bei ³²P Beladung

10	mM	Hepes
----	----	-------

Fraktionierungsmedium (4°C, pH 7,4)

250	mM	Saccharose
10	mM	Tris-HCl
2	mM	EDTA (K ⁺ -Salz)
20	mM	Natriumfluorid
1	mM	Pefabloc SC

Für die Experimente wurden männliche Albinoratten (*Rattus norvegicus*, Stamm Wistar) mit einem Gewicht von 200-220 g, der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität verwendet. Die Ratten erhielten Altromin-Standarddiät (Firma Altromin, Lage/Lippe) und Wasser nach Belieben.

Die Ratten wurden zwischen acht und neun Uhr morgens operiert. Zunächst wurde der Ratte intraperitoneal Nembutal (Pentobarbital-Na; 12 mg/100 g Gewicht, d.h. ca. 175 µl/100 g Gewicht) gespritzt. Etwa 20 Minuten später folgte die Injektion des Heparins (250 I.E./100 g Gewicht) in die Vena femoralis, um der Koagulation des Blutes vorzubeugen. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und die Organe im Bauchraum nach rechts verschoben.

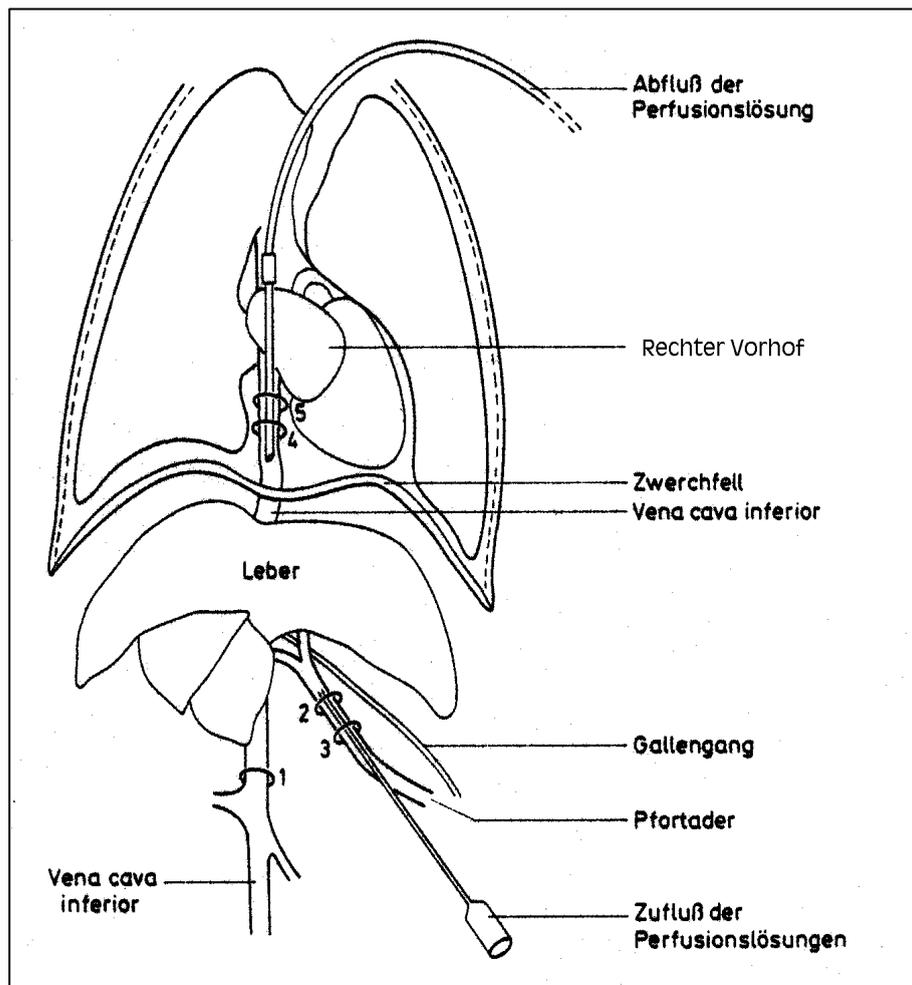


Abb. 4 Präparationschema mit Ligaturen (Nr.1, Nr.2, Nr.3, Nr.4 und Nr.5) und Kanülierungsstellen.

Um die untere **Vena cava inferior** (Hohlvene) unterhalb der Leber wurde mit einer spitzen Pinzette eine lose Ligatur (Nr.1) gelegt. Um die **Vena portae** (Pfortader) wurden ebenfalls zwei lose Ligaturen (Nr.2 und 3) gelegt. Unterhalb der Ligatur Nr.3 wurde die **Vena portae** aufgeschnitten und sofort die Kanüle mit Schlauch eingeführt. Das Perfusionsmedium A wurde mit Carbogen (95 % O₂ : 5 % CO₂) in einem Teflon-Oxygenator begast und durch ein Thermowasserbad auf 37°C erwärmt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Flußgeschwindigkeit 3-4 ml/min. Nach der Kanülierung wurden die beiden Ligaturen um die Vena portae und die Ligatur um die

Vena cava inferior fest verschlossen. Die Vena cava inferior wurde sofort durchgeschnitten, damit das Perfusat abfließen konnte und der Druck auf die Leber verringert wurde. Anschließend wurde der Thorax geöffnet und die Vena cava inferior kanüliert, dann mit zwei Ligaturen (Nr.4 und 5) fest fixiert. Die Flußgeschwindigkeit wurde auf 30 ml/min. eingestellt und blieb bis zum Ende der Perfusion konstant. Anschließend wurde die Leber aus dem Bauch herauspräpariert und auf den Perfusionstisch gelegt. Nach einer 15minütigen, offenen Vorperfusion mit Perfusionsmedium A wurden durch Entzug von Ca^{2+} die Desmosomen gelöst. In einem weiteren Schritt wurde die extrazelluläre Matrix durch Ca^{2+} aktivierte Collagenase aufgelöst. Dies erfolgte mit der Perfusionslösung B ca. 10 Minuten in einem geschlossenen System. Anschließend wurde die Leber in eine eisgekühlte Petrischale mit Waschmedium übergeführt und vorsichtig ausgestrichen. Die Hepatozytensuspension wurde zweimal durch ein Nylontuch (Porengröße 200 μm) filtriert, um Bindegewebe und Zellaggregate zu entfernen. Eine viermalige Sedimentation der Zellsuspension (jeweils 15 Minuten) sorgte für eine schonende Trennung der intakten Hepatozyten (Sediment) von Zelltrümmern (Überstand, der jeweils vorsichtig abgesaugt wurde).

Die Vitalität der Hepatozyten wurde mittels Trypanblau-Färbung (ca. 90 % der isolierten Hepatozyten waren vital) und der Glukoseproduktion der mit Glukagon stimulierten Hepatozyten ermittelt.

So gewonnene Hepatozyten wurden mit Waschmedium auf 15 mg/ml eingestellt und sofort für das Experiment eingesetzt.

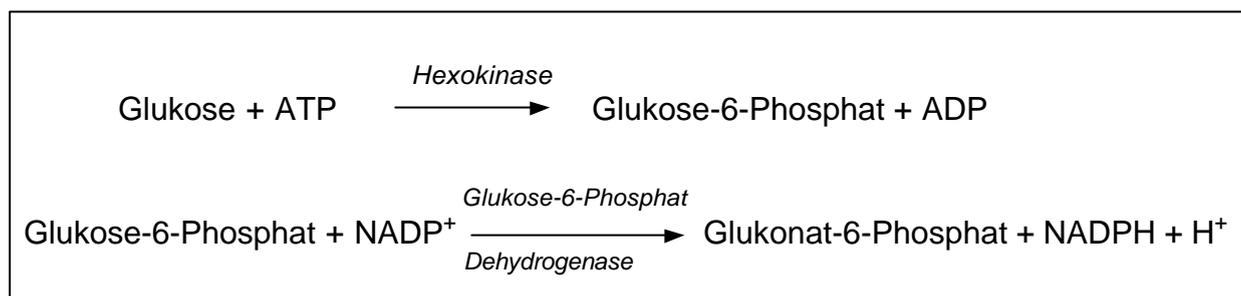
2.4 Bestimmung der freigesetzten Glukose nach Glukagonstimulation

2 ml der Hepatozytensuspension (15 mg/ml Suspension) wurden in einen 25 ml Plastik-Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C in einem Schüttelbad über einen Zeitraum von 15 Minuten vorinkubiert. Zur Beginn der Inkubation wurden die Hepatozyten mit Carbogen ca. 20 Sekunden lang begast, dann alle 20 Minuten. Ab der 15. Inkubationsminute wurde alle 2 Minuten jeweils 100 μl Probe von dem Kontrollansatz entnommen und beginnend mit der 16. Inkubationsminute wurde ebenfalls alle 2 Minuten 100 μl Probe von dem Glukagonansatz entnommen. Die Proben wurden jeweils mit 100 μl 1,2 M Perchlorsäure versetzt (Proteinfällung, Stop der Glucosebildung). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde dem Kontroll-

ansatz 70 µl destilliertes Wasser und dem Glukagonansatz 70 µl Glukagon (10^{-7} M) zugesetzt. Es wurden insgesamt jeweils 15 Proben entnommen. Die Proben wurden anschließend mit der Eppendorf-Tischzentrifuge 2 Minuten zentrifugiert. 160 µl des Überstandes wurde mit 22 µl 1M Trap / 6M KOH neutralisiert und für 10 Minuten bei 4°C stengelassen. Dann folgte erneut eine 2 minütige Zentrifugation.

Der Überstand wurde für die Bestimmung der Glukoseproduktion mittels eines Glukosetests nach Bergmeyer [Bergmeyer, 1974] verwendet.

Reaktion:



Die NADPH Zunahme wurde spektrophotometrisch gemessen.

Testreagenz:

100	mM	Trap (pH 7,6)
0,8	mM	NADP ⁺
0,8	mM	ATP
10	mM	MgCl ₂
1	U	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Testausführung:

600	µl	Testreagenz
100	µl	Probe

Start:

1	U	Hexokinase
---	---	------------

Filter:

334	nm
-----	----

2.5 Beladung der Hepatozyten mit ³²P-Phosphat und Stimulation mit Glukagon und TPA

Pro Ansatz wurden 2 ml Hepatozytensuspension (ca. 15 mg Protein/ml Suspension) in einen 25 ml Plastik-Erlenmeyerkolben überführt und mit 7,4 MBq ³²P-Phosphat versetzt. Die Ansätze wurden in einem Schüttelwasserbad bei 37°C 1 Stunde vorinkubiert. Zu Beginn der Inkubation wurde jeder Ansatz 20 Sekunden lang

vorsichtig mit Carbogen begast und anschliessend luftdicht verschlossen. Die Begasung der Ansätze wurde in 20 minütigen Abständen wiederholt.

Die Zugabe von Glukagon (10^{-7} M) und TPA (2×10^{-7} M) erfolgte nach der einstündigen Vorinkubation und die Inkubation wurde danach für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Danach wurde die Inkubation der Ansätze durch eine kurze Zentrifugation (ca. 30 Sekunden) beendet.

2.5.1 Fraktionierung der Mitochondrien aus Hepatozyten

Fraktionierungspuffer (pH 7,4)

250	mM	Saccharose
10	mM	Tris-HCl
2	mM	EDTA (K^+ -Salz)
20	mM	NaF
1	mM	Pefabloc SC (AEBSF)

Die Sedimente der Hepatozyten wurden mit jeweils 1 ml Fraktionierungspuffer resuspendiert. Die resuspendierten Kontroll-, Glucagon-, bzw. TPA Ansätze wurden vereinigt und in einen 15 ml Glas-Teflon-Potter überführt. Anschliessend wurden die Suspensionen jeweils 20 mal vorsichtig bei 1000 U/min homogenisiert. Die Homogenate wurden 15 Minuten bei 500xg (Sorvall-Zentrifuge; Rotor SS 34, 4°C) zentrifugiert, um die Mitochondrien von groben Verunreinigungen zu befreien. Durch weitere 15 minütige Zentrifugation der Überstände bei 8000xg (Sorvall-Zentrifuge; Rotor SS 34, 4°C) lassen sich die Mitochondrien sedimentieren. Die Sedimente wurden mit dem gleichem Volumen des Fraktionierungspuffer resuspendiert und erneut wie oben bereits beschrieben zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden mit jeweils 500 µl Fraktionierungspuffer resuspendiert.

Der Aufschluß der Mitochondrien erfolgte nach der Methode von Parson [Parson et.al. 1966] wie im Abschnitt 2.6.3 beschrieben.

2.6 Fraktionierung der inneren Mitochondrienmembran aus Rattenleber

Fraktionierungsmedium (pH 7,2)

250	mM	Saccharose
10	mM	Trap
5	mM	KH_2PO_4
20	mM	KCl
2	mM	EDTA

5 mM MgCl₂ x 6H₂O
1 mM Protease Inhibitor (AEBSF)

Hypotonischer Phosphatpuffer (pH 7,4)

20 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (0,18g/1,83g)
0,02 % Albumin

MOPS-NaCl-Puffer (pH 7,4)

300 mM NaCl
10 mM MOPS

Die Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, die Zentrifugation bei 4°C.

2.6.1 Fraktionierung der Mitochondrien aus Rattenleber [Klingenberg & Slenczka, 1959]

Die Leber wurde mit eiskalter 0,9 % NaCl-Lösung blutfrei perfundiert. Anschließend wurde die Leber freipräpariert und in eisgekühltes Fraktionierungsmedium überführt, dann mit einer Schere zerkleinert und mehrmals mit Medium gespült. Die zerkleinerte Leber wurde in einen 60 ml Glas-Teflon-Potter gegeben, auf 60 ml mit Medium aufgefüllt und bei 1000 U/min. vorsichtig homogenisiert. Das Homogenat wurde auf vier Sorvallröhrchen (40 ml) verteilt, auf 40 ml mit Medium aufgefüllt und bei 300xg in der Sorvall-Zentrifuge (Rotor SS 34) zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Kerne zu entfernen. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand wurde 10 Minuten bei 8000xg Sorvall-Zentrifuge (Rotor SS 34) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der im Sediment enthaltene Blutfleck und Fett wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Sedimente wurden mit Fraktionierungsmedium resuspendiert und erneut 20 Minuten bei 8000xg (Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS 34) zentrifugiert. Die Sedimente wurden anschließend mit jeweils 500 µl Fraktionierungsmedium aufgenommen, in einen 5 ml Glas-Teflon-Potter überführt und vorsichtig von Hand homogenisiert.

2.6.2 Reinigung der Mitochondrien über einen Percoll-Gradienten [Riezmann et. al. 1983]

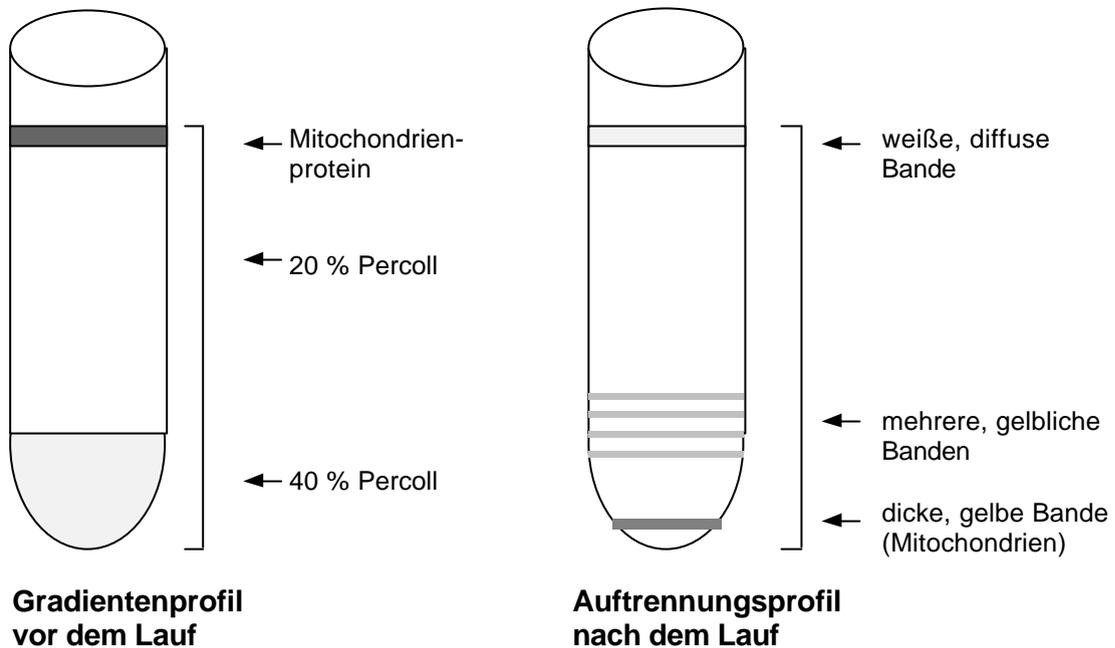
Die Mitochondrien wurden über einem Percoll-Gradienten von Membranfragmenten des endoplasmatischen Retikulums gereinigt. Hierzu wurde ca. 30-37 mg Mitochondrienprotein über einen diskontinuierlichen Gradienten geschichtet.

Die Zentrifugenröhrchen (30 ml Ultra-Clear-Röhrchen, Fa. Beckmann) wurden in folgender Art mit Percoll beschichtet:

- 12 ml 40% Percoll

- 14,25 ml 20% Percoll

Die Zentrifugation erfolgte in einer Beckman Ultrazentrifuge bei 4° C über einen Zeitraum von 30 Minuten (Rotor SW 27; 81 000xg).



Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und verworfen, die Mitochondrien wurden ebenfalls mit einer Pipette abgenommen und in ein 40 ml Sorvall-Röhrchen gegeben.

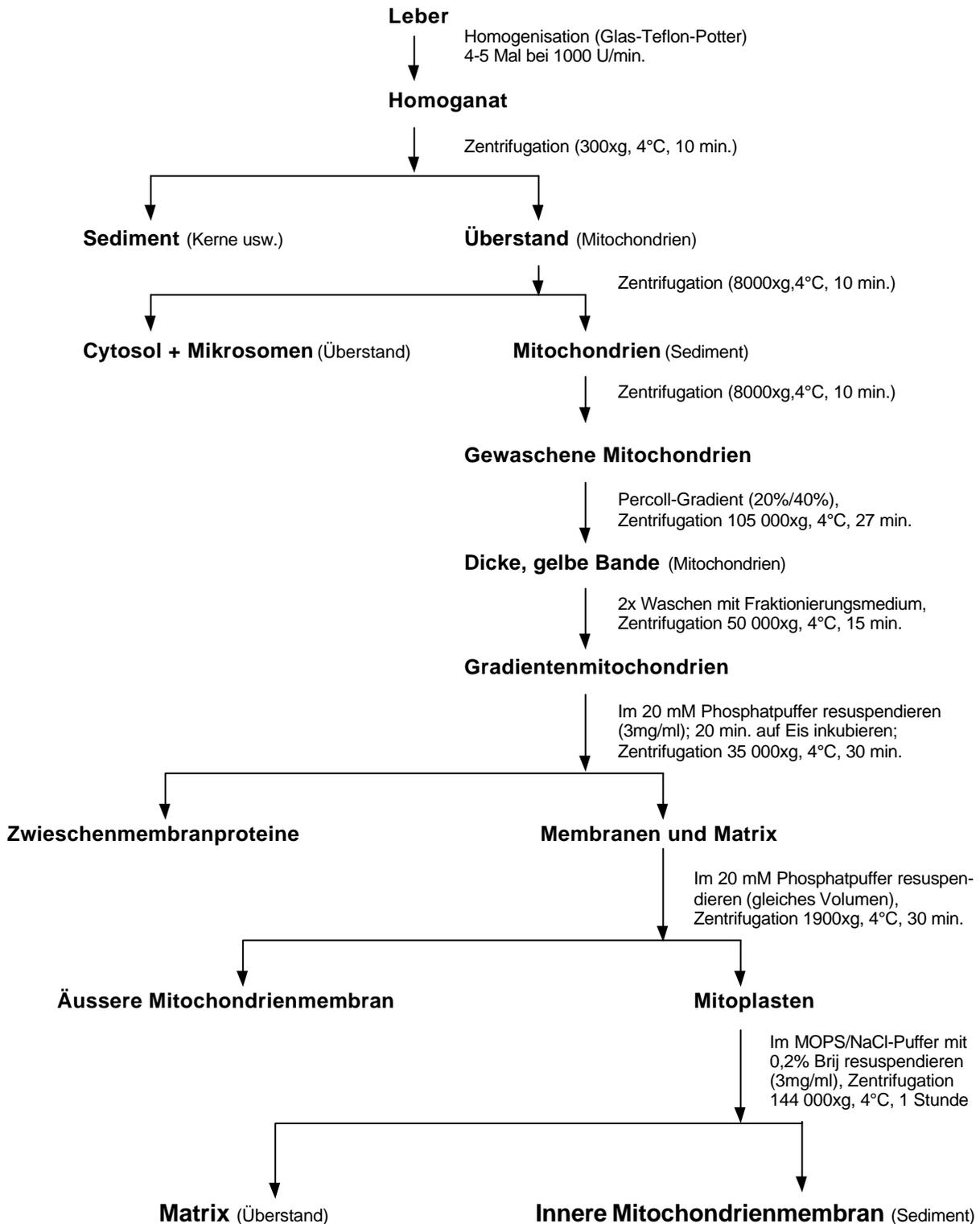
Die geernteten Mitochondrien wurden auf 40 ml mit Fraktionierungsmedium aufgefüllt und zwei mal 15 Minuten bei 50 000xg (Rotor SS 34) zentrifugiert. Der Überstand wurde vom nicht festen Sediment getrennt und verworfen. Das Sediment wurde mit 100 µl Fraktionierungsmedium resuspendiert.

2.6.3 Gewinnung der inneren Mitochondrienmembran [Parson et.al. 1966]

Die resuspendierten Mitochondrien wurden mit hypotonischem Phosphatpuffer auf 3 mg/ml eingestellt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden sie 15 Minuten bei 35 000xg (Rotor SM 24, äusserer Ring) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment wie oben beschrieben mit Phosphatpuffer resuspendiert und erneut 30 Minuten bei 1900xg (Rotor SM 24, äusserer Ring) zentrifugiert. Das Sediment (Mitoplasten) wurden mit MOPS-NaCl-Puffer (ca. 3 mg/ml) resuspendiert und mit 0,2 % Brij-35 + 1 % Protease Inhibitor (AEBSF) versetzt. Die Suspension

wurde 1 Stunde bei 144 000xg (Rotor Ti 50) zentrifugiert. Das Sediment enthält Fragmente der inneren Mitochondrienmembran.

2.6.4 Schema der gesamten Fraktionierung der inneren Mitochondrienmembran aus Rattenleber



2.7 Fraktionierung der Mitochondrien aus Rattenherz

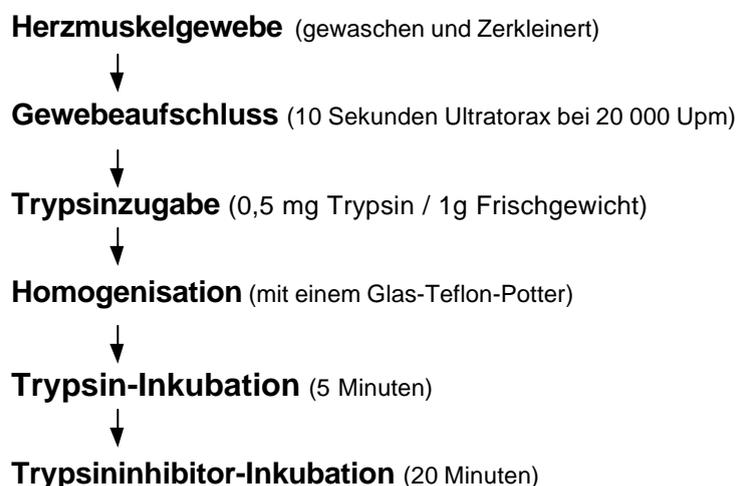
Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis, die Zentrifugationen bei 4°C.

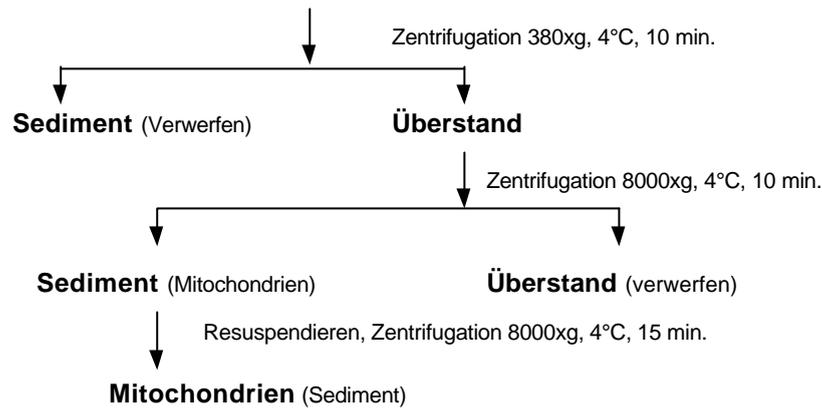
Fraktionierungsmedium (pH 7,2)

250	mM	Saccharose
10	mM	Tris
5	mM	KH ₂ PO ₄
20	mM	KCl
0,2	mM	EDTA

Das Rattenherz wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung blutfrei perfundiert. Das herauspräparierte Herz wurde aufgeschnitten und in gekühlter NaCl-Lösung geschwenkt. Anschliessend wurde es in 5 ml Fraktionierungsmedium gegeben, mit einer Schere zerkleinert und mit dem Ultra-Turrax (10 Sekunden bei Stufe 7) weiter aufbereitet. Es wurden 0,5 mg Trypsin pro 1 Gramm Herzfrischgewicht in 10 ml Fraktionierungsmedium aufgelöst und dem Brei beigemischt. Danach folgte eine sofortige Homogenisation in einem Glas-Teflon-Potter (ca. 20 mal bei 1000 Upm). Das Homogenat wurde 5 Minuten inkubiert und anschließend mit einer äquivalenten Menge Fraktionierungsmedium mit Trypsin-Inhibitor (6 mg Trypsin-Inhibitor / 1 mg Trypsin) versetzt. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 380xg. Der Überstand wurde durch Mull abgegossen und weitere 10 Minuten bei 8000xg zentrifugiert. Die im Sediment enthaltenen Mitochondrien wurden vorsichtig und möglichst vollständig in Fraktionierungsmedium aufgenommen und weitere 15 Minuten bei 8000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl Fraktionierungsmedium aufgenommen und von Hand mit einem Glas-Teflon-Potter vorsichtig homogenisiert.

2.7.1 Schema der gesamten Fraktionierung von Herzmitochondrien





2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration [Lowry et.al. 1951]

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry [Lowry et.al. 1951]. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Messung der Extinktion wurde mit dem Spectralphotometer Ultrospec 3000 bei 578 nm durchgeführt.

2.9 Bestimmung des Atmungskontrollquotienten und des P/O-Quotienten an isolierten Mitochondrien

Der Atmungskontrollquotient stellt ein Maß für die Kopplung zwischen Oxidation und Phosphorylierung dar.

Er wird definiert als:

$$Q = \frac{\text{Sauerstoffverbrauch im aktiven Zustand}}{\text{Sauerstoffverbrauch im kontrollierten Zustand}}$$

Der aktive Zustand bedeutet Stimulation des Sauerstoffverbrauchs in Anwesenheit vom ADP, der kontrollierte Zustand zeigt den Sauerstoffverbrauch nach dem das ADP in ATP überführt worden ist.

Der P/O-Quotient, ein Maß für die Energiekonservierung, ist definiert als die Zahl der ATP-Moleküle, die pro Sauerstoffatom aus ADP und anorganischem Phosphat bei einem bestimmten Substrat der Atmungskette gebildet werden.

$$P/O = \frac{\text{mol ATP gebildet}}{\text{mol O verbraucht}}$$

Die Menge des gebildeten ATP entsprach dem Verbrauch des zugesetzten ADP. Der Sauerstoffverbrauch ergab sich aus der Differenz der Sauerstoffkonzentration zum Zeitpunkt der Zugabe des ADP und der Konzentration nach Verbrauch des ADP.

Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in den verschiedenen Zuständen wurde mit Hilfe einer Clarke-Sauerstoffelektrode registriert [Clarke et.al. 1953], die seitlich in eine Reaktionskammer eingeschraubt wurde (Abb. 5).

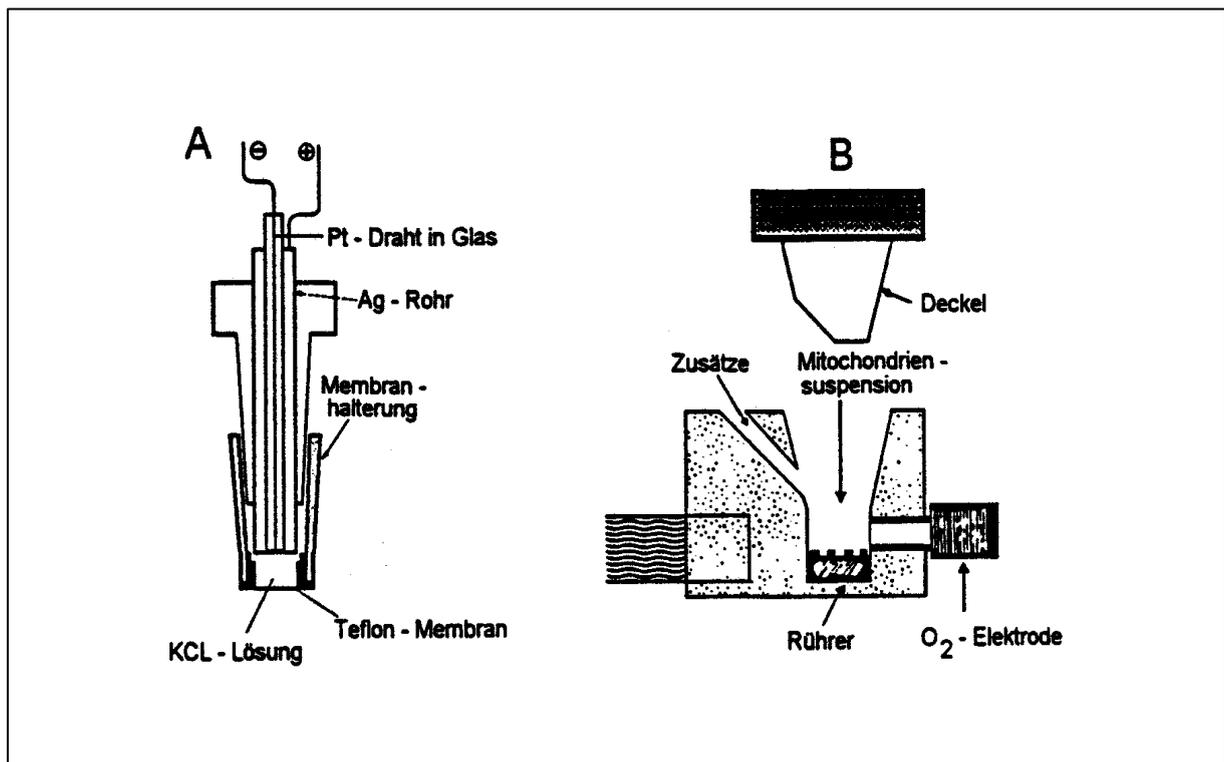


Abb. 5 A: Schematische Darstellung der Clarke-Sauerstoffelektrode, B: Reaktionskammer.

Die Mitochondrien (1mg/ml) wurden in 1,4 ml Fraktionierungsmedium (Raumtemperatur) mit Glutamat (7,2 mM) und Malat (5,8 mM) als Substrate inkubiert. Die Zugaben erfolgten durch einen seitlichen Zugang nach Verschluss der Reaktionskammer. Der O₂-Verbrauch wurde mit einem Schreiber registriert.

2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.10.1 2D-Blue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung der Komplexe der Atmungskette [Schägger et.al. 1991][Schägger et.al. 1994]

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde von Hermann Schägger zur Isolierung von Proteinkomplexen aus biologischen Membranen entwickelt.

Nativer Probenpuffer (pH 7,0)

750 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure
50 mM Bis-Tris/HCl

Laurylmaltosidlösung

10 % Laurylmaltosid

Brillant Blue G-250 Lösung

500 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure
5 % Brillant Blue G 250

400 μ g inneren Mitochondrienmembran wurde in 40 μ l Probenpuffer und 7,5 μ l 10 % Laurylmaltosid gelöst und 35 Minuten bei 100 000xg zentrifugiert (Rotor Ti 50; 4°C). Der Überstand (enthält solubilisierte Komplexe der Atmungskette) wurde durch Zugabe von 3,75 μ l Brillant Blue G-Lösung gefärbt.

Kathodenpuffer (pH 7,0)

50 mM Tricin
15 mM Bis-Tris
0,02 % Brillant Blue G 250

Anodenpuffer (pH 7,0)

50 mM Bis-Tris/HCl

Gelpuffer (3x) (pH 7,0)

1,5 M ϵ -Amino-n-Caprinsäure
150 mM Bis-Tris/HCl

Acrylamid-Bis-Premix 40% (w/v) (29:1)

Zusammensetzung der Gellösungen

Sammelgel:

0,75	ml	Acrylamid-Bis-Premix 40% (w/v) (29:1)
2,5	ml	Gelpuffer (3x)
60	μ l	10 % APS
6	μ l	TEMED
4,2	ml	Wasser (aq. bidest.)

5 % Trenngel:

2,6	ml	Acrylamid-Bis-Premix 40% (w/v) (29:1)
7	ml	Gelpuffer (3x)
90	μ l	10 % APS
9	μ l	TEMED
11,3	ml	Wasser (aq. bidest.)

13 % Trenngel

5,9	ml	Acrylamid-Bis-Premix 40% (w/v) (29:1)
6	ml	Gelpuffer (3x)
3,6	g	Glycerin

60	µl	10 % APS
6	µl	TEMED
2,4	ml	Wasser (aq. bidest.)

Das Gradientengel wurde mit abnehmender Konzentration an Acrylamid in eine Gelkammer bei Raumtemperatur gegossen. Nach der Polymerisation, die ebenfalls bei Raumtemperatur erfolgte, wurde das Sammelgel darüber gegossen.

Nach dem Entfernen des Kamms wurde das Gel mit Gelpuffer (1x) überschichtet und bis zum Einsatz bei 4°C aufbewahrt. Die Geldicke betrug 1,5 mm. Es wurden 80 µl des Überstandes (ca. 400 µg Protein) pro Geltasche auf das Gel aufgetragen. Die Proteinimmigration erfolgte über 1 Stunde bei 100 Volt (const.), die Proteintrennung erfolgte über 4-5 Stunden bei 500 Volt (const.) und höchstens 15 mA Stromstärke. Die Elektrophorese wurde bei 6°C durchgeführt.

Die Elution der Komplexe der Atmungskette erfolgte wie unter 2.11 beschrieben.

2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Schägger et.al.1987][Brandt et.al. 1989]

Die Auftrennung der Komplexe der Atmungskette in ihre Untereinheiten erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Probenpuffer (pH 6,8)

3	M	Harnstoff
50	mM	Tris/HCl
4	%	SDS
0,01	%	Brillant Blue G

Kathodenpuffer (pH 8,25)

100	mM	Tricin
100	mM	Tris
0,1	%	SDS

Anodenpuffer (pH 8,9)

200	mM	Tris/HCl
-----	----	----------

Gelpuffer (pH 8,45)

3	M	Tris/HCl
0,3	%	SDS

Acrylamid-Bis-Premix 40% oder 30% (w/v) (29:1)

Zusammensetzung der Gellösungen

<u>Sammelgel:</u>	0,95 ml	Acrylamid-Bis-Premix 30% (w/v) (29:1)
	1,75 ml	Gelpuffer
	60 µl	10 % APS
	6 µl	TEMED
	4,3 ml	Wasser (aq. bidest.)

<u>16,5 % Trenngel:</u>	12,4 ml	Acrylamid-Bis-Premix 40% (w/v) (29:1)
	10 ml	Gelpuffer
	10,8 g	Harnstoff
	100 µl	10 % APS
	10 µl	TEMED

Die Geldicke betrug jeweils 1 mm. Je nach Breite der Geltaschen wurde 100-200 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die Proteinimmigration erfolgte über 2 Stunden bei 30 Volt (const.), die weitere Proteintrennung erfolgte über 6-7 Stunden bei 40 mA Stromstärke (const.) und höchstens 200 Volt.

Nach beendeter Elektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamidgele gefärbt.

2.10.3 Zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten [Görg et.al. 1988] [Görg, 1991]

Die zweidimensionale Gelelektrophorese mit immobilisiertem pH Gradienten erlaubt die Auftrennung komplexer Proteingemische nach zwei voneinander unabhängigen Parametern: dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht.

2.10.3.1 Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH Gradienten

Solubilisierungslösung

7	M	Harnstoff
2	M	Thioharnstoff
4	%	Chaps
0,8	%	Ampholine pH 3,5-10
1,8	mM	Pefabloc SC

Äquilibrierungspuffer (pH 8,8)

50	mM	Tris/HCl
6	M	Harnstoff
30	%	Glycerin
2	%	SDS
1	%	DTT (erst unmittelbar vor dem Äquilibrieren zugeben)

Bromphenolblaulösung

500	mM	Tris/HCl-Puffer pH 6,8
-----	----	------------------------

0,3 % Bromphenolblau

DTT-Stammlösung

20 % DTT (frisch herstellen)

Äquilibrierlösungen

Lösung 1: 10 ml Äquilibrierungspuffer
30 µl Bromphenolblau-Lösung
500 µl DTT-Stammlösung

Lösung 2: 10 ml Äquilibrierungspuffer
30 µl Bromphenolblau-Lösung
260 mM Jodacetamid

IPG Puffer pH 4-7 L oder 3-10 L

IPG Gelstreifen

pH 4-7 L (130 x 3 x 0,5 oder 180 x 3 x 0,5 mm)

pH 3-10 L (130 x 3 x 0,5 oder 180 x 3 x 0,5 mm)

Es wurden zwischen 100 µg und 1 mg Protein in 340-400 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert. Die Rehydratation der IPG Gelstreifen, sowie der Probeneintritt erfolgten gleichzeitig in einer Rehydratisierungskassette über Nacht bei Raumtemperatur. Der Kühlblock der Fokussierungskammer wurde auf 15 °C temperiert und mit Kerosin benetzt. Die IPG Gelstreifen wurden luftblasenfrei auf den Kerosinfilm aufgelegt. Zusätzlich wurden zwei (links und rechts) ebenfalls rehydratisierte IPG Gelstreifen (ohne Probe) plaziert. Die Elektrodenstreifen wurden mit Wasser (aq. bidest.) getränkt und an den Enden der IPG Gelstreifen aufgelegt und aufgedruckt.

Die Laufparameter für die isoelektrische Fokussierung richteten sich nach der Art der IPG Gelstreifen.

Nach der Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG Gelstreifen bei -80°C aufbewahrt oder direkt für die zweite Dimension verwendet. Hierzu wurde der IPG Gelstreifen in ein Reagenzglas mit Äquilibrier-Lösung 1 gegeben und 15 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Lösung 1 abgegossen und die Äquilibrier-Lösung 2 zugegeben und erneut 15 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde der IPG Gelstreifen auf das Gel für die zweite Dimension plaziert.

2.10.3.2 Vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Kathodenpuffer (pH 7,1)

20 mM Tris
200 mM Tricin
0,1 % SDS

Anodenpuffer (pH 6,6)

112,5 mM Tris/Acetat
0,1 % SDS

Trenngelpuffer (pH 8,8)

1,5 M Tris/HCl
0,4 % SDS

Acrylamid-Bis-Premix 30% (w/v) (29:1)

Agarose-Lösung

0,5 % Agarose im Kathodenpuffer auflösen

Zusammensetzung der Gellösungen

<u>13 % Trenngel:</u>	15,6 ml	Acrylamid-Bis-Premix 30% (w/v) (29:1)
	4,5 g	Glycerin
	9 ml	Trenngelpuffer
	36 µl	40 % APS
	11,2 µl	TEMED
	7,8 ml	Wasser (aq. bidest.)

Die Geldicke betrug 1 mm. Das Gießen des Sammelgels ist nicht notwendig. Der äquilibrierte IPG Gelstreifen wurde auf das obere Ende des Trenngels plaziert und mit 2 ml heißer Agarose-Lösung überschichtet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über Nacht bei 100 Volt.

2.10.4 Coomassie-Blue Färbung [Schägger et.al. 1987]

Fixierlösung

50 % Ethanol
10 % Essigsäure

Färbelösung

0,025 % Brillant Blue G
10 % Essigsäure

Entfärbelösung

10 % Essigsäure

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden 1 Stunde unter ständigem Schütteln in Fixierlösung fixiert. Anschließend wurden die Gele 1-2 Stunden ebenfalls unter Schütteln in Färbelösung gefärbt. Das Entfärben der Gele erfolgte über mehrere Stunden unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung bis die proteinfreie Gelbereiche farblos waren. Die entfärbten Gele wurden dann im Wasser (aq. bidest.) gewässert.

2.10.5 Kolloidale Coomassie-Blue Färbung [Neuhoff et.al. 1988]

Fixierlösung

50	% (v/v)	Methanol
2	% (v/v)	Phosphorsäure

Inkubationslösung

34	% (v/v)	Methanol
2	% (v/v)	Phosphorsäure
17	% (v/v)	Ammoniumsulfat

Färbelösung

34	% (v/v)	Methanol
2	% (v/v)	Phosphorsäure
17	% (v/v)	Ammoniumsulfat
0,066	% (v/v)	Coomassie Blue G-250

Das Gel wurde über Nacht in Fixierlösung fixiert. Am nächsten Morgen wurde das Gel 3 mal mit Wasser (aq. bidest.) jeweils 30 Minuten gewaschen. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation in Inkubationslösung. Das Färben der Gels in Färbelösung dauerte zwischen 1-6 Tage. Danach wurde das Gel über mehrere Stunden im Wasser (aq. bidest) entfärbt.

2.11.6 Silberfärbung

Die Gele wurden anhand eines Silberfärbung-Protokolls für Proteine (Firma Amersham Pharmacia Biotech) gefärbt.

Fixierlösung

40	% (v/v)	Ethanol
10	% (v/v)	Essigsäure

Sensibilisierlösung

30	% (v/v)	Ethanol
25	% (w/v)	Glutardialdehyd

5	% (w/v)	Natriumsulfat
6,8	% (w/v)	Natriumacetat

Silbernitratlösung

2,5	% (w/v)	Silbernitrat
37	% (w/v)	Formaldehyd

Entwicklerlösung

2,5	% (w/v)	Natriumcarbonat
37	% (w/v)	Formaldehyd

Stopplösung

1,5	% (w/v)	EDTA-Na ₂ * 2H ₂ O
-----	---------	--

2.11 Elution der Komplexe der Atmungskette

Die Komplexe der Atmungskette wurden aus dem nativen Polyacrylamidgel ausgeschnitt. Die Proteinbanden wurden in kleine Gelstücke zerlegt und mit jeweils 500 µl Wasser (aq. bidest.) versetzt, dann über Nacht bei 4°C stengelassen. Mit Centricon YM-30 (30 000MW) wurden die Komplexe gereinigt und aufkonzentriert, anschließend für *in vitro* Experimente eingesetzt oder bei -80°C aufbewahrt.

2.12 In vitro Phosphorylierung der Komplexe der Atmungskette

Probenpuffer für Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung (pH 7,4)

20	mM	Tris/HCl
10	mM	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
1	mM	DTT
1	mM	EDTA
1	mM	MnCl ₂
0,2-5	mM	ATP

100-200 µg der eluierten Komplexe der Atmungskette wurden in 20 µl Probenpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 250 µU katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A und 184 kBq γ-³²P-ATP versetzt, dann 2 Stunden im Wasserbad unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Probenpuffer (Abschnitt 2.10.2) gestoppt.

Probenpuffer für Proteinkinase C abhängige Phosphorylierung (pH 7,5)

20	mM	Tris/HCl
100	mM	NaCl
1	mM	EDTA

1	mM	EGTA
15	mM	DTT
10	mM	MgCl * 6 H ₂ O
0,2	mM	ATP

100-200 µg der eluierten Komplexe der Atmungskette wurden in 20 µl Probenpuffer für Proteinkinase C resuspendiert. Die Suspension wurden mit 75 µU der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C und 184 kBq γ -³²P-ATP versetzt, dann 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Probenpuffer (Abschnitt 2.10.2) beendet.

2.13 Autoradiographie

Für die Autoradiographien wurde ein Röntgenfilm (DEF-2) eingesetzt. Die Expositionszeit richtete sich nach der im Gel gemessenen Menge an Radioaktivität und schwankte zwischen 1 bis 5 Tagen. Während dieser Zeit wurden die Kassetten entweder bei -80°C (wenn Verstärkerfolien eingesetzt wurden) oder bei Raumtemperatur gelagert.

Die Entwicklung der Filme erfolgte mit handelsüblichem Röntgenfilm-Entwickler und Röntgenfilm-Fixierer bei Raumtemperatur.

2.14 Western-Blot-Verfahren [Kyhse-Andersen, 1984; modifiziert von Schägger et.al. 1991]

Anodenpuffer (pH 8,7-8,8)

300	mM	Tris
100	mM	Tricin

Kathodenpuffer (pH 8,6-8,7)

300	mM	ϵ -Amino-n-Capronsäure
30	mM	Tris

Primärer Antikörper:

Monoklonaler Antikörper gegen die Cytochrom c Oxidase Untereinheit IV wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bernhard Kadenbach, Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

Sekundärer Antikörper

Peroxidase konjugierter Anti-Maus IgG (H+L), Firma Dianova, Hamburg.

PBS Puffer (=phosphate buffered saline) (pH 7,4-7,6)

10	mM	Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O
10	mM	KH ₂ PO ₄
2,7	mM	KCl
138	mM	NaCl

Blockierungspuffer

3	%	Rinderserumalbumin in PBS (w/v)
---	---	---------------------------------

Peroxidase-Färbung

0,03	%	4-Chloro-1-Naphtol
4,5	ml	Methanol
45	ml	PBS
50	µl	30 % H ₂ O ₂

Immobilon-P Transfer Membran (PVDF-Membran=Polyvinylidinfluorid-Membran)

Der Elektrotransfer der Proteine vom Polyacrylamidgel erfolgte auf PVDF-Membran. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer mit Methanol hydrophilisiert und mit Anodenpuffer angefeuchtet, dann auf drei übereinander gelegte mit Anodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Anschließend wurde das Gel, gefolgt von drei Lagen in Kathodenpuffer getränktem Filterpapier, auf die PVDF-Membran aufgelegt.

Der Elektrotransfer erfolgte ca. 2,5 Stunden bei 10 V.

Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran für 2 Stunden in Blockierungspuffer gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primärem Antikörper (1:500). Die Inkubation dauerte 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln oder 12 Stunden bei 4°C. Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die PVDF-Membran 3 mal 10 Minuten in PBS Puffer gewaschen. Der zweite Waschgang enthielt 50 µl Tween 20 pro 100 ml. Die Inkubationszeit mit dem sekundären Antikörper (1:200) betrug 2 Stunden. Anschliessend wurde die PVDF-Membran, wie oben beschrieben, gewaschen.

Der Antikörperrnachweis erfolgte mittels Meerrettich-Peroxidase-Färbung.

2.15 Massenspektrometrische Untersuchungen an Cytochrom c Oxidase

Die massenspektrometrische Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.E. Meyer, Institut für Physiologische Chemie I, Ruhr-Universität-Bochum, durchgeführt.

2.15.1 In-Gel-Verdau für MALDI-MS und μ HPLC

Die Gelstücke wurden in 1mm² kleine Stückchen zerlegt und 10 Minuten mit Verdaupuffer (10 mM NH₄OAc), dann mit Verdaupuffer/Acetonitril (1:1) gewaschen. Dieser Schritt wurde drei mal wiederholt. Der letzte Waschschrift mit Acetonitril führte zum Schrumpfen der Gelstücke. Diese wurden wieder in einer Trypsinlösung (0,05 μ g Trypsin / μ l Verdaupuffer) gequollen. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.15.2 Probenvorbereitung für MALDI-MS

Am nächsten Morgen wurde 10 μ l des Verdaupuffers zu den Gelstücken zugegeben und diese 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Überstände wurden vereinigt und mit Hilfe von ZipTip Pipettentips (Millipore, Bedford, USA) konzentriert. Die Proben wurden mit einer gesättigter Matrixlösung (4-hydroxy- α -cinnamic acid in 0,1 % TFA/Acetonitril (1:1, v/v)) gemischt.

2.15.3 MALDI-MS

MALDI-MS wurde mit Hilfe von Reflex III, ausgestattet mit SCOUT 384 als Ionenquelle (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland), durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung wurde auf 20 kV und die Reflexionsspannung auf 21,6 kV eingestellt. PSD-Spectra erhielt man mit einer Ursprungionselektion bis zu 30 Da. Die Reflexionsspannung wurde in 14 Schritten von 21,6 kV auf 0,65 kV reduziert. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von SUN Ultra (XACQ Software, Version 4.0) zusammengestellt. Die Weiterverarbeitung der Ergebnisse erfolgte mit XMASS Software, Version 5.0.

2.15.4 Datenbankrecherchen

Alle MS-Spektren wurden mit Hilfe des Algorithmus (SEQUESTTM, Version B22 und C1), eingeführt von Yates und Eng, ausgewertet.

Als Proteindatenbank wurde die aktuelle OWL- und dbEST-Datenbank (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository>) benutzt.

3.0 Ergebnisse

3.1 Glukosefreisetzung aus Hepatozyten nach Glukagonstimulation

Die Glukagoneffekte werden durch einen in der Cytoplasmamembran lokalisierten Glukagonrezeptor vermittelt. Um zu überprüfen ob die Rezeptoren der isolierten Hepatozyten funktionsfähig waren, wurde die Glukosefreisetzung nach Glukagonstimulation gemessen.

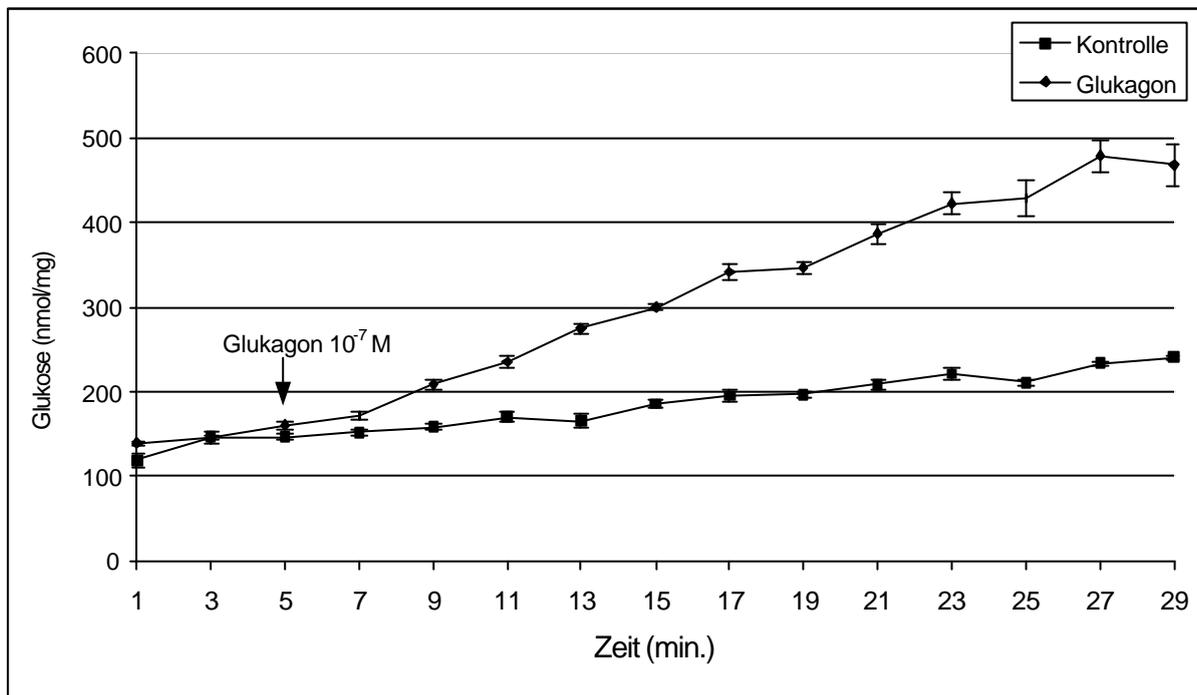


Abb.6 Glukosefreisetzung aus Hepatozyten nach Glukagonstimulation (n=6-7).

Glukagon (10^{-7} M) und destilliertes Wasser wurden nach Abnahme der dritten Probe dem Glukagon- bzw. Kontroll-Ansatz zugegeben. Bereits nach zwei Minuten konnte eine 12% Glukosefreisetzung im Glukagon-Ansatz registriert werden, die nach vier Minuten 31 % betrug und kontinuierlich anstieg (Abb.6).

Die Vitalität der Hepatozyten wurde zusätzlich durch Anfärben mit 0,2 % Trypanblau überprüft, wonach mehr als 90 % der Leberzellen für Trypanblau undurchlässig waren.

3.2 In vitro Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase

Für die *in vitro* Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase wurden diejenigen Proteinkinasen gewählt, deren Existenz in Mitochondrien bereits nachgewiesen wurde, z.B. Proteinkinase A und Caseinkinase II [Burgess et.al. 1986][Schwoch et.al. 1990] [Sardanelli et.al. 1996][Steenart et.al. 1997] oder solche, die für die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine verantwortlich gemacht werden, z.B. Proteinkinase C [Backer et.al. 1986].

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Autoradiographien zeigen reproduzierbare Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase Untereinheiten aus Rattenleber. Bei den einzelnen Experimenten wurden unterschiedliche Polyacrylamidgelsysteme (11,5%, 13%, 16%; mit/ohne 6M Harnstoff) eingesetzt, woraus eine lokale Variation im Trennverhalten der einzelnen Untereinheiten resultiert.

Für die Benennung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase wurde die von Prof. B. Kadenbach eingeführte Nomenklatur verwendet [Kadenbach et.al. 1981][Kadenbach et.al. 1983]. Die angegebenen Molekulargewichte wurden der SWISS-PROT Datenbank entnommen und entsprechen den Molekulargewichten der reifen Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase aus Ratte (*Rattus norvegicus*).

Untereinheiten der COX (<i>Rattus norvegicus</i>)	MG der reifen Untereinheiten (Da)
Untereinheit I	56 937,10
Untereinheit II	25 942,10
Untereinheit III	29 739,51
Untereinheit IV	16 778,00
Untereinheit V a	12 250,00
Untereinheit V b	10 232,00
Untereinheit VI a	9 201,00
Untereinheit VI b (Fragment)	1 039,00
Untereinheit VI c	8 422,00
Untereinheit VII a	6 238,00
Untereinheit VII b (Fragment)	1 210,36
Untereinheit VII c (Fragment)	1 117,14
Untereinheit VIII	4 924,82

3.2.1 Unterschiedliche Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase Untereinheiten durch Proteinkinase A in vitro unter verschiedenen Bedingungen

Als Detergenzien wurden solche ausgewählt, die während der Isolierung der inneren Mitochondrienmembran (siehe 2.6) und der Cytochrom c Oxidase eingesetzt wurden (siehe 2.12.1).

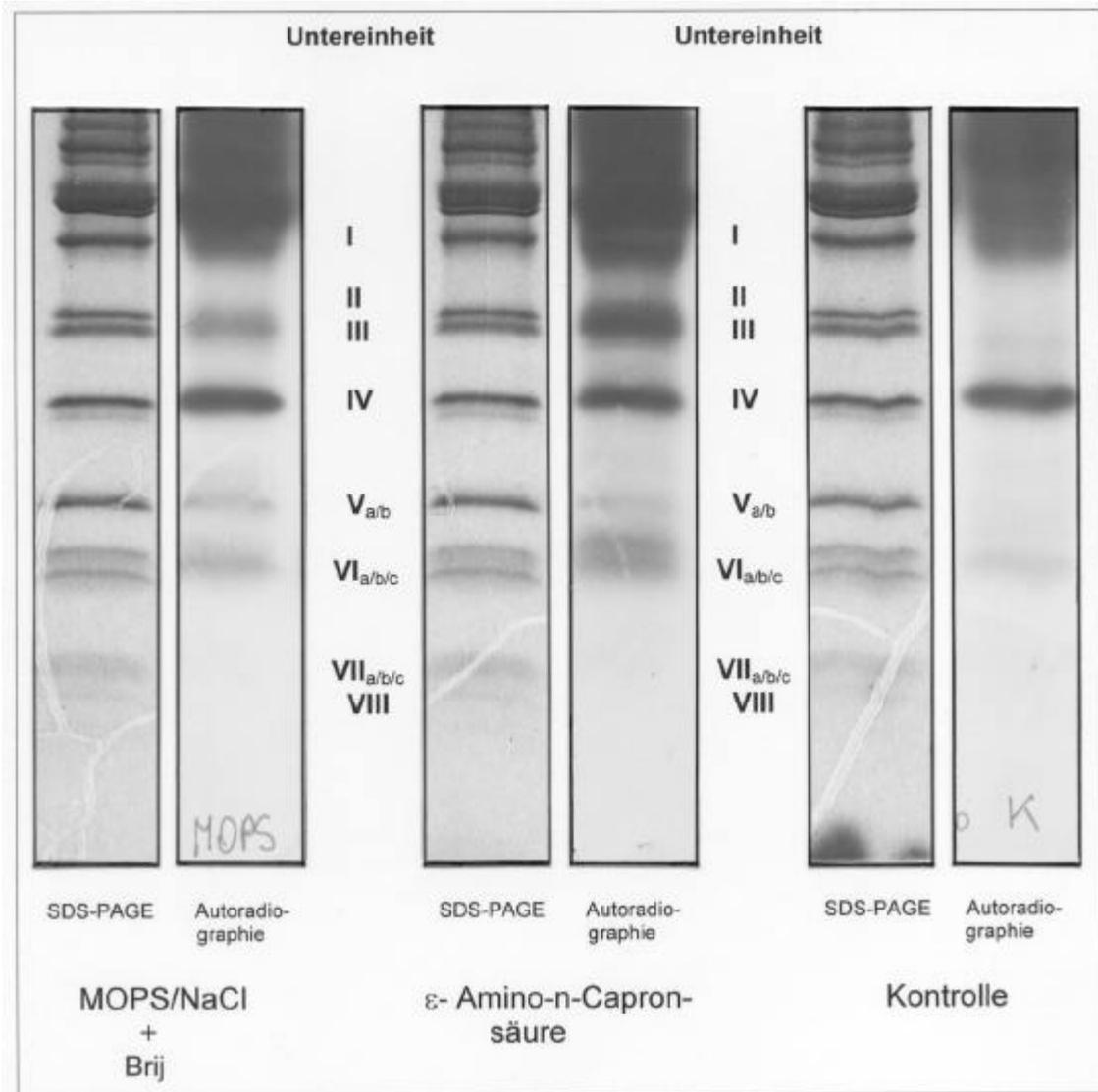


Abb. 7 In vitro Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase aus Rattenleber unter verschiedenen Bedingungen. 16 % Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff.

Die Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP unter verschiedenen Bedingungen, d.h. mit oder ohne Detergenz, zeigte folgendes Phosphorylierungsmuster:

1. In Anwesenheit von ε-Amino-n-Capronsäure wurden die Untereinheiten II, III, IV, V, VI phosphoryliert.

2. In Anwesenheit von MOPS/NaCl + Brij zeigte sich das gleiche Phosphorylierungsmuster wie unter 1. Die Phosphorylierung der Untereinheiten ist jedoch wesentlich schwächer.
3. In Abwesenheit von Detergenzien wurden lediglich die Untereinheiten IV und VI phosphoryliert.

3.2.2 In vitro Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase durch verschiedene Proteinkinasen

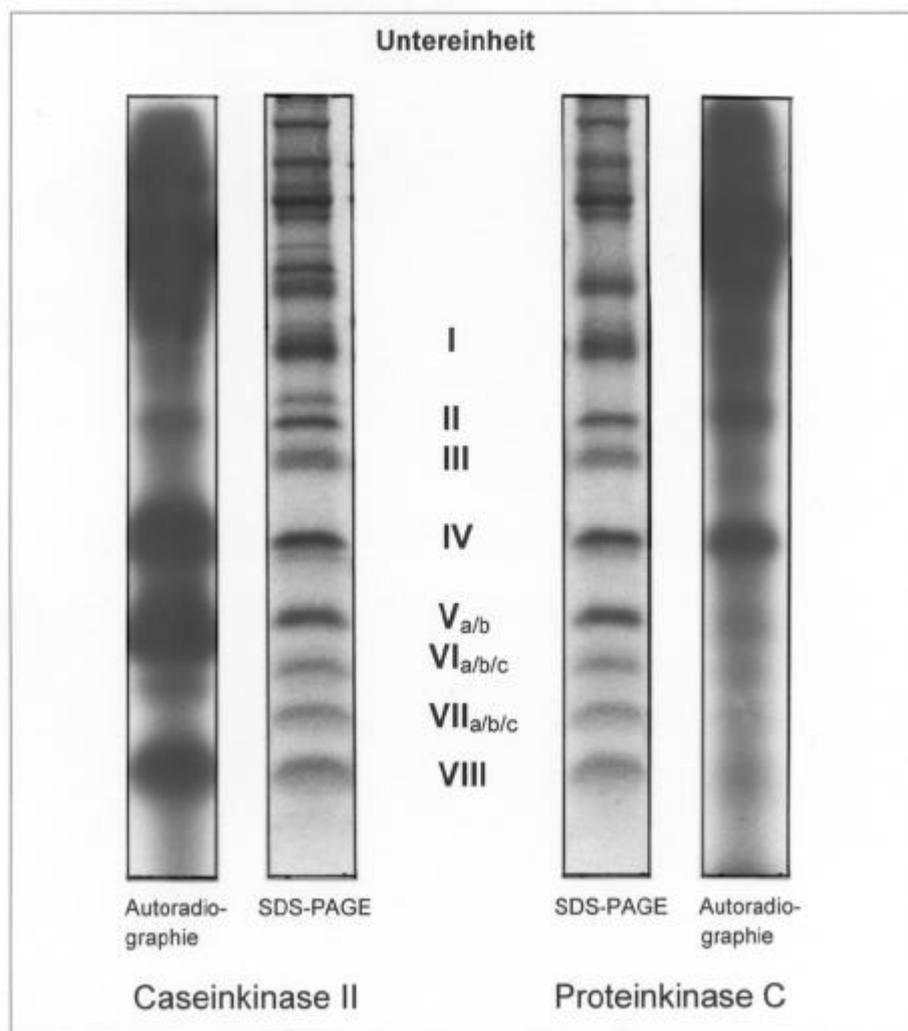


Abb. 8 Polyacrylamidgel und Autoradiographie der Cytochrom c Oxidase nach in vitro Phosphorylierung mit Casein kinase II und Proteinkinase C. 13% Polyacrylamidgel ohne Harnstoff.

Die Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, zeigte eine deutliche Phosphorylierung der Untereinheiten II und IV, sowie eine schwache Phosphorylierung der niedermolekularen Untereinheit V.

Die Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit Caseinkinase II in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, zeigte eine starke Phosphorylierung der Untereinheiten IV, V und VIII, sowie eine schwache Phosphorylierung der Untereinheit II.

3.3 In vitro Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe durch Proteinkinase A

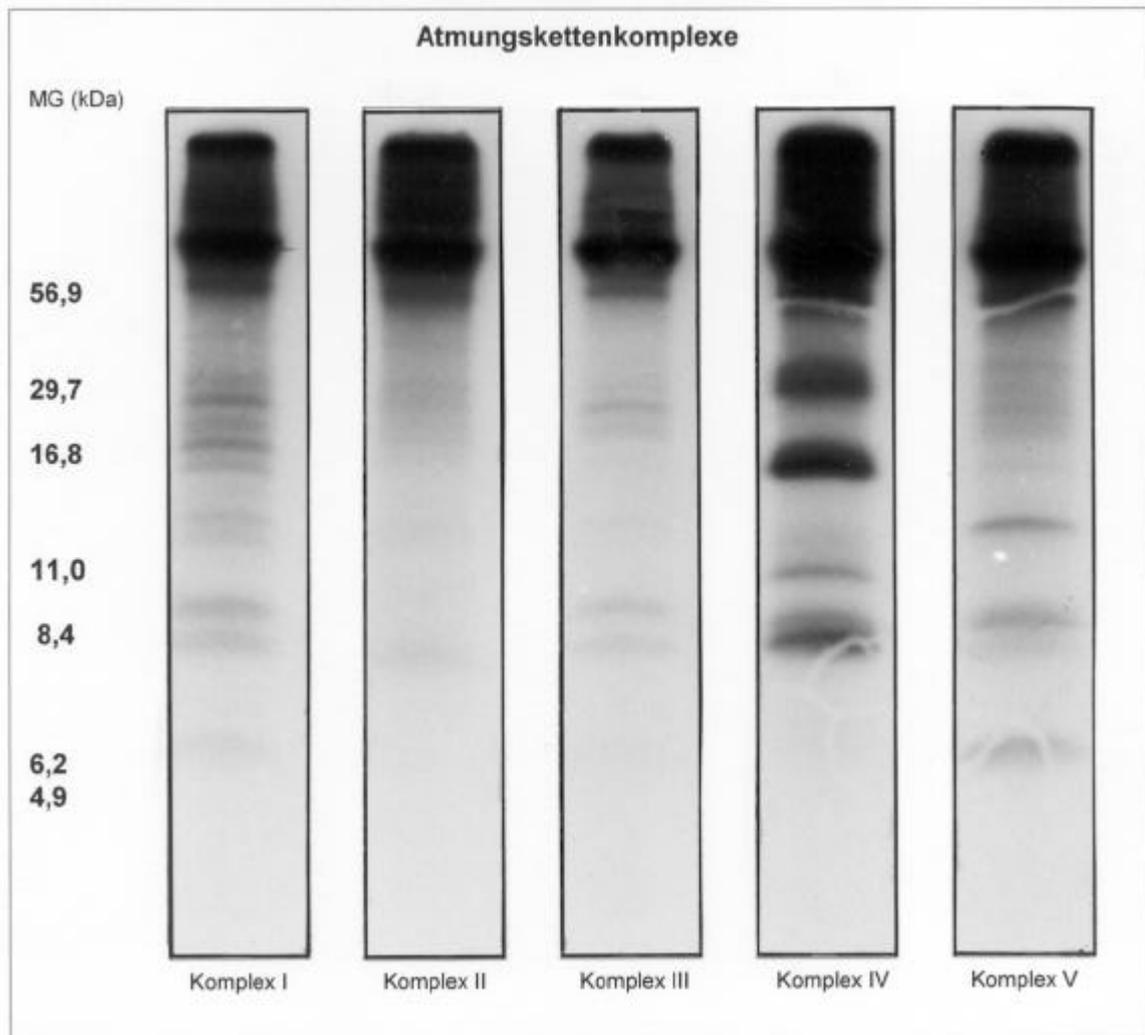


Abb. 9 Autoradiographien der Atmungskettenkomplexe nach in vitro Phosphorylierung mit Proteinkinase A in Anwesenheit von ϵ -Amino-n-Caprönsäure. 16% Polyacralamidgel mit 6 M Harnstoff.

Die Inkubation der Atmungskettenkomplexe mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP ergab folgendes Phosphorylierungsmuster der einzelnen Komplexe:

1. Komplex I [NADH-Dehydrogenase, E.C. 1.6.5.3]: 20 kDa und 25 kDa Proteinbande.

2. Komplex II [Succinat-Dehydrogenase, E.C. 1.3.5.1]: es sind keine deutlich phosphorylierte Proteinbanden zu erkennen.
3. Komplex III [Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase E.C. 1.10.2.2]: eine ca. 25 kDa und zwei ca. 8-10 kDa Proteinbanden.
4. Komplex IV [Cytochrom c Oxidase E.C. 1.9.3.1]: siehe unter 3.2.1 .
5. Komplex V [H^+ -transportierende ATP-Synthase, E.C. 3.6.1.34]: ca. 11 kDa; 8,4 kDa und 5 kDa Proteinbanden.

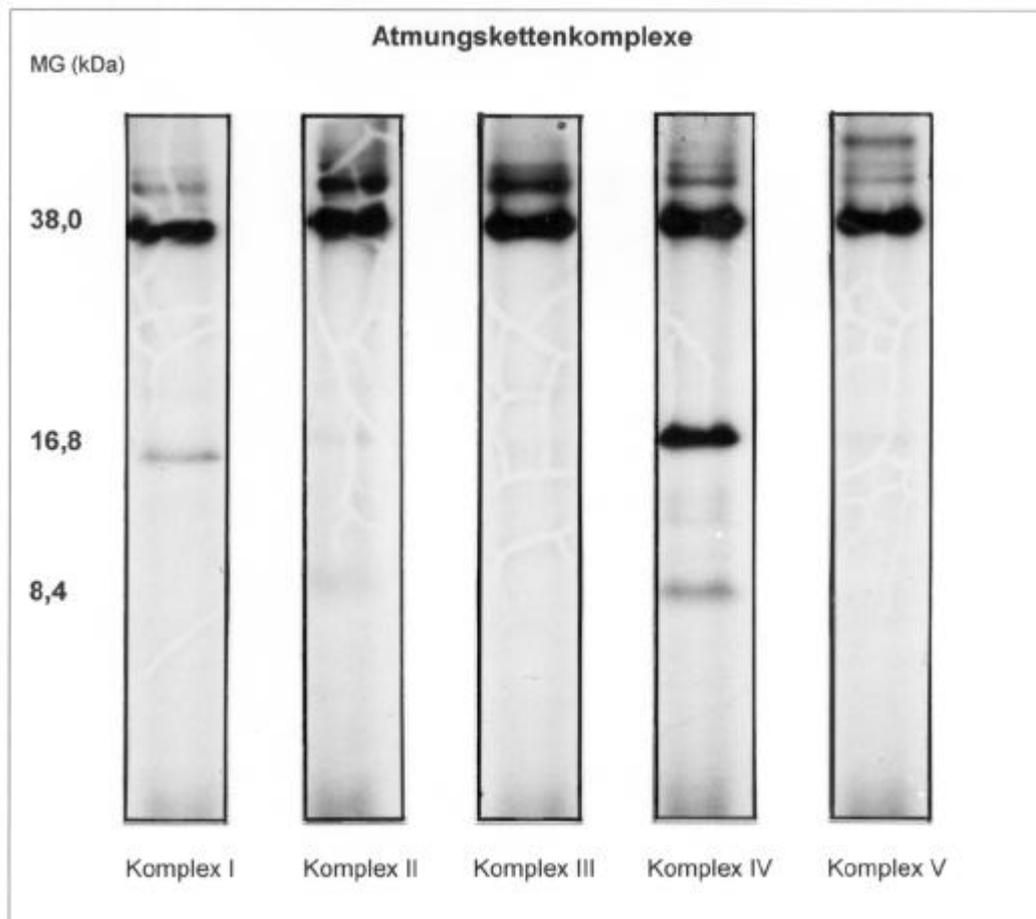


Abb.10 Autoradiographien der Atmungskettenkomplexe nach in vitro Phosphorylierung mit Proteinkinase A in Abwesenheit von ϵ -Amino-n-Caprinsäure. 16 % Polyacrylamidgel ohne Harnstoff.

Die in der Abbildung 10 dargestellten Autoradiographien der Atmungskettenkomplexe zeigen insgesamt drei Phosphoproteinbanden, eine ca. 17 kDa Proteinbande im Komplex I und zwei Proteinbanden mit einem MG von 16,8 kDa und 8,4 kDa im Komplex IV (Untereinheit IV und VIc).

Bei dem ca. 17 kDa Phosphoprotein im Komplex I handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um die Kern kodierte 18 kDa (IP)AQDQ Untereinheit [Bardanelli et.al. 1996]. Bei der ca. 38 kDa Phosphoproteinbande handelt es sich um die katalytische, autophosphorylierte Untereinheit der Proteinkinase A.

3.4 In vitro Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe durch Proteinkinase C

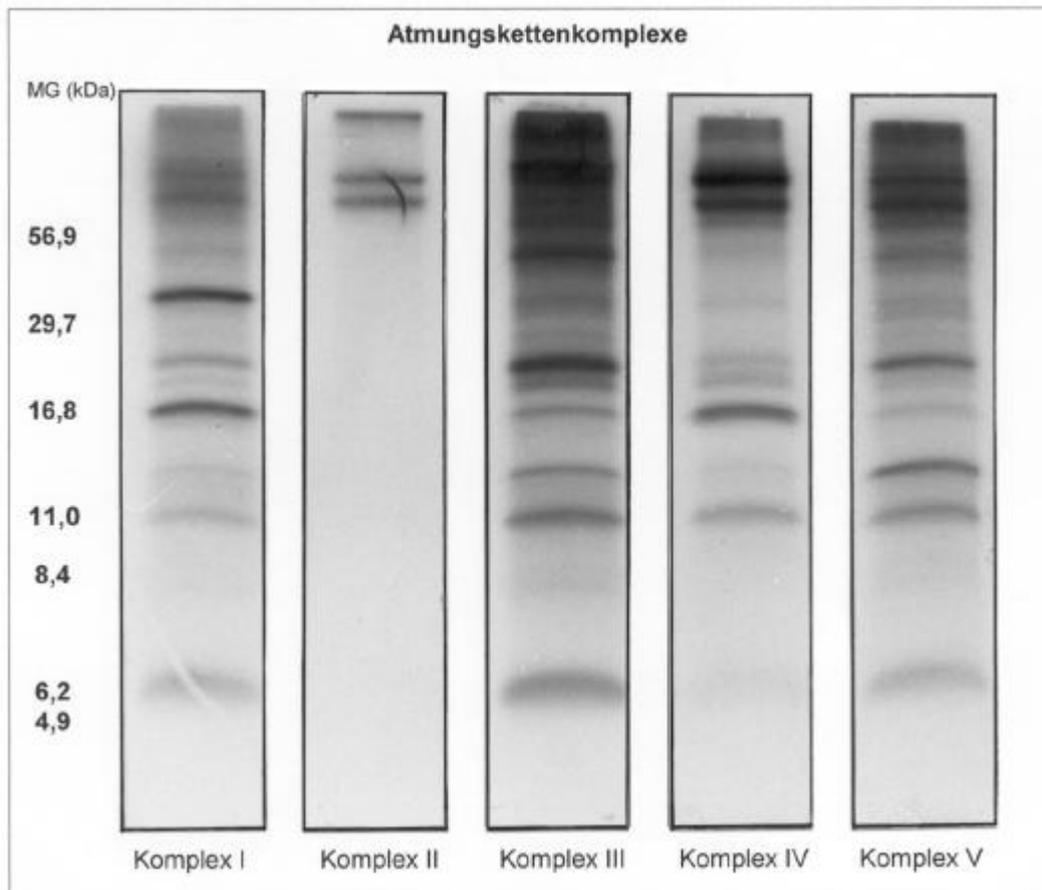


Abb. 11 Autoradiographie der Komplexe der Atmungskette nach in vitro Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C in Anwesenheit von ϵ -Amino-n-Caprinsäure. 16 % Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff.

Die Inkubation der Atmungskettenkomplexe mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP zeigt folgendes Phosphorylierungsmuster (Abb.11):

1. Komplex I [NADH-Dehydrogenase, E.C. 1.6.5.3]: ca. 35 kDa, 25 kDa, 16.8 kDa, 11 kDa und 6.2 kDa Phosphoproteinbanden.
2. Komplex II [Succinat-Dehydrogenase, E.C. 1.3.5.1]: es sind zwei phosphorylierte ca. 60 kDa Proteinbanden zu erkennen.
3. Komplex III [Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase E.C. 1.10.2.2]: ca. 56.9 kDa, 25 kDa, 16.8 kDa, 15 kDa, 11 kDa und 6.2 kDa Phosphoproteinbanden.
4. Komplex IV [Cytochrom c Oxidase E.C. 1.9.3.1]: zwei ca. 60 kDa, 16.8 kDa (Untereinheit IV) und 11 kDa (Untereinheit V) Proteinbanden.

5. Komplex V [H^+ -transportierende ATP-Synthase, E.C. 3.6.1.34]: ca. 60 kDa, 56 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 11 kDa und 6.2 kDa Phosphoproteinbanden.

3.5 In vivo Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase

Die Interkonversion (Proteinphosphorylierung/-dephosphorylierung) wird unter anderem durch Hormone wie z.B. Glukagon ausgelöst, die so ihren Einfluss auf die intrazellulären Prozesse ausüben. In dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass Glukagon und der Tumorpromotor TPA die Phosphorylierung mitochondrialer Proteine beeinflussen.

3.5.1 Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase isoliert aus Hepatozyten, die mit ^{32}P -Phosphat inkubiert und mit Glukagon stimuliert wurden

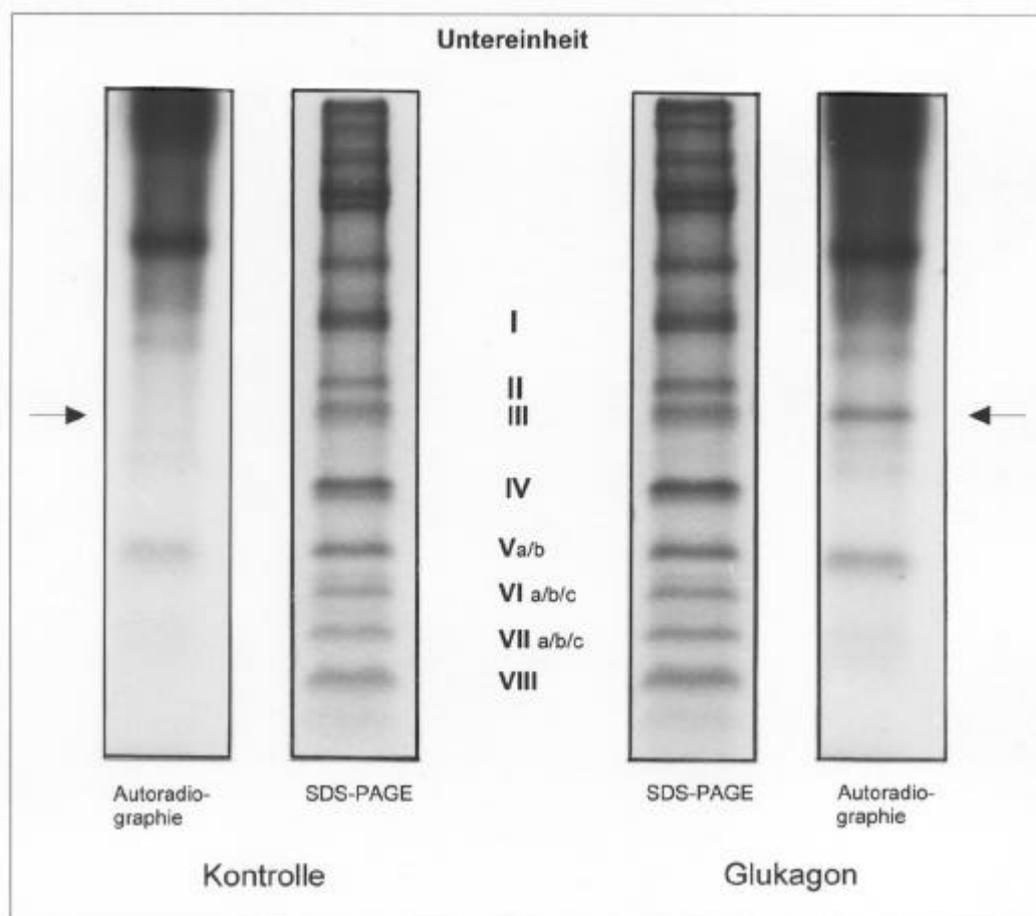


Abb.12 Polyacrylamidgel und Autoradiographie der Cytochrom c Oxidase isoliert aus Hepatozyten nach Glukagonstimulation. 13 % Polyacrylamidgel ohne Harnstoff.

In intakten Hepatozyten, welche mit ^{32}P -Phosphat beladen wurden, ergab die Stimulation mit Glukagon die Phosphorylierung der Untereinheit III der Cytochrom c

Oxidase. Die Phosphorylierung der Untereinheiten Va/b findet sowohl im Kontroll- als auch im Glukagon-Ansatz statt, wobei die Phosphorylierung im Glukagon-Ansatz wesentlich stärker ausgeprägt ist, als im Kontroll-Ansatz (Abb.12).

3.5.2 Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase isoliert aus Hepatozyten, die mit ^{32}P -Phosphat inkubiert und mit TPA stimuliert wurden

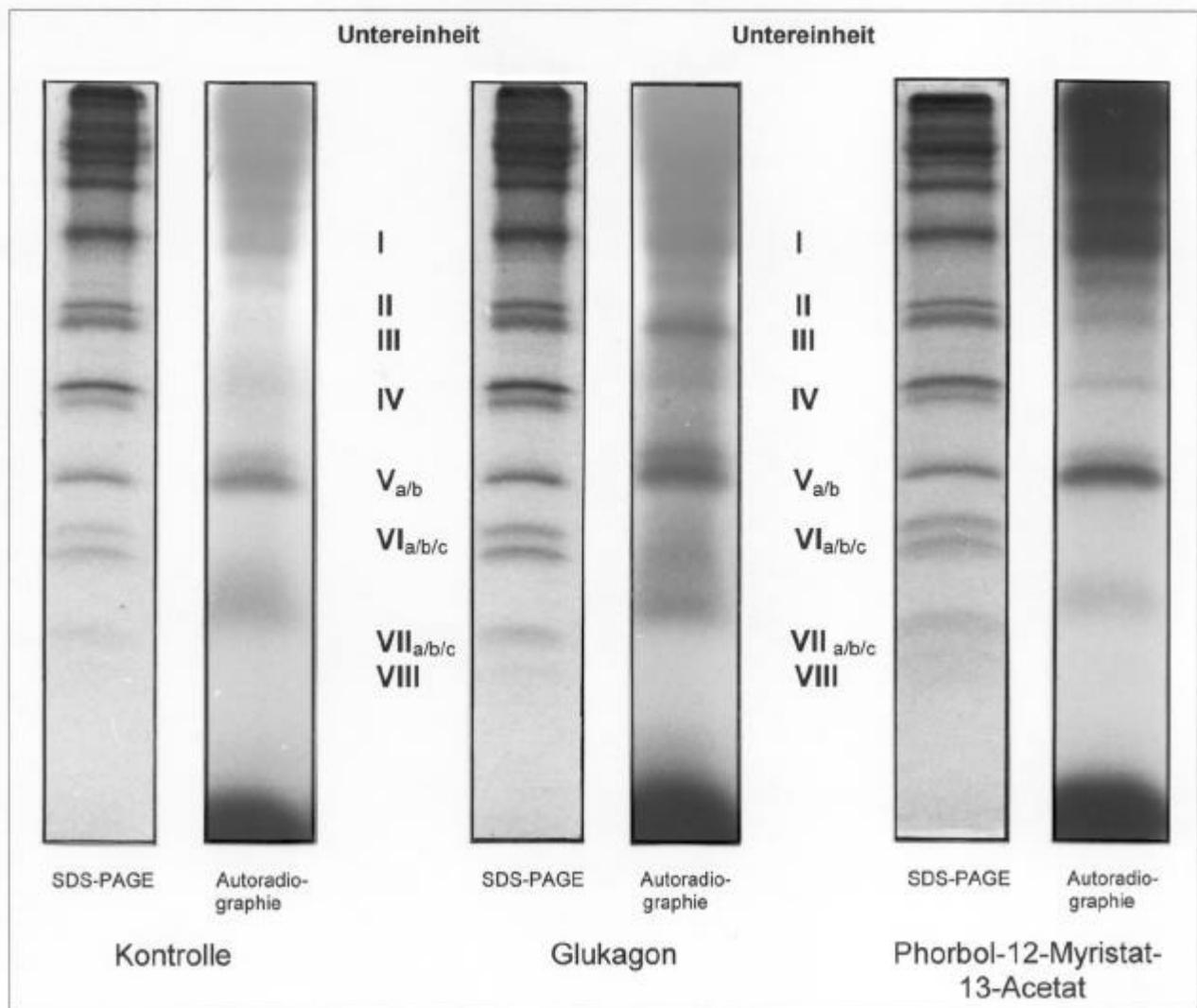


Abb.13 Polyacrylamidgele und Autoradiographien der Cytochrom c Oxidase isoliert aus Hepatozyten nach Glukagon- und TPA-Stimulation. 16 % Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff.

Die Inkubation der intakten Hepatozyten mit ^{32}P -Phosphat und die nachfolgende Stimulation mit TPA zeigte eine schwache Phosphorylierung der Untereinheiten II und/oder III und IV. Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b findet sowohl im Kontroll- als auch im TPA-Ansatz statt, jedoch ist die Phosphorylierung der

Untereinheit Vb im TPA-Ansatz wesentlich stärker ausgeprägt ist als im Kontroll-Ansatz (Abb.13).

3.5.3 Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe isoliert aus Hepatozyten, die mit ^{32}P -Phosphat inkubiert und mit Glukagon/TPA stimuliert wurden

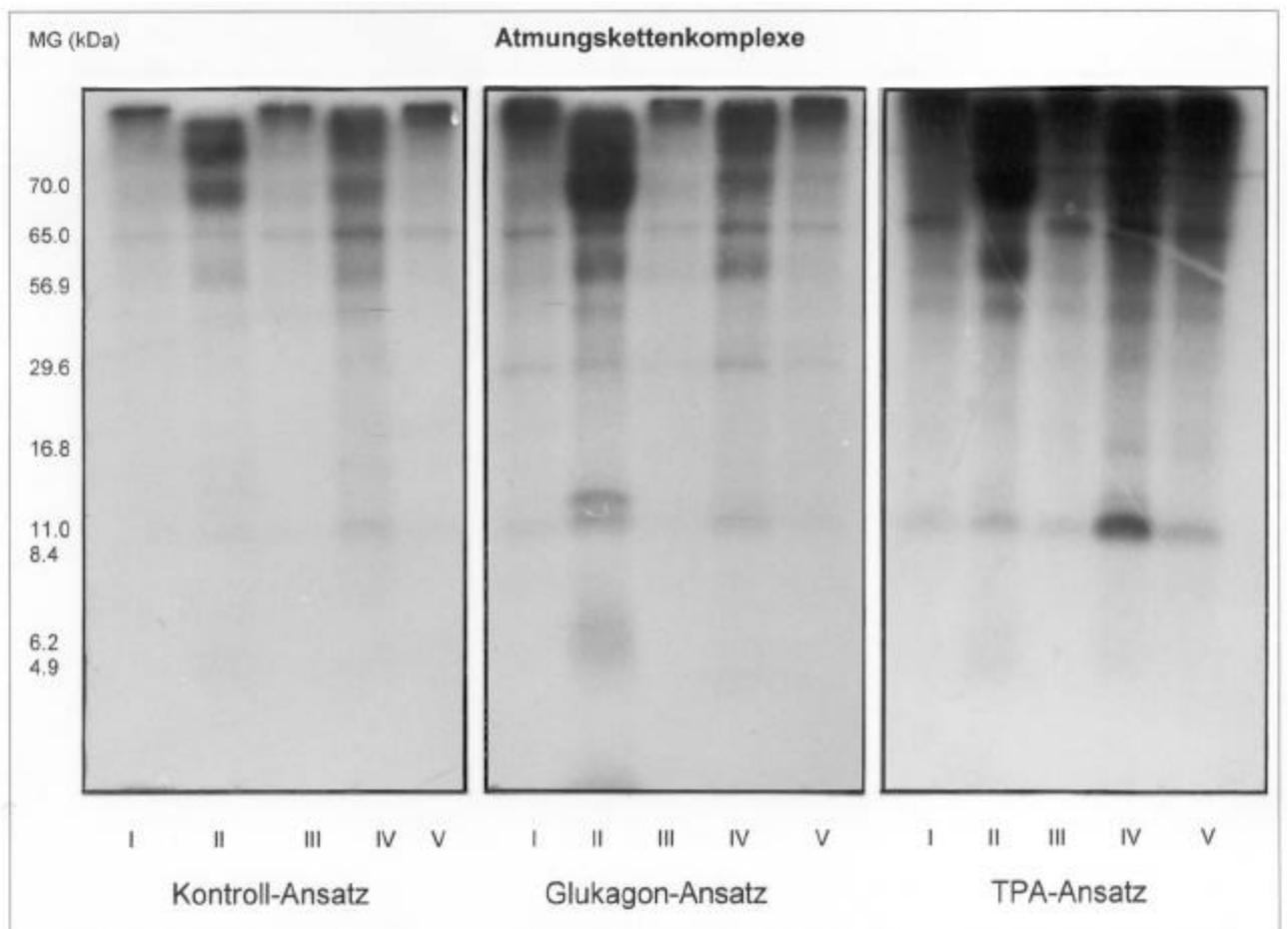


Abb. 14 Autoradiographien der Atmungskettenkomplexe isoliert aus Hepatozyten nach Glukagon/TPA Stimulation. 16 % Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff.

Die Inkubation der intakten Hepatozyten mit ^{32}P -Phosphat und anschließende Stimulation mit Glukagon/TPA ergab folgendes Phosphorylierungsmuster der einzelnen Atmungskettenkomplexe:

Kontroll-Ansatz:

- Komplex I [NADH-Dehydrogenase, E.C. 1.6.5.3]: ca. 65 kDa Phosphoproteinbande.
- Komplex II [Succinat-Dehydrogenase, E.C. 1.3.5.1]: ca. 75 kDa, 65 kDa, 56.9 kDa und 11 kDa Phosphoproteinbanden.

- Komplex III [Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase, E.C. 1.10.2.2]: ca. 65 kDa Phosphoproteinbande.
- Komplex IV [Cytochrom c Oxidase, E.C. 1.9.3.1]: ca. 75 kDa, 65 kDa, 56.9 kDa und 11 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex V [H^+ -transportierende ATP-Synthase, E.C. 3.6.1.34]: ca. 65 kDa Phosphoproteinbande.

Glukagon-Ansatz:

- Komplex I [NADH-Dehydrogenase, E.C. 1.6.5.3]: ca. 65 kDa, 29.6 kDa, 11 kDa Phosphoproteinbande.
- Komplex II [Succinat-Dehydrogenase, E.C. 1.3.5.1]: ca. 75 kDa, 65 kDa, 56.9 kDa, 40 kDa, 29.6 kDa, 15 kDa, 11 kDa und 6.2 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex III [Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase, E.C. 1.10.2.2]: ca. 65 kDa, 29.6 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex IV [Cytochrom c Oxidase, E.C. 1.9.3.1]: ca. 75 kDa, 65 kDa, 56.9 kDa, 29.6 kDa, und 11 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex V [H^+ -transportierende ATP-Synthase, E.C. 3.6.1.34]: ca. 65 kDa, 29.6 kDa, und 11 kDa Phosphoproteinbanden.

TPA-Ansatz:

- Komplex I [NADH-Dehydrogenase, E.C. 1.6.5.3]: ca. 65 kDa, 56.9 kDa, 50 kDa, und 11 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex II [Succinat-Dehydrogenase, E.C. 1.3.5.1]: ca. 70 kDa, 65 kDa, 56.9 kDa, 50 kDa und 11 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex III [Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase, E.C. 1.10.2.2]: ca. 65 kDa, 56.9 kDa, 50 kDa und 11 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex IV [Cytochrom c Oxidase, E.C. 1.9.3.1]: ca. 65 kDa, 56.9 kDa, 50 kDa, 16.8 kDa und 11 kDa Phosphoproteinbanden.
- Komplex V [H^+ -transportierende ATP-Synthase, E.C. 3.6.1.34]: ca. 65 kDa, 56.9 kDa, 50 kDa und 11 kDa Phosphoproteinbanden.

3.6 Identifizierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase

3.6.1 Immunologische Identifizierung der Untereinheit IV

Für die immunologische Identifizierung der Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Untereinheit IV aus Hybridomazellen in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Verdünnung des sekundären Antikörpers, Anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat, betrug 1:200. Der Antikörpernachweis geschah mittels Peroxidase-Färbung.

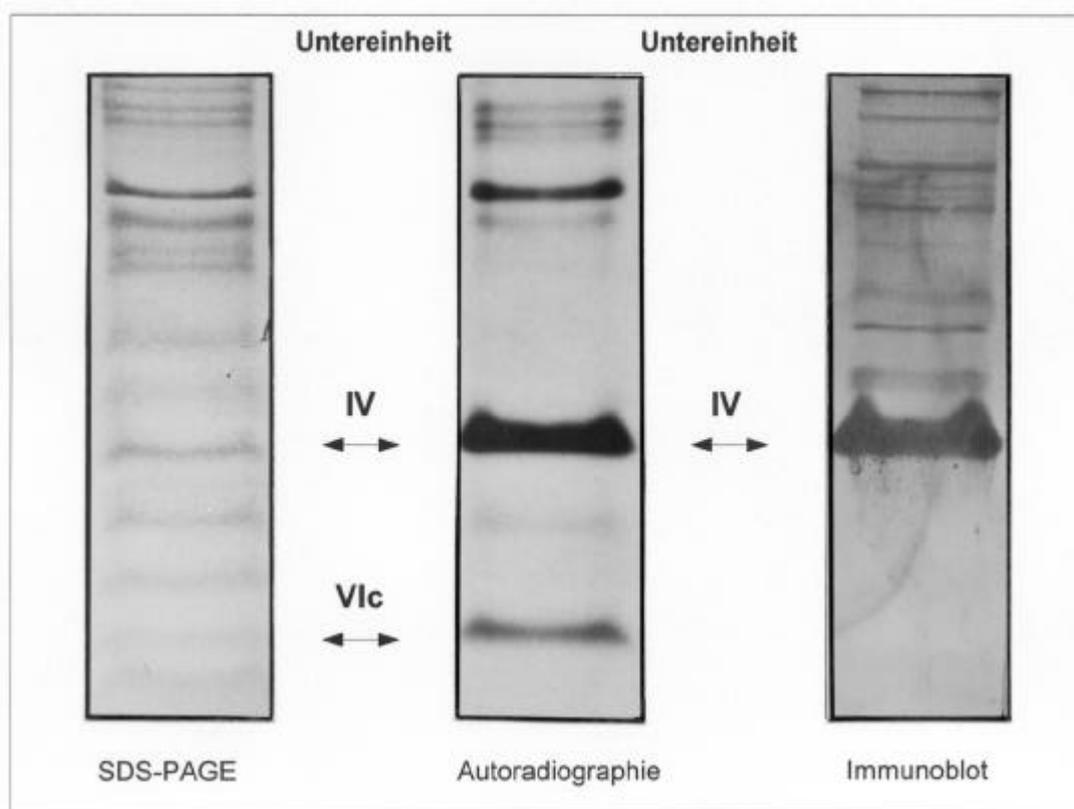


Abb. 15 Polyacrylamidgel, Autoradiographie und Immunoblot der Cytochrom c Oxidase. 11,5 % Polyacrylamidgel ohne Harnstoff.

Dem Immunoblot ist eine sehr starke Reaktion des monoklonalen Antikörpers mit Untereinheit IV zu entnehmen (Abb.15).

Der monoklonale Antikörper gegen die Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase wurde von Prof. Dr. B. Kadenbach Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

3.6.2 Massenspektrometrische Identifizierung der Untereinheit III

Die massenspektrometrische Identifizierung der Cytochrom c Oxidase Untereinheiten wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.E. Meyer, Institut für Physiologische Chemie I, Ruhr-Universität-Bochum, durchgeführt. Alle für die Untersuchungen verwendeten Proben stammten aus *in vitro* Experimenten.

Die Untereinheit III (29,6 kDa Phosphoproteinbande) wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und In-Gel tryptisch verdaut. Das tryptische Peptidgemisch wurde mittels MALDI-MS analysiert.

Das Ergebnis der Analyse ist im oberen Spektrum vom Abb.16 dargestellt. Außer zwei Trypsinspaltprodukten ist ein prominentes Peptid mit der Masse von 1595 Da zu sehen, das für die Sequenzbestimmung mittels MALDI-PSD ausgewählt wurde (Abb.16 unteres Spektrum). Die Datenbanksuche in einer Ratten spezifischen Datenbank ergab als eindeutiges Resultat die Sequenz **EGTYQHHTPIVQK**, die mit einer 100 %igen Wahrscheinlichkeit der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase zugeordnet wurde (Tabelle 1).

Außer der Untereinheit III wurden in der 29,6 kDa Phosphoproteinbande noch weitere Proteine detektiert, die aber nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Daher wurde versucht, mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit immobilisierten pH Gradienten von 4-7, die Untereinheit III von dem Proteingemisch zu trennen (Abb.17). Das Polyacrylamidgel wurde getrocknet und autoradiographiert. Dann wurden 17 hoch radioaktive Spots aus dem Polyacrylamidgel der zweiten Dimension ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse ergab eine *in vitro* Phosphorylierung der Untereinheiten Va, Vb und VIa der Cytochrom c Oxidase (Tabelle 2). Die Phosphorylierung der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden.

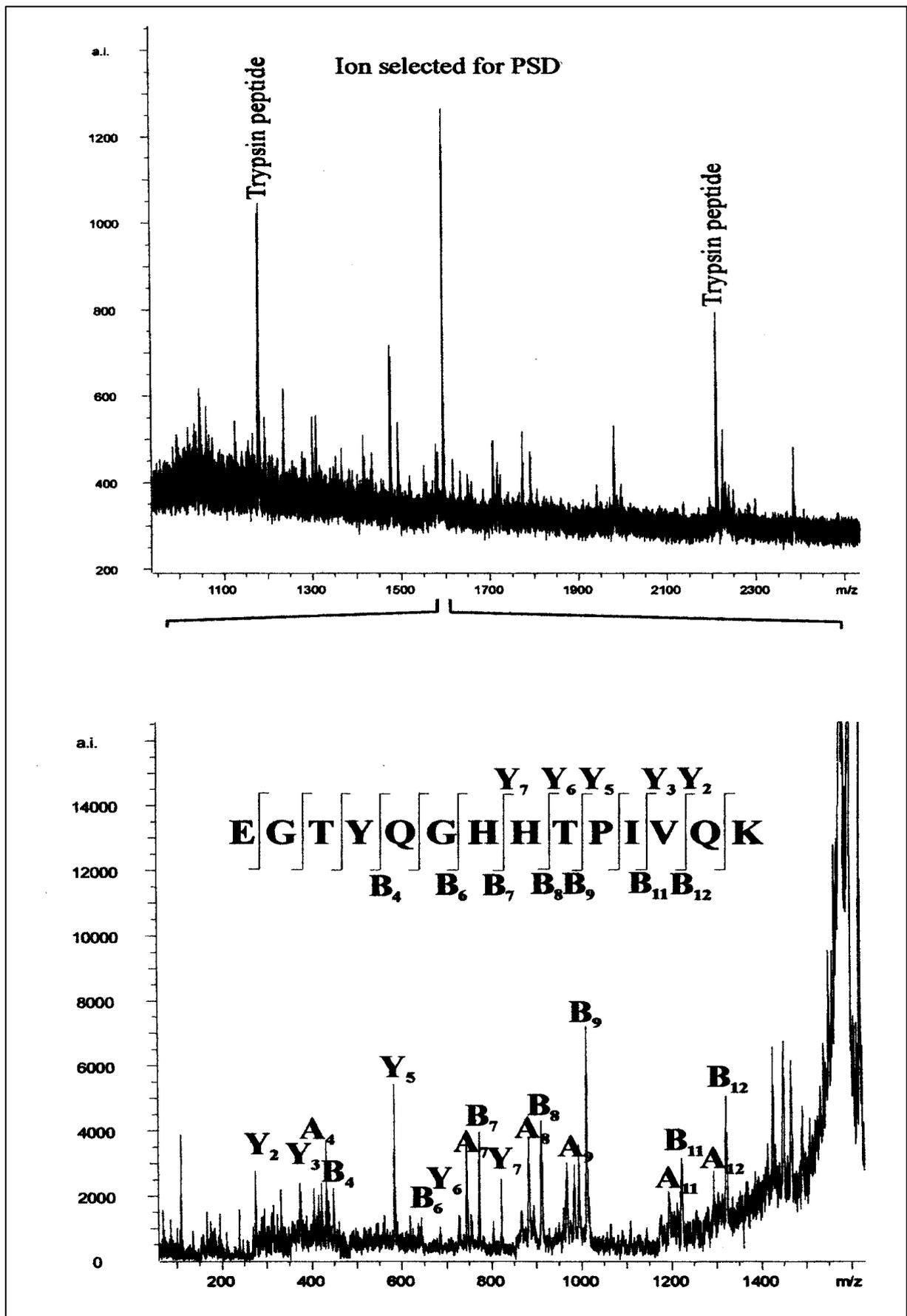


Abb. 16 Massenspektren, die zur Identifizierung der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase (29,6 kDa Phosphoproteinbande) geführt haben.

#	Rank/Sp	(M+H)+	Cn	deltCn	C+10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1/1	1594.9	1.0000	0.0000	1.4293	320.5	17/39	owl PO5505 COX3 +10	(R) EGTYYQGHHTPIVQK
2.	2/3	1594.9	0.6791	0.3209	0.9706	238.6	15/36	owl U66057 MMU6 +1	(K) IYYPDFIVDPKPK
3.	3/16	1595.6	0.6450	0.3550	0.9218	121.0	12/33	owl Y10495 MMCD	(K) CQELTQECDEKK
4.	4/57	1594.9	0.5467	0.4533	0.7814	93.3	11/36	owl PO6399 FIBA	(R) INKLKNSLFDQK
5.	5/4	1594.8	0.5268	0.4732	0.7529	235.0	18/48	owl B49425 B494	(R) AGDSVLAPGGDALQPAR
6.	6/6	1593.8	0.5186	0.4814	0.7412	211.5	14/36	owl P50517 VAT2 +1	(K) RIPQSTLSEFYPR
7.	7/2	1593.9	0.4977	0.5023	0.7113	244.7	14/36	owl AF062655 AF	(R) TRSRSPSHTRPRR
8.	8/90	1594.8	0.4957	0.5043	0.7085	76.3	10/36	owl AF067834 AF +1	(R) TSDKVYQMKNKPR
9.	9/90	1594.7	0.4856	0.5144	0.6941	81.2	10/36	owl D38629 RATA +1	(K) SFHVEDTPVCFSR
10.	10/69	1594.8	0.4629	0.5371	0.6616	86.4	11/42	owl Y10623 CPGG	(K) ADPSIQAKFSQFAGK

1. owl|PO5505|COX3_RAT CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE III (E.C. 1.9.3.1). – RATTUS NORVEGICUS

2. owl|U66057|MMU66057 MMU66057 NID:g1794220 – house mouse

3. owl|Y10495|MMCDV1R MMCDV1R NID: g2995446 – house mouse

Tabelle 1 Ergebnisse der Datenbanksuche, die die Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase ermittelt haben.

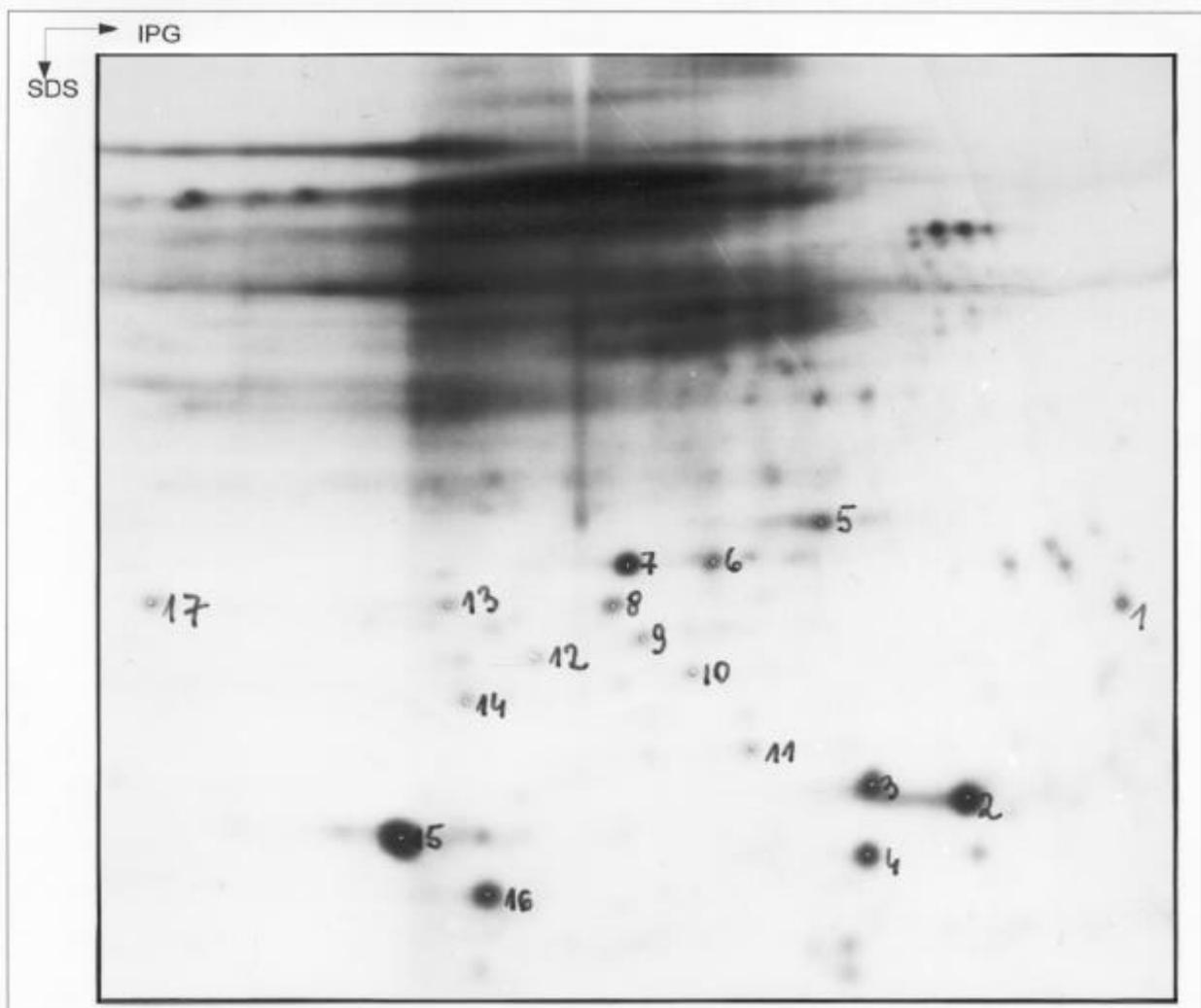


Abb. 17 Autoradiographie der zweiten Dimension der Polyacrylamidgelelektrophorese mit immobilisiertem pH Gradienten. Die 17 radioaktiven Spots wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

Nr.	Protein	Analyse Nr.	DB Suche
1.	gi 92350 pir A28701 H ⁺ -transporting ATP synthase gi 1082558 pir S41161 keratin 9, cytoskeletal – human	LCQ0563	C + 57 M + 16 ST + 80
3.	gi 117100 sp P11240 COXA_RAT POLYPEPTIDE VA, MITOCHONDRIA (Spectrum lcq0644.1683.1684 3.Hit)	LCQ0644	C + 57 M + 16 ST + 80
3.	gi 117100 sp P11240 COXA_RAT POLYPEPTIDE VA, MITOCHONDRIA gi 4557705 ref NP_000217.1 keratin 9 gi 4557697 ref NP_000412.1 keratin 10	LCQ0643	C + 57 M + 16 ST + 80
4.	gi 1352167 sp P12075 COXB_RAT POLYPEPTIDE VB; MITOCHONDRIA gi 4557705 ref NP_000217.1 keratin 9	LCQ0642	C + 57 M + 16 ST + 80
5.	gi 4557705 ref NP_000217 keratin 9 (gi 55992 emb CAA32425.1 cytochrome c oxidase VIa	LCQ0645	C + 57 M + 16 ST + 80
6.	gi 4557705 ref NP_000217 keratin 9	LCQ0646	C + 57 M + 16 ST + 80
7.	gi 4557697 ref NP_000412.1 keratin 10	LCQ0647	C + 57 M + 16 ST + 80
8.	gi 4557705 ref NP_000217 keratin 9	LCQ0648	C + 57 M + 16 ST + 80
9.	gi 4557705 ref NP_000217 keratin 9	LCQ0652	C + 57 M + 16 ST + 80
10.	gi 4557705 ref NP_000217 keratin 9	LCQ0653	C + 57 M + 16 ST + 80
11.	Probe fehlte!	-	-
12.	keine identifizierten Peptide	LCQ0658	C + 57 M + 16 ST + 80
13.	keine identifizierten Peptide	LCQ0659	C + 57 M + 16 ST + 80
14.	keine identifizierten Peptide	LCQ0661	C + 57 M + 16 ST + 80
15.	gi 4557705 ref NP_000217.1 keratin 9	LCQ0653	C + 57 M + 16 ST + 80

16.	gi 111965 pir A37981 microtubule-associated protein 2b-rat (nur ein Peptid)	LCQ0664	C + 57 M + 16 ST + 80
17.	gi 4557705 ref NP_000217.1 keratin 9	LCQ0666	C + 57 M + 16 ST + 80

Tabelle 2 Zusammenfassung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der 17 radioaktiven Spots aus der zweiten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit immobilisiertem pH Gradienten .

3.6.3 Massenspektrometrische Identifizierung der Untereinheit IV

Die Phosphoproteinbande mit dem MG von 16,8 kDa (Untereinheit IV) wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und das Phosphoprotein In-Gel tryptisch verdaut. Das tryptische Peptidgemisch wurde mittels ESI-MS/MS analysiert (Abb.18).

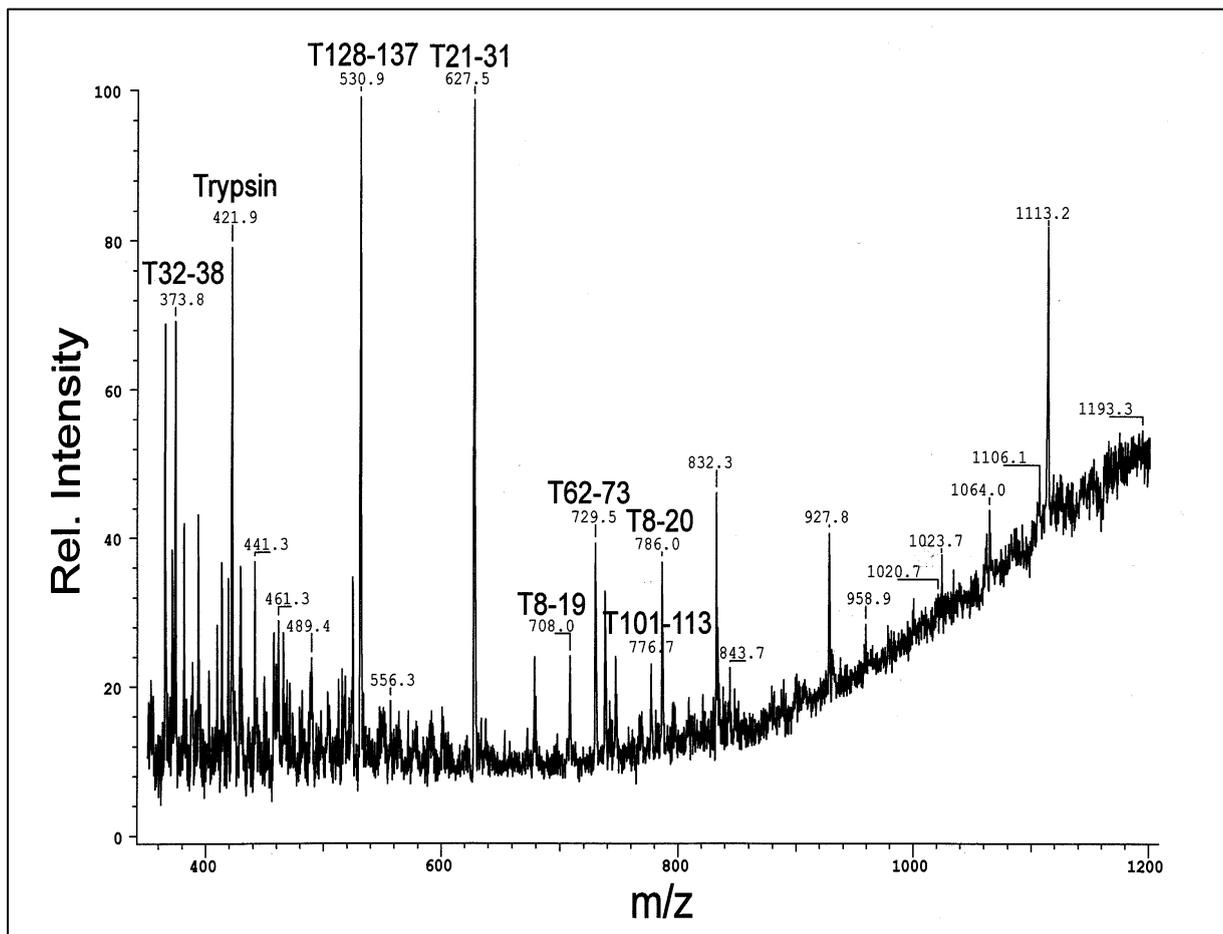


Abb.18 ESI-MS/MS Spektrum der 16,8 kDa Phosphoproteinbande (Untereinheit IV) nach tryptischem Verdau.

Das in der Abbildung 18 vorgestellte Spektrum wurde zur Datenbanksuche in einer Ratte spezifischen Proteindatenbank benutzt, wonach die Massen der folgenden

sieben Peptide (T32-38, T128-137, T21-31, T8-19, T62-73, T8-20, T101-113) eindeutig der Untereinheit IV zugeordnet werden konnten, wodurch 54% ihrer Sequenz erfasst werden konnte.

Das Peptid mit der Masse von 421,9 Da wurde als Trypsinspaltprodukt identifiziert, die Identität der drei weiteren Peptide mit den Massen 832,3 Da, 927,8 Da und 113,2 Da konnte nicht bestimmt werden. Die erstellte Trefferliste (Tabelle 3) zeigt eine 10⁵ höhere Wahrscheinlichkeit für die Untereinheit IV im Vergleich zu anderen Kandidaten.

Rank	Probability	Name	Long Name	Matched Frag.
1	1.0e+00	COX4_RAT	CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE IV PRECURSOR (EC 1.9.3.1).-Rattus Norvegicus (RAT).	Table/Map
2	4.6e-06	D50858_owl	D50858 NID: g2647939-Pseudomonas putida (strain:mt-2) DNA, clone: pCN12.	Table/Map
3	4.2e-07	A64632	hypothetical protein HP0897-Heliobacter pylori (strain 26695).	Table/Map
4	3.6e-07	EFP_SYNP7	ELONGATION FACTOR P (EF-P).-SYNECHOCOCCUS SP: (STRAIN PCC 7942) (ANACYSTIS NIDULANS R2).	Table/Map
5	3.1e-07	AIDB_ECOLI	AIDB PROTEIN:-ESCHERICHIA COLI.	Table/Map
6	2.6e-07	XELMYOHCHN_owl	XELMYOHCHN NID: g214605-Xenopus laevis cDNA to mRNA.	Table/Map
7	2.6e-07	SPAC27D713_owl	SPAC27D/ NID: g2664234- fassion yeast	Table/Map
8	8.7e-08	YD57_METJA	PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL PROTEIN MJ1357.-METHANOCOCCUS JANNASCHII.	Table/Map
9	7.7e-08	MANA_HUMAN	MANNOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.8) (PHOSPHOMANNOSE ISOMERASE) (PMI) (PHOSPHOHEXOMUTASE).- HOMO SAPIENS (HUMAN)	Table/Map
10	7.5e-08	COX_BOVIN	CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE IV PRECURSOR (EC 1.9.3.1).- BOS TAURUS (BOVINE).	Table/Map

Tabelle 3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Datenbanksuche der sieben Peptide, die mittels ESI-MS/MS ermittelt wurden.

Des Weiteren wurde das Peptid T21-31 (MG 627,5 Da) für eine Sequenzanalyse mittels Nanospray-ESI-MS/MS gewählt. Die Datenbankrecherche in einer Ratten

spezifischen Proteindatenbank ergab als Resultat die Sequenz **DYPLPDVAHVK**, die der Matrixregion der Untereinheit IV zugeordnet wurde (Tabelle 4).

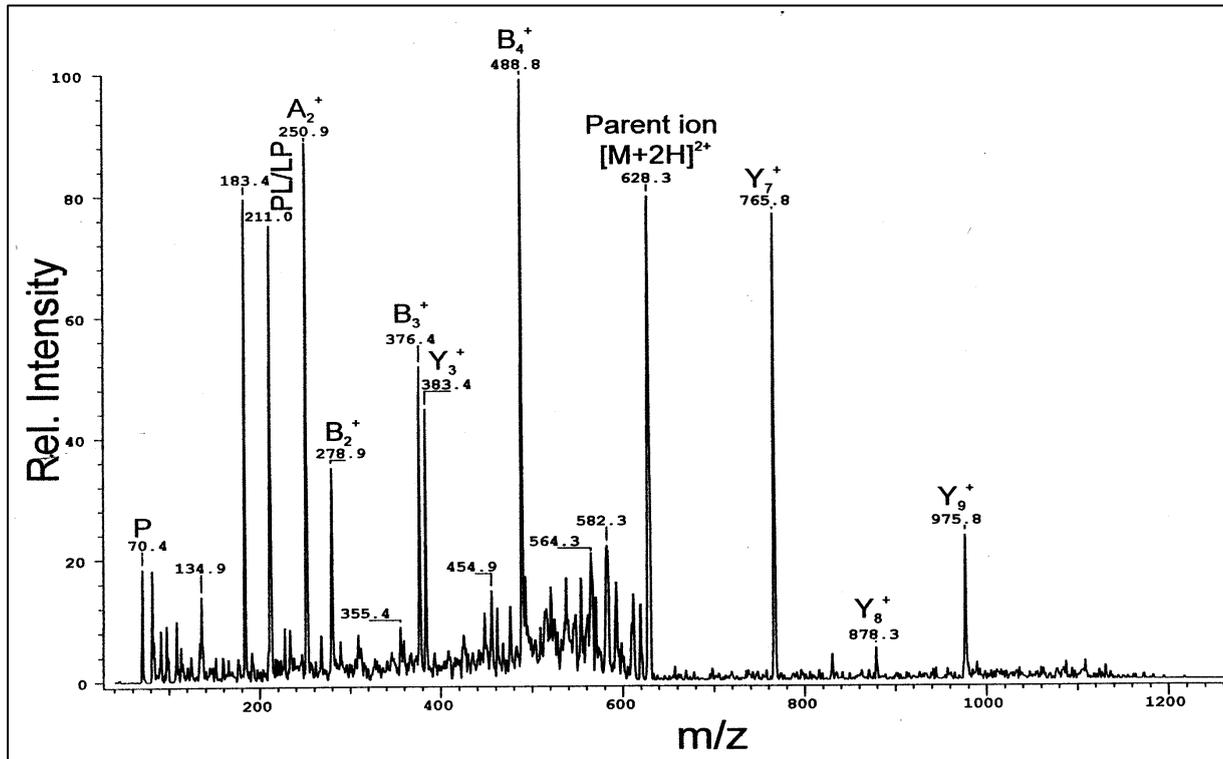


Abb.19 Spektrum des Peptids T21-31 (Masse 627,5 Da) das mittels Nanospray-ESI-MS/MS ermittelt wurde.

#	Rank/Sp	(M+H)+	Cn	deltCn	C*10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1/1	1254.4	1.0000	0.0000	1.8863	1233.3	19/30	pir P10888	(R) DYPLPDVAHVK
2.	2/7	1254.4	0.7875	0.2125	1.4304	441.7	14/33	pir P35429	(R) LPRGVGDAAELR
3.	3/27	1254.4	0.7226	0.2774	1.3125	348.0	13/30	pir P16610	(R) LELTHTPSLSR
4.	4/4	1254.5	0.5986	0.4014	1.0871	488.2	13/27	pir P07338	(K) NPKFNMFTVR
5.	5/67	1254.5	0.5975	0.4025	1.0853	251.2	11/30	pir Q03555	(R) MSPFPLTSMK
6.	6/16	1255.5	0.5906	0.4094	1.0726	388.8	13/30	pir Q28479	(K) LDFANVVHVK
7.	7/19	1252.3	0.5790	0.4210	1.0517	371.8	13/30	pir P35444	(R) DTDLGFPDEK
8.	8/21	1252.5	0.5651	0.4349	1.0263	367.6	12/30	pir D45852	+24 (K) VEEVGLIDLK
9.	9/6	1254.4	0.5622	0.4378	1.0211	449.2	13/27	pir P35053	+1 (R) AFRDLYAELR
10.	10/241	1253.4	0.5439	0.4561	0.9879	144.6	8/27	pir Q63344	+1 (R) FLDRGLFTHR
								pir U62316 RNU62316 RNU62316 NID: g1432166 Norway rat.	
1.		pir P10888	COX4_RAT CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE IV PRECURSOR (E.C. 1.9.3.1).						
2.		pir P35429	HES2_RAT TRANSCRIPTION FACTOR HES2. RATTUS NORVEGICUS (RAT).						
3.		pir P16610	NK2R_RAT SUBSTANCEK RECEPTOR (SKR) (NEUROKININ A RECEPTOR) (NK2 RECEPTOR).						

Tabelle 4 Zusammenfassung der Datenbanksuche in einer Ratten spezifischen Datenbank anhand des Spektrums des Peptids T21-31 (Masse 627,5 Da).

Für die Bestimmung der Phosphorylierungsstellen wurde die Phosphoproteinbande, wie bereits beschrieben, aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und tryptisch verdaut.

Das tryptische Peptidgemisch wurde chromatographisch (reversed-phase capillar-HPLC) in einzelne Spaltprodukte (Peptide) aufgetrennt. Jeweils 5 µl von jeder der gesammelten, radioaktiven Fraktion wurde 1 Minute lang in einem Szintillationszähler gezählt (Abb. 20).

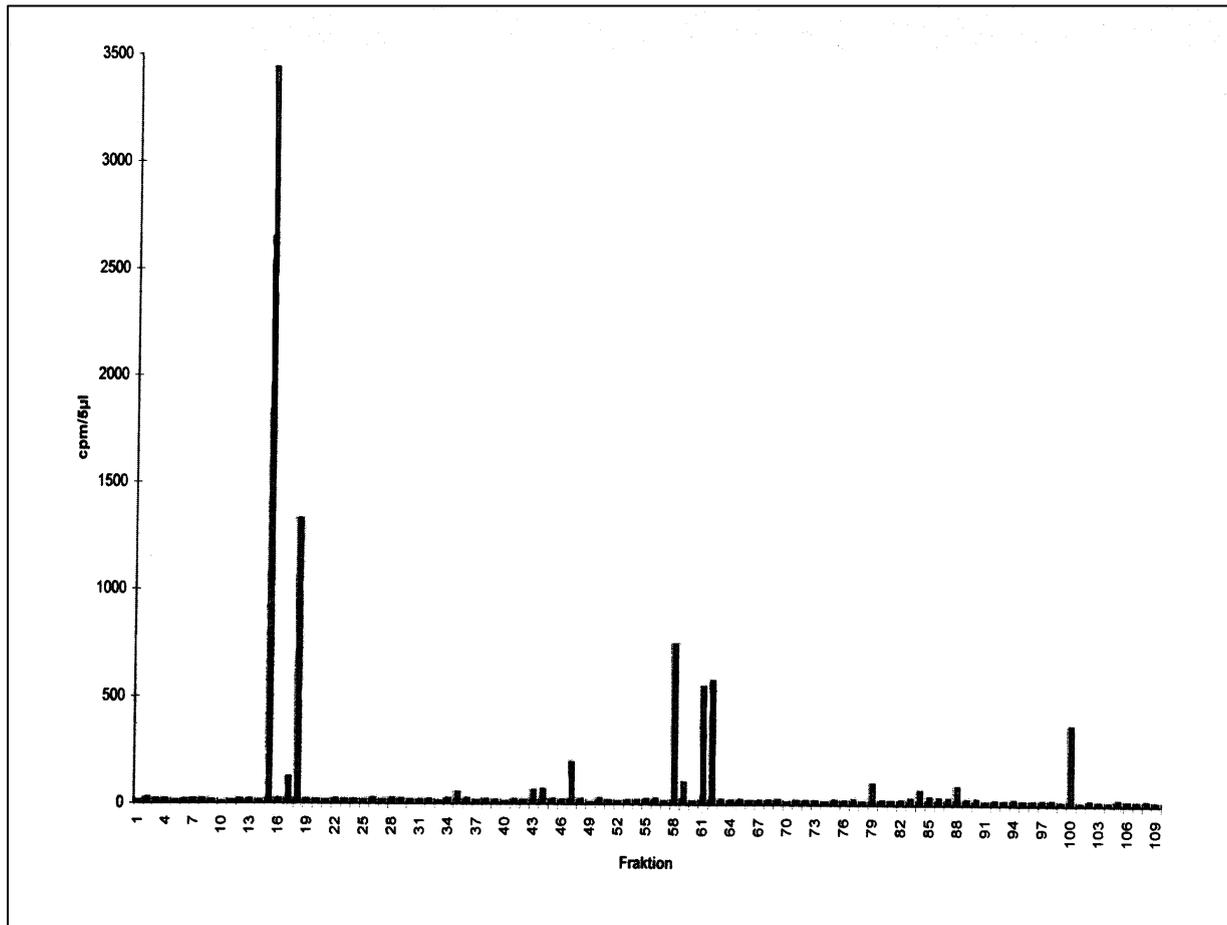


Abb. 20 Radioaktivitätsprofil der Spaltprodukte.

Die Fraktion, die den höchsten Radioaktivitätsanteil zeigte (Fraktion Nr. 15) wurde mittels eines ABI 467 Protein-Sequenzers sequenziert, wonach die Aminosäuresequenz **LLSASQK** ermittelt wurde. Es gab Hinweise, dass der erste Serinrest dieser Sequenz phosphoryliert wird. Diese Vermutung konnte bislang jedoch nicht eindeutig reproduziert werden.

3.6.4 Massenspektrometrische Identifizierung der Untereinheit VIc

Die 8,4 kDa Phosphoproteinbande wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und das Phosphoprotein In-Gel tryptisch verdaut. Das tryptische Peptidgemisch wurde mittels HPLC (C18-Säule) getrennt und für massenspektrometrische Untersuchung eingesetzt.

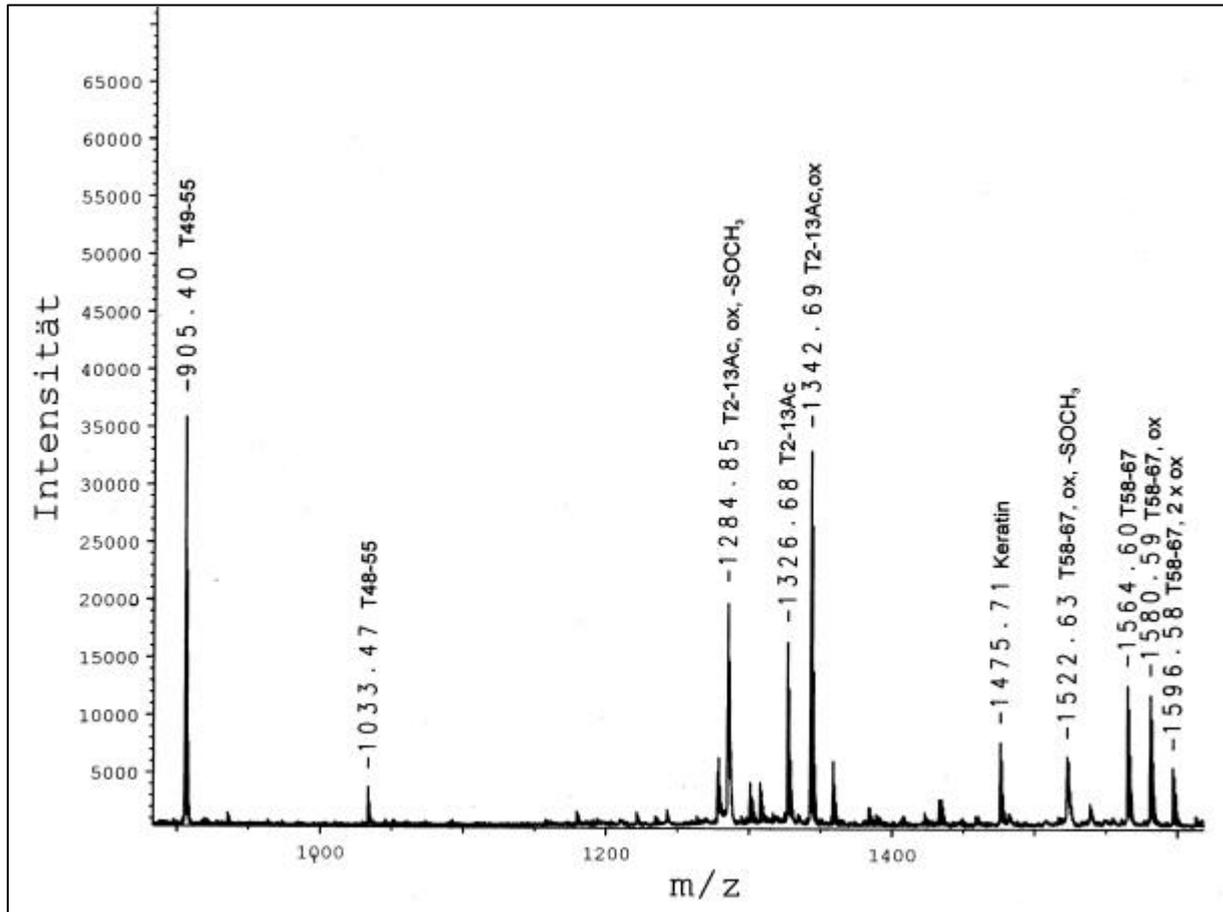


Abb. 21 Spektrum der tryptisch verdauten 8.4 kDa Phosphoproteinbande.

Die Abbildung 21 zeigt ein MALDI-PSD Spektrum eines resultierenden Peptids mit der Masse von 906,4 Da, das zur Datenbankrecherche verwendet wurde, die als eindeutiges Resultat die Untereinheit VIc der Cytochrom c Oxidase ergab (Tabelle 5).

#	Rank/Sp	(M+H) ⁺	Cn	deltCn	C+10 ⁴	Sp	Ions	Reference	Peptide
1.	1/1	906.0	1.0000	0.0000	2.1279	635.7	11/18	pir P11950 +1	(K) AYADFYR
								pir P11951 COXI_RAT CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIC	
2.	2/58	906.0	0.4229	0.5771	0.8998	130.3	6/18	pir Q09167 +1	(R) FSSRRPR
								pir AF020683 AF020683 AF 020683 NID:g2460179 Norway rat	
3.	3/26	906.0	0.3971	0.6029	0.8451	194.4	6/15	pir P05432	(K) YEKYFR
4.	4/13	905.1	0.3925	0.6075	0.8352	252.9	7/18	pir X68101	(K) LLKEVFR
5.	5/20	906.0	0.3899	0.6101	0.8297	210.7	7/18	pir P32076 +1	(K) FAEHVFR
								pir P35333 VIS3_RAT VISININLIKE PROTEIN 3 (VILIP3)	
6.	6/97	906.0	0.3717	0.6283	0.7910	93.9	6/18	pir Q96528	(K) QPGERYR

7.	7/86	906.1	0.3471	0.6529	0.7387	100.4	6/18	pir V01201	(R) ELLLVYR
8.	8/17	905.1	0.3338	0.6662	0.7102	227.0	8/18	pir S28858 +1	(K) KLENNMR
		pir U08256	RNU08256	RNU08256	NID: g475543	Norway rat			
9.	9/81	906.1	0.3088	0.6912	0.6572	105.1	6/18	pir U52034	(K) IRRAYR
10.	10/50	906.0	0.3052	0.6948	0.6495	136.3	6/15	pir P13286	(R) IYYQYR
1.	pir P11950	COXH_RAT CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIC1 (E.C. 1.9.3.1.).RATTUS...							
2.	pir Q09167	CL4_RAT INSULININDUCED GROWTH RESPONSE PROTEIN CL4 (DELAYEDEARLY PROTEIN)							
3.	pir P05432	G33_RAT GENE §§ POLYPEPTIDE: RATTUS NORVEGICUS (RAT).							

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Datenbankrecherchen.

3.7 Einfluss des cyclischen AMP auf den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette

Die Sauerstoffmessungen wurden mittels Clarke-Sauerstoffelektrode bei Raumtemperatur (ca. 22°C) durchgeführt. Die Elektrode wurde mit Na₂S₂O₄ (0 mM O₂) und mit destilliertem Wasser (~ 0,2 mM O₂) geeicht.

Die Mitochondrien wurden für den jeweiligen Messtag aus der Leber und dem Herz von gefütterten Ratten isoliert.

Die Funktionstüchtigkeit der intakten Leber- und Herzmitochondrien wurde anhand des Atmungskontrollquotienten Q bestimmt. Der mittlere Atmungskontrollquotient betrug für die Lebermitochondrien **5,4** (n=18; SEM=0,252) und für die Herzmitochondrien **7,2** (n=14; SEM=0,24).

Es wurde ca. 1 mg Leber- bzw. Herzmitochondrienprotein pro Messkammer eingesetzt. Die ADP Endkonzentration betrug zwischen 189 nM und 200 nM.

Als Parameter, die den Einfluss des cyclischen AMP auf den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette charakterisieren sollten, dienten der P/O-Quotient und der Sauerstoffverbrauch im aktiven Zustand (state 3).

3.7.1 Ergebnisse der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Mitochondrien isoliert aus Rattenleber

Der Sauerstoffverbrauch der intakten Lebermitochondrien wurde bei verschiedenen cAMP Konzentrationen registriert (Abb.22) und die state 3-Atmung, sowie der ADP/O-Verbrauch (P/O-Quotient) errechnet.

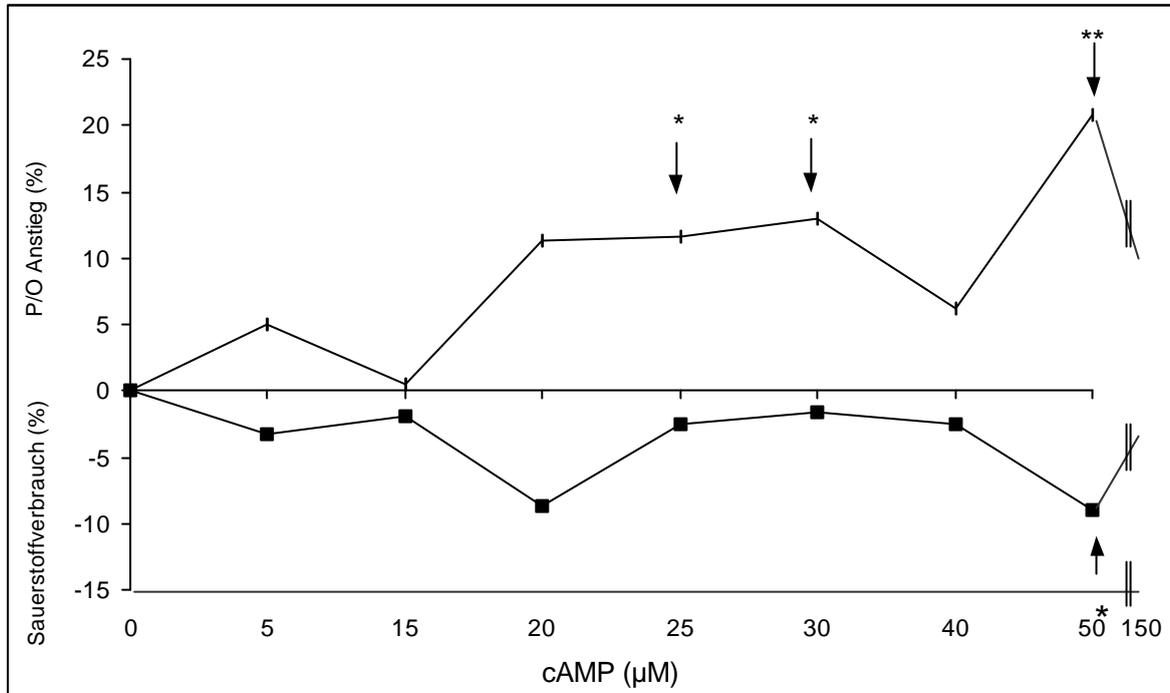


Abb.22 Einfluss der steigenden cAMP Konzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette in intakten Rattenlebermitochondrien (n=7-18).

Bei 50 μM cAMP wurde ein hoch signifikanter Anstieg des P/O-Quotienten (**p ≤ 0,005) und eine signifikante Abnahme des state 3 Sauerstoffverbrauchs (*p ≤ 0,05) registriert. Darüber hinaus wurde eine 11-12 % Zunahme des P/O-Quotienten bei 20 μM, 25 μM und 30 μM cAMP Konzentrationen beobachtet, wobei die P/O Zunahme bei 25 μM und 30 μM cAMP signifikant ist (*p ≤ 0,05). Bei den Konzentrationen von 25 μM und 30 μM wurde eine Verringerung des Sauerstoffverbrauchs der Atmungskette lediglich um 2,5 % bzw. 1,6 % registriert.

Wie der Grafik zu entnehmen ist, gibt es eine eindeutige Korrelation zwischen der Zunahme des P/O-Quotienten und der Abnahme des Sauerstoffverbrauchs im aktiven Zustand bei cAMP Konzentrationen von 5 μM, 15 μM, 20 μM und 50 μM .

3.7.2 Ergebnisse der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Mitochondrien isoliert aus Rattenherz

Der Einfluss der verschiedenen cAMP Konzentrationen auf den state 3 Sauerstoffverbrauch und den P/O-Quotienten wurde auch an intakten Herzmitochondrien untersucht (Abb. 23).

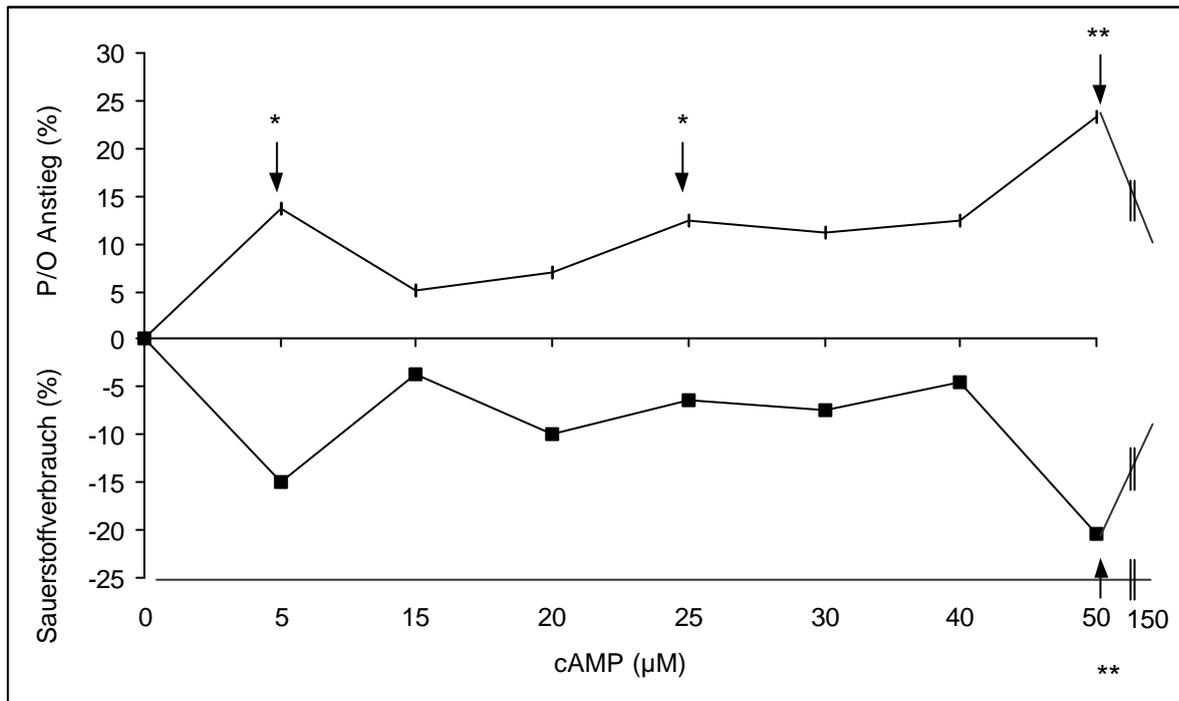


Abb.23 Einfluss der verschiedenen cAMP Konzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette in intakten Rattenherzmitochondrien (n=3-14).

Eine hoch signifikante Zunahme des P/O-Quotienten wurde bei 50 μM cAMP (**p ≤ 0,0001) registriert, die von einer ebenfalls hoch signifikanten Abnahme des Sauerstoffverbrauchs (**p ≤ 0,005) begleitet wurde. Darüber hinaus konnte eine signifikante Zunahme des P/O Quotienten bei 5 μM und 25 μM cAMP (*p ≤ 0,025) gezeigt werden. Die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs betrug bei 5 μM und 25 μM cAMP 14,9 % bzw. 6,4 %.

Wie der Grafik zu entnehmen ist, korreliert die Zunahme des P/O-Quotienten mit der Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bei 5 μM, 15 μM, 20 μM und 50 μM cAMP deutlich. Bei den dazwischen liegenden cAMP-Werten ist kein eindeutiger Trend sichtbar.

3.7.3 Vergleich der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Mitochondrien isoliert aus Rattenleber und Rattenherz

Der Vergleich der Sauerstoffmessungen durchgeführt an Leber- und Herzmitochondrien zeigt gewisse Parallelen (Abb. 24). Die Herzmitochondrien reagieren im allgemeinen wesentlich empfindlicher auf das cyclische AMP, als die Lebermitochondrien .

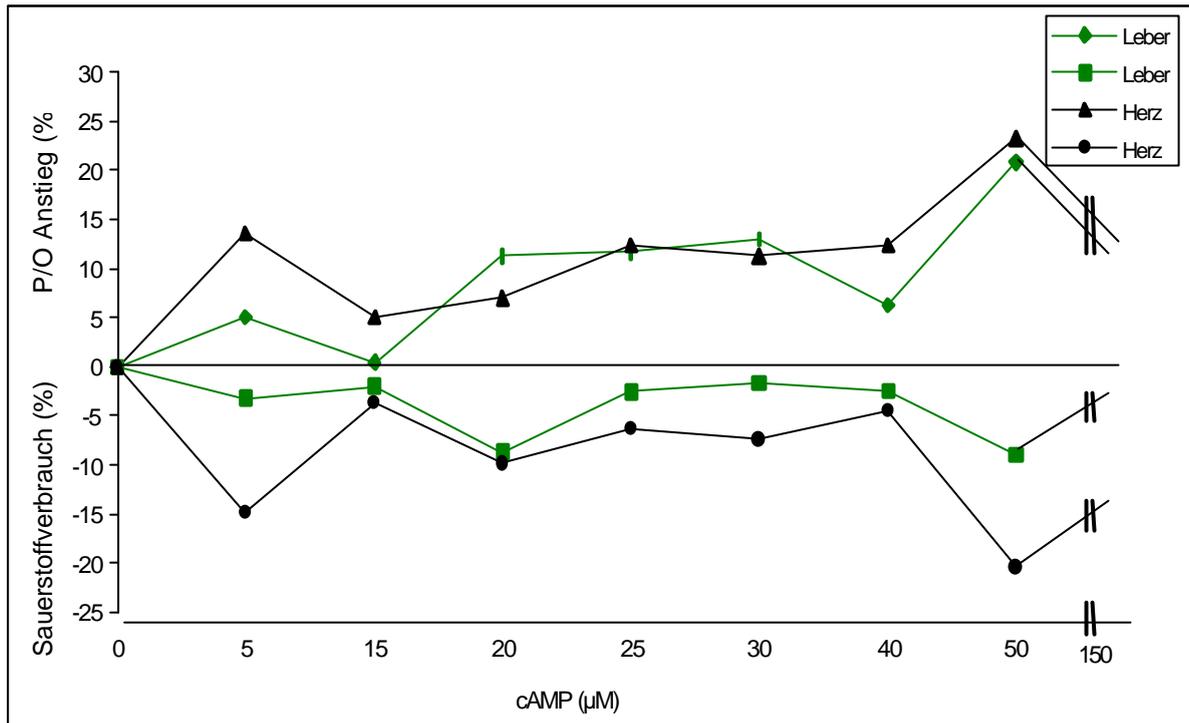


Abb. 24 Vergleich der P/O Zunahme und des Sauerstoffverbrauchs zwischen intakten Leber- und Herzmitochondrien bei steigenden cAMP Konzentrationen.

Die cAMP Konzentration von 5 µM führte sowohl bei den Leber- als auch den Herzmitochondrien zu einem klar erkennbaren Anstieg des P/O-Quotienten, der von einer deutlichen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs begleitet wurde.

Eine Erhöhung der cAMP Konzentration auf das dreifache (15 µM) beeinflusst die Atmung der Herz- und Lebermitochondrien nur geringfügig. Bei einer cAMP Konzentration von 20 µM wurde besonders bei den Lebermitochondrien ein Anstieg des P/O-Quotienten und eine deutliche Abnahme des Sauerstoffverbrauchs registriert.

Die cAMP Konzentrationen von 25 µM, 30 µM und 40 µM zeigen keine erkennbare Korrelation zwischen der Zunahme des P/O-Quotienten und der Abnahme des Sauerstoffverbrauchs. Bei 50 µM cAMP wurde bei den Herz- und Leber-

mitochondrien die höchste Zunahme des P/O-Quotienten registriert, die von einer starken Abnahme des Sauerstoffverbrauchs begleitet wurde.

3.7.4 Einfluss des Proteinkinase A Inhibitors H-89 auf die Aktivität der Atmungskette

H-89 ist ein selektiver und wirksamer Inhibitor der Proteinkinase A mit einer Hemmungskonstanten von $K_i = 48 \text{ nM}$. Darüber hinaus hemmt er bei höheren Konzentrationen andere Serin/Threonin Proteinkinasen wie z.B. Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ($K_i = 29,7 \text{ }\mu\text{M}$), Caseinkinase I ($K_i = 38,3 \text{ }\mu\text{M}$), Myosin Light Chain Kinase ($K_i = 28,3 \text{ }\mu\text{M}$) und Proteinkinase C ($K_i = 31,7 \text{ }\mu\text{M}$) [Chijiwa et.al. 1990].

In dieser Versuchsreihe war der Einfluss des Proteinkinase A Inhibitors H-89 auf den P/O-Quotienten und die state 3-Atmung von Interesse. Die dazu erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst.

Die intakten Rattenherzmitochondrien wurden fünf Minuten mit $50 \text{ }\mu\text{M}$ cAMP vorinkubiert (Tabelle 4). Diese Vorinkubation führte zu einer Steigerung des P/O-Quotienten um $22,6 \%$ und zu einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um $12,7 \%$. Die Zugabe des Proteinkinase A-Inhibitors H-89 (50 nM Endkonzentration) zu den mit dem cyclischen AMP vorinkubierten Herzmitochondrien führte zu einer deutlichen Hemmung der cAMP-vermittelten Effekte, die mit einer Zunahme des P/O-Quotienten um ca. 4% und einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um ca. 8% deutlich werden.

	P/O	O ₂ (nmol/(min·mg))
Kontrolle	2,48 ± 0,12	59,89 ± 9,3
50 μM cAMP	3,04 ± 0,108 p £ 0,01	52,29 ± 7,96
50 μM cAMP/ 50 nM H-89	2,59 ± 0,069	54,93 ± 7,45

Tabelle 6. Intakte Herzmitochondrien wurden 5' mit $50 \text{ }\mu\text{M}$ cAMP vorinkubiert, dann mit 50 nM H-89 versetzt; (n=4; ±SEM).

Die in der Tabelle 6 dargestellten Ergebnisse konnten weder mit den mit $50 \text{ }\mu\text{M}$ cAMP vorinkubierten Lebermitochondrien noch mit nicht vorinkubierten Leber- und Herzmitochondrien reproduziert werden.

Bei einer Konzentration von 30 μM des Proteinkinase A-Inhibitors H-89 wurde der state 3 der intakten Leber- und Herzmitochondrien vollständig gehemmt.

4.0 Diskussion

4.1 In vitro Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase durch Caseinkinase II

Die Caseinkinasen I und II sind „second-messenger“ unabhängige Proteinkinasen, deren Name von ihrer bevorzugten in vitro Phosphorylierung von sauren Substratproteinen wie z.B. Casein bzw. Phosvitin stammt [Hathaway et.al. 1982][Pinna, 1990]. Sie sind an der Stoffwechselregulation, der Transduktion der extrazellulären Signale, sowie an der Zellproliferation und Zelltransformation beteiligt [Pinna, 1990].

Die Caseinkinase II ist innerhalb der Eukaryonten weit verbreitet [Hathaway et.al. 1982][Damuni et.al. 1988][Vallejo et.al. 1997]. Es ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei katalytischen und zwei nicht katalytischen Untereinheiten ($\alpha_2\beta_2$, MW ca. 130 kDa) [Edelman et.al. 1987][Pinna, 1991]. Eine chronologische Zusammenfassung der von Caseinkinase II phosphorylierten Substratproteine ist bei Pinna [Pinna, 1990] zu finden. Bei der Ratte wurden die höchsten Konzentrationen der Caseinkinase II in der Milz, sowie den Hoden und die geringsten Konzentrationen im Fettgewebe, sowie der Skelettmuskulatur lokalisiert [Singh et.al. 1985]. In den Hepatozyten der Ratte wurde die Caseinkinase II-Aktivität mit bis zu 90 % im Cytosol festgestellt. Geringe Aktivitäten wurden im Zellkern, den Mitochondrien, sowie in den Mikrosomen gefunden [Edelman et.al. 1987].

Folgende Konsensussequenz wurde für eine Phosphorylierung durch Caseinkinase II gefunden: **S*/T***-(D/ES(P)₁₋₃, X₂₋₀; E=Glutaminsäure, D=Asparaginsäure, *=Phosphorylierungsstelle [Pearson et.al. 1991][Kennelly et.al. 1991]. Die Autoradiographie des *in vitro* Experimentes (Abb.8) zeigt eine starke ³²P-Phosphat Beladung der Untereinheiten IV, Va/b, sowie VIII nach Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit Caseinkinase II in Anwesenheit von γ ³²P-ATP. Die Untereinheit II zeigt dagegen nur einen geringen Phosphorylierungsgrad.

Die Aminosäuresequenzen der phosphorylierten Untereinheiten weisen mehrere potentielle Konsensussequenzen für eine mögliche Phosphorylierung durch Caseinkinase II auf:

- die Untereinheit II: **S***TMD (S54), **S***YE (S107), **T***DYE (T11), **T***ND (T125), **S***ED (S 166), **T***D (T172), **S***E (S197).
- die Untereinheit IV: **S***YVD (S36), **S***RDE (S74), **S***FAE (S88), (Abb.29)
- die Untereinheit Va: **S***HE (S41), TLNE (T129), **S***TPE (S136)

- die Untereinheit Vb: **T*DE** (T39), **T*GLE** (T45), **T*KED** (T73)
- die Untereinheit VIII: **S*HLE** (S35)

Bei der Untereinheit IV befindet sich eines der drei Sequenzmotive in der hoch konservierten Region AS 54-84 (Abb.29). Bei der Untereinheit II ist eine der sieben Konsensussequenzen zwischen den transmembranen Helices TM1 und TM2, die restlichen sechs Sequenzmotive sind in der extramembranen, cytosolischen Domäne lokalisiert.

Die ubiquitäre Verteilung der Caseinkinase II innerhalb der Zelle sowie ihre zahlreichen Konsensussequenzen innerhalb der kern- und mitochondrial kodierten Untereinheiten könnten auf eine potentielle Beteiligung dieser Proteinkinase an der Reifung der mitochondrial-/kernkodierten Untereinheiten, dem Transport der nucleären Untereinheiten, sowie dem Assemblierungsprozess des Oxidase-Komplexes hindeuten.

4.2 In vitro und in vivo Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase durch Proteinkinase A

Die Idee der intrazellulären Signalumwandlung mit Hilfe von sekundären Botenstoffen hat ihren Ursprung in der Entdeckung der Rolle des cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP). Der bekannte Proteinkinase A-Weg ist verantwortlich für die hormonelle Kontrolle vieler zellulärer Signalkaskaden. Die Proteine, die in den verschiedenen Zellkompartimenten durch Proteinkinase A phosphoryliert werden, umfassen Enzyme, Membranrezeptoren, Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren.

Vom großen Interesse für die Bioenergetik ist die Frage, ob eine Ausdehnung der cAMP-vermittelten Effekte auf die Regulation der Zellatmung stattfindet und welche Bedeutung sie für den Energiestoffwechsel der Zelle hat.

Die Existenz cAMP-abhängiger Proteinkinasen in Mitochondrien verschiedener Spezies wurde wiederholt beschrieben [Henriksson et.al. 1979][Müller et.al. 1987][Müller et.al. 1987][Burgess et.al. 1987][Schwoch et.al. 1990][Sardanelli et.al. 1996][Vallejo et.al. 1997][Papa et.al. 1999]. Die Phosphorylierung von spezifischen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe konnte *in vitro* und *in vivo* bei der 18 kDa Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) gezeigt werden [Papa et.al. 1996][Scacco et.al. 2000]. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz der 18 kDa Phosphoproteinbande ergab die kernkodierte AQDQ-Untereinheit der NADH-Dehydrogenase. Die Präsequenz, sowie

das reife Protein weisen Konsensussequenzen für eine mögliche cAMP-abhängige Phosphorylierung, die die Funktion und/oder die Biogenese des Enzymkomplexes regulieren könnten [Papa et.al. 1996]. Die Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase wurde *in vitro* in Abwesenheit von cAMP mittels einer endogenen, mitochondrialen Proteinkinase phosphoryliert [Steenart et.al. 1997]. Bender [Bender et.al. 2000] zeigte die cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheit II und/oder III, sowie der Untereinheit Vb der isolierten Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente konzentrierten sich hauptsächlich auf die Untersuchung der cAMP-abhängigen Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase aus Rattenleber *in vitro* am isolierten Enzymkomplex und *in vivo* an intakten Hepatozyten.

Die *in vitro* Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP ergab eine deutliche Phosphorylierung der Untereinheiten II, III, IV und VI, sowie eine schwache Phosphorylierung der Untereinheit V (siehe Abb.7). Die Inkubation der intakten Hepatozyten mit ^{32}P -Phosphat und die nachfolgende Stimulation mit Glukagon ergab, im Gegensatz zu dem *in vitro* Experiment, klar erkennbar nur die Phosphorylierung der Untereinheit III. Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b konnte sowohl im Kontroll- als auch im Glukagon-Ansatz beobachtet werden, wobei die Phosphorylierung im Glukagon-Ansatz deutlich stärker ausgeprägt ist als im Kontroll-Ansatz (Abb.12).

Obwohl die Aminosäuresequenzen der reifen Untereinheiten II, IV und VI keine klassischen, in der Literatur beschriebenen Konsensussequenzen für eine Proteinkinase A Phosphorylierung aufweisen [Pearson et.al. 1991][Kennelly et.al. 1991], zeigen die Autoradiogramme der *in vitro* Experimente starke Phosphoproteinbanden. Der Versuch, diese unspezifischen Phosphorylierungsstellen mittels massenspektrometrischer Methoden zu identifizieren, zeigte wenig Erfolg. Es gelang nur einmal, die Phosphorylierung eines Serinrestes der Sequenz **LLS*ASQK** (S34) der Untereinheit IV zu zeigen. Dieser Serinrest gehört einer konservierten, α -helicalen Region der extramembranären Domäne dieser Untereinheit an, die in den Matrixraum ragt. Da die cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheiten II, IV und VI nur in *in vitro* Experimenten zu finden ist, ist anzunehmen, dass sie keine physiologische Bedeutung hat.

Die Präsequenzen einiger kernkodierter Untereinheiten zeigen ebenfalls Konsensussequenzen für eine cAMP-abhängige Phosphorylierung durch Proteinkinase A:

(Untereinheit IV: RALS* (S8) und RAIS* (S16); Untereinheit Va: RRCT* (T10) und RCYS* (S38); Untereinheit VIa: RYS* (S12) und RPMS* (S27); Untereinheit VIIa: RTIS* (S17)). Die Präsenz dieser Konsensussequenzen in der Präsequenz und in dem reifen Protein könnte in einer Phosphorylierung des unreifen Proteins mittels Proteinkinase A sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien resultieren. Diese zweifache Phosphorylierung könnte so die Reifung und/oder den Import der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase in die Mitochondrien, sowie ihre Assemblierung in den Enzymkomplex beeinflussen [Papa et.al. 1999].

Die Untereinheit III weist nur eine einzige Phosphorylierungssequenz REGT* (T65) auf, die von der Matrixseite zwischen den transmembranen Helices TM2 und TM3 lokalisiert ist (Abb. 25).

Die Untereinheit Va weist zwei Phosphorylierungsmotive RWVT* (T54) und RPT* (T129) auf. Dagegen zeigt die Aminosäuresequenz der Untereinheit Vb keine typischen Phosphorylierungstellen der Proteinkinase A. In der Literatur wurde ein Serinrest in Position 84 in der Untereinheit Vb aus Rinderherz als eine mögliche Phosphorylierungsstelle postuliert [Kadenbach et.al. 1999].

4.2.1 Die Phosphorylierung der Untereinheit III

Die Untereinheit III, ein stark hydrophobes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 29 739 Da, ist die zweitgrößte der mitochondrial kodierten Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase. Die Primärstruktur der Untereinheit III ist hoch konserviert, es besteht eine ca. 71 %ige Ähnlichkeit zwischen den entsprechenden Untereinheiten aus *Rb. sphaeroides* und dem Menschen [Bratton et.al. 1999].

Die Untereinheit III, bestehend aus 260 Aminosäuren, weist sieben transmembrane Segmente auf [Tsukihara et.al. 1996], mit wenig regulärer Anordnung [Iwata et.al. 1998].

Die sieben transmembranen Helices der Untereinheit III sind in zwei Bündel geteilt. Das erste Bündel besteht aus den wenig konservierten, transmembranen Helices TM1 und TM2 (Abb.26). Es formt eine abgesonderte Domäne, die durch eine V-förmige Spalte von dem zweiten Bündel getrennt ist, das aus den hoch konservierten Helices TM3-TM7 besteht. Die transmembranen Helices TM4-TM7 in dem zweiten Bündel bilden eine abgesonderte, aus vier Helices bestehende Bündelstruktur, in die die TM3 nicht involviert ist [Tsukihara et.al. 1996][Riistama et.al. 1996][Iwata et.al. 1998][Mather et.al. 1998].

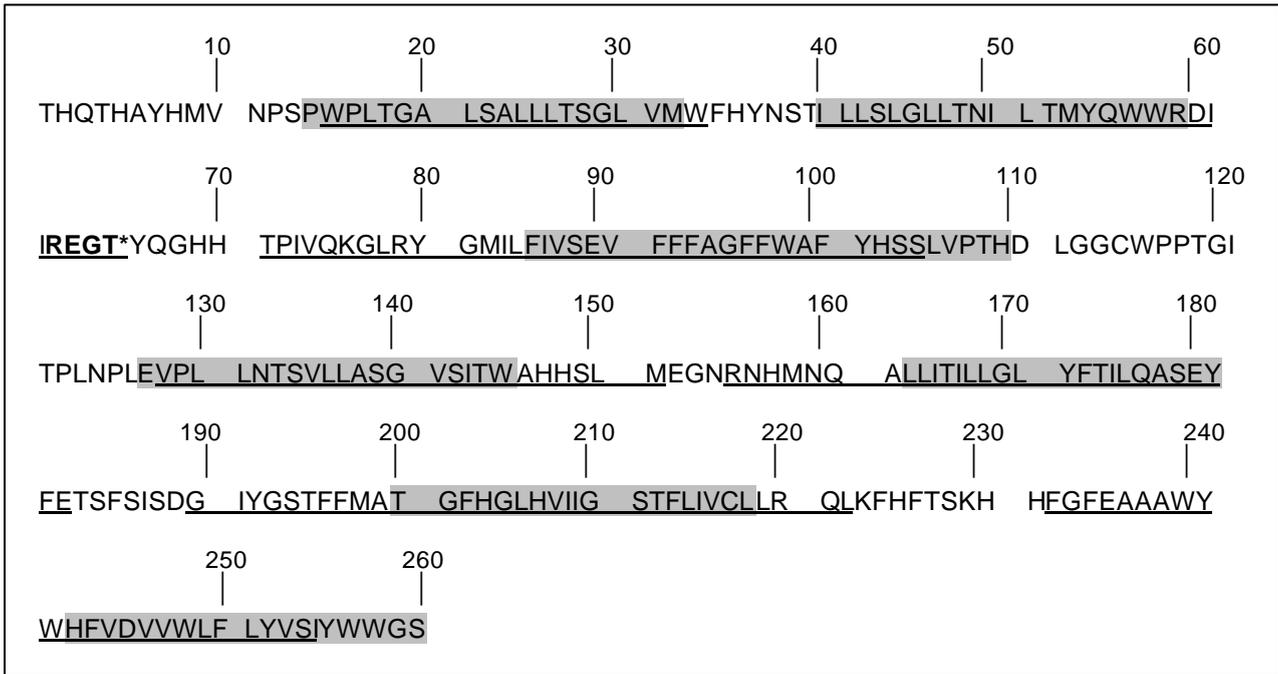


Abb. 25 Aminosäuresequenz der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase aus Rattenleber, entnommen aus der SWISS-PROT Datenbank. Die unterstrichenen Abschnitte stellen die transmembranen Helices, die anhand der Kristallstruktur des Enzymkomplexes aus Rinderherz bestimmt wurden, dar. Die grau markierten Abschnitte zeigen die 7 transmembranen Helices, die aufgrund der Aminosäuresequenz bestimmt wurden [Tsukihara et.al. 1996].

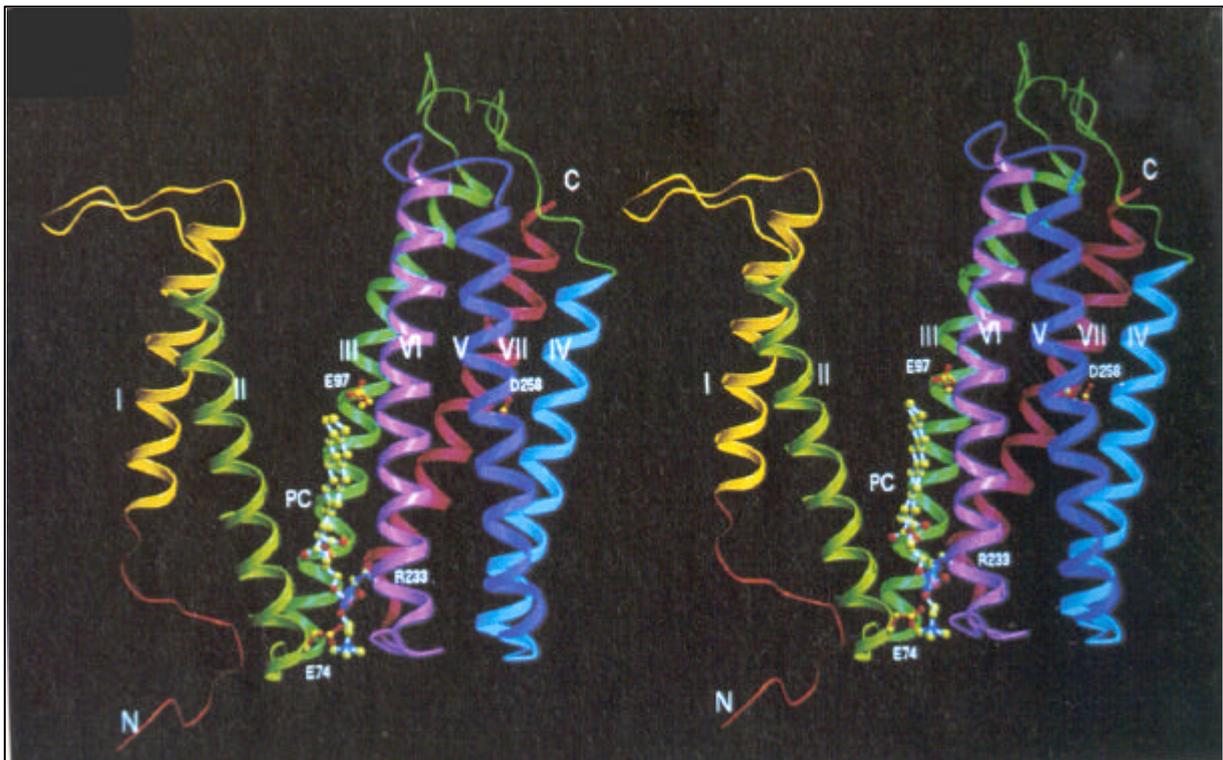


Abb. 26 Struktur der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase aus *P. denitrificans* (parallele Anordnung zur Membran) [Iwata et.al. 1995]. PC=Phosphatidylcholin.

An der Unterseite der V-förmigen Spalte wurden Lipidmoleküle lokalisiert (zwei Phosphatidyläthanolamin- und ein Phosphatidylglycerolmolekül im Oxidasekomplex aus Rinderherz und ein Phosphatidylcholin im Oxidasekomplex aus *P. denitrificans*. Es wird angenommen, dass diese Spalte als ein Lipidpool dient [Wata et.al. 1995] [Tsukihara et.al. 1996].

Die Untereinheit III besitzt keine Metallzentren, sodass sie nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt ist. Nichtsdestoweniger bildet sie, zusammen mit den Untereinheiten I und II, das „Core-Protein“.

Die einzige, theoretische Konsensussequenz für eine cAMP-abhängige Phosphorylierung in der Untereinheit III (REGT*) ist zwischen den beiden Peptidomänen (TM1-TM2 und TM3-TM7) an der Matrixseite lokalisiert (Abb. 25). Ob die bereits bekannten Konsensussequenzen, die durch die cytosolische Proteinkinase A bevorzugt phosphoryliert werden, auch mit denen der mitochondrialen Proteinkinase A übereinstimmen, ist nicht bekannt. Die Sequenzabschnitte, die zwischen den transmembranen Helices in den Intermembran- und den Matrixraum exponiert sind, weisen zahlreiche Serin und Threoninreste auf, die phosphoryliert werden könnten (siehe Abb.25). Bis heute konnten nur wenige mitochondriale Phosphoproteine identifiziert werden und die Identifizierung der phosphorylierten Sequenzen erweist sich als noch problematischer, u.a. wegen des niedrigen Phosphorylierungsgrades der Proteine (ca. 8% in den eigenen *in vitro* Experimenten).

Bereits Mitte der siebziger Jahre konnten kleine, aber signifikante Mengen einer cAMP-abhängigen Proteinkinase in den Lebermitochondrien der Ratte detektiert werden [Leitke et.al. 1976] [Henriksson et.al. 1979]. In den folgenden Jahren wurde die Proteinkinase A-Aktivität in anderen Säugetierorganen nachgewiesen [Dimino et.al. 1981][Burgess et.al. 1986][Schwoch et.al. 1990][Sardanelli et.al. 1996]. Darüber hinaus wurde Proteinkinase A ebenfalls in Mitochondrien anderer Species gefunden, wie z.B. der Hefe (*S. cerevisiae*) [Rödel et.al. 1985][Müller et.al. 1987][Müller et.al. 1989] sowie bei den Wirbellosen (*Artemia franciscana*) [Vallejo et.al. 1997].

Die wenigen Untersuchungen bezüglich der submitochondrialen Lokalisation der Proteinkinase A ergaben unterschiedliche Resultate. Zum einen fand man bis zu 90% der Proteinkinase A-Aktivität im Intermembranraum von Rattenlebermitochondrien [Henriksson et.al. 1979], zum anderen ca. 80 % in der Matrixregion der Rinderherzmitochondrien [Burgess et.al. 1986] oder der äußeren Mitochondrienmembran der Spermien [Liebermann et.al. 1988]. Immunologische Untersuchungen an verschiedenen

Gewebe der Ratte ergaben eine eindeutige Lokalisation der Proteinkinase A in der inneren Mitochondrienmembran und im Matrixraum [Schwoch et.al. 1990]. Diese Untersuchungen zeigten außerdem eine Beschränkung der regulatorischen Untereinheit (RI) der Proteinkinase A auf die innere Mitochondrienmembran. Die variable Verteilung der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A zwischen der inneren Mitochondrienmembran und dem Matrixraum deutet darauf hin, dass die katalytische Untereinheit lose mit der regulatorischen Untereinheit assoziiert ist [Schwoch et.al. 1990]. Daher wird angenommen, dass die katalytische Untereinheit von der regulatorischen in den Matrixraum entlassen wird, nachdem das zyklische AMP an die regulatorische Untereinheit, vermutlich von der cytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran, gebunden ist. Die freigesetzte katalytische Untereinheit könnte anschließend Membran-, sowie Matrixproteine phosphorylieren und somit ihre enzymatischen Eigenschaften verändern [Papa et.al. 1999].

Die mehrfach beschriebene Existenz einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A in den Mitochondrien verschiedener Species, ist in Einklang mit der im Rahmen dieser Dissertation erzielten cAMP-abhängigen Phosphorylierungen der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase *in vivo* in intakten Hepatozyten nach Glukagonstimulation (Abb.12, 13, 14) .

Im Gegensatz zu den Untereinheiten I und II wurde der Untereinheit III bis heute keine genau definierte Rolle zugeteilt. Aus den Mutageneseexperimenten geht hervor, dass die Untereinheit III eine Rolle bei der Assemblierung und Stabilisierung des reifen Enzymkomplexes spielt [Haltia et.al. 1991]. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass diese Untereinheit in den Protonentransfer involviert ist. Bereits anfangs der achtziger Jahre zeigte Casey [Casey et.al. 1979][Casey et.al. 1980], dass eine Derivatisierung der Untereinheit III mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) die Protonenpumpaktivität der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz bis zu 80 % hemmte, wobei der Elektronentransport nur teilweise aufgehoben wurde. Das DCCD bindet kovalent an einem Glutaminsäurerest (Glu⁹⁰), der in der hoch konservierten Region (TM3) der Untereinheit III lokalisiert ist [Prochaska et.al. 1981]. EEDQ bindet, ähnlich wie DCCD, vorzugsweise an die Untereinheiten II und III des Oxidase-Komplexes aus Rinderherz, was in der Hemmung der Protonentranslokationseffizienz von bis zu 70 % resultiert [Steverding et.al. 1991]. Experimente mit Oxidasekomplex aus Rinderherz, bei dem die Untereinheit III entfernt wurde, ergaben, dass der Enzymkomplex bis zu 50 % seiner Protonenpumpaktivität verloren

hatte [Wilson et.al. 1990]. Das Fehlen der Untereinheit III im Enzymkomplex von *Rb. Sphaeroides* führte zu einer spontanen, irreversiblen Inaktivierung des Enzymkomplexes während der Sauerstoffreduktion, bei physiologischen pH Wert (sog. „suicide“ Inaktivierung). Dieses Phänomen beschränkt sich nicht nur auf die bakteriellen Oxidasen. Auch die mitochondrialen Oxidasen, bei denen die Untereinheit III fehlt, verlieren schnell während des katalytischen Umsatzes ihre Aktivität. Der Hauptzielort der „suiciden“ Inaktivierung scheint das Cu_B-Zentrum zu sein. Da die Untereinheit III keinen direkten Kontakt zu den Liganden des Cu_B, sowie anderen Gruppen an der Außenhülle dieses Zentrums hat, wird angenommen, dass sie an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Cu_B-Zentrums mitwirkt [Bratton et.al. 1999]. Die Punktmutationen an Glu⁹⁸ (E98A) und Asp²⁵⁹ (D259A) der Untereinheit III aus *P. denitrificans* führten zu einer Hemmung der ATP Synthese, außerdem hemmte die Punktmutation an Glu⁹⁸ die Entstehung des elektrochemischen Protonenpotentials [Wu et.al. 1995]. Die Punktmutationen, die die Protonenpumpaktivität und/oder die Energieumwandlung beeinflussen, befinden sich in der gleichen Peptidomäne, entweder in dem Zentrum des Bündels (TM4-TM7), oder direkt oberhalb des Zentrums, nahe der periplasmatischen Oberfläche [Mather et.al. 1998].

Um den Protonentransportmechanismus des Cytochrom c Oxidase-Komplexes zu erläutern, wurden zahlreiche Modelle und Hypothesen aufgestellt. Anhand der Kristallstruktur der Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz postulierte Tsukihara [Tsukihara et.al. 1996] drei mögliche Protonenkanäle (Abb.27). Zwei dieser Kanäle transportieren offenbar die gepumpten (vektoriellen) Protonen, der dritte Kanal die chemischen (skalaren) Protonen (Protonen zur Wasserbildung). Die Protonen werden sehr effizient unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken transportiert, besonders in einer hydrophoben Umgebung, z.B. transmembrane Regionen eines Enzymkomplexes [Tsukihara et.al. 1996].

Der erste Protonenkanal (A) ist zwischen den Helices 3 und 4 der Untereinheit I lokalisiert, dagegen befindet sich der zweite Kanal (B) zwischen den Helices 11 und 12 der Untereinheit I. Der Dritte Kanal (C) wird von den Helices 6 und 8 der Untereinheit I, sowie dem Häm a₃ gebildet [Tsukihara et.al 1996].

Der Kontakt zwischen der Untereinheit I und der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase ist gegeben durch die Helices 3 und 4 der Untereinheit I mit der Helix 1 der Untereinheit III, sowie den Helices 4 und 5 der Untereinheit I mit der Helix 3 der

Untereinheit III (Abb.28). Nicht alle Helices sind parallel zueinander angeordnet. Die Helix 1 der Untereinheit III befindet sich in einem Winkel von 20° zu den Helices 3 und 4 der Untereinheit I. Die Helix 3 der Untereinheit III liegt in einem Winkel von 50° zu den Helices 4 und 5 der Untereinheit I [Tsukihara et.al. 1996].

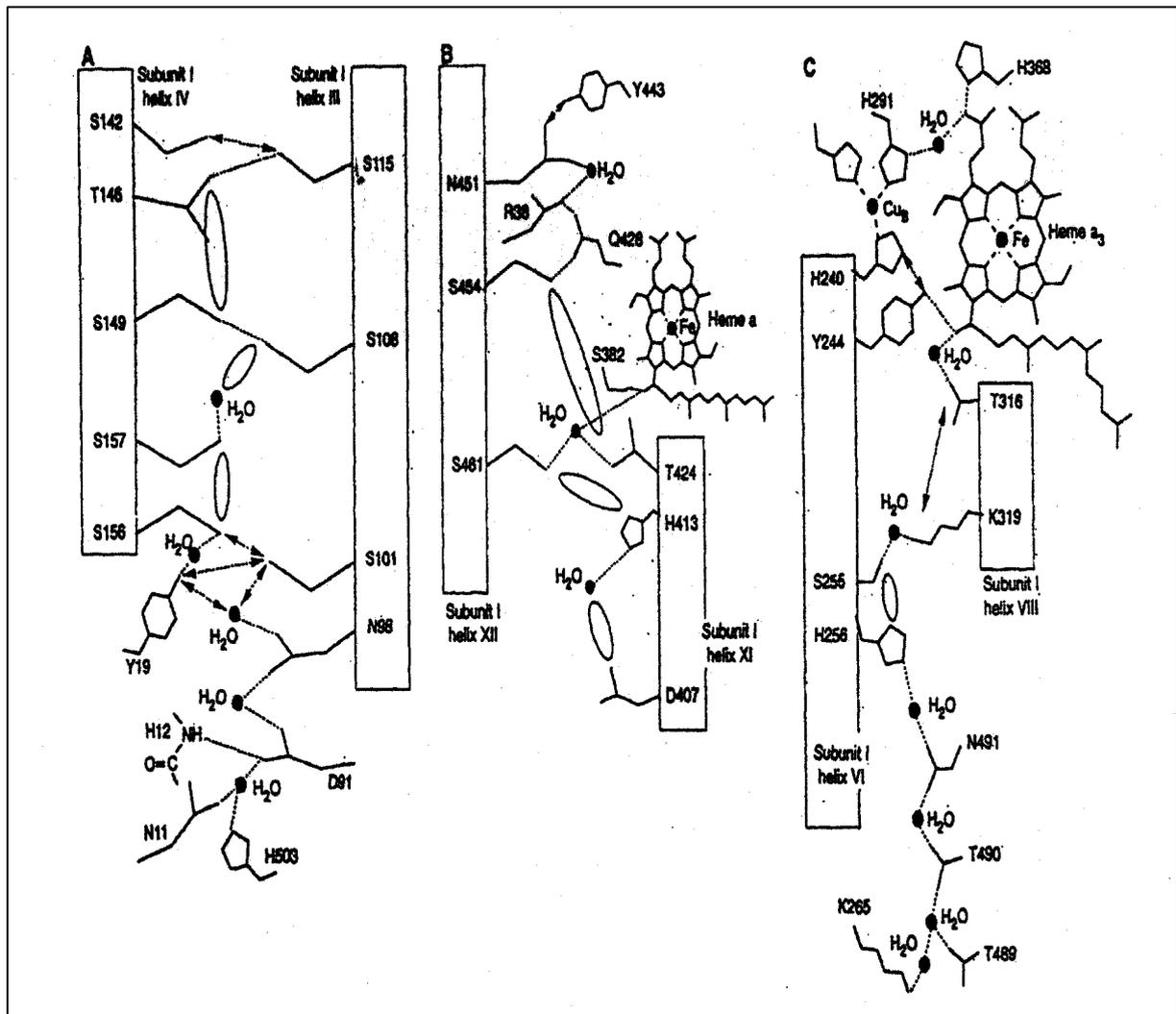


Abb. 27 Schematische Darstellung der drei postulierten Protonenkanäle. **A** und **B**: mögliche Kanäle für die gepumpten Protonen. **C**: ein möglicher Kanal für die chemischen Protonen. Jede Figur zeigt die Struktur des Kanals von dessen Eingang bis zu seinem Ende. Ovale: Stellen mit keiner detektierbaren Elektronendichteverteilung. Gepunkteten Linien: Wasserstoffbrückenbindungen. Gepunktete Pfeile: mögliche Strukturen für eine Wasserstoffbrückenbindung [Tsukihara et.al. 1996].

Es besteht somit eine Kontaktstelle zwischen der Untereinheit III (mittels ihrer transmembranen Helices 1 und 3) und dem ersten Protonenkanal. Auf der transmembranen Helix 3 der Untereinheit III befindet sich das Glu^{90} , das den Protonentransport zu beeinflussen scheint. Die Phosphorylierung der Konsensussequenz REGT* (T65) zwischen den transmembranen Helices TM2 und TM3 der Untereinheit III könnte zu einer konformativen Änderung dieser Untereinheit führen, die zu einer

Strukturänderung des Protonenkanals führen und somit den Protonentransfer beeinflussen könnte.

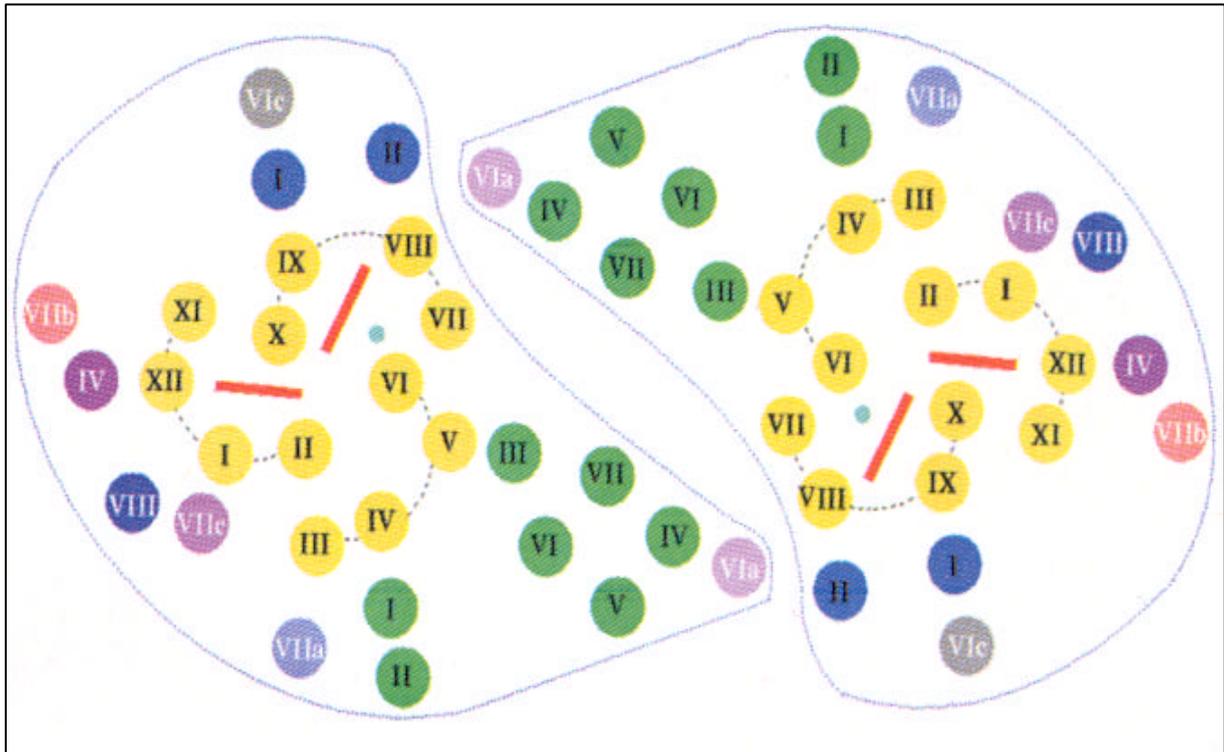


Abb. 28 Schematische Darstellung der transmembranen Helices der Cytochrom c Oxidase von der cytosolischen Seite aus betrachtet. Die dunkelroten Balken sowie der blaue Punkt stellen die Hämzentren und das Cu_B dar. Die schwarzen römischen Zahlen in den gelben, blauen und grünen Kreisen bezeichnen die Helixnummer der Untereinheiten I, II, und III. Weiße Zahlen in den anderen Kreisen zeigen die kernkodierte Untereinheiten. Die molekulare Oberfläche von jedem Monomer ist durch die gepunktete Linie dargestellt. Die gestrichelte Linie, die die gelben Kreise verbindet, zeigt die Helixanordnung der Untereinheit I beobachtet wurden [Tsuchihara et.al. 1996].

Bei *P. denitrificans* zeigt nur die transmembrane Helix 3 der Untereinheit III eine Wechselwirkung mit der Untereinheit I, in der Nähe des sog. D-Kanals für die gepumpten Protonen [Mather et.al. 1998]. Der D-Kanal beginnt mit der hochkonservierten Asp¹²⁴ lokalisiert am Eingang der Pore, die durch die Helices 2 und 6 gebildet ist, und führt in einen polaren, mit Wassermolekülen gefüllten Hohlraum. Der Kanal pumpt die Protonen von der cytoplasmatischen Seite bis zum dem hochkonservierten Glu²⁷⁸ (Helix 6) in dem Zentrum der Untereinheit I. Das hochkonservierte Glu²⁷⁸ bildet das Ende des Kanals. Jenseits von Glu²⁷⁸ ist der weitere Protonenweg unbekannt. Einerseits könnte er mittels zahlreicher Wassermoleküle mit dem Cu_B -Zentrum oder mit den Histidinliganden des Cu_B in Verbindung stehen [Iwata et.al. 1998], andererseits wird es angenommen, dass die Protonen von dem Glu²⁷⁸ der Untereinheit I auf Glu⁹⁷ (homolog zu Glu⁹⁰ aus

Rinderherz) der Untereinheit III übertragen werden. Von dort könnten sie den Kern des Bündels (TM4-TM7) erreichen und anschließend zu der periplasmatischen Oberfläche diffundieren. Es wird vermutet, dass das aus vier transmembranen Helices (TM4-TM7) der Untereinheit III bestehende Bündel, einen Ausgangskanal für die gepumpten Protonen bildet [Mather et.al. 1998].

Über diesem hypothetischen Ausgangskanal befindet sich im Oxidase-Komplex aus Rinderherz die cytoplasmatische, extramembrane Domäne der Untereinheit VIa [Tsukihara et.al. 1996], die den Ausgang des Protonenkanals entweder schließen oder öffnen könnte und somit den Protonenfluss beeinflussen könnte [Mather et.al. 1998][Hüttemann et.al. 1999]. Darüber hinaus steht die transmembrane Helix der Untereinheit VIa nur mit der transmembranen Helix 4 der Untereinheit III im Kontakt [Tsukihara et.al. 1996], die den oben beschriebenen hypothetischen Ausgangskanal (TM4-TM7) bildet (Abb.28). Die Untereinheit VIa kommt in zwei gewebespezifischen Isoformen vor (VIa L/H), die für die variable H^+/e^- -Stöchiometrie der Cytochrom c Oxidase verantwortlich gemacht werden [Frank et.al. 1996][Hüttemann et.al. 1999].

4.2.2 Die Phosphorylierung der Untereinheiten Va/b

Die Untereinheiten Va und Vb sind an der Matrixseite des Oxidase-Komplexes lokalisiert und weisen daher keine transmembranen Helices auf [Tsukihara et.al. 1996].

Die Autoradiogramme der *in vitro* Experimente ergaben eine schwache Phosphorylierung der Untereinheit Va/b durch die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A in Anwesenheit von $\gamma^{32}P$ -ATP (Abb.7 und 9). In den Abbildungen 12, 13 und 14 wurden die Autoradiogramme der *in vivo* Experimente zusammengestellt. Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b im Kontroll-Ansatz erfolgt offenbar auch durch cAMP-unabhängige Proteinkinasen und ist daher für den Grundumsatz des Oxidase-Komplexes von Bedeutung. Die Zunahme des Phosphorylierungsgrades nach Zugabe von Glukagon lässt vermuten, dass die Untereinheit Va/b durch verschiedene mitochondriale Proteinkinasen in Abhängigkeit vom Energiestatus der Zelle phosphoryliert und damit reguliert wird.

Da die Acrylamidgele keine eindeutige Auftrennung der Va/b Phosphoproteinbande in klare Va- und Vb-Banden zeigen, lässt sich nicht eindeutig bestimmen, welche der beiden Untereinheiten bevorzugt phosphoryliert wird. Da jedoch die Aminosäuresequenz der Untereinheit Va, nicht aber der Untereinheit Vb, zwei Sequenzmotive für

eine Phosphorylierung durch Proteinkinase A zeigt, kann angenommen werden, dass die Untereinheit Va nach Glukagonzugabe cAMP-abhängig phosphoryliert wird. Die Untereinheit Va wird ohne einen direkten Kontakt zur Untereinheit I durch die Matrixdomäne der Untereinheit IV und das extramembrane Segment der Untereinheit VIc an ihrem Platz festgehalten [Tsukihara et.al. 1996]. Die Matrixdomäne der Untereinheit IV enthält die Sequenz V5-V6-K7, die vermutlich den Zugang der Protonen in den Protonenkanal des Oxidase-Komplexes vermittelt [Capitanio et.al. 1994]. Die transmembrane Helix der Untereinheit IV steht darüber hinaus mit den transmembranen Helices 11 und 12 der Untereinheit I im Kontakt, die den zweiten Protonenkanal für die vektoriellen Protonen bilden (Abb.27, 28) [Tsukihara et.al. 1996]. Es liegt daher nahe, dass über die Phosphorylierung der Untereinheit Va, die offenbar mit konformativen Änderungen im Oxidase-Komplex einhergeht, der Zugang zu dem zweiten Protonenkanal und/oder der Protonentransfer selbst beeinflusst wird.

Neben dem Glukagon üben auch Thyroidhormone ihre Wirkung über die Untereinheit Va auf die Cytochrom c Oxidase aus. Das 3,5-Diiodothyronin bindet an die von der Matrixseite lokalisierte Untereinheit Va und führt zur Aufhebung der allosterischen Hemmung des Oxidase-Komplexes durch ATP [Arnold et.al. 1998]. Die cAMP-abhängige Phosphorylierung könnte eine ähnliche Wirkung auf den Enzymkomplex haben, wie das 3,5-Diiodothyronin.

Am isolierten Oxidasekomplex aus Rinderherz konnte eine cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheit Vb gezeigt werden [Bender et.al. 2000], die die allosterische Hemmung der Cytochrom c Oxidase mittels ATP einleitet [Bender et.al. 2000][Kadenbach et.al. 2000].

Die cAMP-abhängige Phosphorylierung der Untereinheiten Va bzw. Vb könnte somit eine antagonistische Wirkung auf den Enzymkomplex ausüben.

4.3 In vitro und in vivo Phosphorylierung der Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase durch Proteinkinase C

Der Phorbolester (TPA) bindet mit hoher Affinität an den C1-Abschnitt der regulatorischen Domäne der Proteinkinase C. Die aktivierende Funktion von TPA ist in der Förderung einer Umverteilung der Proteinkinase C vom Cytosol zur Membran und nachfolgenden Membranassoziation begründet [Kraus, 1997]. Die direkte Aktivierung der Proteinkinase C durch den Tumorpromotor TPA erklärt ihre Beteiligung an der Wachstumskontrolle. Darüberhinaus nimmt man an, dass sie auch an der Regulation

der Zellproliferation, sowie der Zelldifferenzierung beteiligt ist [Clemens et.al. 1992] [Nishizuka et.al. 1992].

Die äußere Mitochondrienmembran macht einen wesentlichen Anteil an den gesamten zellulären Membranen, die für die Proteinkinase C zugänglich werden könnten, aus. Es ist daher denkbar, dass die mitochondrialen Membranen die Proteinkinase C aktivieren sowie ihre Zielproteine enthalten könnten [Backer et.al. 1986]. Die *in vitro* Phosphorylierung mitochondrialer Proteine durch Proteinkinase C konnte an den Rattenlebermitochondrien [Becker et.al. 1986], sowie an den Mitochondrien der Nebennierenrinde [Vilgrain et.al. 1984] gezeigt werden. Darüber hinaus zeigte die innere Mitochondrienmembran der adrenokortikalen Mitochondrien Proteinkinase C-Aktivität [Vilgrain et.al. 1984].

Die *in vitro* Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase C in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP ergab eine deutliche Phosphorylierung der Untereinheiten II und IV, sowie der Untereinheit Va/b (Abb.8 und 11).

Die Autoradiogramme der *in vivo* Experimente (Abb.13 und 14) zeigten einen geringen Phosphorylierungsgrad der Untereinheiten II und/oder III, sowie der Untereinheit IV. Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b tritt sowohl im Kontroll- als auch im TPA-Ansatz auf.

4.3.1 Die Phosphorylierung der Untereinheit II und/oder III

Im Gegensatz zu der Untereinheit III weist die Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase insgesamt vier Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch Proteinkinase C auf. Dies erklärt die fehlende Phosphorylierung an der Untereinheit III. Die erste Phosphorylierungsstelle befindet sich zwischen den transmembranen Helices 1 und 2 (KLT* (T54)). Die zweite Phosphorylierungsstelle ist am Ausgang der zweiten transmembranen Helix aus der Membran lokalisiert (S*LR (S81)). Zwei weitere Sequenzmotive befinden sich in der extramembranen, in den Intermembranraum ragenden Domäne der Untereinheit II [T*VK (T96) und S*NR (S186)], wo ebenfalls die Bindungsstelle für das Cytochrom c, sowie das Cu_A -Zentrum lokalisiert ist. Die Phosphorylierung dieser beiden Sequenzmotive könnte einerseits die Bindung vom Cytochrom c an die Untereinheit II und somit den Elektronentransport vom Cytochrom c auf das Cu_A -Zentrum beeinflussen. Andererseits könnte sie den Elektronentransfer vom Cu_A -Zentrum der Untereinheit II entweder über das Häm_a bis

zum Häm α_3 -Cu_B-Zentrum oder direkt zum Häm α_3 -Cu_B-Zentrum der Untereinheit I, lenken [Capitanio et.al. 1996].

4.3.2 Die Phosphorylierung der Untereinheit IV

Die Aminosäuresequenz der Präsequenz, sowie der reifen Untereinheit IV weist zahlreiche Sequenzmotive für eine mögliche Phosphorylierung durch verschiedene Proteinkinasen auf [Steenart et.al. 1997] (Abb.29). Über eine Phosphorylierung der Untereinheit IV durch eine endogene, mitochondriale Proteinkinase wurde von Steenaart berichtet [Steenart et.al. 1997].

Drei Sequenzmotive für eine mögliche Phosphorylierung durch Proteinkinase C sind in der C-terminalen, extramembranen Domäne lokalisiert, die in den Intermembranraum ragt. Drei weitere Sequenzmotive befinden sich in der N-terminalen, matrixorientierten Domäne und zwar in den, während der Evolution konservierten Regionen (AS 26-32 und AS 54-84), die als gute Kandidaten für eine Phosphorylierung fungieren [Wu et.al. 1997]. Da aber bis heute keine Proteinkinase C-Aktivität in den Rattenlebermitochondrien nachgewiesen wurde, resultiert die schwache Beladung der Untereinheit IV-Proteinbande vermutlich aus der Phosphorylierung der C-terminal lokalisierten Sequenzmotive (Abb.29).

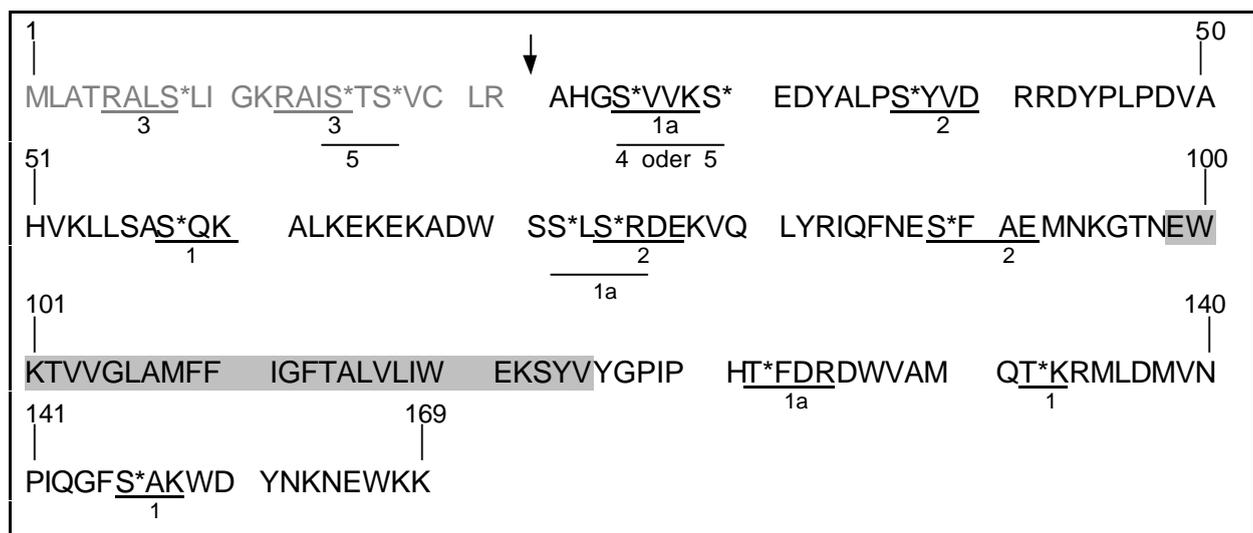


Abb. 29 Aminosäuresequenz der Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase aus Rattenleber, entnommen der SWISS-PROT Datenbank. Das grau markierte Abschnitt zeigt die mögliche α -helicale, transmembrane Region, die anhand der Kristallstruktur des Oxidasekomplexes aus Rinderherz ermittelt wurde [Tsukihara et.al. 1996]. Die möglichen Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen: **1** und **1a** Proteinkinase C; **2** Caseinkinase II; **3** Proteinkinase A; **4** Glycogensynthase Kinase-3; **5** Caseinkinase I [Steenart et.al. 1997]. Präsequenz AS 1-22.

Die sechs Sequenzmotive für eine potenzielle Phosphorylierung durch Proteinkinase C könnten darüber hinaus bei der Reifung, sowie dem Transport der Untereinheit IV in die Mitochondrien und vor allem bei der Assemblierung des Oxidase-Komplexes eine Rolle spielen. Studien an humanen Zellkulturen zeigten, dass die Zusammensetzung des aus dreizehn Untereinheiten bestehenden Enzymkomplexes mit der Vereinigung der Untereinheiten I und IV beginnt [Nijtmans et.al. 1998].

Die konservierte Region AS 26-32, die die Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch verschiedene Proteinkinasen aufweist, ist auch die Region, die für die Protonentranslokation von Bedeutung ist (V5-V6-K7) [Capitanio et.al. 1994]. Es wird daher angenommen, dass die Protonentranslokation durch Phosphorylierung reguliert werden könnte [Steenaaert et.al. 1997]. Diese Annahme wird durch den Kontakt der transmembranen Region der Untereinheit IV mit den Helices TM11 und TM12 der Untereinheit I, die den zweiten Protonenkanal bilden, unterstützt (siehe Abb.27) [Tsukihara et.al. 1996].

4.3.3 Die Phosphorylierung der Untereinheit Va/b

Die in den Abbildungen 13 und 14 zusammengestellten Autoradiographien der *in vivo* Experimente zeigen, dass die Proteinbande der Untereinheit Va/b nach Zugabe von TPA wesentlich intensiver mit ^{32}P -Phosphat beladen ist, als im Kontroll- bzw. Glukagon-Ansatz.

Die Untereinheit Vb weist, im Gegensatz zu der Untereinheit Va, drei Sequenzmotive für eine mögliche Phosphorylierung durch Proteinkinase C auf: KAAS* (S71), S*NK (S84), S*QR (S110). Ob die Phosphorylierung der matrixlokalisierten Untereinheit Vb durch die Proteinkinase C selbst oder durch TPA aktivierte, mitochondriale Proteinkinasen erfolgt, ist unklar.

4.4 Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierungsmuster der Cytochrom c Oxidase

Die *in vitro* Inkubation der Cytochrom c Oxidase mit den verschiedenen Proteinkinasen wurde in An- bzw. Abwesenheit von Detergenzien durchgeführt. Dies resultierte in einem unterschiedlichem Phosphorylierungsmuster (Abb.7,8,11).

Es zeigt, dass Detergenzien zusätzliche Domänen der zum Teil sehr hydrophoben Untereinheiten für die Phosphorylierung zugänglich machen und dadurch ein unter-

schiedliches Phosphorylierungsmuster entsteht. Ein Hinweis auf die mögliche physiologische Relevanz können die *in vivo* Experimente an intakten Hepatozyten geben. Hier findet man nach Stimulation der intakten Hepatozyten mit Glukagon eine deutliche ^{32}P -Makierung nur bei der Untereinheit III, sowie eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades bei der Untereinheit Va (Abb.12,13).

Andererseits führte die Stimulation der Proteinkinase C in den intakten Hepatozyten durch den Tumorpromotor TPA zur schwachen Phosphorylierung der Untereinheiten II und IV, sowie einer verstärkten Zunahme des Phosphorylierungsgrades bei der Untereinheit Vb (Abb.13,14).

So kann aus dem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Daten folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die Phosphorylierung der Untereinheiten Va (Abb.12, 13) und Vb (Abb.13,14) zeigt, dass Proteinkinasen mit dieser Spezifität in der Matrix und/oder innerer Mitochondrienmembran lokalisiert sein müssen, da diese beiden Untereinheiten an der Matrixseite lokalisiert sind (siehe 4.1.1 und 4.2).
- Hervorzuheben ist die Tatsache, dass die Untereinheit III *in vitro* nur durch die Zugabe von Detergenzien der Phosphorylierung zugänglich gemacht wird, aber dennoch *in vivo* durch Proteinkinase A phosphoryliert wird (Abb.7,12,13).
- Die *in vivo* Phosphorylierung der Untereinheit III durch die Proteinkinase A, sowie der Untereinheit IV durch die Proteinkinase C, unterstreicht die mögliche Rolle der Untereinheiten III und IV bei der Protonentranslokation (siehe 4.1.1 und 4.2.1).
- Die Untereinheit II besitzt einige Phosphorylierungstellen in der intermembranären Domäne, die der Proteinkinase C zugänglich sein könnten. Hier interagiert sie mit der Untereinheit I, möglicherweise bei Elektronentransfer vom Cu_A -Zentrum der Untereinheit II über das Häm a zum Häm a_3 - Cu_B -Zentrum der Untereinheit I [Capitanio et.al. 1996].

4.5 Einfluss des zyklischen AMP auf die mitochondriale Atmung

Die in den Abbildung 12 und 13 vorgestellte Autoradiographien der *in vivo* Experimente zeigen zum ersten Mal eine hormonabhängige Phosphorylierung der Untereinheiten III und Va der Cytochrom c Oxidase durch eine mitochondriale, cAMP-abhängige Proteinkinase. Darüber hinaus weisen die anderen Atmungsketten-

komplexe nach der Glukagonstimulation ebenfalls zahlreiche, wenn auch nicht so intensive Phosphoproteinbanden auf (Abb.14).

Es stellte sich somit die Frage, ob die cAMP-vermittelte Modifikation der Atmungskettenkomplexe einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung hat. Hierzu wurden die intakten Leber- und Herzmitochondrien mit steigenden Konzentrationen von cAMP behandelt und die auftretenden Änderungen im Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien mittels einer Clarke-Sauerstoffelektrode registriert (siehe 2.8).

Die Zunahme des P/O-Quotienten, die von einer stetigen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs begleitet wurde (Abb.22,23), deutet auf eine bessere, cAMP-vermittelte Kopplung der oxidativen Phosphorylierung hin. Diese hat ihre höchste Effizienz bei 20 μM und 50 μM cAMP bei den Lebermitochondrien (Abb.22), sowie 5 μM und 50 μM cAMP bei den Herzmitochondrien (Abb.23). Außer Glukagon üben auch andere Hormone und Neurotransmitter ihre Wirkung über das zyklische AMP aus. Die intrazelluläre cAMP Konzentration ist die Regelgröße, die die Aktivität der Proteinkinase A kontrolliert und bestimmt, wie viele katalytische Untereinheiten verfügbar sind. Es kann daher angenommen werden, dass bei einem variablen cAMP Spiegel ein unterschiedlicher Phosphorylierungsgrad und/oder -muster der Untereinheiten III und Va der Cytochrom c Oxidase, sowie der anderen protonenpumpenden Atmungskettenkomplexe (Komplex I und III) auftritt und somit unterschiedlich die oxidative Phosphorylierung beeinflusst. Die zwei Wirkungsmaxima bei der Abhängigkeit des P/O-Quotienten, sowie der Atmungsraten von der cAMP-Konzentrationen in isolierten Mitochondrien könnten ein Hinweis dafür sein (Abb.12,13). Als Folge dieser kovalenten Modifikationen, die oft von konformativen Änderungen begleitet werden, könnte der Protonentransfer durch die zwei postulierten Protonenkanäle für die vektoriellen Protonen (Kanal A und B, Abb.27) beeinflusst werden. So könnte die Untereinheit III den ersten Protonenkanal zum einen durch die Modulation (Erweiterung bzw. Verengung) des Ausgangskanals (TM4-TM7), den sie selbst bildet, beeinflussen oder zum anderen infolge der Änderung der Position dieses Kanals zu der cytosolischen, extramembranen Domäne der Untereinheit VIa, die über dem Kanal lokalisiert ist und somit den Austritt der Protonen blockieren könnte (siehe 4.1.1). Die Untereinheit Va beeinflusst wahrscheinlich den Zugang der Protonen zu dem zweiten Protonenkanal über die Interaktion mit der N-terminalen Domäne der Untereinheit IV (siehe 4.1.2).

Für die Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz wurde eine variable H^+/e^- -Stöchiometrie (zwischen 0 und 1) angegeben [Papa et.al. 1991][Frank et.al. 1996]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Kadenbach wurde gezeigt, dass die Bindung von ADP bzw. ATP an die N-terminale Domäne (Matrixseite) der Untereinheit VIa-H (Herz-Typ) die H^+/e^- -Stöchiometrie reguliert: Bei einem hohen ATP/ADP-Verhältniss findet ein Austausch vom gebundenen ADP durch ATP statt, was in einer Abnahme der H^+/e^- -Stöchiometrie von 1 auf 0,5 resultiert. Nimmt dagegen das ATP/ADP-Verhältniss ab, dann führt der Austausch des gebundenen ATP durch ADP zu einem Anstieg der H^+/e^- -Stöchiometrie von 0,5 auf 1. Bei dem Oxidase-Komplex aus Leber, der die VIa-L Isoform (Leber-Typ) enthält, fehlt die Regulation der Protonentranslokation durch die Adennukleotide und die H^+/e^- -Stöchiometrie beträgt 0,5 [Frank et.al. 1996][Hüttemann et.al. 1999].

Die cAMP-abhängige Zunahme des P/O-Quotienten (Abb.22,23) deutet auf eine Erweiterung der Regulation der Protonentranslokation im Oxidase-Komplex, durch Phosphorylierung der Untereinheiten III und Va, in beiden Organen, Herz und der Leber, hin. Die Abnahme des Protonen-“slip“ führt nicht nur zur Erhöhung des P/O-Quotienten, sondern auch zur Senkung der Atmungsrate, was auf eine effizientere Kopplung der oxidativen Phosphorylierung in Zuständen hindeuten könnte, in denen das cAMP erhöht ist, z.B. Hunger und Stress.

Die Behandlung der mit cyklichem AMP vorinkubierten Herzmitochondrien mit dem Proteinkinase A-Inhibitor H-89 (Tabelle 6) führte zur fast vollständigen Aufhebung der cAMP-vermittelten Effizienzsteigerung der oxidativen Phosphorylierung und bekräftigt somit die in dieser Dissertation postulierte kovalente Modifikation der Atmungskettenkomplexe durch eine endogene, mitochondriale Proteinkinase A.

Die Arbeitsgruppe um Papa [Papa et.al. 1996] zeigte bereits Mitte der neunziger Jahre eine cAMP-abhängige Phosphorylierung am Komplex I der Atmungskette (siehe 4.1). Mit weiteren Untersuchungen an Fibroblasten gelang eine *in vivo* Phosphorylierung der 18 kDa Untereinheit nach Stimulation mit Choleratoxin bzw. Dibutyryl-cAMP, die von einer zwei- bis dreifachen Zunahme der Atmung, sowie der NADH-Dehydrogenase-Aktivität begleitet wurde [Scacco et.al. 2000]. Diese Untersuchungen am Komplex I bekräftigen unsere Experimente, dass das cykliche AMP möglicherweise auch durch Phosphorylierung der Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe die mitochondriale Atmung reguliert. Sie führt aber im Gegensatz zu

unseren Untersuchungen zu einer Stimulation der Atmung, sowie der Aktivität von Komplex I und nicht zur einer Abnahme. Auch in Hepatozyten wird unter dem Einfluss von Glukagon eine Zunahme der Atmung beobachtet [Siess et.al. 1979]. Die in den eigenen Messungen registrierte Abnahme der Atmung durch Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase in isolierten Mitochondrien muss jedoch nicht notwendigerweise eine Verminderung der Atmung in Glukagonstimulierten (cAMP) Zellen zur Folge haben. Vielmehr kann durch die erhöhte Effizienz der oxidativen Phosphorylierung am Komplex IV ein noch größerer Anstieg des Sauerstoffverbrauchs verhindert werden. Ein solcher Regulationsmechanismus erscheint physiologisch sinnvoll. So ist im Hunger und unter Stress der zelluläre cAMP-Spiegel und als Folge davon der Gesamtstoffwechselumsatz erhöht. Wie in den Abbildungen 22 und 23 gezeigt, trifft dieser Effekt (Erhöhung des P/O, Abnahme der Atmung) sowohl bei den Mitochondrien der Leber als auch des Herzens auf. Während im Hungerzustand die veränderte Stoffwechselleistung der Leber im Vordergrund steht, erfordert die klassische Stresssituation eine erhöhte Herzleistung.

Eine direkte Beziehung zwischen der Phosphorylierung der Untereinheiten III und Va der Cytochrom c Oxidase und der Abnahme der Atmung durch cAMP in isolierten Mitochondrien steht noch aus. Dies scheiterte bisher am Prälabelling einer ausreichenden Menge an intakten Mitochondrien mit ^{32}P -Phosphat. Die Untersuchungen sind zur Zeit im Gange.

5.0 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Phosphorylierung der Atmungskettenkomplexe aus Rattenleber durch verschiedene Proteinkinasen (PKA; PKC) *in vitro* an isolierten Enzymkomplexen, sowie *in vivo* an intakten Hepatozyten, induziert durch Glukagon bzw. TPA, untersucht. Besonders wurde die cAMP-abhängigen Phosphorylierung der Cytochrom c Oxidase betrachtet.

Die *in vitro* Inkubation der Cytochrom c Oxidase wurde in An- bzw. Abwesenheit von Detergenzien durchgeführt, was in einem unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster resultierte.

Unter *in vivo* Bedingungen ergab die Stimulation der intakten Hepatozyten mit Glukagon eine deutliche ^{32}P -Beladung nur bei der Untereinheit III, sowie eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades bei der Untereinheit Va. Die Stimulation der Proteinkinase C in den intakten Hepatozyten durch den Tumorpromotor TPA führte zur schwachen Phosphorylierung der Untereinheiten II (und/oder III), sowie der Untereinheit IV und einer verstärkten Zunahme des Phosphorylierungsgrades bei der Untereinheit Vb. Über den möglichen Einfluss der Phosphorylierung der Untereinheiten III, IV und Va der Cytochrom c Oxidase auf die Protonentranslokation wurde ausführlich diskutiert (siehe 4.2 / 4.3).

Darüber hinaus wurde der Einfluss des zyklischen AMP auf die Atmung der intakten Leber- und Herzmitochondrien untersucht. Steigende Konzentrationen von cAMP führten bei Leber- und Herzmitochondrien, zu einer Zunahme des P/O-Quotienten, der von einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs begleitet wurde. Dies deutet auf eine bessere, cAMP-vermittelte Kopplung der oxidativen Phosphorylierung in Hunger- und Stress-Zuständen hin. Ein Maximum des Effektes wurde bei 20 μM und 50 μM in den Lebermitochondrien, sowie 5 μM und 50 μM in den Herzmitochondrien beobachtet.

Ein variabler cAMP-Spiegel führt offenbar zu einem unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster und/oder –grad bestimmter Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase. Es ist denkbar, dass die cAMP-vermittelte Interkonvertierung vor allem der Untereinheiten III und Va, zu einer Modulierung der Protonentranslokation durch die Cytochrom c Oxidase und der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung führt. Somit wird eine schnellere, dem Energiebedarf der Zelle angepasste Bereitstellung des Energieträgers ATP gewährleistet.

- Arnold, S.**, Lee, I., Kim, M., Song, E., Linder, D., Lottspeich, F., Kadenbach, B. (1997):
The subunit structure of cytochrome-c oxidase from tuna heart und liver.
Eur. J. Biochem. 248, 99-103.
- Arnold, S.**, Goglia, 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):
The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrom c oxidase activity
allosterically.
FEBS Letters, 443, 105-108.
- Asaoka, Y.**, Nokamura, S., Yoshida, K., Nishizuka, Y. (1992):
Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation.
TIBS, 17, 414-417.
- Azzi, A.**, Boscoboinil, D., Hensey, C. (1992):
The protein kinase C family.
Eur. j. Biochem. 208, 547-557.
- Backer, J. M.**, Arcoleo, J. P., Weinstein, I. B., (1986):
Protein phosphorylation in isolated mitochondria and the effects of protein kinase C.
FEBS Letters, 200, 161-164.
- Bender, E.**, Kadenbach, B. (2000):
The allosteric ATP-inhibition of cytochrom c Oxidase activity is reversibly switched on
by cAMP-dependent phosphorylation.
FEBS Letters, 466, 130-134.
- Bergmeyer, H.U.** (1974):
Methoden der enzymatischen Analyse; 3 Aufl., Verlag Chemie, Weinheim.
- Bisson, R.**, Schiavo, G. (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.**, vettore, S., Aratori, E., Sandona, D. (1997):
Subunit change in cytochrome c oxidase: identification of the oxygen switch in
Dictyostelium.
The EMBO Journal, Vol. 16, No. 4, 739-749.
- Bonne, G.**, Seibel, P., Possekkel, S., Marsac, C., Kadenbach, B. (1993):
Expression of human cytochrome c oxidase subunits during fetal development.
Eur. J. Biochem., 217, 1099-1107.

Brandt, U., Schägger, H., Von Jagow, G. (1989):
Purification of Cytochrome-c oxidase retaining its pulsed form.
Eur. J. Biochem., 182, 705-711.

Bratton, M.R., Pressler, M.A., Hosler, J.P. (1999):
Suicide Inactivation of Cytochrome c Oxidase: catalytic Turnover in the Absence of
Subunit III Alters the Active Site.
Biochemistry, 38, 16236-16245.

Burgess, J., Yamada, W. E. (1986):
cAMP-dependent protein kinase isozymes with preference for histone H2B as
substrate in mitochondria of bovine heart.
Biochem. Cell Biol., 65, 137143.

Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Gennis, R.B. (1994):
The Cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps.
TIBS, 19, 325-330.

Capaldi, R.O., (1990):
Structure and function of cytochrome c oxidase.
Ann. Rev. Biochem. 59, 569-596.

Capitanio, N., Peccarisi, R., Capitanio, G., Villani, G., De Nitto, E., Scacco, S., Papa, S.
(1994):
Role of Nuclear-Encoded Subunits of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase in Proton
Pumping Revealed by Limited Enzymatic Proteolysis.
Biochemistry, 33, 12521-12526.

Capitanio, N., Capitanio, G., Demarinis, 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.

Casey, R.P., Thelen, M., Azzi, A. (1979):
Dicyclohexylcarbodiimide inhibits proton translocation by Cytochrome c Oxidase.
Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 87, No. 4, 1044-1051.

Casey, R.P., Thelen, M., Azzi, A. (1980):
Dicyclohexylcarbodiimide Binds Specifically and Covalently to Cytochrome c Oxidase
While Inhibiting Its H^+ -translocating Activity.
J. Biol. Chem., Vol. 255, No.9, Issue 10, 3994-4000.

Castresana, J., Lübben, M., Saraste, M., Higgins, D.G. (1994):
Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen.
The EMBO Journal, Vol. 13, No. 11, 2516-2525.

Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K.,
Toshioka, T., Hidaki, H. (1990):
Inhibition of Forskolin-induced Neurite Outgrowth and Protein Phosphorylation by a
Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase, n-[2-
(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D Pheo-
chromocytoma Cells.

J. Biol. Chem., Vol.265, Issue of March 25, pp 5267-5272.

Clarke, L.C.J., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z. (1953):
Continuous recording of blood oxygen tension by polarography.
J. Appl. Physiol., &, 189-193

Clemens, M.J. Trayner, I., Menaya, J. (1992):
The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation.
J. Cell Sci., 103, 881-887.

Cohen, F. (1992):
Signalintegration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates.
Trends Biochem. Sci., 17, 408-413.

Damuni, Z., Reed, L. (1988):
Purification and Properties of a Protamine Kinase and a Type II Casein Kinase from Bovine Kidney Mitochondria.
Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 262, No. 2, 574-584.

Dekker, L.V., Parker, P.J. (1994):
Protein kinase C - a question of specificity.
TIBS, 19, 73-77.

Dimino, M.J., Bieszczad, R.R., Rowe, J.M. (1981):
Cyclic AMP-dependent Protein Kinase in Mitochondria and Cytosol from Different-sized Follicles and Corpora Lutea of porcine Ovaries.
J. Biol. Chem., Vol. 256, No. 21, 10876-10882.

Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987):
Protein serine/threonine kinases.
Ann. Rev. biochem., 56, 567-613.

Ewart, D.G., Zhang, Y.-Z., Capaldi, R.A. (1991):
Switching of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa isoforms in skeletal muscle during development.
FEBS Letter, 292, 779-84.

Finel, M., Wikström, M. (1988):
Monomerization of cytochrome c oxidase may be essential for the removal of subunit III.
Eur. J. Biochem., 176, 125-129.

Francis, S.H., Corbin, J.D. (1994):
Structure und function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
Annu. Rev. Physiol., 56, 237-72.

Frank, V., Kadenbach, B. (1996):
Regulation of the H^+/e^- stichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios.
FEBS Letters, 382, 121-124.

Freund, R., Kadenbach, B. (1994):

Identification of tissue-specific isoforms for subunits Vb and VIIa of cytochrome c oxidase isolated from rainbow trout.

Eur. J. Biochem., 221, 1111-1116.

Garcia-Horsman, J.A., barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R.B. (1994):

The Superfamily of Heme-Copper Respiratory Oxidases.

Journal of Bacteriology, Vol. 176, No. 18, 5587-5600.

Glass, D.B., Krebs, E.G. (1980):

Protein phosphorylation catalyzed by cyclic AMP-dependent and cyclic GMP-dependent protein kinases.

Ann. Rev. pharmacol. Toxicol., 20, 363-88.

Gohlke, U., Warne, A., Saraste, M. (1997):

Projection structure of the cytochrome bo ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* at 6 Å resolution.

The EMBO Journal, Vol. 16, No. 6, 1181-1188.

Grossman, L.I., Lomax, M. (1997):

Nuclear genes of cytochrome c oxidase.

Biochimica et Biophysica Acta, 1352, 174-192.

Görg, A., Postel, W., Günther, S. (1988):

The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.

Elektrophoresis, 9, 531-546.

Görg, A. (1991):

Two-dimensional electrophoresis.

Nature, 349, 545-546.

Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T. (1988):

The Protein Kinase Family: conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains.

Science, 241, 42-52.

Henriksson, T., Jergil, B., (1979):

Protein kinase activity and endogenous phosphorylation in subfractions of rat liver mitochondria.

Biochimica et Biophysica Acta, 588, 380-391.

Houwelig, M., Vaartjes, W.J., van Golde, L.M.G. (1989):

Isozymic forms of protein kinase C in regenerating rat liver.

FEBS Letter, 247, 487-491.

Huang, L.J., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J., Taylor, S.S. (1997):

Identification of a Novel Protein Kinase A Anchoring Protein That Binds Both Type I and Type II Regulatory Subunits.

J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 12, Issue 21, 8057-8064.

Hug, H., Sarre, T. (1993):

Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?

Biochem. J. 291, 329-343.

Hunter, T. (1991):
Protein Kinase Classification.
Methods in Enzym., 200, 3-37.

Hüttemann, F., 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.

Iwata, S., Ostermeier, Ch., Ludwig, B., Michel, H. (1995):
Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*.
Nature, Vol. 376, 660-669.

Iwata, S. (1998):
Structure and Function of Bacterial Cytochrome c Oxidase.
J. Biochem., 123, 369-375.

Jelinek, L.J., Lok, S., Rosenberg, G.B., Smith, R.A., Grant, F.J., Biggs, S., Bensch, P.A., Kuijper, J.L., Sheppard, P.O., Sprecher, S.A., O'Hara, P.J., Foster, D., Walker, K.M., Chen, L.H.J., McKernan, P.A., Kinsvogel, W. (1993):
Expression Cloning and Signaling Properties of the Rat Glucagon Receptor.
Science, Vol. 259, 1614-1616.

Kadenbach, B., Merle, P. (1981):
On the function of multiple subunits of cytochrome c oxidase from higher eukaryotes.
FEBS Letter, 135, 1-11.

Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R., Merle, P., (1983):
Separation of Mammalian Cytochrome c Oxidase into 13 Polypeptides by a Sodium Dodecyl Sulfate-Gel Electrophoretic Procedure.
Analytical Biochemistry, 129, 517-521.

Kadenbach, B., (1983):
Struktur und Funktion des Atmungsferments Cytochrom-c-Oxidase.
Angew. Chem., 95, 273-281.

Kadenbach, B., Barth, J., Akgün, R., Freund, R., Linder, D., Possekkel, S. (1995):
Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease.
Biochimica et Biophysica Acta, 1271, 103-109.

Kadenbach, B., Bender, E., Reith, A., Becker, A., Hammerschmidt, S., Lee, I., Arnold, S., Hüttemann, M. (1999):
Possible Influence of Metabolic Activity on Aging.
Journal of Anti-Aging Medicine, Volume 2, Number 3, 255-264.

Kadenbach, B., Hüttemann, M., Arnold, S., Lee, I., Bender, E. (2000):
Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase.
Free Radical Biology and Medicine, Vol. 29, Issues 3-4, 211-221.

Kennelly, P., Krebs, E.G. (1991):
Consensus Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases.
J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 24, 15555-15558

Klingenberg, M. und Slenczka, W. (1959):
Purinnukleotide in Lebermitochondrien.
Biochem. Z., 331, 486-517.

Krauss, G. (1997):
Biochemie der Regulation und Signaltransduktion.
WILEY-VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim.

Krebs, E.G., Fischer, E.H. (1956):
The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle.
Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 20, 150-157.

Krebs, E.G., Beavo, J. (1979):
Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes.
Ann. Rev. Biochem., 48, 923-959.

Krebs, E.G. (1983):
Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 302, 3-11.

Krebs, H.A., Henseleit, K. (1932):
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie, 210, 33-36.

Kyhse-Andersen, J. (1984):
Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J. Biochem. Biophys. Methods, 10, 203-209.

Ligtowlers, R.N., Ewart, G., Aggeler, R., Zhang, Y.-Z., Calavetta, L., Capaldi, R.A. (1990):
Isolation and characterization of cDNAs encoding two isoforms of subunit C_x of bovine cytochrome c oxidase.
J. Biol. Chem., 265, 2677-2681.

Löffler, G., Petrides, P.E. (1998):
Biochemie und Pathobiochemie.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 6. Auflage.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C. und Randal (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Mather, M.W., Rottenberg, H. (1998):
Intrinsic uncoupling of cytochrome c oxidase may cause the maternally inherited mitochondrial diseases MELAS and LHON.
FEBS Letters, 433, 93-97.

McIntohs, L., Eichler, T., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R., Wang, Y. (1998):
Biochemical and genetic control exerted by plant mitochondria.
Biochemica et Biophysica Acta, 1365, 278-284.

Merle, P., Kadenbach, B. (1982):
Kinetic and Structural Differences between Cytochrome c Oxidases from Beef Liver
and Heart.
Eur. J. Biochem., 125, 239-244.

Michel, H. (1999):
Cytochrom c Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanismus of Proton Pumping-A
Discussion.
Biochemistry, 38, 15129-15140.

Müller, G., Bandlow, W. (1987):
cAMP-dependet protein kinase aktivty in yeast mitochondria.
Z. Naturforsch. 42, 1291-1302.

Müller, G., Bandlow, W., (1987):
Protein phosphorylation in yeast mitochondria: cAMP-dependence, submitochondrial
localisation and substrates of mitochondrial protein kinases.
Yeast, 3, 161-174.

Müller, G., Bandlow, W., (1989):
An amphitropic cAMP-binding protein in yeast mitochondria. Synergistic control of the
intramitochondrial location by calcium and phospholipid.
Biochemistry, 28, 9957-9967.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988):
Electrophoresis, 9, 255-262.

Nijtmans, L.G.J., Taanman, J-W., Muijsers, A.O., Speijer, D., van den Bogert, C. (1998):
Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells.
Eur. J. Biochem., 254, 389-394.

Nishizuka, Y. (1992):
Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase
C.
Science, 258, 607-614.

Papa, S., Capitanio, G., De Nitto, E., Minuto, M (1991):
The Cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻-stoichiometry.
FEBS Letters, 288, 183-186.

Papa, S., Sardanelli, A.M., Cocco, T., Speranza, F., Scacco, S.C., Technikova-Dobrowa, Z.
(1996):
The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is
phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase.
FEBS Letters, 379, 299-301.

Papa, S., Sardanelli, A.M., Scacco, S., Technikova-Dobrova, Z. (1999):

cAMP-dependent protein kinase and phosphoproteins in mammalian mitochondria. An extension of the cAMP-mediated intracellular signal transduction.
FEBS Letter, 444, 245-249.

Parsons, D.F., Williams, G.R., Chance, B. (1966):
Characteristic of isolated and purified preparation of the outer and inner membranes of mitochondria.
Annals N. Y. Academy of Sc., 137, 643-666.

Pearson, R.B., Kemp, B.E. (1991):
Protein Kinase Phosphorylation Site Sequences and Consensus Specificity Motifs: Tabulations.
Methods in Enzymol., 200, 62-81.

Pinna, L.A. (1991):
„Independent“ protein kinases: a challenge to canons.
NATO ASI Series, Vol. H 56; Cellular Regulation by Protein Phosphorylation;
Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Prochaska, L.J., Bisson, R., Capaldi, R.A., Steffens, G.C.M., Buse, G. (1981):
Inhibition of Cytochrome c Oxidase function by Dicyclohexylcarbodiimide.
Biochimica et Biophysica Acta, 637, 360-373.

Riezmann, H., Hay, R., Gasser, S. Daum, G., Schneider, G., Witte, Ch. und Schatz, G. (1983):
The outer membran of yeast mitochondria: Isolation of outside out sealed vesicles.
The EMBO Journal, Vol. 2, Nr. 7, 1105-1111.

Rizzuto, R., Nakase, H., Darras, B., Francke, U., Fabrizi, G.M., Mengel, T., Walsh, F., Kadenbach, B., DiMauro, S., Schon, E. (1989).
A Gene Specifying Subunit VIII of Human Cytochrome c Oxidase Is Localized to Chromosome 11 and Is Expressed in Both Muscle and Non-muscle Tissues.
J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 18, pp. 10595-10600.

Röderl, G., Müller, G., Bandlow, W. (1985):
Cyclic AMP Receptor Protein from Yeast Mitochondria: Submitochondrial Localization and Preliminary Characterisation.
Journal of Bacteriology, Vol. 161, No. 1, 7-12.

Rubin, Ch.S. (1994):
Akinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP.
Biochimica et Biophysica Acta, 1224, 467-479.

Sardanelli, M. A. Technikova-Dobrova, Z., Speranza, F., Mazzocca, A., Scacco, S., Papa, S. (1996):
Topology of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase and its substrates.
FEBS Letter 396, 276-278.

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.

Analytical Biochemistry, 166, 368-379.

Schägger, H., von Jagow, G., (1991):

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

Analytical Biochemistry, 199, 223-231.

Schägger, H., Cramer, W., A., von Jagow, G. (1994)

Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Elektrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Elektrophoresis.

Analytical Biochemistry, 217, 220-230.

Schägger, H., Noack, H., Halangk, W., Brandt, U., von Jagow, G. (1995):

Cytochrome-c oxidase in developing rat heart: Enzymatic properties and amino-terminal sequences suggest identity of the fetal and the adult liver isoform.

Eur. J. Biochem., 230, 235-241.

Scheja, K., Kadenbach, B. (1992):

Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit VIII of cytochrome c oxidase from rat heart.

Biochimica et Biophysica Acta, 1132, 91-93.

Schlerf, A., Droste, M., Winter, M., Kadenbach, B. (1988):

Charakterisation of two different genes (cDNA) of subunit VIa from heart and liver of the rat.

EMBO J., 7, 2387-2391.

Schneyder, B., Mell, O., Anthony, G., Kadenbach, B. (1991):

Cross reactivity of monoclonal antibodies and cDNA hybridization suggest evolutionary relationships between cytochrome c oxidase subunits VIa and VIc and between VIIa and VIIb.

Eur. J. Biochem., 198, 85-92.

Schwoch, G., Trinczek, B., Bode, Ch. (1990):

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

Biochem. J., 270, 181-188.

Seelan, R.S., Grossman, L.I. (1991):

Cytochrom c oxidase subunit VIIa isoforms. Charakterization and expression of bovine cDNAs.

J.Biol.Chem., 266, 19752-19757.

Siess, E.A., Wieland, O.H. (1979):

Isolated hepatocytes as a model for the study of stable glucagon effects on mitochondrial respiratory functions.

FEBS Letters, Vol. 101, No. 2, 277-281.

Smith, E.O., Lomax, M. (1993):

Structural organization of the bovine gene for the heart/muscle isoform of cytochrome c oxidase VIa.

Biochimica et Biophysica Acta, 1171, 63-71.

Speijer, D., Breek, C.K.D., Muinsers, A.O., Groeneveld, P.X., Dekker, H., de Haan, A., Benne, R. (1996):

The sequence of a small subunit of cytochrome c oxidase from *Critidia fasciculata* which is homologous to mammalian subunit IV:

FEBS Letters, 381, 123-126.

Steenart, N. A. E., Shore, G. C. (1997):

Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an endogenous kinase.

FEBS Letter, 417, 294-298.

Steverding, D., Kadenbach, B. (1991):

Influence of N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline Modification on Proton Translocation and Membrane Potential of Reconstituted Cytochrome-c Oxidase Support „Proton Slippage“.

J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 13, Issue 5, 8097-8101.

Taanman, J.-W., Herberg, N.H., De Vries, H., Bolhuis, P.A., Van den Boggert, C. (1992): Steady-state transcript levels of cytochrome c oxidase genes during human myogenesis indicate subunit switching of subunit VIa and co-expression of subunit VIIa isoforms.

Biochimica et Biophysica Acta, 1139, 155-162.

Taanman, J.-W., Turina, p., Capaldi, R.A. (1994):

Regulation of Cytochrome c Oxidase by Interaction of ATP at Two binding Sites, One of subunit VIa.

Biochemistry, 33, 11833-11841.

Taylor, S.S., Yonemoto, W.R.G., Dostmann, D.L., Knighton, J.M., Sowadski, F.W., Herberg, J.A., Buechler, J.A., Ji-Buechler, Y. (1991):

Protein kinase structure & funktion: cAMP-dependent protein kinase.

In NATO ASI Series, Vol. H 56; Cellular Regulation by Protein Phosphorylation, Edited by L.M.G. Heilmeyer, Jr., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1991.

Taylor, S.S., Radzio-Andzelm, E. (1994):

Cyclic AMP-dependent protein kinase.

In Oxford University Press: Protein Kinases, Edited by James Robert Woodgett.

Trumpower, B.L., Gennis, R.B. (1994):

Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translokation.

Ann. Rev. Biochem., 63, 675-716.

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, Vol. 272, 1136-1144.

Vallejo, C.G., Seguido, A.M., Fernandez-Renart, M. (1997):

Proteinkinases in mitochondria of the invertebrate *Artemia franciscana*.
Arch. Biochem. Biophys., 339, 9-16.

Vilgrain, I., Defaye, G., Chambaz, E.M. (1984):
Adrenocortical Cytochrome P-450 responsible for cholesterol side chain cleavage (P-450_{SCC}) is phosphorylated by the calcium-activated, phospholipid-sensitive protein kinase (Protein kinase C).
Biochemical and biophysical research communication, Vol. 125, No. 2, 554-561.

Walsh, D.A., Perkins, J.P., Krebs, E.G. (1968):
An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle.
J. Biol. Chem., Vol. 243, No. 13, 3763-3774.

Weishaupt, A., Kadenbach, B. (1992):
Selective Removal of Subunit VIb Increases the Activity of Cytochrome c Oxidase.
Biochemistry, 31, 11477-11481.

Wu, W., Goodman, M., Lomax, I.M., Grossman, L.I. (1997):
Molecular Evolution of Cytochrome c Oxidase Subunit IV: Evidence for Positive Selection in Simian Primates.
J. Mol. Evol., 44: 477-491.

Zahlten, R.N., Hochberg, A., Stratman, F.W., Lardy, H. (1972):
Glucagon-Stimulated Phosphorylation of Mitochondrial and Lysosomal Membranes of Rat Liver In Vivo.
Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 69, No. 4, 800-804.

Danksagungen:

Bei meiner Doktormutter Frau Prof. S. Soboll möchte ich mich besonders herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie ihr persönliches Engagement, mit der Sie die Anfertigung dieser Arbeit unterstützte, bedanken.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Strotmann, Institut für Biochemie der Pflanzen, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. H. Sies danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. H. Meyer, Institut für Physiologische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum, möchte ich für die Durchführung der Sequenz- und der massenspektrometrischen Analysen, sowie die nette Hilfsbereitschaft, danken.

Für die Anfertigung der zahlreichen Photographien bin ich Frau I. Wegling zu Dank verpflichtet.

Bei Frau Sonja Gründel möchte ich mich ganz herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft, die hervorragende Hilfe bei der Durchführung der Experimente, sowie die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institut für Physiologische Chemie I für die freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre liebevolle Unterstützung danken.

