

Institut für Biotechnologie

**Mechanistische und strukturelle Aspekte
der Transportkatalyse am Beispiel des
mitochondrialen Aspartat/Glutamat-Carriers –
seine funktionellen Eigenschaften
im Vergleich zu ADP/ATP-, Oxoglutarat-
und Dicarboxylat-Carrier**

Thomas Dierks

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

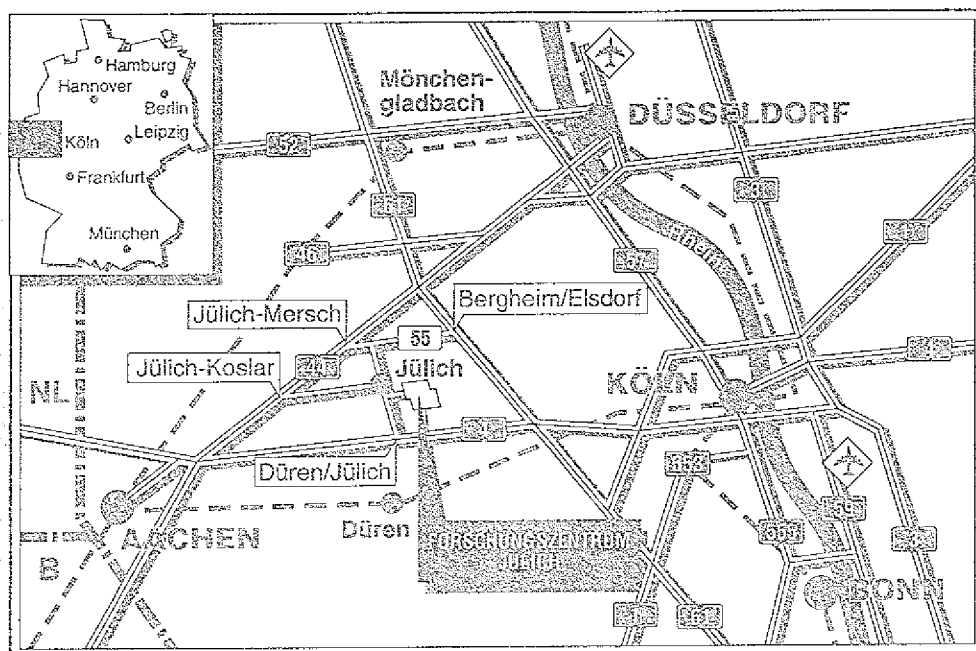
1900

1900

1900

1900

1900



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2447

ISSN 0366-0885

Institut für Biotechnologie Jüli-2447

D-61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

**Mechanistische und strukturelle Aspekte
der Transportkatalyse am Beispiel des
mitochondrialen Aspartat/Glutamat-Carriers –
seine funktionellen Eigenschaften
im Vergleich zu ADP/ATP-, Oxoglutarat-
und Dicarboxylat-Carrier**

Thomas Dierks

Wiederum ist die Arbeit der
der Arbeit der Arbeit der Arbeit
der Arbeit der Arbeit der Arbeit
der Arbeit der Arbeit der Arbeit
der Arbeit der Arbeit der Arbeit
der Arbeit der Arbeit der Arbeit

Wiederum ist die Arbeit der

INHALTSVERZEICHNIS

1. Allgemeine Einführung	1
1.1 Die innere Mitochondrienmembran als Metabolitbarriere	1
1.2 Der Asp/Glu-Carrier	2
1.3 Die strukturelle Familie der mitochondrialen Carrier	4
1.4 Transportkatalyse	5
1.5 Allgemeine Zielsetzung	7
2. Material und allgemeine Methoden	8
2.1 Material	8
2.2 Präparative Methoden	9
2.3 Analytische Methoden	10
3. Right-side-out-Orientierung des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers	13
3.1 Einleitung	13
3.2 Methoden	14
3.3 Ergebnisse	16
3.3.1 Asymmetrische Insertion des Carrierproteins in die Liposomenmembran	16
3.3.2 Right-side-out-Orientierung des rekonstituierten Carrierproteins	18
3.4 Diskussion	24
4. Antiportfunktion des Asp/Glu-Carriers:	
Aufklärung des Reaktionsmechanismus in Proteoliposomen und Mitochondrien	27
4.1 Einleitung	27
4.2 Methoden	28
4.3 Ergebnisse	30
4.3.1 Kinetische Bisubstrat-Analysen	30
4.3.1.1 Untersuchungen im rekonstituierten System	30
4.3.1.2 Untersuchungen in intakten Rattenherz-Mitochondrien	32
4.3.2 Einfluß des zweiten Substrats bei Anwesenheit im selben Kompartiment	33
4.3.3 Einfluß des Membranpotentials	33
4.4 Diskussion	35
5. Antiportfunktion des Oxoglutarat-Carriers:	
Aufklärung des Reaktionsmechanismus des asymmetrisch rekonstituierten Proteins	42
5.1 Einleitung	42
5.2 Methoden	43
5.3 Ergebnisse	44
5.3.1 Zuverlässigkeit der Rücktausch-Methode	44
5.3.2 Bestimmung der internen Transport-Affinitäten	45
5.3.3 Symmetrie der Austauschreaktion	45
5.3.4 Orientierung des rekonstituierten Carrierproteins	47
5.3.5 Kinetischer Mechanismus des Antiports	48
5.4 Diskussion	51
6. Antiportfunktion des Dicarboxylat-Carriers: Reaktionsmechanismus mit zwei	
separaten Bindungsstellen an der Außenseite des rekonstituierten Proteins	54
6.1 Einleitung	54
6.2 Methoden	55
6.3 Ergebnisse	57
6.3.1 Inhibition durch Substratanaloga	57
6.3.2 Wechselseitige Inhibition der Substrate Malat und Phosphat	57
6.3.3 Inhibition durch Schwefel-enhaltende Anionen	59
6.3.4 Analyse des Mechanismus der Transportinhibition	59
6.4 Diskussion	61

7. Effluxfunktion des rekonstituierten Asp/Glu- und ADP/ATP-Carriers: Modifizierung durch SH-Reagenzien führt zum Umschalten von obligatem Gegentauch zu unidirektionalem Transport	63
7.1 Einleitung	63
7.2 Methoden	64
7.3 Ergebnisse	67
7.3.1 Grundlegende Eigenschaften der Efflux-Induktion	67
7.3.2 Abhängigkeit von aktivem Protein	67
7.3.3 Ausschluß einer Beteiligung von Porin	69
7.3.4 Identifizierung des Efflux-vermittelnden Proteins	71
7.3.4.1 Kompetitionsstudien	72
7.3.4.2 Inhibitorstudien	73
7.3.4.3 Sensitivität gegenüber Proteinasen	73
7.3.4.4 Untersuchungen mit gereinigten Carrierproteinen	75
7.4 Diskussion	77
8. Antiport-Efflux-Interkonversion des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers: Porenartige Eigenschaften lassen einen präformierten Kanal als strukturelle Voraussetzung carrier-vermittelten Transports erkennen	81
8.1 Einleitung	81
8.2 Methoden	81
8.3 Ergebnisse	82
8.3.1 Substrat-Spezifität und -Affinität	82
8.3.2 Reversibilität der Effluxinduktion	84
8.3.3 Aktivierungsenergie des Effluxes	86
8.3.4 Einfluß des externen Substrats auf Effluxinduktion und Effluxaktivität	86
8.3.5 Einflüsse der Membran auf Efflux und Antiport	88
8.4 Diskussion	90
9. Strukturelle Aspekte der Transportfunktionen des Asp/Glu-Carriers: Modifizierung und Markierung funktioneller Gruppen der aktiven Bindungsstelle	95
9.1 Einleitung	95
9.2 Methoden	95
9.3 Ergebnisse und Diskussion	98
9.3.1 Aminosäure-Zusammensetzung des Asp/Glu-Carriers	98
9.3.1.1 Identifizierung des Asp/Glu-Carrierproteins	98
9.3.1.2 Aminosäure-Analyse	98
9.3.2 Bindungsstellen- und Translokationsinhibitoren des Asp/Glu-Carriers: Klassifizierung nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten	99
9.3.3 Funktionelle Gruppen an der exofazialen Bindungsstelle	101
9.3.3.1 Modifizierung von Lysin	102
9.3.3.1.1 Modifizierung mit Pyridoxalphosphat	102
9.3.3.1.2 Carbodiimid-katalysierte Acylierung	104
9.3.3.1.3 Modifizierung mit Isothiocyanostilbendisulfonaten	112
9.3.3.2 Modifizierung von Cystein	115
9.3.3.2.1 Modifizierung mit Hg-Verbindungen und DTNB	115
9.3.3.2.2 Modifizierung mit 4-Chlor-7-nitro-benzofurazan (NBD-Cl)	117
9.3.3.3 Modifizierung mit Histidin-Reagenzien	119
9.3.3.3.1 Modifizierung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)	119
9.3.3.3.2 Modifizierung mit 4-Bromphenacylbromid (BPAB)	123
10. Allgemeine Diskussion	124
10.1 Asymmetrische Rekonstitution von Membranproteinen	124
10.2 Die kinetische Familie der mitochondrialen Antiporter	125
10.3 Transportkatalyse nach dem erweiterten 'gated-pore'-Modell: funktionelle, energetische und strukturelle Aspekte	128
10.4 Einblicke in die Topographie der exofazial zugänglichen Bindungsstelle	130
11. Zusammenfassung	132
12. Literaturverzeichnis	134
13. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	140

1. Allgemeine Einführung

1.1 Die innere Mitochondrienmembran als Metabolitbarriere

Mitochondrien sind die Organellen eukaryontischer Zellen, die - neben anderen wichtigen Aufgaben - vor allem für die Bereitstellung chemischer Energie in Form von ATP verantwortlich sind. Der Matrixraum der Mitochondrien, in dem die ATP-Synthese stattfindet, ist durch zwei Membranen vom Cytosol getrennt. Mitochondrien benötigen daher Transportsysteme zum Austausch von Metaboliten und energiereichen Verbindungen, um die Kompartimentierung der zur ATP-Synthese führenden oxidativen Phosphorylierung sowie anderer Stoffwechselwege zu überbrücken.

Während die äußere Membran für Metabolite aufgrund des Poren-bildenden Porins durchlässig ist, wird der intensive Stofftransport über die innere Membran durch ein ganzes Ensemble spezifischer Carrierproteine vermittelt (eine Übersicht geben LaNoue & Schoolwerth 1984, Meijer & Van Dam 1981, Krämer & Palmieri 1989). Entsprechend der Notwendigkeit zum Metabolit-Austausch zwischen Matrix und Cytosol handelt es sich bei den meisten Carriern um Antiporter, wie untenstehende Tabelle zeigt.

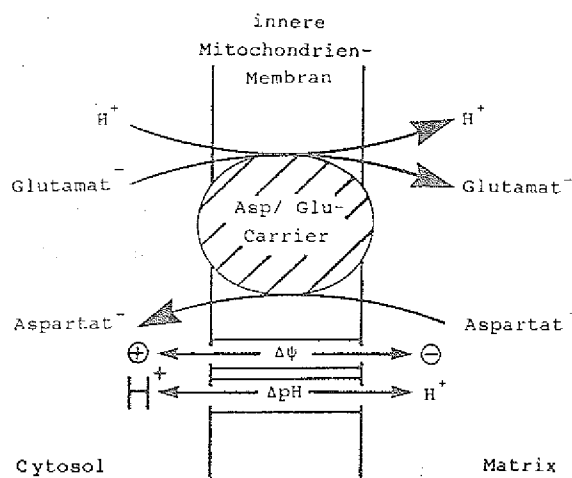
Die Einteilung der aufgelisteten Carrier wurde auch nach deren elektrischen Eigenschaften vorgenommen. Da beim ADP/ATP- und beim Asp/Glu-Antiport eine Nettoladung über die Membran transloziert wird, spricht man von elektrogenen Carriern. Dadurch bedingt besteht eine Kopplung mit der elektrischen Potentialdifferenz $\Delta\Psi$, dem quantitativ wichtigeren Bestandteil des durch die Aktivität der Atmungskette an der inneren Membran aufgebauten elektrochemischen Protonenpotentials (Δp). Die genannten elektrogenen Carrier können daher ihre unterschiedlich geladenen Substrate - relevant sind die Carrier-Substrat-Komplexe - auch gegen einen Konzentrationsgradienten befördern, solange das (negative) elektrische Potential den Konzentrationsterm in Gl. 1.1 kompensiert. Als einziges mitochondriales Transportsystem kann der Asp/Glu-Carrier

Carrier	Transport Cytosol Matrix	elektrische Eigenschaften
ADP/ATP	$\text{ADP}^{3-} \rightleftharpoons \text{ATP}^{4-}$	elektrogen
Aspartat/ Glutamat	$\text{Glu}^{-} + \text{H}^{+} \rightleftharpoons \text{Asp}^{-}$	elektrogen
Phosphat	$\text{P}_i^{-} \rightleftharpoons \text{OH}^{-}$	elektroneutral
Ketoglutarat (gegen Malat)	$\text{Mal}^{2-} \rightleftharpoons \text{KGA}^{2-}$	elektroneutral
Dicarboxylat	$\text{Mal}^{2-} \rightleftharpoons \text{P}_i^{2-}$	elektroneutral
Tricarboxylat	$\text{Mal}^{2-} \rightleftharpoons \text{Citrat}^{2-}$	elektroneutral
Pyruvat	$\text{Pyr}^{-} \rightleftharpoons \text{OH}^{-}$	elektroneutral
Glutamat	$\text{Glu}^{-} \rightleftharpoons \text{OH}^{-}$	elektroneutral

aufgrund des kotransportierten Protons (s. Schema) zusätzlich den pH-Gradienten des Protonenpotentials als treibende Kraft nutzen. Im Gleichgewicht ($\Delta G = 0$) stellt sich (theoretisch) eine Substratverteilung ein, die sich in elektrischen Einheiten ($\Delta p = \Delta G/F$) wie folgt ausdrücken läßt ($Z = 2.3 RT/F = 59 \text{ mV}$, R: allgemeine Gas-konstante, F: Faradaykonstante):

$$Z \log \frac{[\text{Asp}_{\text{ex}}][\text{Glu}_{\text{in}}]}{[\text{Asp}_{\text{in}}][\text{Glu}_{\text{ex}}]} = -\Delta \Psi + Z \Delta \text{pH} = -\Delta p \quad (\text{Gl. 1.1})$$

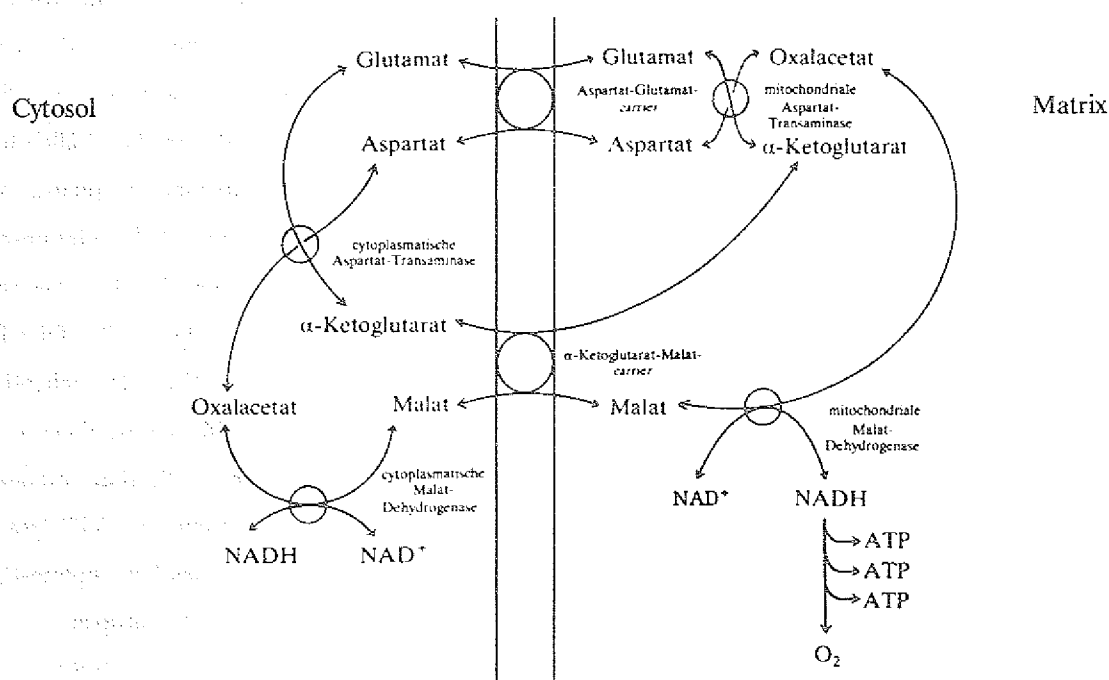
Da einige Substrate von mehreren Carriern transportiert werden (s. Tabelle), besteht über die jeweiligen Substratgradienten auch eine Abhängigkeit der Carrier untereinander. Dadurch daß der Phosphat-Carrier, getrieben vom Protonengradienten, in der Matrix Phosphat anhäuft, kann sekundär der elektroneutrale Dicarboxylat-Carrier Malat ausschleusen, was wiederum den Oxoglutarat- oder den Tricarboxylat-Carrier beeinflußt. In einigen Fällen wird diese Kooperation der Carrier erst durch die Aktivität von Enzymen in Matrix und Cytosol ermöglicht. Diese funktionellen Kombinationen werden Shuttles genannt und sind für die Koordination des mitochondrialen und des cytosolischen Stoffwechsels von großer Bedeutung, wie unten am Beispiel des Malat/Aspartat-Shuttles beschrieben werden soll (s. 1.2).



1.2 Der Asp/Glu-Carrier

Der Asp/Glu-Carrier wurde indirekt als energie-abhängiger Schritt bei der Bildung von Aspartat durch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase entdeckt (Klingenberg et al. 1965). Unter den verschiedenen mitochondrialen Carriern ist er eines der interessantesten Transportsysteme, da es als einziges - wie bereits erwähnt - durch beide Komponenten der protonenmotorischen Kraft (Δp), d. h. durch $\Delta \Psi$ und ΔpH , moduliert wird (LaNouc & Tischler 1974). Während Aspartat als monovalentes Anion transloziert wird, wird die negative Ladung von Glutamat durch ein kotransportiertes Proton kompensiert (s. Schema). Folglich ist in energetisierten Mitochondrien der Export von Aspartat ins Cytosol und der Import von Glutamat in die Matrix stark begünstigt (vgl. Gl. 1.1). Da der Asp/Glu-Carrier ein zentraler Bestandteil des Malat/Aspartat-Redoxshuttles ist, wird über diesen Carrier auch das Redoxpotential der Nicotinamidadenindinucleotide in Matrix und Cytosol beeinflusst.

Der Malat/Aspartat-Shuttle spielt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel von Herz, Leber und Niere. Er transferiert Reduktionsäquivalente, die vom NADH des Cytoplasmas stammen (Glykolyse, Aminosäure-Katabolismus u. a.), in die mitochondriale Atmungskette. NADH selbst kann die Membran nicht permeieren. Das Zusammenwirken von Asp/Glu- und Oxoglutarat-Carrier, verbunden durch je zwei Isoenzyme der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und der Malat-Dehydrogenase, ist unten wiedergegeben. Als sekundäres Redoxpaar (nach NADH/NAD) fungiert dabei Malat/Oxalacetat, wobei letzteres jedoch als Aspartat (nach Transaminierung) transportiert werden muß. Das ganze fügt sich zu einem Zyklus, da die Transport-Gegensubstrate von Malat und Aspartat, nämlich α -Ketoglutarat bzw. Glutamat, durch die gleiche Transaminierungsreaktion ineinander umgewandelt werden. Die wechselseitige Abgängigkeit der zwei Carrier dieses Shuttles unter Einbeziehung der verbindenden Enzyme wurde inzwischen auch in Proteoliposomen durch Korekonstitution gezeigt (Indiveri et al. 1987). Als zweiter, in bestimmten Muskel- und Nervenzellen nachgewiesener Redoxshuttle sei der Glycercinphosphat-Shuttle genannt.



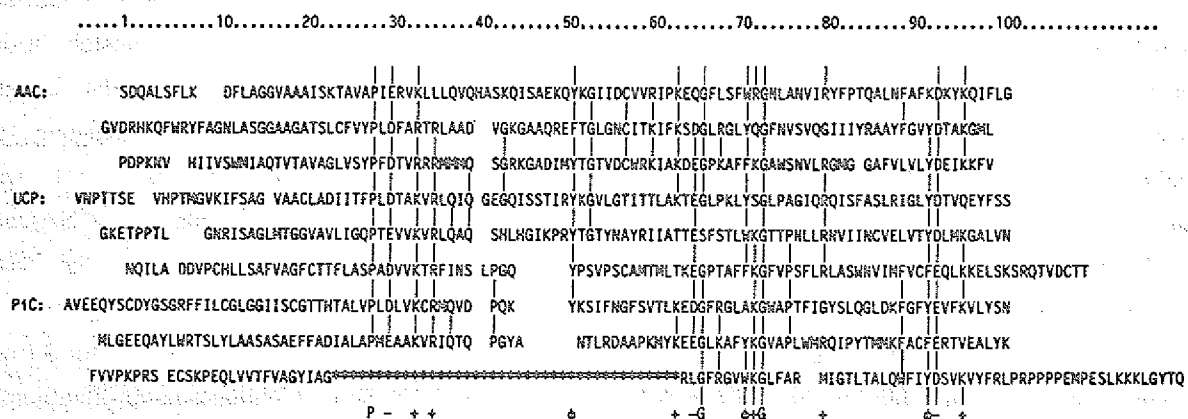
Der Asp/Glu-Carrier verbindet zwei weitere Stoffwechselwege, die zwischen Cytosol und Mitochondrien-Matrix kompartimentiert sind (s. auch Williamson 1976). Bei der Gluconeogenese aus Lactat entsteht in der Eingangsreaktion, die von der mitochondrialen Pyruvat-Carboxylase katalysiert wird, Oxalacetat. Dessen Export (als Aspartat) ins Cytosol wird ähnlich wie beim Malat/Aspartat-Shuttle unter Beteiligung von Oxoglutarat-Carrier und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase gelöst. Bei der Gluconeogenese aus Pyruvat hingegen kommt dem Dicarboxylat-Carrier die entscheidende Rolle zu, da hier Malat ("Oxalacetat + NADH") exportiert wird (vgl. 6.1). Auch der Harnstoffzyklus läuft teilweise im Mitochondrium ab (Citrullin-Synthese). Der Asp/Glu-Carrier ist hier an der Zulieferung des Stickstoffdonators Glutamat beteiligt.

Die Eigenschaften des Asp/Glu-Carriers wurden intensiv in Mitochondrien untersucht. Wie unter 3.1 und 4.1 genauer erläutert wird, führten die von den Arbeitsgruppen von LaNoue und Williamson veröffentlichten Ergebnisse jedoch zu fundamentalen Widersprüchen in nahezu jeder Hinsicht. Solch grundlegende Eigenschaften wie der kinetische Mechanismus oder die Bindung des kotransportierten Protons wurden völlig kontrovers diskutiert, und sogar die publizierten K_m -Werte lagen teilweise um Größenordnungen auseinander. Auch das Phänomen einer funktionellen Asymmetrie in entkoppelten Mitochondrien blieb unverstanden. Alle diese Punkte konnten im Proteoliposomen-System geklärt werden (s. 3. und 4.).

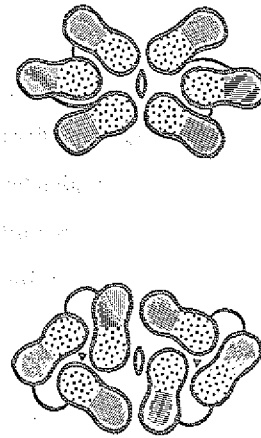
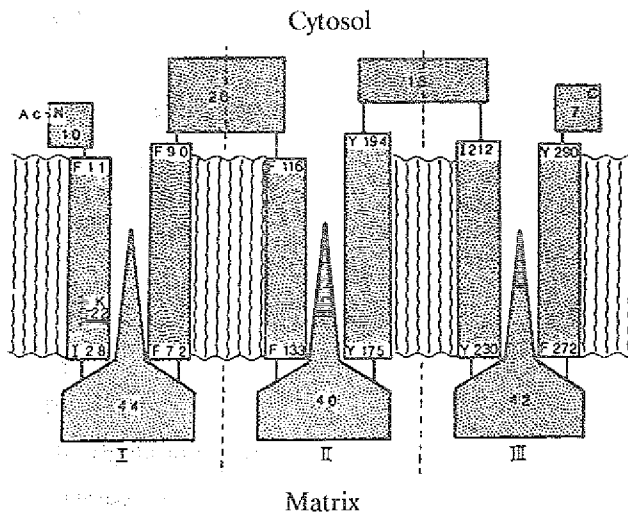
1.3 Die strukturelle Familie der mitochondrialen Carrier

Infolge ihrer intrazellulären Lokalisierung benötigen die mitochondrialen Carrier keine komplexe Transportmaschinerie mit mehreren Komponenten (wie z. B. bei Bindeprotein-, Phosphotransferase- oder ATPase-Systemen). Die Translokation wird von einer Proteinkette mittlerer Länge bewerkstelligt, wobei die funktionelle Einheit den bisherigen Befunden zufolge durch ein Homodimer gebildet wird (Hackenberg & Klingenberg 1980, Klingenberg 1981).

Eine gleichartige Struktur der verschiedenen Carrier läßt sich schon aufgrund der überraschenden Ähnlichkeit der Reinigungsprozeduren auf Hydroxylapatit vermuten (Krämer & Palmieri 1989, vgl. 2.2, 5.2, 6.2, 7.2). Bis dato sind die Aminosäure- (bzw. cDNA-) Sequenzen von vier mitochondrialen Carriern ermittelt worden, die des ADP/ATP-Carriers (Aquila et al. 1982), des Uncoupling-Proteins (Aquila et al. 1985), des Phosphat-Carriers (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987) und kürzlich auch die des Oxoglutarat-Carriers (Runswick et al. 1990). Alle vier Carrier bestehen aus ca. 300 Aminosäure-Resten. Darunter befindet sich ein für Membranproteine recht hoher Anteil an polaren Aminosäuren, wobei die Zahl der basischen Reste die der sauren deutlich übersteigt (vgl. Tab. XII). Die bemerkenswerteste Gemeinsamkeit ist der in allen Fällen festzustellende tripartite Aufbau der Primärstruktur, bestehend aus ähnlichen, sich wiederholenden Sequenzen von je ca. 100 Aminosäuren. Homologien zwischen diesen Segmenten zeigten sich nicht nur innerhalb jedes einzelnen Proteins, sondern zwischen allen vier Carriern, wie unten aufgeführte Sequenzvergleiche der insgesamt 9 Segmente des ADP/ATP-, des Phosphat- und des Uncoupling-Carriers belegen (AAC, P_iC, UCP). Dies führte zu der "Proteinfamilie" oder "Gen-Superfamilie" der mitochondrialen Carrier, deren Mitglieder sich offenbar von einem Ur-Carrier ableiten, der seinerseits durch Gentryplikation entstanden sein dürfte (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987, 1990). Die funktionelle Diversifikation im Laufe der Evolution ist allerdings erstaunlich, da zwei der sequenzierten Carrier, der ADP/ATP-Carrier und das Uncoupling-Protein, mit ATP bzw. H⁺ zwei Substrate transportieren, deren Größenunterschied extremer nicht sein kann. Da das Uncoupling-Protein auch Cl⁻ transportiert, ist man geneigt, in Analogie zum Phosphat-Carrier H⁺ nur als Kosubstrat anzusehen. Eine stöchiometrisch gekoppelte Translokation wurde beim Uncoupling-Protein jedoch nicht gefunden.



Primärstruktur sowie (nächste Seite) Vorschläge zur Sekundär- und Quartärstruktur mitochondrialer Carrier. AAC und P_iC aus Rinderherz, UCP aus Hamster (braunes Fettgewebe). Einige konservierte Reste sind durch vertikale Linien markiert: P, Prolin; G, Glycin; +, -, Ø, geladene bzw. aromatische Reste. Nächste Seite: Die Lage der transmembranen Helizes des ADP/ATP-Carriers ist den Positionen der flankierenden Aminosäuren zu entnehmen. Andere Zahlenangaben betreffen die Länge der interhelikalen Abschnitte. I, II und III bezeichnen den tripartiten Aufbau. K22, Lysin am Translokationsweg. , Bindungsstelle. Blickrichtung in (links) oder auf die Membranebene (rechts, amphipathische Helizes gepunktet). (Aus: Aquila et al. 1987 sowie Klingenberg 1989)



Die Homologie dieser Carrier, betrachtet man die gesamte Sequenz, ist relativ gering (15-22%, T. A. Link, persönliche Mitteilung). Jedoch finden sich eine Reihe hochkonservierter Aminosäure-Reste von struktureller (Prolin und Glycin) und eventuell auch funktioneller Bedeutung (positive Ladungen entlang des Transportweges?). Jedes der drei Segmente eines Proteins kann eine Sekundärstruktur mit zwei transmembranen Helizes einnehmen, wie oben für den ADP/ATP-Carrier schematisch dargestellt ist. Diese Vorhersage war jedoch erst durch Anwendung von Computerprogrammen möglich, die die Ausbildung amphipathischer Helizes berücksichtigten (Aquila et al. 1987). Ein jedes Segment besteht demnach aus einer amphipathischen und einer mehr hydrophoben α -Helix. Dieses generelle Prinzip läßt einen dreidimensionalen Aufbau des Dimers in sechs Domänen (à zwei Helizes) vermuten (s. Schema), wobei die amphipathischen Helizes (gepunktet) hydrophile Porenstrukturen formen könnten. Im Falle des ADP/ATP-Carriers wurden mindestens drei Lysin-Seitenketten mit Bindung und Translokation des Substrats in Verbindung gebracht, da ihre chemische Modifizierbarkeit mit dem Funktionszustand korrelierte (Bogner et al. 1986). Die Bindungsstelle(n) selbst ließ(en) sich bisher jedoch in keinem der Carrier präzise lokalisieren. In dieser Hinsicht brachten Photoaffinitätsmarkierungen erste Erfolge (Boulay et al. 1983, Mayinger et al. 1989).

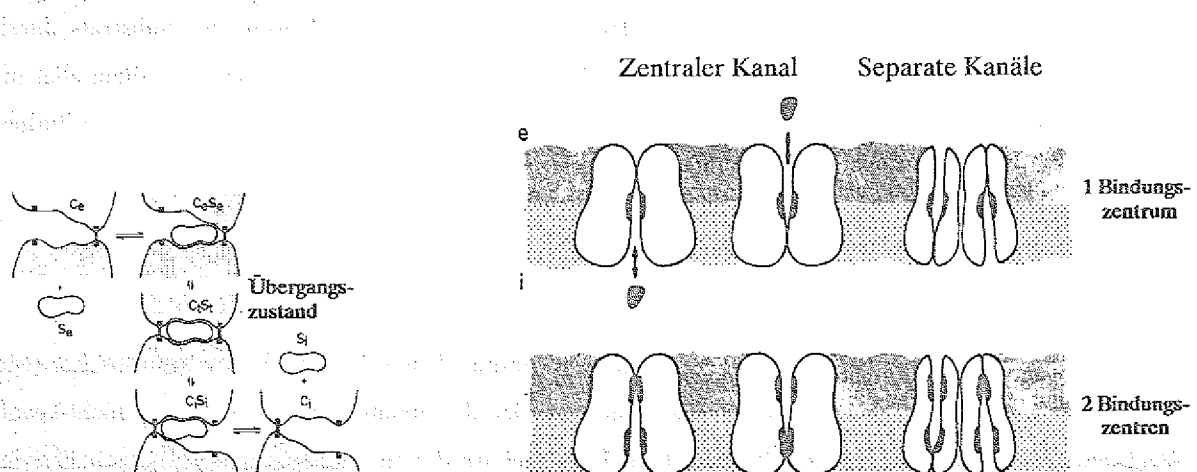
Diese strukturellen Informationen, die die Ausbildung einer kanalartigen Struktur nahelegen, sind eine gewisse Hilfestellung, will man dem fundamentalen Problem des Durchschleusens des Substrats durch das Carrierprotein näherkommen. Das strukturelle Modell wird verbessert werden müssen, vor allem aber muß es mit funktionellen Erkenntnissen in Einklang gebracht werden, um zu einem tieferen Verständnis der Transportkatalyse zu gelangen.

1.4 Transportkatalyse

Katalysatoren bewirken die Absenkung der Aktivierungsenergie chemischer - und chemiosmotischer (Mitchell 1979) - Vorgänge. Wie Enzyme so entnehmen auch Carrier die "katalytische Energie" der nicht-kovalenten Wechselwirkung von Substrat und Protein. Die dabei frei werdende Bindungsenergie nutzen Enzyme zur Destabilisierung der Substratstruktur durch Eingriff in die chemische Reaktion. Carrier hingegen setzen sie zur Absenkung der Energiebarriere des eigenen Konformationswechsels ein, der zur Translokation notwendig ist. Es wird also das Protein verändert und nicht das Substrat.

Nach dem Konzept des 'induced fit' (Koshland 1958) erhöht sich die Bindungsenergie durch flexible Anpassung des aktiven Zentrums an das Substrat. Bei Transportprozessen sollte die maximale Bindungsenergie im Übergangszustand frei werden, wo sich ein optimal passendes Bindungszentrum ausbildet (s. Schema). Der Anstieg der Bindungsenergie im 'festen' Übergangszustand (C_iS_i) gegenüber dem 'lockeren' Carrier-Substrat-Komplex (C_eS_e , C_iS_i) erhöht gleichzeitig die Transportrate, die Substratspezifität und - im Falle von Antiportern - auch den Grad der Kopplung (Krupka 1989). Eine Veränderung der intrinsischen Bindung wird folglich mehrere Parameter beeinflussen (s. 8.4 und 10.3). Der unten abgebildete 'gated-pore'-Mechanismus, wie er von Klingenberg (1976, 1981, 1989) für den ADP/ATP-Carrier beschrieben wurde, soll diese Betrachtungen illustrieren. Es wird deutlich, daß das 'gating' der Pore nur bei fester Bindung des Substrats erfolgen kann. Die so ausgelöste Öffnung der Pore erstreckt sich jedoch nicht über die ganze Membran aufgrund der Flexibilität der Kanal-Struktur (Salzbrücken etc.). Ein wesentlicher, kontrovers betrachteter Aspekt der Translokation betrifft die Frage, ob allein das Substrat sich relativ zum Protein bewegt, oder ob das gebundene Substrat auch durch die Mobilität von Aminosäure-Seitenketten der Bindungsstelle transportiert wird. Auf weitere hinsichtlich der Dynamik der Energiebarrieren mehrfach verfeinerte Konzepte, die auf den Berechnungen von Läger (1980, 1985) aufbauen, soll in der Diskussion eingegangen werden (8.4, 10.3).

Zum Verständnis der Funktionsweise eines Carriers als Transportkatalysator bedarf es neben der Energetik auch der Kenntnis seines kinetischen Mechanismus. Für die bisherigen Betrachtungen ist von einem Bindungszentrum in einem (postulierten) Kanal ausgegangen worden. Ein solches Modell wird in der ein oder anderen Variante für viele Carrier und auch für den sehr gut untersuchten Anionenaustauscher aus Erythrocyten (Passow 1986) favorisiert. Aus den strukturellen Daten der mitochondrialen Carrier (s. 1.3) lassen sich Modelle sowohl mit einem Kanal (einer Bindungsstelle) als auch mit zweien konstruieren (s. unten dargestellte Alternativen). Tatsächlich ist die Anzahl der Bindungsstellen vor allem für den ADP/ATP-Carrier ein bis heute umstrittenes Thema. Die hier für den Asp/Glu- und den Oxoglutarat-Carrier vorgestellten Ergebnisse (s. 4.-6.) sind konsistent mit zwei Bindungsstellen (je eine von jeder Membranseite aus zugänglich); beim Dicarboxylat-Carrier ließen sich zwei Bindungsstellen allein auf der Außenseite unterscheiden. Zur Diskussion der Konsequenzen dieser Befunde für das Verständnis mitochondrialer Antiporter sei auf die Kapitel 4.4, 5.4, 6.4 und 10.2 verwiesen.



Alternative 'gated-pore'-Modelle (aus: Klingenberg 1981, 1989).

C, Carrier; S, Substrat; e, extern; i, intern; t, transitorisch.

1.5 Allgemeine Zielsetzung

Wie die bisherigen Ausführungen deutlich machen, ist die Aufklärung des molekularen Translokationsmechanismus aus Struktur-Funktions-Beziehungen für keinen Carrier biologischer Membranen auch nur annähernd gelöst. Vorhandene strukturelle Informationen lassen sich in mechanistischer Hinsicht bisher nicht zwingend interpretieren. Den erfolgreichsten Ansatz, zwischen Funktionsmechanismen zu unterscheiden, bietet die Kinetik. Daher sind es die Informationen zur Carrierfunktion, die den Rahmen abstecken, in dem Interpretationen struktureller und molekularer Daten stattfinden müssen. Dementsprechend wird in der vorliegenden Arbeit die Funktionsaufklärung in den Vordergrund gestellt, um dann die aus der chemischen Modifizierung spezifischer Aminosäuren erhaltenen Befunde mit dem abgeleiteten Funktionsmodell zu korrelieren.

Viele Versuche klassischer kinetischer Studien in intakten Mitochondrien führten entweder zu erstaunlich komplexen oder sogar zu extrem widersprüchlichen Transportmodellen, was insbesondere für den Asp/Glu-Carrier zutrifft (s. 1.2). Vor allem technische Probleme behinderten die Ermittlung zuverlässiger Transportraten bei unterschiedlichen Konzentrationen an externen und internen Substraten, zumal hierfür eine ganze Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein müssen (s. Sluse et al. 1989). Einen anderen Weg, den katalytischen Mechanismus von Carriern zu erhellen, bietet das rekonstituierte System, das mehrere der methodischen Schwierigkeiten vermeidet. Die Durchführung aussagekräftiger Studien setzt hier allerdings eine genaue Charakterisierung des rekonstituierten Proteins und seiner transmembranen Orientierung voraus. Die Aufnahme von Bisubstratkinetiken in solch einem System mit asymmetrisch in liposomale Membranen eingebautem Carrierprotein wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig durchgeführt. Die Relevanz der erhaltenen Ergebnisse für den Carrier *in vivo* wurde durch vergleichende Analysen in intakten Mitochondrien bestätigt. Darauf aufbauend war es von besonderem Interesse, die Untersuchungen auch auf andere mitochondriale Carrier auszudehnen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufzuklären. Dabei versprach der Vergleich des Oxoglutarat-Carriers, also eines Mitglieds der beschriebenen Proteinfamilie (s. 1.3), mit dem Asp/Glu-Carrier Aufklärung darüber, ob letzterem Protein wegen seines doppelt so hohen Molekulargewichts (s. Ergebnisse) auch funktionell eine Sonderstellung zukommt.

Die genauere Erforschung der allgemein bekannten Empfindlichkeit mitochondrialer Carrier gegenüber SH-Reagenzien berührte, ohne daß man dies erwarten konnte, sehr grundlegende Aspekte der Transportkatalyse. Aus der deutlich vereinfachten Funktionsweise des SH-modifizierten Asp/Glu-Carriers ergaben sich Evidenzen für einen Kanal als Voraussetzung carrier-vermittelter Transports, wie bereits aus strukturellen und energetischen Modellen gefordert wurde (vgl. 1.3 bzw. 1.4). In diesen Untersuchungen bot sich über die SH-Modifizierung die Möglichkeit, strukturelle und funktionelle Aspekte der Transportkatalyse miteinander zu korrelieren. Unter ständiger Berücksichtigung der betroffenen Cysteine wurden schließlich auch weitere essentielle Aminosäure-Reste identifiziert und in ein Gesamtbild integriert.

2. Material und allgemeine Methoden

2.1 Material

Chemikalien der Firma Amersham International (Buckinghamshire):

AMPLIFY, L-[U-¹⁴C]Aspartat, L-[2,3-³H]Aspartat, [8-¹⁴C]ATP, D-[U-¹⁴C]Glucose, L-[U-¹⁴C]Glutamat, ³H₂O, α-Keto-[5-¹⁴C]glutarat, L-[U-¹⁴C]Lysin, L-[U-¹⁴C]Malat, [2-¹⁴C]Malonat, ¹⁴C-methylierte Rainbow Molekulargewicht-Standardproteine, [²²Na]Natriumchlorid, Natrium[³⁶Cl]chlorid, Natrium[³⁵S]sulfat, L-[U-¹⁴C]Ornithin, [³²P]Phosphat, [1,4-¹⁴C]Succinat, [U-¹⁴C]Sucrose, UDP-D-[U-¹⁴C]Glucose.

Chemikalien der Firma Sigma (St. Louis):

Agaricin, DL-α-Aminoadipinsäure, Aminooxyacetat, Bathophenanthrolin, C₁₃E₁₀, Cardiolipin, CAT, Cibacron Blue 3GA, Cycloserin, DEPC, [Carbonyl-¹⁴C]DEPC, 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, DTE, DTNB, EDC, Fluorescein-5-isothiocyanat, Glycinmethylester, Lysinmethylester, Mersalyl, MOPS, Nigericin, Palmityl-CoA, PCMB, PCMS, Phospholipid aus Truthahn-Eigelb, Pipes, Rotenon, Triton X-100, Triton X-114, Woodward's Reagents K.

Phospholipid aus Truthahn-Eigelb von Sigma erwies sich als besser geeignet als andere kommerziell erhältliche Phospholipide.

Chemikalien der Firma Fluka (Buchs):

Acetylimidazol, Amberlite XAD-2, Amidoschwarz, Benzylalkohol, BPAB, DOWEX 1-X8, NBD-Cl, Phenylglyoxal, Phenylisothiocyanat, SITS.

Weitere Materialien:

Antimycin, Pronase, Trypsin, Valinomycin (Boehringer Mannheim, Mannheim); Acrylamid, DOWEX 50W-X8, Hydroxylapatit (Bio-Gel HTP), N,N'-Methylen-bisacrylamid, SDS (Bio-Rad, Richmond); Sephadex, Phast Gel 10-15, Phast SDS-Pufferstreifen (Pharmacia, Uppsala); NEM, Ninhydrin, PLP (Merck, Darmstadt); Celite 545, Subtilisin, N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin (Serva, Heidelberg); C₁₂E₈ (Kouyoh Trading Company, Tokyo); Celite 535 (Roth, Karlsruhe); 3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure (Calbiochem, La Jolla); DIDS, o-Phthaldialdehyd (Pierce, Rockford); [1,2-³H]-1,2-(2,2'-Disulfo-4,4'-diisothiocyano)-diphenylethan (³H₂-DIDS) (HSC Research Development Co., Toronto); ENHANCER (NEN Du Pont, Boston); flüssige Gelatine (Norland, New Brunswick); [¹⁴C]NBD-Cl (3-Chlor-7-nitro-[U-¹⁴C]benzo-2-oxa-1,3-diazol (CEA, Gif-sur-Yvette); Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Fc) (affinity pure) (Dianova, Hamburg).

Die Antikörper gegen Porin waren ein Geschenk von Prof. D. Brdiczka (Konstanz), die gegen den ADP/ATP-Carrier von Dr. B. Seitner (München). Der polyanionische Inhibitor des Porins wurde von Prof. T. König (Budapest) synthetisiert und durch Prof. R. Benz (Würzburg) zur Verfügung gestellt. BKA wurde von Prof. Berends (Delft) isoliert. DNDS erhielten wir von Dr. L. Zaki (Frankfurt).

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien waren von höchster verfügbarer Qualität.

2.2 Präparative Methoden

Im folgenden werden jene Methoden beschrieben, die für die Untersuchung der Antiportfunktion des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers und des korekonstituierten ADP/ATP-Carriers Anwendung fanden, jedoch nur soweit sie sich auf mehrere der Ergebnis-Kapitel beziehen. Zur Präparation von Rattenherz-Mitochondrien siehe 3.2, zur Reinigung des ADP/ATP-Carriers siehe 7.2, zur Reinigung und Rekonstitution des Oxoglutarat- bzw. Dicarboxylat-Carriers siehe 5.2 bzw. 6.2.

Präparation von Rinderherz-Mitochondrien

Mitochondrien wurden aus frischen Rinderherzen nach der Vorschrift von Smith (1967) präpariert und suspendiert in 250 mM Sucrose/10 mM Tris-HCl/50 μ M EDTA bei pH 7.4 in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Proteingehalt lag bei ca. 50 mg/ml.

Präparation von angereichertem Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier (G-25-Protein)

Die Präparation des Asp/Glu-Carriers aus Rinderherz-Mitochondrien wurde zuvor beschrieben (Krämer et al. 1986). Durch eine Vorextraktion der Mitochondrien mit 2% $C_{13}E_{10}$ in 10 mM Pipes (pH 7) ohne Salzzusatz wurden vor allem Proteine der Mitochondrienmatrix entfernt. Die Solubilisierung des Asp/Glu- und ADP/ATP-Carriers erfolgte dann durch 1% $C_{12}E_8$ in 10 mM Pipes/1.2 M Ammoniumacetat (pH 6.5). Den wesentlichen Reinigungsschritt stellte die darauffolgende Chromatographie auf Hydroxylapatit dar. Bei Auftrag von 2.5 ml des Solubilisierungsüberstandes auf 1 g trockenes Hydroxylapatit wurden unter den gegebenen Hochsalz-Bedingungen $\geq 85\%$ der kontaminierenden Proteine gebunden, während Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier sich im Durchlauf fanden. Um die Inaktivierung beider Proteine auf Hydroxylapatit zu verringern, wurde die Chromatographie durch Zentrifugation der in einem Rotor platzierten Säulen beschleunigt. Für die weitere Verwendung wurde das Eluat durch Gelfiltration auf Sephadex G-25 (PD10-Säulen, Pharmacia) entsalzt; dabei durfte das Ammoniumacetat (pH 6.5) nicht unter 200 mM gesenkt werden, um eine Aggregation des Proteins zu vermeiden. Das so erhaltene G-25-Protein (ca. 800 μ g/ml Protein) enthielt den Asp/Glu-Carrier mit ungefähr 17-fach und den ADP/ATP-Carrier mit ca. dreifach angereicherter Transportaktivität. Letzteres Protein überwog wegen seiner Abundanz in der inneren Mitochondrienmembran den Asp/Glu-Carrier dennoch deutlich (vgl. Tab.IX, XI sowie Abb.23, 44 A).

Reinigung des Asp/Glu-Carriers

Für die Identifizierung des Asp/Glu-Antiporters und auch des Aspartat-Effluxcarriers (Tab.IX, Abb.27) war eine weitere Reinigung notwendig. Dies wurde durch HPLC auf einer Hydroxylapatit-Säule (PEC 102, 7.5 x 100 mm, Pentax-Asahi, Tokyo) mit Hilfe eines HPLC-Gradientensystems (ERC, Tokyo / Knauer, Berlin) erreicht. Dazu wurde eine komplizierte Sequenz von Elutionspuffern angewendet, analog der von Krämer et al. (1986) beschriebenen Vorgehensweise. Die Unterschiede waren wie folgt: Fluß 1.0 ml/min; Voräquilibrierung der Säule mit 0.4% $C_{12}E_8$ / 300 mM Ammoniumacetat; Injektion von 2.5 mg G-25-Protein (0.64% $C_{12}E_8$ /600 mM Ammoniumacetat); linearer Phosphatgradient (10.5 ml, mit einem Plateau von 3.5 ml) von 10 bis 130 mM Natriumphosphat bei konstant 50 mM Ammoniumacetat und 0.05% Cardiolipin; kontinuierliche Reduktion des Phosphats auf 10 mM und gleichzeitiger Anstieg des Cardiolipins von 0.05 auf 0.1%; linearer Ammoniumacetat-Gradient von 50 bis 1200 mM (20 Min) unter Erniedrigung des Flusses von 1.0 auf 0.8 ml/min zu Ende des Gradienten. Die bei 650-850 mM Ammoniumacetat gesammelten Fraktionen enthielten nahezu reines Asp/Glu-Carrierprotein (vgl. Abb.27 A).

Präparation von Proteoliposomen

Die Inkorporation der Carrierproteine in Liposomen wurde unter langsamer Entfernung des Detergens durch hydrophobe Chromatographie erreicht (Krämer & Heberger 1986). Dazu wurden gemischte Detergens/ Protein/ Lipid-Mizellen in einer rezyklisierenden Prozedur über Polystyrol-Kügelchen (Amberlite XAD-2) gegeben, die zuvor mit Methanol gewaschen und mit dem Puffer und dem Substrat der Mizellen äquilibriert worden waren. Die genaue Zusammensetzung der Rekonstitutionsmischung war wie folgt: 12 mg/ml Phospholipid (zugegeben in Form von Schalliposomen (Krämer & Klingenberg 1977)), 1.75 mg $C_{12}E_8$ /mg Phospholipid, etwa 0.04 mg G-25-Protein/mg Phospholipid, Aspartat, Glutamat und/oder ATP in den für das Innenvolumen angegebenen Konzentrationen, 100 mM MOPS/KOH (pH 6.5, wenn nicht anders angegeben). Diese Mischung (maximal 1 ml) wurde 15 mal über eine Amberlite-Säule (5 mm Durchmesser) gegeben, wobei 20 mg $C_{12}E_8$ auf 1 g Amberlite (in feuchtem Zustand gewogen) kamen.

2.3 Analytische Methoden

Zur Messung der Antiportaktivität des Asp/Glu-Carriers in intakten Mitochondrien siehe 3.2, zur Messung seiner Effluxaktivität sowie der des ADP/ATP-Carriers siehe 7.2 (und auch 8.2). Die Analyse des rekonstituierten Oxoglutarat- und Dicarboxylat-Carriers ist in 5.2 bzw. 6.2 beschrieben.

Transportmessungen (Asp/Glu- und ADP/ATP-Antiport)

Alle Transportaktivitäten wurden durch Messung des Fluxes von ^{14}C -markiertem Substrat bestimmt. Zur Verfolgung der Antiportaktivität wurden zwei verschiedenen Techniken angewendet, die zunächst für den Asp/Glu-Carrier beschrieben werden sollen (vgl. Dierks & Krämer 1988).

Vortauschtechnik (Aufnahme von Markierung). Nach Erzeugung eines Substratgradienten durch Gelfiltration der Proteoliposomen auf einer Sephadex G-75-Säule (7 x 130 mm, äquilibriert mit 100 mM MOPS/KOH (pH 6.5) und Sucrose in einer die Osmolarität des internen Substrats ausgleichenden Konzentration (1-80 mM)) wurde die Messung durch Zugabe von ^{14}C -markiertem Aspartat oder Glutamat gestartet, dessen Konzentration für jedes Experiment angegeben ist. Die Zusammensetzung des Puffers während der Messung war mit der des Gelfiltrationspuffers identisch. Der Austausch wurde mit ≥ 25 mM Pyridoxalphosphat gestoppt. Zu Kontrollproben wurde Pyridoxalphosphat gleichzeitig mit dem markierten Substrat zugesetzt. Schließlich wurde die nicht von den Liposomen aufgenommene Radioaktivität durch Passage über Anionenaustauscher entfernt. Dazu wurden 90-130 μ l jeder Probe auf mit DOWEX 1-X8 (Acetatform) gefüllte Säulchen (5 x 45 mm) aufgetragen, die zuvor mit 4 mg Phospholipid und 2 mg Rinderserum-Albumin pro Säule konditioniert worden waren, um einen Verlust an Proteoliposomen zu unterdrücken. Die Liposomen wurden mit 100 mM Natriumacetat in Schritten von 100, 300 und 500 μ l direkt in ein Gefäß mit Szintillationsflüssigkeit eluiert.

Um den sogenannten Grundefflux (vgl. 7.3.1) von internem Substrat zu eliminieren, der in gewissem Ausmaß während der Erzeugung von Substratgradienten auftritt und bei nichtsättigenden internen Substratkonzentrationen (3.3, 4.3) das Meßergebnis verfälschen könnte, wurden die Proteoliposomen mit 200 μ M 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) behandelt, bevor sie auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen wurden. Dieses Reagens blockierte den Efflux (und Antiport) nahezu vollständig (s. Abb.21). Nach der Säulenpassage wurde der Carrier durch Gabe von 4 mM Dithioerythrit (DTE) 30 s vor Start des Austausches reaktiviert (vgl.

Dierks & Krämer 1988). In vielen Experimenten wurden die Liposomen vor der Messung außerdem mit Valinomycin und Nigericin behandelt, um deenergetisierte Bedingungen zu gewährleisten (s. 3.2, 4.2).

Die Austauschrate wurde mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt, das den zeitlichen Verlauf der Isotopenäquilibration den Datenpunkten gemäß einem Prozeß erster Ordnung anpaßte. Dabei wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt:

$$\text{dpm}_{\text{in}} = \frac{\text{dpm}_{\text{tot}} \cdot S_{\text{in}} V_{\text{in}}}{S_{\text{ex}} V_{\text{ex}} + S_{\text{in}} V_{\text{in}}} (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Gl. 2.1})$$

dpm_{in} bedeutet die von den Proteoliposomen aufgenommene Radioaktivität, dpm_{tot} die Gesamtmenge der zu Beginn des Experiments zugegebenen Markierung, S die Substratkonzentration und V das Volumen des externen bzw. internen Kompartiments; k ist die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung und t die Meßzeit. Die Isotopenäquilibration folgte dieser theoretisch abgeleiteten Gleichung in den ersten fünf (bis acht) Minuten nahezu perfekt, d. h. bis die Mehrzahl der transportaktiven Liposomen das kinetische Gleichgewicht von einwärts- und auswärtsgerichtetem Isotopenflux erreicht hatte. Im Gleichgewicht gilt:

$$\text{dpm}_{\text{in}}/\text{dpm}_{\text{ex}} = S_{\text{in}} V_{\text{in}}/S_{\text{ex}} V_{\text{ex}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Später wurde ein entsprechendes, kommerziell erhältliches Programm angewendet (s. 7.2). Die Transportraten wurden vom Computer unter Berücksichtigung der spezifischen Radioaktivität aus der Anfangssteigung der Kurve berechnet. In der vorliegenden Arbeit sind die 'Vortauschaktivitäten' des rekonstituierten Asp/Glu- und ADP/ATP-Carriers, soweit sie nur mit angereichertem und nicht mit gereinigtem Protein ermittelt wurden, als Volumenaktivitäten ($\mu\text{mol}/\text{min}$ pro l Liposomen) angegeben und nicht als spezifische Aktivitäten ($\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein). Wenn verschiedene Liposomenpräparationen innerhalb eines Experiments Verwendung fanden, so wurden im Falle quantitativer kinetischer Analysen (3.3, 4.3) die gemessenen Transportaktivitäten auf der Basis von Phospholipid-Bestimmungen (Chen et al. 1956) normiert, wodurch leichte Unterschiede in der Verdünnung während der verschiedenen Säulenpassagen eliminiert wurden.

Rücktausch-Technik (Export von Markierung). Bei dieser Meßmethode bedarf es der Vormarkierung des internen Substratpools. Zu diesem Zweck ließ man die Proteoliposomen [^{14}C]Substrat ($0.5\text{--}5 \mu\text{M}$) im Vortausch zwischen beiden Kompartimenten äquilibrieren. Solange dies im Homoaustausch geschah, änderte sich die interne Substratkonzentration dabei nicht. Nach einer zweiten Gelfiltration auf Sephadex G-75 zur Entfernung der nicht aufgenommenen Radioaktivität wurde der Export der internen Markierung durch Gabe von unmarkiertem Substrat (in den jeweils angegebenen Konzentrationen) initiiert. Der Austausch wurde durch $50\text{--}80 \text{ mM}$ Pyridoxalphosphat gestoppt. Wegen des kompetitiven Verhaltens dieses Inhibitors (Abb.35) wurde er in höherer Konzentration als beim Vortausch eingesetzt, da normalerweise auch höhere externe Substratkonzentrationen als im Vortausch verwendet wurden (s. 3.3.1). Gelfiltration, Vormarkierung der Liposomen und Rücktausch-Messung wurden in demselben Puffer durchgeführt, wie für den Vortausch beschrieben. Die Transportaktivitäten aus Rücktausch-Experimenten wurden entweder durch ein Kurvenanpassungsprogramm (s. 7.2) oder graphisch ermittelt (vgl. Pfaff et al. 1969). Zu diesem Zweck wurde der Grad der Isotopenäquilibration, α , als Meßparameter eingeführt ($\text{dpm}(0, t, \infty)$ = interne Radioaktivität zu Beginn, zur Zeit t bzw. am Ende der Äquilibration):

$$\alpha = \frac{\text{dpm}(0) - \text{dpm}(t)}{\text{dpm}(0) - \text{dpm}(\infty)} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Wenn die Menge an externem Substrat groß ist im Vergleich zum internen Pool ($S_{\text{ex}} V_{\text{ex}} \gg S_{\text{in}} V_{\text{in}}$), so wird die Zeitabhängigkeit durch die Gleichung beschrieben:

$$\alpha = 100 (1 - e^{-kt}), \quad (\text{Gl. 2.4})$$

die sich linearisieren läßt zu:

$$-\ln [(100 - \alpha)/100] = kt = vt / S_{\text{in}} V_{\text{in}} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Bei Auftragung von $-\ln[(100 - \alpha)/100]$ gegen die Zeit ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung k aus der Steigung der resultierenden Geraden. Dieses graphische Verfahren wurde auch bei Verfügbarkeit eines Computerprogramms, das k direkt aus dem zeitlichen Verlauf der Isotopenrückäquilibration berechnet (s. 7.2), benutzt, um den mit einer Exponentialfunktion angemessen zu beschreibenden Anfangsbereich genau zu definieren. Durch Multiplikation von k mit dem internen Substratpool läßt sich v berechnen (Gl. 2.5). Wegen der Ungenauigkeit bei der Bestimmung des aktiven Innenvolumens der Proteoliposomen (V_{in} , s. unten) wurde jedoch in den meisten Fällen direkt mit den k -Werten gearbeitet, oder es wurden - bei kinetischen Analysen mit variiert interner Substratkonzentration - relative Geschwindigkeiten (v') nach Gl. 2.6 berechnet, wie von Dierks & Krämer 1988 ausführlich beschrieben wurde. Diese v' -Werte waren für K_m -Bestimmungen ohne Einschränkung geeignet (s. 3.3.1, 4.3 und 5.3), was belegt, daß sich unabhängig von der Substratkonzentration im Rekonstitutionsansatz ein konstantes V_{in} ergibt.

$$v' = k \cdot S_{\text{in}} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Exakt die gleichen experimentellen Vorgehensweisen wurden für die Bestimmung der Antiportaktivität des rekonstituierten ADP/ATP-Carriers angewendet. Der ATP/ATP-Homöo-austausch wurde entweder im Rücktausch-Verfahren als Export von $[^{14}\text{C}]\text{ATP}$ aus vormarkierten Proteoliposomen nach Zugabe von unmarkiertem ATP gemessen oder im Vortausch-Modus direkt als Aufnahme von $[^{14}\text{C}]\text{ATP}$. In beiden Fällen dienten 33 μM CAT und 5 μM BKA als Stopp-Inhibitoren.

Berechnung des aktiven Liposomeninnenvolumens

Nur der Teil aller Liposomen, der Austauschaktivität zeigt, trägt zum Erreichen des Isotopengleichgewichtes bei. Das an der Äquilibration beteiligte Innenvolumen läßt sich aus Gleichgewichtsbestimmungen berechnen (vgl. Krämer & Heberger 1986). Dies wird durch Umstellung von Gl. 2.2, die den Ausgleich der spezifischen Radioaktivitäten zwischen beiden Kompartimenten beschreibt, veranschaulicht; (das externe Volumen wurde gleich 100% oder 1000 $\mu\text{l/ml}$ gesetzt):

$$V_{\text{in}} (\mu\text{l/ml}) = 1000 \frac{\text{dpm}_{\text{in}} \cdot S_{\text{ex}}}{\text{dpm}_{\text{ex}} \cdot S_{\text{in}}} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach einer modifizierten Lowry-Methode bestimmt (Helenius & Simons 1972). Wegen der hohen Ammoniumacetat-Konzentrationen wurden die Proben zuvor durch 0.015% Desoxycholat und 7.2% Trichloressigsäure präzipitiert (Peterson 1977). In den Experimenten zu Kapitel 5.2 und 6.2 wurde die Vorschrift von Dulley & Grieve (1975) angewendet.

3. Right-side-out-Orientierung des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers

(Dierks & Krämer 1988; Sluse, Evens, Dierks, Duyckaerts, Sluse-Goffart & Krämer 1990)

3.1 Einleitung

Die kinetischen Eigenschaften des Asp/Glu-Carriers wurden ausführlich in Mitochondrien untersucht (LaNoue et al. 1979, Murphy et al. 1979). Die beiden beteiligten Arbeitsgruppen kamen jedoch zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen im Hinblick auf mehrere Aspekte der Transportfunktion, worauf bereits unter 1.2 kurz eingegangen wurde. Insbesondere wiesen die publizierten K_m -Werte für Aspartat auf der Matrixseite drastische Unterschiede auf (55 μ M bzw. 5 mM, Tab. I). In einer kontroversen Diskussion wurden diese Diskrepanzen zwischen der Bestimmung in intakten Mitochondrien (5 mM, Murphy et al. 1979) und in submitochondrialen Partikeln (55 μ M, LaNoue et al. 1979) mit der Ultraschallbehandlung während der Partikelpräparation erklärt (Murphy et al. 1979). Auf der anderen Seite wurde postuliert, daß die Bestimmung des K_m für Matrix-Aspartat in intakten Mitochondrien zu falschen Werten führe wegen einer Mikrokompartimentierung des internen Substrats (LaNoue et al. 1979, Duszynski et al. 1978). Dieser grundlegende Konflikt reflektiert die Komplexität des Meßsystems, in dem vor allem technische Probleme die direkte Bestimmung von Transportraten bei unterschiedlichen internen und externen Substratkonzentrationen erschweren.

Die genannten Widersprüchlichkeiten zu klären war ein erstes Ziel, als wir den Asp/Glu-Carrier im rekonstituierten System studierten. Die Insertion einer partiell gereinigten Proteinpräparation in Liposomen gelang durch hydrophobe Chromatographie gemischter Mizellen auf Amberlite XAD-2, wobei das Detergens nach und nach entfernt wurde, so daß sich Proteoliposomen bildeten (s. 2.2). Unter Verwendung von Pyridoxalphosphat als Inhibitor (Krämer 1984) wurde eine optimierte Inhibitor-Stopp-Technik entwickelt (Dierks & Krämer 1988). Neben der üblichen Vortausch-Methode (Messung der Aufnahme radioaktiven Substrats) konnte auch die komplexere Rücktausch-Methode etabliert werden (Export von 14 C-Substrat aus vorbeladenen Liposomen), wie durch Dierks & Krämer (1988) beschrieben. Der Rücktausch ist bei hohen externen und/oder niedrigen internen Substratkonzentrationen die einzig anwendbare Technik (s. Ergebnisse).

Im Liposomensystem wird die kinetische Analyse des carrier-vermittelten Asp/Glu-Austausches durch das Fehlen seitenspezifischer Inhibitoren behindert. Da grundsätzlich eine statistische Orientierung des rekonstituierten Proteins in der Liposomenmembran erwartet werden mußte, war ohne die Verfügbarkeit solcher Inhibitoren die Signifikanz kinetischer Experimente eingeschränkt. Ein wesentliches Ziel im Hinblick auf die Klärung des Transport-Mechanismus (s. 4.) war daher, die transmembrane Topologie des rekonstituierten Carrierproteins zu bestimmen. Dies gelang durch die kinetische Untersuchung der Seitenspezifität funktioneller Eigenschaften (Dierks & Krämer 1988). Nachfolgende Studien mit intakten Rattenherz-Mitochondrien (Sluse et al. 1990) erlaubten es, durch einen direkten Vergleich zur *in vivo*-Situation die Proteinorientierung im rekonstituierten System auch absolut festzulegen.

3.2 Methoden

Kinetische Analyse des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers

Proteoliposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu-Carrier aus Rinderherz-Mitochondrien wurden präpariert und zur Transportmessung (bei Raumtemperatur) eingesetzt, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben. In allen hier durchgeführten Experimenten wurde die Austauschaktivität unter deenergetisierten Bedingungen bestimmt. Diese wurden gewährleistet, indem Valinomycin (500-700 ng/mg Phospholipid) und Nigericin (20-40 ng/mg Phospholipid) den Liposomen zugesetzt wurde (bei ca. 120 mM K^+ innen und außen). Nahezu alle Transport-Affinitäten wurden bei pH 6.5 ermittelt. Um die pH-Abhängigkeit der K_m -Werte für externes und internes Aspartat zu untersuchen, wurden unterschiedliche pH-Werte eingestellt, indem drei Portionen an Proteoliposomen, präpariert bei pH 6.9 (100 mM MOPS/KOH), über Sephadex G-75-Säulen gegeben wurden, die zuvor bei pH 6.5, 6.9 oder 7.4 mit 100 mM MOPS/KOH (plus Sucrose) äquilibriert worden waren. Die Verwendung oben genannter Ionophore sollte dabei den pH in den Liposomen dem externen pH angleichen ($\Delta pH = 0$).

Kinetische Analyse des Asp/Glu-Carriers in Mitochondrien: Variation der internen Substratkonzentrationen

Mitochondrien aus Herzen von Wistar-Ratten wurden nach der Vorschrift von Tyler & Gonze (1967) präpariert. Ohne weitere Behandlung enthielten diese Mitochondrien interne Konzentrationen an Aspartat und Glutamat von ca. 6 bzw. 2.5 mM. Um Glutamat-verarmte und Aspartat-beladene Mitochondrien zu erhalten, wurden von Sluse et al. (1990) mehrere Verfahren entwickelt, die hier nur kurz erwähnt werden sollen.

(a) Die Malat-Inkubation führte zu Mitochondrien mit hoher Aspartat- (5.0 ± 1.2 mM) und niedriger Glutamatkonzentration (0.36 ± 0.08 mM). Der Gehalt an Glutamat in der Matrix wurde reduziert durch 30 Min Inkubation bei 0°C in Isolationsmedium mit 20 mM Tris/HCl (pH 7.4) und 5 mM Malat. Das durch die Oxidation des aufgenommenen Malats produzierte Oxalacetat wird in der Matrix durch Glutamat zu Aspartat und α -Ketoglutarat transaminiert. Letzteres wird metabolisiert.

(b) Die α -Ketoglutarat- plus Malat-Inkubation führte zu einem mittleren Aspartat-Gehalt. Werden vor der Malat-Inkubation die Mitochondrien 30 Min in Isolationsmedium mit 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 5 mM α -Ketoglutarat und 1 mM Arsenit inkubiert, so verschiebt das aufgenommene α -Ketoglutarat das Gleichgewicht der von der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase katalysierten Reaktion. Folglich wird Aspartat zu Oxalacetat und schließlich zu Malat umgewandelt mit einem parallelen Anstieg des Glutamats, das durch den Glutamat/ OH^- -Carrier ins Medium abgegeben werden kann. Die α -Ketoglutarat-Inkubation reduzierte den Gesamtpool an Aspartat plus Glutamat, und die folgende Malat-Inkubation erniedrigte (wie in (a)) den Gehalt an Glutamat (0.18 ± 0.07 mM) bei gleichzeitigem Anstieg von Aspartat (3.3 ± 1.0 mM).

(c) Die Depletierungsininkubation führte zu Mitochondrien mit niedrigem Aspartat-Gehalt. Die von Sluse et al. (1979) beschriebene Behandlung zur Depletierung an Malat durch Inkubation für 10 Min bei 25°C in einem Malat-freien Medium führte ebenso zu einer Abnahme an Aspartat (0.98 ± 0.34 mM) und Glutamat (0.07 ± 0.01 mM). Die Anwesenheit von 0.6 mM Arsenit, 12.5 μ g/ml Rotenon und 0.11 mM Mersalyl im Depletierungsmedium erwies sich als notwendig. Kontrollversuche zeigten, daß Mersalyl allein

nur in millimolaren Konzentrationen zu einem Efflux an Aspartat und Glutamat führen kann, eine Wirkung, die vermutlich auf die Modifizierung von SH-Gruppen des Asp/Glu-Carriers zurückzuführen ist (s. 7).

Die jeweils angegebenen Konzentrationen an Substraten des Asp/Glu-Carriers konnten bei allen drei Inkubationen nur erreicht werden, wenn im Anschluß daran die Glutamat-Verarmung unter Ausnutzung des Heteroaustausches $\text{Aspartat}_{\text{ex}}/(\text{Glutamat-H}^+)_{\text{in}}$ noch verbessert wurde. Dazu wurden die jeweiligen Präparationen für 30 Min bei pH 7.4 und 0°C in Isolationsmedium mit 20 mM Tris/HCl, 10 mM Aspartat und 2 mM Aminoxyacetat, einem Transaminase-Inhibitor, inkubiert. Unter diesen Bedingungen sank der Glutamatgehalt vor allem in den Präparationen (b) und (c), so daß er in jedem Fall unterhalb von 8% des Aspartatgehalts lag (bei hoher, mittlerer und niedriger Konzentration). Alle mitochondrialen Präparationen wurden schließlich in einem großen Volumen Isolationsmedium (mit 2 mM Aminoxyacetat) gewaschen, um eine Kontamination mit Aspartat im extra-Matrixraum zu eliminieren.

Der Aspartat- und Glutamat-Gehalt der Mitochondrien-Matrix wurde nach Perchlorat-Extraktion sedimentierter Mitochondrien bestimmt. Eine Probe (1 µl) des Extraktionsüberstandes, nach Neutralisation mit Carbonat/KOH, wurde auf eine reversed-phase-Säule aufgetragen (Merck Licrospher RP-18, 3 x 150 mm). Die Trennung der Aminosäuren - nach Vorsäulen-Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd - wurde mit Hilfe eines HPLC-Gradientensystems (HP 1090M, Hewlett Packard) entsprechend dem Protokoll von Jones & Gilligan (1983) durchgeführt. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch. Aus den Meßwerten ließen sich interne Konzentrationen berechnen. Grundlage dafür war die Kenntnis der echten Matrixvolumina, die aus dem $^3\text{H}_2\text{O}$ -Gehalt des Mitochondrien-Sediments unter Berücksichtigung des [^{14}C]Sucrose-zugänglichen Raums bestimmt wurden (Klingenberg & Pfaff 1967).

Kinetische Analyse des Asp/Glu-Carriers in Mitochondrien: Entwicklung einer Inhibitor-Stopp-Technik

In der jeweiligen Mitochondrienpräparation (0.5 mg Protein) wurde der Aspartat/Aspartat-Austausch durch Messung der [^{14}C]Aspartat-Aufnahme verfolgt. Dies geschah bei 2°C und pH 7.4 sowie in Anwesenheit von 2 mM Aminoxyacetat, 2 mM Cycloserin, Rotenon (4 µg/mg Protein) und Antimycin (6 µg/mg Protein). Der experimentelle Aufbau entsprach dem von Sluse et al. (1979) beschriebenen. Markiertes Aspartat und Stopp-Inhibitor (23 mM Pyridoxalphosphat) wurden mit HAMILTON-Pipetten (CR-700) zugesetzt, die ein sofortiges Mischen ermöglichten.

Bei Anwendung oben genannter Inhibitoren entsprach die Aufnahme von [^{14}C]Aspartat dem intern verfügbaren Aspartatgehalt (s. Abb.3 B, 2 nmol/µl). Folglich wurde das aufgenommene [^{14}C]Aspartat nicht metabolisiert, wie in Abwesenheit der Hemmstoffe zu beobachten war. Nach mehr als 30 Min stellte sich ein stabiles Isotopengleichgewicht ein (s. Abb.3 B). Wenn Pyridoxalphosphat 5 s vor dem markierten Aspartat zugesetzt wurde, entsprach die Radioaktivität in den sedimentierten Mitochondrien lediglich dem Aspartat im Sucrose-zugänglichen Raum. Diese Menge [^{14}C]Aspartat wurde von allen anderen Meßwerten abgezogen. Der Stopp-Inhibitor führte also zu einer kompletten Blockierung der Substrataufnahme. Trotzdem war der Transport nicht gleich null, wenn Pyridoxalphosphat und Substrat gleichzeitig zugesetzt wurden. Die Stoppverzögerung war jedoch selbst bei den höchsten externen Aspartatkonzentrationen geringer als 5 s (s. Ergebnisse). Danach wurde keine zusätzliche Aufnahme mehr festgestellt.

3.3 Ergebnisse

Die Transportaktivität des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers sollte als erleichterte Diffusion unabhängig von $\Delta\Psi$ oder ΔpH untersucht werden. Durch Anwendung von Valinomycin und Nigericin (s. 3.2) wurde eine vollständige elektrochemische Äquilibration der Liposomenmembran erreicht (pH 6.5). Nach Zugabe von markiertem Substrat zu aktiven Proteoliposomen stellte sich im Austausch-Gleichgewicht eine Isotopenverteilung ein, die allein vom Verhältnis des internen und externen Substratpools abhing (Gl. 2.2). Wegen des geringen aktiven Innenvolumens der Proteoliposomen erlaubte es die Vortausch-Meßtechnik, die Substratkonzentration extern nur bis maximal 0.5 mM zu variieren, um bei sättigender Konzentration an internem Substrat (16 mM) noch zuverlässige Transportraten aus der Aufnahme von ^{14}C -Substrat bestimmen zu können. Unter diesen Bedingungen pseudo-erster Ordnung wurden K_m -Werte von 50 μM für externes Aspartat und 250 μM für externes Glutamat ermittelt (Tab.I). Die erhaltenen Werte waren generell unabhängig von der Art des zweiten Substrats (Aspartat oder Glutamat) auf der anderen Seite der Membran (nicht gezeigt).

Für die Bestimmung der internen K_m -Werte ist prinzipiell die Rücktausch-Technik zu bevorzugen, da - gerade umgekehrt wie beim Vortausch - der Flux (hier Export) von markiertem Substrat umso besser gemessen werden kann, je höher die externe Substratkonzentration ist; im Gleichgewicht gilt ebenfalls Gl. 2.2. So kann auch bei geringen internen Konzentrationen eine Sättigung mit externem Substrat gewährleistet werden. Abb.1 zeigt Eadie-Hofstee-Auftragungen der Austauschaktivität in Abhängigkeit von der internen Substratkonzentration. Der K_m -Wert für die Substrate Aspartat und Glutamat lag in beiden Fällen bei ca. 3 mM (Abb.1 A). Dieser Konzentrationsbereich ($\geq 1\text{ mM}$) war auch einer Untersuchung mit der Vortausch-Technik zugänglich, wenn extern die Substratkonzentration auf 0.4 mM gesenkt wurde. Abb.1B belegt eine nahezu perfekte Übereinstimmung der Ergebnisse, die mit den beiden alternativen Methoden gewonnen wurden.

3.3.1 Asymmetrische Insertion des Carrierproteins in die Liposomenmembran

Die deutlich verschiedenen K_m -Werte hinsichtlich der beiden Seiten des Asp/Glu-Carriers wurden als Indikatoren seiner Orientierung in der Membran betrachtet. Bei statistischer Orientierung sollten höher- und nieder-affine Bindungsstellen intern wie extern in ungefähr gleichen Anteilen zu finden sein. Dies experimentell zu überprüfen bedeutete vor allem eine methodische Herausforderung. Um die seitenspezifische Verteilung der gemessenen Transportaffinitäten zu quantifizieren, mußten die Substratkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran über einen weiten Bereich variiert werden, da in einem Experiment beide K_m -Werte erfaßbar sein sollten. Diese Forderung konnte nur durch zuverlässige Rücktausch-Kinetiken erfüllt werden. Es zeigte sich, daß bei Anwendung dieser Technik intern wie extern eine Limitierung nur bei tiefer Substratkonzentration ($\leq 200\text{ }\mu\text{M}$) gegeben war. Dabei war es äußerst wichtig, die Grundefflux-Aktivität des Carriers (vgl. 7.) durch DTNB zu blockieren, um eine Änderung der internen Substratkonzentration während der Gelfiltration der Liposomen zu unterdrücken. Vor Beginn der Transportmessung wurde der Carrier mit DTE reaktiviert (s. 2.3).

Tab.I: Transport-Affinitäten des mitochondrialen Asp/Glu-Carriers: Vergleich des nativen und des rekonstituierten Proteins.

Membran- seite	Substrat	rekonstituierter <u>Asp/Glu-Austausch (pH 6.5)</u>		Mitochondrien	
		Vortausch	Rücktausch		
		K_m (mM)			
intern	Aspartat	3	3	0.055	(pH 6.0) ^a
				5.0	(pH 7.2) ^b
	Glutamat	3	3	0.5	(pH 7.4) ^c
extern	Aspartat	0.05	n.b. ^d	3.5	(pH 7.2) ^f
	Glutamat	0.25	0.16	3.0	(pH 6.4) ^e
				5.8	(pH 7.2) ^g

^a Bestimmt in submitochondrialen Partikeln aus Rattenherz, Aufnahme von markiertem Aspartat (LaNoue et al. 1979).

^b Bestimmt in Rattenleber-Mitochondrien, Export von Aspartat in Abhängigkeit von internem Aspartat (Murphy et al. 1979).

^c Siehe Fußnote (a), aber Bestimmung von K_i (kompetitive Inhibition, LaNoue et al. 1979).

^d Kann im Rücktausch nicht bestimmt werden.

^e Bestimmt in Rattenherz-Mitochondrien, Atmung in Abhängigkeit von zugesetztem Glutamat (LaNoue et al. 1979).

^f Siehe Fußnote (e), aber Bestimmung von K_i (nicht-kompetitive Inhibition, LaNoue & Tischler 1976).

^g Bestimmt in Rattenleber-Mitochondrien, Export von Aspartat in Abhängigkeit von zugesetztem Glutamat (Murphy et al. 1979).

Tab.II: Vergleich der Transportraten aus Vortausch- und Rücktausch-Experimenten. Austauschraten wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Proteoliposomen bestimmt, wobei ein weiterer Konzentrationsbereich abgedeckt wurde (0.5 bzw. 0.25 mM bis 20 mM). Vortausch-Aktivitäten (v_f) wurden direkt als Anfangsraten bestimmt, wie unter Methoden beschrieben. Rücktausch-Aktivitäten (v_b^*) hingegen errechneten sich durch Multiplikation der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_b mit dem internen Substratpool (s. Text). Dessen Größe basiert auf einem uniformen aktiven Innenvolumen der Liposomen von 2 μ l per ml Meßansatz (s. Text), was ungefähr 0.25 μ l/mg Phospholipid entspricht. Die Indizes der Symbole dienen nur der Kenntlichmachung der Transport-Richtung.

externes Aspartat (mM)	0.5 mM internes Aspartat			20 mM internes Aspartat		
	k_b (1/min)	v_b^* (μ M/min)	v_f (μ M/min)	k_b (1/min)	v_b^* (μ M/min)	v_f (μ M/min)
0.25	0.37	0.37	0.74	0.11	4.4	8.9
0.5	0.51	0.51	1.2	0.14	5.6	10.7
20	0.69	0.69	n.b. ^a	0.16	6.4	n.b. ^a

^a Kann im Vortausch nicht bestimmt werden.

Tab.II vergleicht die Transportaktivitäten aus Vortausch- und Rücktausch-Messungen, die mit denselben Liposomenpräparationen ermittelt wurden. Absolute Rücktausch-Geschwindigkeiten (v_b^*) wurden berechnet nach $v_b^* = k_b \cdot S_{in} V_{in}$ (vgl. Gl. 2.5), wobei ein aktives Liposomen-Innenvolumen (V_{in}) von 2 $\mu\text{l/ml}$ zugrunde gelegt wurde, wie sich aus (Vortausch-) Messungen der Isotopenäquibrierung ergab (Gl. 2.7). Es zeigte sich, daß die 'Rücktausch-Raten' etwa um den Faktor 2 unter den 'Vortausch-Raten' (v_f) lagen, ein systematischer Fehler, der unabhängig von den jeweiligen Substratkonzentrationen war (Tab.II). Dies beruhte vor allem auf der zusätzlichen Verdünnung der Liposomen während der zweiten Gelfiltration (Faktor ≥ 1.5). Außerdem mußte eine Unterbestimmung des aktiven Innenvolumens berücksichtigt werden, hervorgerufen durch einen leichten Efflux von internem Substrat, der bei Gleichgewichtsmessungen nicht zu vernachlässigen war (vgl. 7.). Die Konstanz des Faktors zwischen Vortausch- und Rücktausch-Raten selbst bei unterschiedlichsten Substratgradienten versprach jedoch zuverlässige K_m -Bestimmungen auch bei hohen externen wie internen Substratkonzentrationen, wo mit der Vortausch-Technik keine Transportmessungen möglich waren.

Die Analyse der Carrierorientierung konzentrierte sich auf den Glutamat/Glutamat-Homöo-austausch. Der höhere K_m -Wert für externes Glutamat (0.2 mM) im Vergleich zu Aspartat (0.05 mM) war besser geeignet, um die - bei statistischer Orientierung - erwarteten zusätzlichen Bindungsstellen mit ähnlicher Affinität an der Innenseite des Carriers nachzuweisen. Zwei repräsentative Experimente dieser Art sind in Abb.2 in Form von Eadie-Hofstee-Diagrammen wiedergegeben. Für die Bestimmungen des internen und externen K_m -Werts war über den gesamten Konzentrationsbereich von 0.3 bis 10 mM bzw. von 0.25 bis 20 mM nur jeweils eine kinetische Komponente auszumachen, wie der monophasische Kurvenverlauf anzeigt. Die aus der Steigung ermittelten K_m -Werte (intern 2.5 mM, extern 0.16 mM) stimmen mit den oben angegebenen gut überein und müssen daher als spezifisch und ausschließlich für die entsprechende Seite des rekonstituierten Proteins angesehen werden. Wie in Abb.2 zu erkennen, bewirkte eine Erhöhung der externen Glutamatkonzentration von 1 auf 20 mM nur eine geringfügige Erhöhung der Transportaktivität, wodurch ein externer K_m -Wert im millimolaren Bereich definitiv ausgeschlossen werden kann. Andererseits waren alle Anstrengungen vergeblich, einen niedrigen K_m -Wert auf der Innenseite nachzuweisen. Allerdings verbleibt in dieser Hinsicht eine leichte Ungewißheit, da im wichtigen Konzentrationsbereich unter 0.3 mM eine exakte Messung der Transportaktivität nicht mehr möglich war. Diesen Umstand illustriert Abb.2 durch einen stark abweichenden Punkt bei 0.15 mM internem Glutamat, was offensichtlich bereits außerhalb des zuverlässigen Bereichs dieser Methode lag. Eine Proteinorientierung mit gemischten Affinitäten auf der Innenseite bei homogener Affinität auf der Außenseite erscheint jedoch wenig sinnvoll. Die Ergebnisse von Abb.2 belegen also, daß der Asp/Glu-Carrier durch die angewendete Rekonstitutionsmethode asymmetrisch in die Liposomenmembran eingebaut wurde.

3.3.2 Right-side-out-Orientierung des rekonstituierten Carrierproteins

In Tab.I ist der komplette Satz an Transportaffinitäten für Aspartat und Glutamat sowohl an der Innen- wie an der Außenseite der Liposomenmembran zusammengefaßt. Diese Daten werden mit den K_m -Werten verglichen, die in der Literatur für intakte Mitochondrien oder invertierte submitochondriale Partikel angegeben wurden. Legt man die Affinitäten für Glutamat auf der Cytosol- (3 mM) und für Aspartat auf der Matrixseite zugrunde (55 μM), die von LaNoue et al. (1979) in Mitochondrien bzw. submitochondrialen Partikeln aus

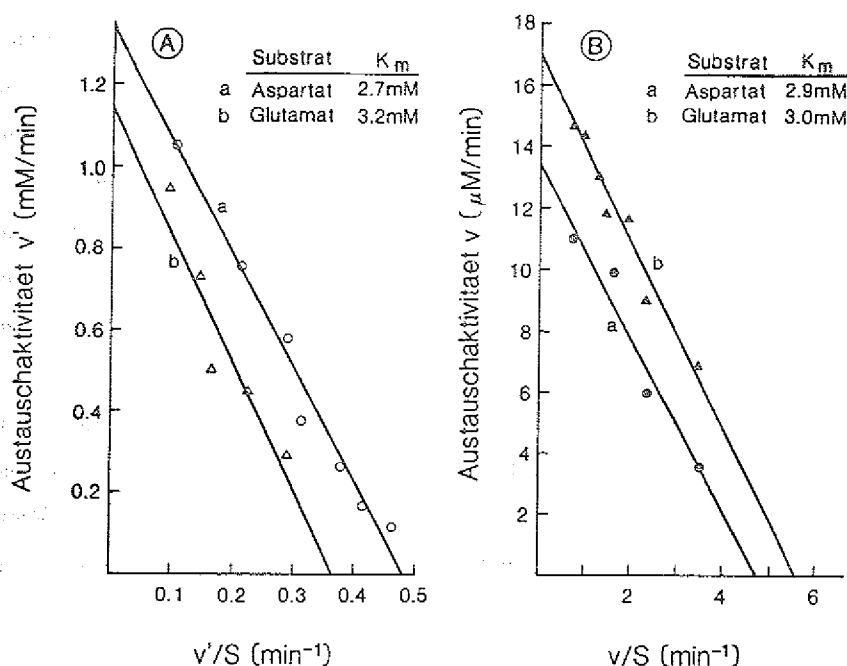


Abb.1: Transport-Affinitäten des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers an der Membran-Innenseite. Die gezeigten Eadie-Hofstee-Diagramme wurden erhalten aus Rücktausch- (A) und Vortausch-Messungen (B) der Transportaktivität unter Variation der internen Substratkonzentration (○, ●, Aspartat; △, ▲, Glutamat). Zur Definition von v' siehe Gl. 2.6. Die Substratkonzentrationen waren wie folgt. A: ○, 8 mM externes und 0.25-10 mM internes Aspartat; △, 8 mM externes Glutamat und 1-10 mM internes Glutamat. B: 0.4 mM externes Aspartat in beiden Experimenten, 1-15 mM internes Aspartat (●) bzw. 2-20 mM internes Glutamat (▲). Die ermittelten K_m -Werte sind angegeben.

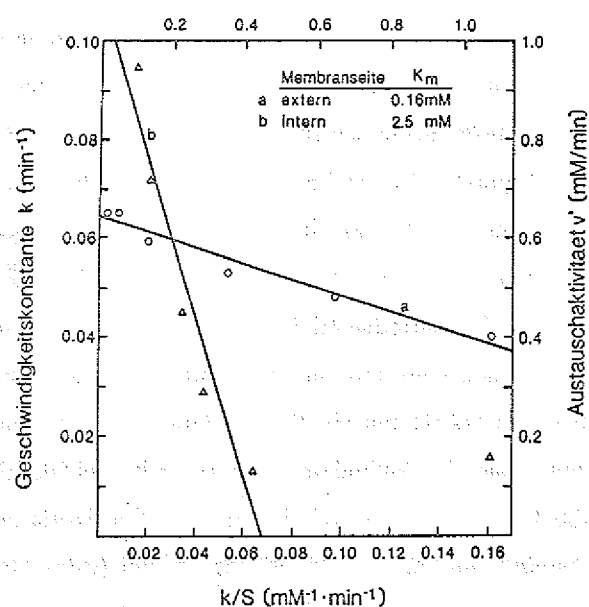


Abb.2: Funktionelle Analyse der Proteinorientierung. Um die seitenspezifische Verteilung der höher- und nieder-affinen Bindungsstellen aufzuklären, wie zunächst nur an der externen bzw. internen Membranseite gefunden (Abb.1), wurden die Transport-Affinitäten diesmal so bestimmt, daß in einem Experiment die externe und interne Substratkonzentration über einen Bereich variiert wurde, der beide K_m -Werte umfaßte. Die gezeigten Eadie-Hofstee Diagramme wurden aus Rücktausch-Messungen der Geschwindigkeitskonstanten k in Abhängigkeit von externem (○) und internem (△) Glutamat erhalten. Zur Definition von v' siehe Gl. 2.6. Die Glutamat-Konzentrationen waren wie folgt: ○, 16 mM innen und 0.25-20 mM außen; △, 0.15-10 mM innen und 5 mM außen. Die berechneten K_m -Werte sind angegeben.

Rattenherz ermittelt wurden, so ergeben sich sehr gute Übereinstimmungen unter Annahme einer inside-out-Orientierung des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers. Diese Schlußfolgerung stützt sich jedoch allein auf die niedrigen, d. h. submillimolaren K_m - und K_i -Werte für Matrix-Aspartat bzw. -Glutamat, die auf der Außenseite von submitochondrialen Partikeln gefunden wurden (Tab.I). Das Ausmaß der Inversion der Partikel wurde in den zitierten Arbeiten aber nicht explizit angegeben. Die Arbeitsgruppe von Williamson dagegen fand in intakten Rattenleber-Mitochondrien einen K_m -Wert für Matrix-Aspartat von 5 mM und für cytosolisches Glutamat von 5.8 mM (Tab.I). Diese Daten helfen bei der Frage der Orientierung des rekonstituierten Carriers allerdings nicht weiter.

Angesichts solcher Diskrepanzen erschien es notwendig, den Asp/Glu-Carrier auch in intakten Mitochondrien zu untersuchen und direkte Vergleiche zum Liposomensystem anzustellen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. F. Sluse (Lüttich) wurden Experimente mit intakten Rattenherz-Mitochondrien durchgeführt. Um aus den kinetischen Messungen möglichst eindeutige Ergebnisse zu erhalten, wurden einfachste Bedingungen gewählt und der elektroneutrale Aspartat/Aspartat-Homöo-austausch untersucht. Durch Verwendung von Aspartat-beladenen und Glutamat-verarmten Mitochondrien (s. 3.2) konnte eine Netto-Aufnahme von Aspartat aus dem Inkubationsmedium (im Austausch für Matrix-Glutamat) unterdrückt und eine Änderung der Substratkonzentrationen während der Transportmessung vermieden werden. Der Metabolismus von Aspartat wurde effektiv blockiert durch Messung bei 2°C und durch Anwendung verschiedener Inhibitoren der Transaminierung und Atmung (s. 3.2).

Für die kinetischen Studien wurde unter Anwendung von Pyridoxalphosphat eine Inhibitor-Stopp-Technik entwickelt, so daß eine zufriedenstellende kinetische Auflösung erreicht werden konnte (Stopp-Verzögerung ≤ 5 s, s. 3.2). Bestimmungen der Austauschraten vom ersten linearen Bereich der [^{14}C]Aspartat-Aufnahme waren aber nur mit relativ geringer Genauigkeit möglich. Dies wird in Abb.3 illustriert, wo der [^{14}C]Aspartat-Gehalt der - nach Gabe von Pyridoxalphosphat - sedimentierten Mitochondrien gegen die Zeit aufgetragen wurde, gemessen für drei externe Aspartatkonzentrationen (80, 234 und 900 μM) bei 4.9 mM internem Aspartat. Die Anfangsphase der Aufnahmekurve verlief für etwa 20-30 s linear (Abb.3A). Aus den Steigungen errechneten sich für die drei angegebenen Aspartatkonzentrationen Raten von 1.61 ± 0.11 , 3.16 ± 0.27 und 5.11 ± 1.53 pmol/s pro μl Mitochondrien. Es wird jedoch deutlich, daß die Genauigkeit der Steigungen nicht befriedigend ist und daß der Fehler mit der externen Substratkonzentration ansteigt. Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, daß das eigentliche Meßsignal, nämlich die Aufnahme [^{14}C]Aspartats in die Matrix, nur ein Teil der Gesamtradioaktivität im Mitochondrien-Sediment ist und daß dieser Teil mit steigender Außenkonzentration sinkt (bei 900 μM nur 22%, gemessen nach 20 s Inkubationsdauer). In Abb.3A ist dies an der relativ hohen Radioaktivität bei $t=0$ zu erkennen, welche hauptsächlich auf das [^{14}C]Aspartat im Sucrose-zugänglichen Raum (extra-Matrix Raum) des Sediments und in geringerem Ausmaß ($\leq 13\%$) auf die Stopp-Verzögerung des Inhibitors zurückzuführen ist.

Aus diesen Ergebnissen ließen sich folgende Schlüsse ziehen: (a) Die Aktivität des Carriers bei 2°C ist relativ gering. Die Isotopenäquilibration kann 30-60 Minuten in Anspruch nehmen (Abb.3B). (b) Der externe K_m für Aspartat, berechnet aus Abb.3A, liegt im Bereich von 200-300 μM . (c) Um die Genauigkeit der Messungen bei intern niedrigen und/oder extern hohen Konzentrationen zu erhöhen, mußte das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Deshalb versuchten wir, den vollständigen Verlauf der [^{14}C]Aspartat-Aufnahmekurve zur Auswertung heranzuziehen.

Unter Homoaustausch-Bedingungen bleiben die Substratkonzentrationen in beiden Kompartimenten konstant. Somit kann die gesamte Progressionskurve der $[^{14}\text{C}]$ Aspartat-Aufnahme bis zum Gleichgewicht benutzt werden, um die tatsächliche steady-state-Anfangsrate zu berechnen. Wenn man die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ Aspartat im Gleichgewicht (Y_{eq}) kennt, lässt sich die Progressionskurve wie folgt linearisieren:

$$Z = Y_{\text{eq}} \ln \frac{Y_{\text{eq}}}{Y_{\text{eq}} - Y_t} = vt \quad (\text{Gl. 3.1}),$$

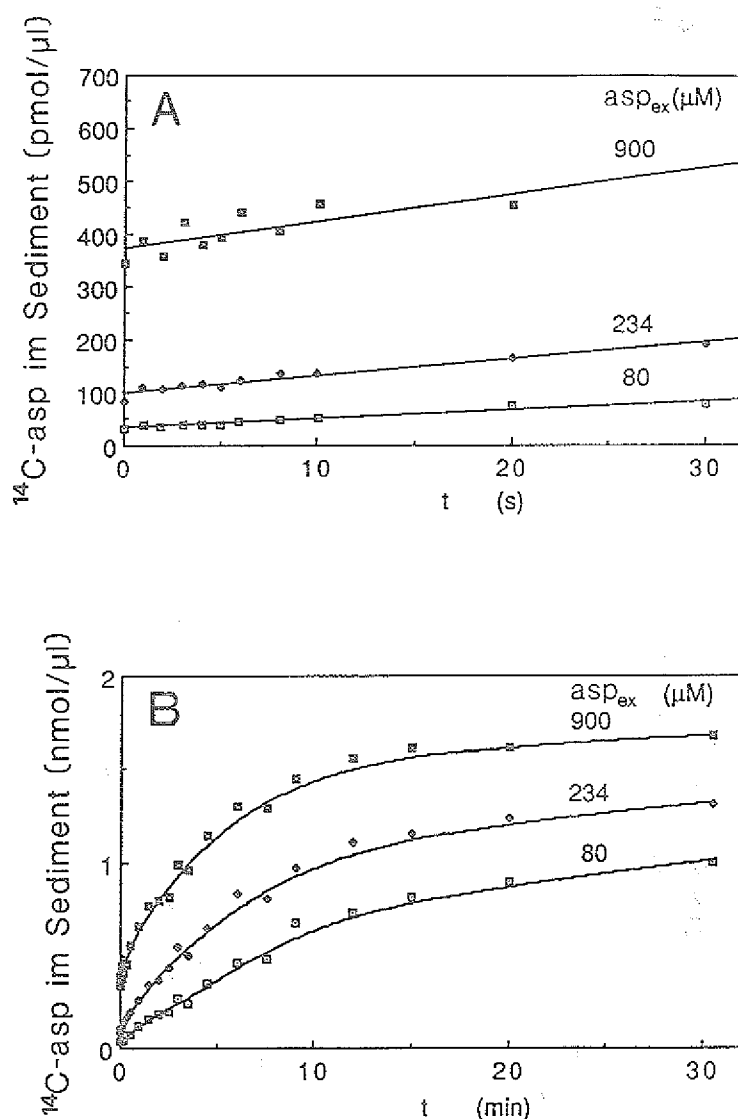


Abb.3: Anfangsraten und vollständige Progressionskurven des Aspartat/Aspartat-Austauschs in Rattenherz-Mitochondrien. A. Linearer Bereich des $[^{14}\text{C}]$ Aspartat_{ex}/Aspartat_{in}-Austauschs; interne Aspartatkonzentration 4.92 mM, interne Glutamatkonzentration 0.47 mM. Externe Aspartatkonzentrationen sind angegeben. Die Aspartat-Aufnahme bei $t = 0$ (simultane Injektion von Aspartat und 23 mM Pyridoxalphosphat) entspricht dem Aspartat-Gehalt im Sucrose-zugänglichen Raum und zusätzlich der Restaufnahme nach Injektion des Inhibitors (nicht korrigiert). B. Dasselbe Experiment wie A, Daten für längere Inkubationszeiten gezeigt (vollständige Progressionskurven).

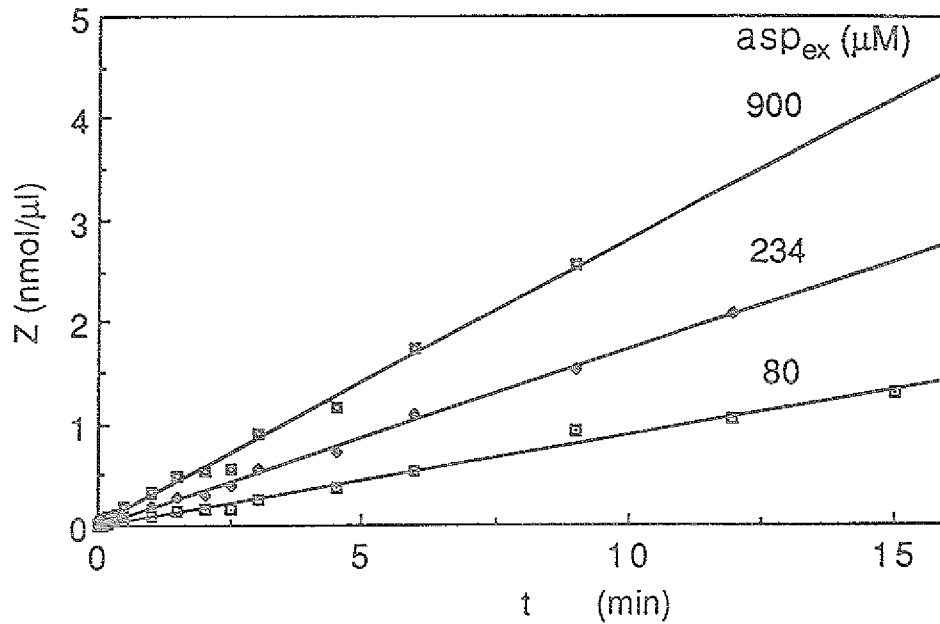


Abb.4: Bestimmung von Transportraten aus Progressionskurven. Die Z-Werte (siehe Text) wurden aus den Progressionskurven der Abb.3B berechnet. Die Anfangsraten, die sich aus der Steigung der Geraden ableiten, sind im Text angegeben.

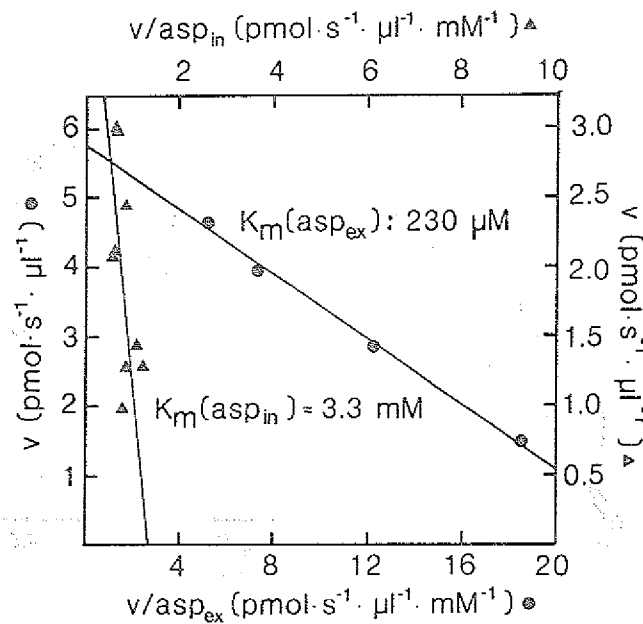


Abb.5: Bestimmung der Transport-Affinitäten des Asp/Glu-Carriers für Aspartat auf Matrix- und Cytosol-seite von Rattenherz-Mitochondrien. Vollständige Progressionskurven wurden bei verschiedenen Konzentrationen an externem (80-900 μM , ●) und internem Aspartat (1.0-4.7 mM, ▲) gemessen (2°C, pH 7.4). Die Konzentration an Aspartat im jeweils anderen Kompartiment betrug 4.9 mM intern (●) bzw. 0.18 mM extern (▲). Mit Hilfe der Z-Funktion (Gl. 3.1) wurden Anfangsraten berechnet (s. Abb.4). Aus den gezeigten Eadie-Hofstee Diagrammen ergibt sich ein K_m für cytosolisches Aspartat von 232 μM und für Matrix-Aspartat von 3.3 ± 1.6 mM.

wobei Y_t die Aufnahme nach der Inkubationszeit t ist (Aufnahme bei $t=0$ abgezogen). Z läßt sich verstehen als Aufnahme, die für die Variation (während der Isotopen-Äquilibration) der spezifischen Radioaktivität des externen und internen Aspartats korrigiert wurde. Die Rate v stellt die Geschwindigkeit der unidirektionalen Aspartat-Aufnahme (nicht nur der Markierung) dar, die natürlich während des gesamten Experiments konstant bleibt (s. Abb.4).

Abb.3B zeigt die Progressionskurven für dieselben Mitochondrien-Präparationen wie in Abb.3A und für die gleichen internen und externen Aspartatkonzentrationen. Y_{eq} war $1.25 \text{ nmol}/\mu\text{l}$, was gut übereinstimmt mit dem theoretischen Wert, der sich aus der Größe des externen und internen Substratpools errechnen läßt. In Abb.3B - wie in Abb.3A - wurde die Markierung im Sediment bei $t=0$ nicht abgezogen, um aufzuzeigen, daß diese Menge im Vergleich zu Y_{eq} gering ist und daß somit das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert wurde.

Die Linearisierung der Progressionskurven entsprechend Gl. 3.1 ist in Abb.4 dargestellt, wo Z gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die perfekte Linearität beweist, daß die Progressionskurve durch eine einfache Exponentialgleichung exakt beschrieben werden kann. Aufgrund dieser methodischen Verbesserung konnten wesentlich präzisere Raten aus den Steigungen ermittelt werden: 1.48 ± 0.03 , 2.86 ± 0.03 und $4.65 \pm 0.06 \text{ pmol/s pro } \mu\text{l}$ für 80, 234 bzw. 900 μM externes Aspartat. Das aus diesen Daten resultierende Eadie-Hofstee-Diagramm zeigt Abb.5. Es ergab sich ein K_m -Wert für externes Aspartat von 230 μM . Weitere Messungen führten zu einem statistisch abgesicherten Wert von $216 \pm 23 \mu\text{M}$ (Tab.IV).

Der K_m -Wert für Matrix-Aspartat konnte ermittelt werden durch Variation der Konzentration im Bereich von 1-5 mM (s. 3.2) bei konstantem externen [^{14}C]Aspartat (180 μM). Abb.5 zeigt die aus linearisierten Progressionskurven abgeleiteten Austauschraten in reziproker Darstellung. Die Streuung der Punkte ist darauf zurückzuführen, daß jede einzelne Rate notwendigerweise mit einer anderen Mitochondrien-Präparation bestimmt werden mußte. Trotzdem ergab sich eine lineare Abhängigkeit, die zu einem internen K_m von ca. 3 mM führte. Auch dieser Wert konnte weiter abgesichert werden, wobei ein recht verlässlicher K_m von $2.4 \pm 0.5 \text{ mM}$ erhalten wurde (Tab.IV). Die starke Asymmetrie des Carriers hinsichtlich seiner Affinitäten auf beiden Seiten der Membran geht direkt aus der unterschiedlichen Steigung der Geraden im Eadie-Hofstee-Diagramm hervor (Abb.5).

Um diese Ergebnisse aus intakten Mitochondrien besser mit den in Tab.I aufgelisteten K_m -Werten aus Liposomen vergleichen zu können, mußte noch ein wesentlicher Faktor berücksichtigt werden. Es stellte sich heraus, daß der pH-Wert einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf die K_m -Bestimmungen hatte. Daher wurde die Affinität des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers für Aspartat statt bei pH 6.5 nun bei pH 7.4 ermittelt, dem pH-Wert, der auch für die Messungen mit intakten Mitochondrien eingestellt worden war. Um Schwierigkeiten mit pH-Gradienten zu vermeiden, wurde der pH in beiden Kompartimenten parallel eingestellt (s. 3.2). Wie Tab.III verdeutlicht, war an der Liposomen-Außenseite ein signifikanter Anstieg des K_m -Wertes mit dem pH von 44 μM (pH 6.5) auf 123 μM (pH 7.4) zu beobachten. Die internen Werte hingegen lagen bei pH 6.5, 6.9 und 7.4 stets im Bereich von 3 mM. Bei pH 7.4 ist also eine sehr enge Korrelation zu den Transportaffinitäten festzustellen, die in intakten Rattenherz-Mitochondrien bestimmt wurden (Tab.IV), wodurch die right-side-out-Orientierung des rekonstituierten Carrierproteins klar belegt wird.

3.4 Diskussion

Um die transmembrane Topologie des rekonstituierten Carrierproteins funktionell zu analysieren, mußten Ergebnisse aus Vor- und Rücktausch-Experimenten herangezogen werden. Die Kompatibilität dieser beiden Methoden zur Messung des Substratfluxes wurde daher grundlegend überprüft. Mit Hilfe eines Computerprogramms konnte gezeigt werden, daß sich die Isotopenäquilibration in Vor- und Rücktausch-Messungen mit einer einfachen Exponentialgleichung beschreiben läßt - im Einklang mit theoretischen Überlegungen (Gl. 2.1 und Gl. 2.4). Zwar war die Berechnung absoluter Rücktausch-Raten mit einem gewissen systematischen Fehler behaftet (Tab.II), der wegen einer Unterbestimmung des aktiven Liposomenvolumens nicht korrigiert werden konnte, doch war dies für die Ermittlung der K_m -Werte belanglos, da hierzu relative Transportgeschwindigkeiten (v') ausreichten (Gl. 2.6). Abb.1 und Tab.I belegen eine gute Übereinstimmung der K_m -Werte, die in Vor- und Rücktausch-Experimenten erhalten wurden. Es ist - zumindest für Liposomensysteme - das erste Mal, daß die beiden klassischen Methoden zur Messung von carrier-vermitteltem Substrataustausch so detailliert gegenübergestellt wurden. Dies bedeutete in jedem Fall auch einen Vergleich von theoretischem Verständnis und praktischer Verifikation der Antiportfunktion.

Die grundlegende Übereinstimmung und wechselseitige Ergänzung beider angewendeter Techniken ermöglichte eine zuverlässige kinetische Charakterisierung. Die maximale Austauschrate betrug 25 $\mu\text{mol/min}$ pro 1 Liposomen, die ungefähr 10-20 mg rekonstituierten Asp/Glu-Carrier enthielten. Zum Vergleich sei hier auch die V_{max} des Carriers aus intakten Rattenherz-Mitochondrien genannt, die sich bei 2°C und pH 7.4 auf 2.8 nmol/min pro mg Protein belief. Die Transport-Affinitäten an der Außenseite der Liposomenmembran waren signifikant höher (K_m : 50 und 250 μM) als an der Innenseite (K_m : 3 mM) (Tab.I). In Kontrollexperimenten mit externen Substratkonzentrationen bis 20 mM konnte die Existenz eines zweiten externen K_m -Wertes im millimolaren Bereich definitiv ausgeschlossen werden. Dementsprechend fanden sich auch an der Membraninnenseite keine höher-affinen Bindungsstellen (Abb.2). Die erhaltenen Transport-Affinitäten können also als eindeutige Merkmale der beiden Membranseiten angesehen werden.

Diese hochpräferenzielle Orientierung ($\geq 85\%$) der aktiven Carriermoleküle in der Lipid-Doppelschicht schien genau entgegengesetzt zur Ausrichtung in Rattenherz-Mitochondrien zu sein, wie Tab.I zu entnehmen ist. Die von LaNoue et al. (1979) veröffentlichten Daten zur Affinität des Carriers für externes Glutamat (3.0 mM) und - in submitochondrialen Partikeln - für externes Aspartat (55 μM) stimmten überraschend genau überein mit unseren Werten für internes Glutamat (3 mM) bzw. externes Aspartat (50 μM). Wegen der Invertierung der submitochondrialen Partikel mußte der K_m von 50 μM der Matrixseite zugeschrieben werden. Auch der K_m für externes Glutamat in Proteoliposomen (ca. 200 μM) war nicht sehr verschieden vom K_1 -Wert für externes Glutamat (500 μM), das in submitochondrialen Partikeln die [^{14}C]Aspartat-Aufnahme kompetitiv inhibierte (LaNoue et al. 1979).

Die ebenfalls in Tab.I aufgelisteten K_m -Werte, die von Murphy et al. (1979) in intakten Rattenleber-Mitochondrien mit z.T. wesentlich direkteren Meßmethoden gewonnen wurden, widersprechen jedoch klar einem submillimolaren K_m auf der Matrixseite. Es entstand eine Kontroverse über die Tauglichkeit der unterschiedlichen Meßsysteme (submitochondriale Partikel bzw. intakte Mitochondrien) für die

Tab.III: Einfluß des pH auf die K_m -Werte des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers für externes und internes Aspartat. Austauschgeschwindigkeiten wurde mit der Vortausch-Methode als Aufnahme von [^{14}C]Aspartat ermittelt (externe K_m -Bestimmungen: 25-260 μM , interne K_m -Bestimmungen: 50 μM). Die Proteoliposomen enthielten 16 mM oder, im Falle der internen K_m -Bestimmungen, 1-9 mM Aspartat. Die K_m -Werte wurden aus reziproken Diagrammen ermittelt (Lineweaver-Burk oder Eadie-Hofstee) und sind als Mittelwert aus vier Bestimmungen angegeben. Die Einstellung des pH-Werts ist unter 3.2 beschrieben.

	pH	K_m extern (mM)	K_m intern (mM)
	6.5	0.044 ± 0.003	2.6 ± 0.3
	6.9	0.084 ± 0.008	3.7 ± 0.6
	7.4	0.123 ± 0.011	2.8 ± 0.6

Tab.IV: Michaelis-Konstanten (K_m) des mitochondrialen Asp/Glu-Carriers bei pH 7.4.

System	Substrat	Temperatur	K_m (mM)	
			Matrixseite	cytosolische Seite
Proteoliposomen, Carrier aus Rinderherz-Mitochondrien (Tab.III)	Aspartat	Raumtemp.	2.8 ± 0.6	0.123 ± 0.011
intakte Rattenherz-Mitochondrien (Abb.5)	Aspartat	2 $^{\circ}\text{C}$	2.4 ± 0.5	0.216 ± 0.023
intakte Rattenleber-Mitochondrien (pH 7.2) ^a	Aspartat	10 $^{\circ}\text{C}$	5.0	—
invertierte submitochondriale Partikel aus Rattenherz ^b	Aspartat	17 $^{\circ}\text{C}$	0.042	—
Proteoliposomen, Carrier aus Rinderherz-Mitochondrien ^c	Glutamat	Raumtemp.	—	1.81
intakte Rattenleber-Mitochondrien (pH 7.2) ^a	Glutamat	10 $^{\circ}\text{C}$	—	5.8

^a Murphy et al. 1979

^b LaNoue et al. 1979

^c Dierks et al. 1988

Bestimmung der Affinitätskonstanten auf der Matrixseite (Duszynski et al. 1978, LaNoue et al. 1979, LaNoue und Watts 1979, Murphy et al. 1979, Williamson et al. 1979). Wir selbst mußten feststellen, daß die kinetischen Untersuchungen zum Transportmechanismus, die LaNoue et al. (1979) in submitochondrialen Partikeln unternahmen, sehr unpräzise waren und deshalb zu falschen Ergebnissen führten (s. 4.). Doch auch die offensichtlich zuverlässigeren K_m -Werte aus intakten Rattenleber-Mitochondrien von Murphy et al. (1979) halfen in der Frage der Orientierung des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers nicht weiter, da die gemessenen Affinitäten auf Cytosol- und Matrixseite ungefähr gleich waren (5.8 bzw. 5.0 mM). Tatsächlich stellte sich auch in unseren Messungen mit Proteoliposomen heraus, daß bei dem von Williamson und Mitarbeitern (Murphy et al. 1979) verwendeten pH von 7.2 der K_m -Wert für externes Glutamat (1.8 mM, pH 7.4) nahe bei dem für internes Aspartat (2.8 ± 0.6 mM, pH 7.4) lag (Tab.IV). Infolge der Regulation des Glutamat/ H^+ -Cotransports durch den pH-Wert (s. 4.4) war nämlich ein deutlich höherer K_m für dieses Substrat zu messen.

Für die endgültige Klärung der transmembranen Proteinorientierung fehlten Daten zur Transport-Affinität des nativen Asp/Glu-Carriers für cytosolisches Aspartat, zumal dieser K_m -Wert einem erheblich geringeren pH-Einfluß unterlag (Tab.III). Die hier durchgeführten Experimente mit intakten Rattenherz-Mitochondrien lieferten einen Wert von 216 ± 23 μ M (pH 7.4). Wie in Proteoliposomen (123 ± 11 μ M) lag dieser K_m somit definitiv niedriger als der entsprechende K_m für Aspartat auf der Innenseite von Mitochondrien (2.4 ± 0.5 mM) und Liposomen (2.8 ± 0.6 mM) (Tab.IV). Diese Korrelation belegt eindeutig, daß das rekonstituierte Protein 'right-side out' orientiert ist. Die wirklich erstaunliche numerische Übereinstimmung läßt darauf schließen, daß die Transport-Affinitäten des Carriers aus verschiedenen Organismen (Rinder- bzw. Rattenherz) ähnlich sind und daß sie sich weder durch die Isolierung des Proteins noch durch verschiedene Temperaturen wesentlich verändern (Tab.IV). Der klar meßbare Einfluß des pH auf die K_m -Bestimmungen wurde berücksichtigt (Tab.III), was die Zuverlässigkeit dieses Vergleiches von Proteoliposomen und Mitochondrien erhöht.

Wie Tab.IV weiterhin zeigt, konnte somit auch der Konflikt zwischen den Arbeitsgruppen von LaNoue und Williamson zugunsten letzterer aufgelöst werden. Dies belegt die Signifikanz sorgfältiger kinetischer Studien, in denen das native und das rekonstituierte System vergleichend eingesetzt werden. Entscheidend dabei ist eine grundlegende methodische Absicherung, um auch in intakten Mitochondrien zu korrekten Austauschraten zu kommen, wie in 3.2 und 3.3.2 (Abb.3 und 4) beschrieben wurde. Zuverlässige Anfangsraten möglichst direkt zu ermitteln ist keineswegs trivial. Technische Probleme limitieren oft die Anwendbarkeit des kinetischen Ansatzes in Untersuchungen mitochondrialer Carrier. Die hier beschriebene gegenseitige Bestätigung der Resultate aus Mitochondrien und Proteoliposomen bedeutete eine gute Basis vor allem für die Erforschung des kinetischen Transportmechanismus und erhöhte die Relevanz der Ergebnisse für den Carrier in vivo (s. 4.). Die Aufklärung der right-side-out-Orientierung war außerdem von Interesse für die unidirektionale Exportaktivität des Asp/Glu-Carriers in Liposomen (s. 7.), welche so direkt mit den in Mitochondrien beobachteten Efflux-Phänomenen korreliert werden konnte. Der Befund der asymmetrischen Rekonstitution eines (relativ kleinen) Membranproteins wird in der allgemeinen Diskussion auch vor einem methodischen Hintergrund betrachtet und mit den verfügbaren Daten zur Orientierung anderer Membranproteine verglichen (s. 10.1).

4. Antiportfunktion des Asp/Glu-Carriers:

Aufklärung des Reaktionsmechanismus in Proteoliposomen und Mitochondrien (Dierks, Riemer & Krämer 1988; Dierks & Krämer 1989a; Sluse, Evens, Dierks, Duyckaerts, Sluse-Goffart & Krämer 1990)

4.1 Einleitung

Der kinetische Ansatz bietet in den allermeisten Fällen die wichtigste oder sogar einzige Möglichkeit, um den Mechanismus carrier-vermittelten Transports zu erhellen. Wegen fehlender Daten zur Raumstruktur der Carrierproteine kann die Kinetik immer nur ein mehr oder weniger detailliertes Funktionsmodell liefern, das die Carrier-Substrat-Wechselwirkung und u. U. auch die Transportschritte beschreibt. Die Gewinnung funktioneller Informationen aber kann, das zeigt die Literatur, mit großen methodischen Problemen verbunden sein, wobei die Komplexität des Meßsystems oft der limitierende Faktor ist. In mitochondrialen Membranen jedenfalls kam es stets zu äußerst verschiedenen Modellvorschlägen, wenn mehr als eine Arbeitsgruppe denselben Carrier kinetisch analysierte, was bisher für den ADP/ATP-Carrier (s. 4.4) und den Asp/Glu-Carrier zutrifft.

Im Falle des Asp/Glu-Carriers versuchten zwei Laboratorien, den Antiportmechanismus kinetisch zu beschreiben (LaNoue et al. 1979, Murphy et al. 1979). Zum einen wurden die Ergebnisse klassischer Bisubstrat-Analysen und Hemmkinetiken, die vor allem in submitochondrialen Partikeln von Rattenherz-Mitochondrien durchgeführt wurden, als Indizien für einen Ping-Pong-Mechanismus gewertet; dieser impliziert die Exponierung einer Bindungsstelle in alternierender Folge auf den beiden Seiten der Membran (LaNoue et al. 1979). Zum anderen wurden intakte Rattenleber-Mitochondrien untersucht und kinetische Muster erhalten, die einen sequentiellen Bisubstratmechanismus anzeigten; demzufolge wären zwei Bindungsstellen involviert, deren Besetzung zur Bildung eines ternären Komplexes führte (Murphy et al. 1979). In dieser Studie wurden jedoch keine Indizien erbracht, die die Reihenfolge der Bindungs- und Transportschritte beschrieben hätten, sondern es wurde lediglich postuliert, daß der ternäre Komplex nicht das Translokationsintermediat darstellt. Darüberhinaus wurde die Interaktion der beiden Substrate Aspartat und Glutamat mit dem Carrier sowohl als kompetitiv (LaNoue et al. 1979) als auch als nicht-kompetitiv klassifiziert (Tischler et al. 1976). Ebenso kontrovers war der Cotransport des Protons. La Noue et al. (1979) zeichnen ein Modell mit einer distinkten H^+ -Bindungsstelle, während Murphy et al. (1979) zu dem Schluß kamen, daß das Proton als Glu^-/H^+ gebunden wird. Ein weiterer Befund, der nicht verstanden wurde, betrifft die funktionelle Asymmetrie des Asp/Glu-Heteroaustausches in deenergetisierten Mitochondrien (Tischler et al. 1976).

Um diese ungelösten Fragestellungen zu klären, untersuchten wir den Asp/Glu-Antiport in erster Linie im rekonstituierten System. Dieses bietet neben der Eliminierung des mitochondrialen Stoffwechsels vor allem den für Bisubstratkinetiken entscheidenden Vorteil, das interne wie das externe Kompartiment experimentell nahezu beliebig variieren zu können. Mit der asymmetrischen Insertion des aktiven Carrierproteins in liposomale Membranen (right-side out, s. 3.) wurde ein Modellsystem etabliert, das klare Interpretationen der durchgeführten kinetischen Experimente ermöglichte. Auf erste, hier nicht vorgestellte Ergebnisse zur Symmetrie der Antiportreaktion unter deenergetisierten Bedingungen (Dierks et al. 1988) sowie zum Transport des Protons (Dierks et al. 1988, Dierks & Krämer 1989) soll in der Diskussion (4.4) näher eingegangen werden.

Die offensichtliche Widersprüchlichkeit der Ergebnisse, die in mitochondrialen Membranen erhalten wurden, unterstreicht aber auch die Notwendigkeit, den Asp/Glu-Carrier erneut in intakten Organellen zu

untersuchen. Diese Aufgabe, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. F. Sluse (Lüttich) angegangen wurde, bedeutete zunächst eine methodische Optimierung und eine fundierte kinetische Beschreibung der Cytosol- und der Matrixseite des Carriers (s. 3.). Der vergleichende Einsatz beider analytischer Systeme, Proteoliposomen wie Mitochondrien, führte schließlich zu konsistenten Ergebnissen, die somit erstmalig eine verlässliche kinetische Beschreibung eines mitochondrialen Antiporters liefern.

4.2 Methoden

Kinetische Analyse des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers

Proteoliposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu-Carrier aus Rinderherz-Mitochondrien wurden präpariert und zur Transportmessung eingesetzt, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben. In den meisten Experimenten wurde Valinomycin und Nigericin benutzt, um deenergetisierte Bedingungen zu gewährleisten (s. 3.2). Zur Untersuchung des Einflusses des Membranpotentials wurden K^+ -Diffusionspotentiale durch Anwendung von Valinomycin (500 ng/mg Phospholipid) in Gegenwart von K^+ -Gradienten (100 mM intern/1 mM extern oder umgekehrt) erzeugt. Die K^+ -Gradienten wurden geschaffen, indem während der Gelfiltration der Liposomen (intern MOPS/KOH) das externe MOPS/KOH gegen MOPS/NaOH ausgetauscht wurde, oder - für die umgekehrte Polarität - indem 50 mM K_2SO_4 zugesetzt wurden (intern MOPS/NaOH). Um bei diesen Messungen Störungen des Diffusionspotentials durch NH_4^+ -Ionen zu vermeiden, war es notwendig, das Protein in 100 mM Natriumphosphat statt in 300 mM Ammoniumacetat zu präparieren.

Vortausch-Aktivitäten wurden mit Hilfe eines Computerprogramms berechnet (s. 2.3). Wie in den jeweiligen Legenden angemerkt ist, konnten im Falle umfangreicher Bisubstrat- oder Kompetitionsanalysen nur Einpunktkinetiken (20 s) gemessen werden, um bei annehmbarem experimentellen Aufwand eine ausreichende Zahl an Datenpunkten zu erhalten. In Kontrollexperimenten konnte sichergestellt werden, daß die ersten 30 s der Isotopenäquilibration unter allen Bedingungen im linearen Bereich der durch Gl. 2.1 beschreibbaren Kurve lagen. Die statistische Sicherheit war gegeben, solange genügend Aktivitätsdaten für eine verlässliche lineare Regression zur Verfügung standen, die für die Gewinnung der kinetischen Konstanten aus reziproken Diagrammen durchgeführt wurde. Wenn verschiedene Liposomenpräparationen innerhalb eines Experimentes Verwendung fanden, so wurden die gemessenen Transportaktivitäten auf der Basis von Phospholipid-Bestimmungen (Chen et al. 1956) normalisiert, um unterschiedliche Verdünnungsfaktoren während der Säulenspassagen aufzuheben. Außerdem wurde DTNB und DTE eingesetzt, um den langsamen Efflux von internem Substrat zu eliminieren, der während der Entfernung des externen Substrats auftrat (s. 2.3).

Kinetische Analyse des Asp/Glu-Carriers in Mitochondrien

Alle angewendeten Methoden zur Messung der Aspartat/Aspartat-Homöo Austauschaktivität in intakten Rattenherz-Mitochondrien wurden in 3.2 beschrieben. Die Antiportraten wurden entsprechend Gl. 3.1 aus linearisierten Progressionskurven der $[^{14}C]$ Aspartat-Aufnahme berechnet (s. 3.3, Abb.4). Die statistische Auswertung der Daten in Abb.7 und 8 wurde zuvor von Sluse et al. (1973) beschrieben.

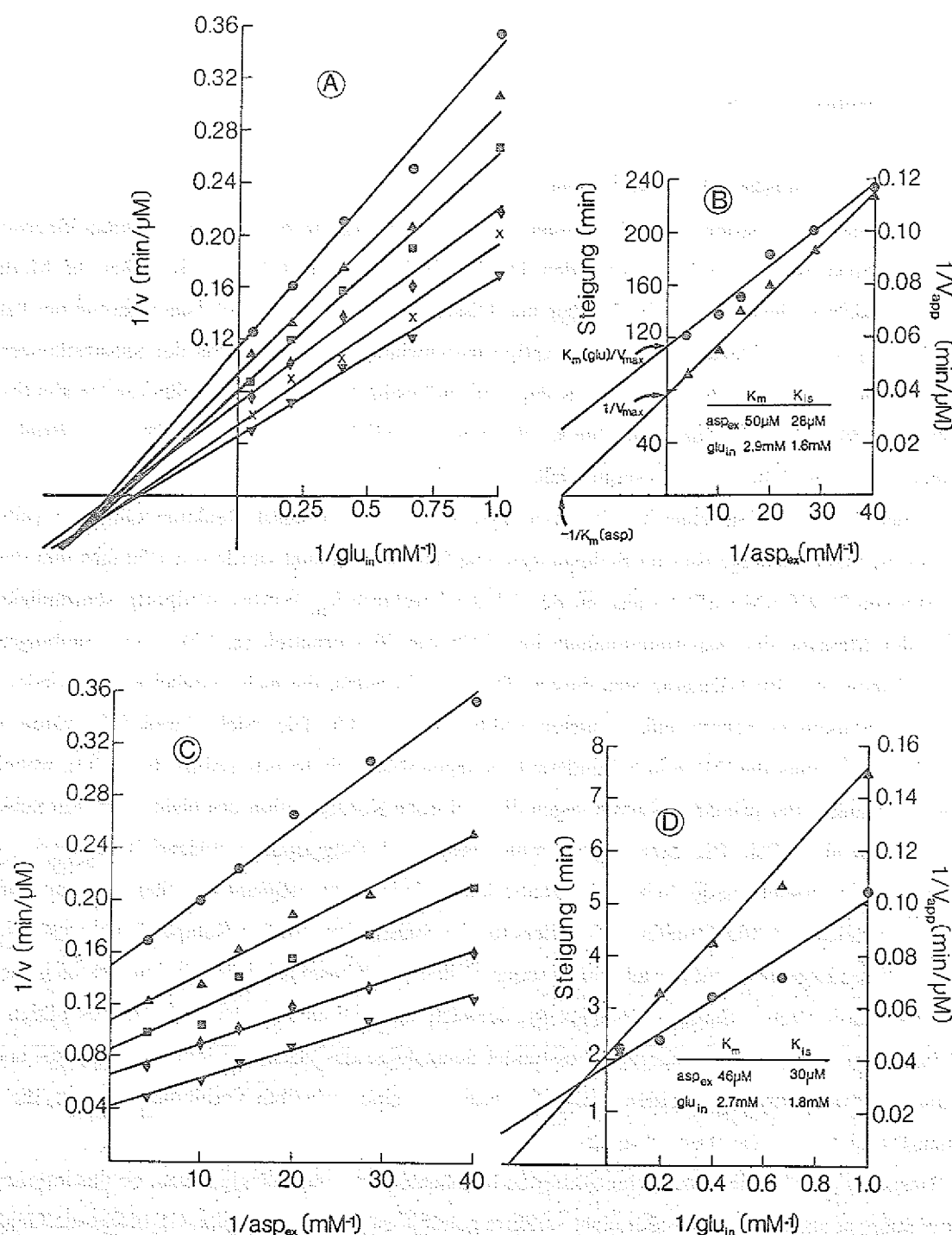


Abb.6: Bisubstrat-Analyse der vom rekonstituierten Asp/Glu-Carrier vermittelten Antiport-Reaktion (Glu_{in}/Asp_{ex}). Die [¹⁴C]Aspartat-Aufnahme nach 20 s diente zur Berechnung von Anfangsgeschwindigkeiten des Austausches. A, C: Lineweaver-Burk-Diagramme zeigen die Abhängigkeit der Antiportaktivität von internem Glutamat bzw. externem Aspartat. Die Konzentration der Gegensubstrate war wie folgt; A: 25 (●), 35 (▲), 50 (■), 70 (◆), 100 (×) und 250 μM (▼) externes Aspartat; C: 1 (●), 1.5 (▲), 2.5 (■), 5 (◆) und 20 mM (▼) internes Glutamat. B, D: Sekundäre Auftragung der Steigungen (●) und Ordinatenabschnitte (= 1/V_{app}) (▲) der primären Diagramme A und C. Die angegebenen konzentrationsunabhängigen K_m -Werte (s. Text) wurden aus den Achsenabschnitten der sekundären Diagramme ermittelt, wie in B angegeben. Zur Bedeutung der K_{is} -Werte siehe Text. Die V_{max} -Werte, extrapoliert auf unendliche Konzentration von internem und externem Substrat, lagen bei 26 μM/min (B) bzw. 25 μM/min (D).

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Kinetische Bisubstrat-Analysen

4.3.1.1 Untersuchungen im rekonstituierten System

Der Gegentauch zweier Substrate über Membranen, katalysiert von einem Antiportcarrier, kann kinetisch in Form einer Bisubstratreaktion beschrieben werden. Die klassische Bisubstrat-Analyse ist daher die Methode der Wahl, um Einsicht in die Sequenz von Bindung und Dissoziation der Substratmoleküle während des katalytischen Zyklus zu gewinnen. Dazu muß man die Antiportgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentrationen sowohl im internen als auch im externen Kompartiment bestimmen. Aus dem resultierenden kinetischen Muster sollte eine klare Entscheidung getroffen werden können zwischen den zwei grundlegenden Bisubstrat-Mechanismen, dem Ping-Pong- und dem sequentiellen Typ (Cleland 1970).

Abb.6 zeigt die Ergebnisse einer Bisubstrat-Analyse der Heteroaustausch-Reaktion Glutamat (intern)/Aspartat (extern) unter deenergetisierten Bedingungen. Das interne Glutamat wurde von 1-20 mM und das externe Aspartat von 25-250 μM variiert - also im Bereich des jeweiligen K_m -Wertes. Antiportgeschwindigkeiten wurden aus der Messung der Aspartataufnahme innerhalb von 20 s ermittelt (s. 4.2). Dieser umfangreiche Datensatz, in Lineweaver-Burk-Diagrammen dargestellt, ergab Geraden, die nicht parallel waren, sondern ein Muster mit gemeinsamem Schnittpunkt bildeten (Abb.6 A und C). Die Nicht-Parallelität wurde noch offensichtlicher, wenn man die Daten in Sekundärauftragungen weiter analysierte (Abb.6 B und D), wobei der Auftrag der Steigungen der primären Kurven gegen die reziproke Konzentration des nicht-variierten Substrats keinesfalls horizontal verlief. Die Steigung im Lineweaver-Burk-Diagramm repräsentiert $K_{m,app}/V_{max,app}$. Demnach erhöht eine Anhebung der Substratkonzentration in einem Kompartiment vor allem die Transportrate ($V_{max,app}$), ohne gleichzeitig die Affinität des Carriers für das Substrat im anderen Kompartiment wesentlich zu beeinflussen. Dieses Ergebnis kann nur mit einem sequentiellen Mechanismus erklärt werden, dessen Charakteristikum ein ternärer Protein-Substrat-Komplex ist, der sich während des katalytischen Zyklus bilden muß (Cleland 1970). Im Falle des Heteroaustausches bindet demzufolge das Carrierprotein ein Aspartat- und ein Glutamatmolekül, wobei zwischen beiden Assoziationsschritten eine reversible Verbindung besteht, die nicht durch einen Translokationsschritt unterbrochen wird.

Die Tatsache, daß dasselbe kinetische Muster zu beobachten war, unabhängig davon, ob das interne oder das externe Substrat als das variierte oder nicht-variierte gewählt wurde (Abb.6 A bzw. C), belegt die Gültigkeit der folgenden Bisubstrat-Geschwindigkeitsgleichung, die in algebraischer Hinsicht bezüglich beider Substrate symmetrisch ist. Sie soll hier für externes Aspartat als dem variierten Substrat angegeben werden:

$$1/v = 1/V_{max} + K_A/(V_{max} \cdot A) + K_G/(V_{max} \cdot G) + K_{iA} \cdot K_G/(V_{max} \cdot A \cdot G) \quad (\text{Gl. 4.1})$$

A und G sind die Konzentrationen des externen Aspartats bzw. internen Glutamats. Die Michaelis-Konstanten K sind entsprechend indiziert. K_{iA} ist die Dissoziationskonstante des binären Carrier-Aspartat-Komplexes. K_{iG} kann eingeführt werden durch einfaches Umschreiben der Gleichung für Glutamat als variablem Substrat. Der Wert dieser spezifischen Konstanten in Ping-Pong-Mechanismen wäre null, da kein ternärer Komplex involviert ist. Wie jedoch aus Abb.6 B und D klar erkennbar, haben alle in der Gleichung benutzten Parameter finite

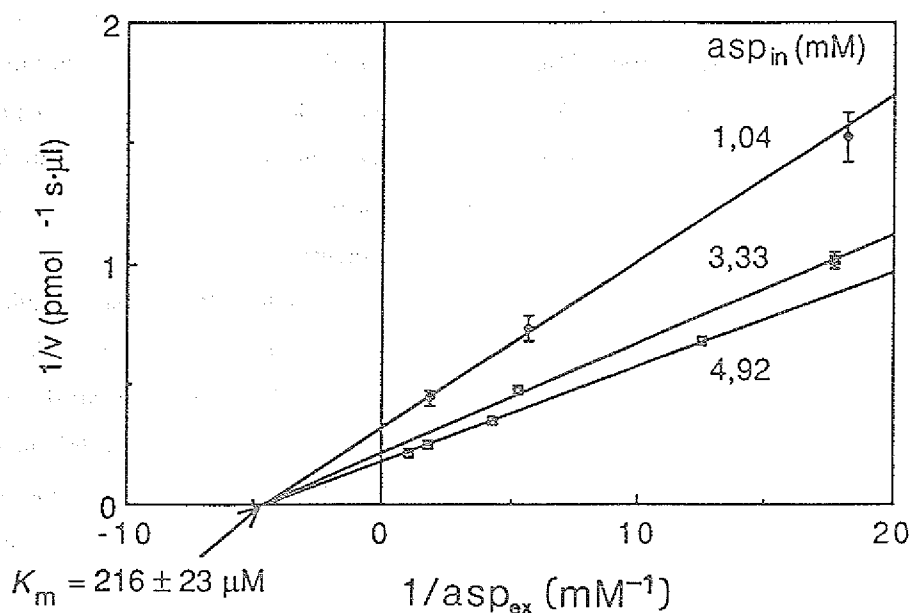


Abb.7: Bisubstrat-Analyse der vom Asp/Glu-Carrier vermittelten Antiport-Reaktion (Aspartat/Aspartat) in intakten Rattenherz-Mitochondrien. Vollständige Progressionskurven wurden aufgenommen bei verschiedenen Konzentrationen von internem und externem Aspartat, wie angegeben (2°C, pH 7.4). Anfangsraten ($\pm$ Standardabweichung) wurden aus der Auftragung von Z gegen die Zeit ermittelt (s. Abb.4). Die Geraden wurden den Datenpunkten angepaßt unter Annahme eines gemeinsamen Schnittpunktes auf der Abszisse, der jedoch nicht vorgegeben wurde.

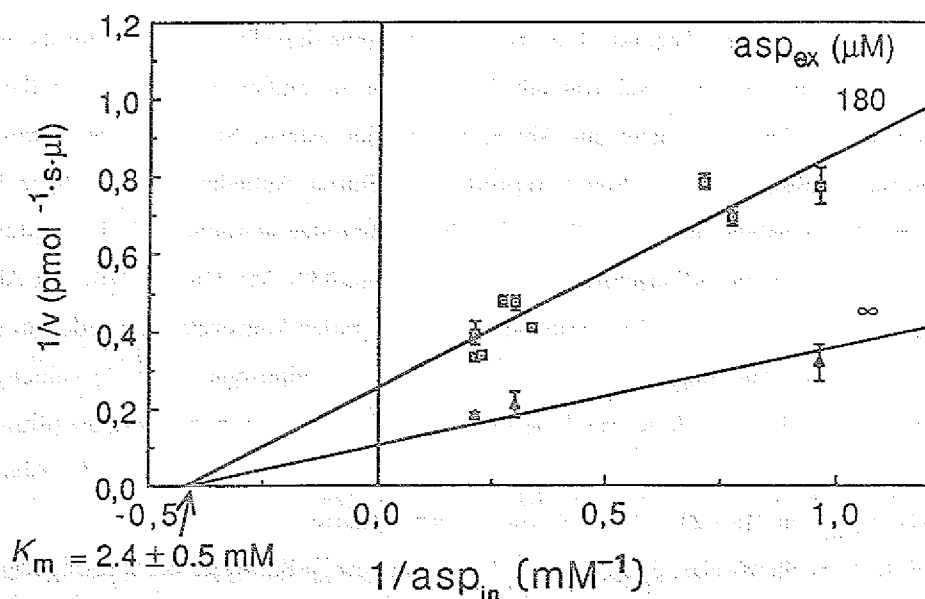


Abb.8: Einfluß der internen Aspartatkonzentration auf die Antiportaktivität (Aspartat/Aspartat) des Asp/Glu-Carriers in intakten Rattenherz-Mitochondrien. Vollständige Progressionskurven wurden aufgenommen (2°C, pH 7.4) bei verschiedenen internen Aspartatkonzentrationen und 180 μ M externem [14 C]Aspartat ($\square$). Die Daten für unendliche externe Aspartatkonzentration ($\triangle$) stammen aus Abb.7 (apparente $V_{\max}$ -Werte). Das interne Glutamat betrug unter allen Bedingungen weniger als 7% des internen Aspartats. Zur Darstellung und Auswertung der Daten s. Abb.7.

Werte, die sich aus den Achsenabschnitten und Steigungen der sekundären Diagramme errechnen ließen (Cleland 1970). Die angegebenen Transportaffinitäten sind extrapoliert für unendliche Konzentration des nicht-variierten Substrats auf der anderen Seite der Membran. Ihre Werte, 46-50 μM für externes Aspartat und 2.7-2.9 mM für internes Glutamat, sind identisch mit den bei endlicher Substratkonzentration ermittelten K_m -Werten (Tab.I). Für die $V_{\max}$ bei unendlicher Konzentration von internem und externem Substrat ergab sich ein Wert von 25 $\mu\text{mol/min pro l}$ Liposomen (10-20 mg Asp/Glu-Carrierprotein).

Die Bisubstrat-Analyse des Asp/Asp- oder Glu/Glu-Homöo-austausches führte zu sehr ähnlichen kinetischen Mustern, wie für den Hetero-austausch erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich muß allen Austauschreaktionen ein Protein-immanenter Mechanismus zugrunde liegen, der unabhängig von der Art des Substrats ist. Der beobachtete Schnittpunkt der Geraden lag stets nahe bei der Abszisse. Dies bedeutet, daß die entsprechenden K_m - (K_A oder K_G) und K_{is} -Konstanten (K_{iA} oder K_{iG}) ähnliche Werte haben. Die Bindung sowohl des internen als auch des externen Substrats erfolgt also mit vergleichbarer Affinität an den freien oder einfach besetzten Carrier. Die unabhängig in Abb.6 B und D bestimmten K_{is} -Werte für internes Glutamat (1.6 mM) bzw. externes Aspartat (30 μM) führen zu einem konstanten Faktor (0.57 bzw. 0.62) zwischen K_m und K_{is} , so daß ein rapid-equilibrium-random-Mechanismus vorliegen muß, ein Spezialfall des sequentiellen Reaktionstyps (s. 4.4).

4.3.1.2 Untersuchungen in intakten Rattenherz-Mitochondrien

Die Bedeutung dieser Ergebnisse für den Carrier in der intakten Mitochondrienmembran wurde überprüft, indem Bisubstratkinetiken auch in ganzen Organellen durchgeführt wurden. Voraussetzung dafür war die Etablierung und Optimierung verschiedener methodischer Ansätze, wie unter 3. beschrieben. Der Befund, daß die Interaktion des Substrats mit dem Carrier, charakterisiert durch interne und externe K_m -Werte, in Mitochondrien und Proteoliposomen quantitativ vergleichbar war (Tab.IV), bot ideale Bedingungen für die Untersuchung, ob auch der zugrundeliegende Transportmechanismus derselbe war. Um nun die wechselseitige Interaktion von internem und externem Substrat mit dem Carrier zu studieren, wie oben für das Liposomen-system beschrieben, wurde das Experiment aus Abb.4, wo nur das externe Substrat variiert worden war, bei verschiedenen internen Substratkonzentrationen reproduziert. Durch Aufnahme vollständiger Progressionskurven des Asp/Asp-Homöo-austausches (s. 3.3.2) wurden drei Datensätze gewonnen für die Austauschraten bei drei verschiedenen internen Aspartatkonzentrationen (1.04, 3.3 und 4.9 mM). Diese wurden in Abb.7 doppelt-reziprok aufgetragen. Die durch lineare Regression erhaltenen Geraden konvergierten wiederum sehr nahe bei der x-Achse, was - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Proteoliposomen (Abb.6) - einen sequentiellen Transportmechanismus anzeigt. Durch Anwendung einer speziellen statistischen Methode (Sluse et al. 1973) konnte unter Berechnung der kleinsten Fehlerquadrate ein gemeinsamer Schnittpunkt auf der Abszisse ermittelt werden, der zu einem K_m von $216 \pm 23 \mu\text{M}$ für externes Aspartat führte.

Die umgekehrte Vorgehensweise, d. h. die Variation des internen Substrats bei verschiedenen konstanten externen Konzentrationen, ist in Mitochondrien wegen der in methodischer Hinsicht beschränkten Zugänglichkeit des Matrixraumes mit größerem Aufwand und deshalb auch mit größerer Ungenauigkeit verbunden (s. 3.2). Nimmt man die Daten zur K_m -Bestimmung für internes Aspartat, durchgeführt bei halbsättigender externer Substratkonzentration (Abb.5), und außerdem die Austauschraten bei unendlicher externer Konzentration, die sich aus den Ordinatenabschnitten von Abb.7 ergeben, so kommt man zu zwei Geraden, die ebenfalls einen gemeinsamen Schnittpunkt nahe der Abszisse zeigen. Der in Abb.8 gezeigte Schnittpunkt entspricht einem K_m

für internes Aspartat von 2.4 ± 0.5 mM. Die Konvergenz der Geraden auf der Abszisse, wie in Abb.7 und 8 beobachtet, bedeutet, daß der Wert des externen und internen K_m unabhängig von der Substratkonzentration im jeweils anderen Kompartiment ist (vgl. 4.3.1). Es werden also die K_m -Werte bestätigt, die für den Vergleich mit dem Liposomensystem herangezogen wurden (Abb.5). Die maximale Austauschrate, die aus Abb.8 für unendliche Konzentration an externem und internem Aspartat extrapoliert werden konnte, belief sich bei 2°C und pH 7.4 auf 9.4 ± 1.6 pmol·s⁻¹·µl⁻¹, was einem Wert von 2.8 nmol/min pro mg Protein entspricht.

4.3.2 Einfluß des zweiten Substrats bei Anwesenheit im selben Kompartiment

Diese Konsolidierung der Ergebnisse durch Vergleich mit intakten Mitochondrien bot eine gute Basis, um den Transportmechanismus in Proteoliposomen noch detaillierter zu untersuchen. Dies geschah zunächst in Form von Inhibitionskinetiken, die bei Anwesenheit beider Substrate auf derselben Seite der Membran gemessen wurden. Genaue Analysen des Inhibitionstyps erlauben es vorherzusagen, ob verschiedene Carrier-Formen an der Substratbindung beteiligt sind und/oder ob zwischen ihnen ein schnelles Gleichgewicht vorliegt (s. 4.4). Bei diesem experimentellen Ansatz wurde nur ein Substrat markiert eingesetzt. Das jeweils andere unmarkierte Substrat wurde als Inhibitor betrachtet, da nicht seine eigene Translokation verfolgt wurde, sondern sein Einfluß auf den Transport des markierten Substrats. Abb.9A zeigt die Inhibition der Aspartataufnahme durch die Anwesenheit von Glutamat auf der Membranaußenseite. Die Eadie-Hofstee-Auswertung führte zu Geraden, die sich auf der Ordinate schnitten. Dies steht im Einklang mit einem kompetitiven Inhibitionsmechanismus, wodurch angezeigt wird, daß Aspartat und Glutamat an dieselbe(n) externe(n) Stelle(n) binden. Die Inhibitionskonstante K_i , die sich aus einer Sekundärauftragung ergab (Einsatz von Abb.9A), lag bei 180 µM und stimmt gut überein mit dem externen K_m , der zuvor für Glutamat ermittelt wurde (ca. 200 µM, Tab.IV).

Weitere Kompetitionsstudien wurden für das innere Kompartiment durchgeführt. Hier konnte nur eine weitaus geringere Anzahl von Datenpunkten erhalten werden, da für jede Substrat/Inhibitor-Kombination eine eigene Liposomenpräparation nötig war. Um extern sättigende Bedingungen zu gewährleisten, mußte außerdem die wesentlich aufwendigere Rücktausch-Technik eingesetzt werden (s. Methoden). Während der Vormarkierung des internen Glutamat-Pools galt es, eine Änderung des internen Aspartat/Glutamat-Verhältnisses zu vermeiden. Deshalb wurden bei diesem Schritt nur submikromolare Konzentrationen markierten Glutamats eingesetzt bei einer Inkubationsdauer von wenigen Minuten. Den Einfluß von internem Aspartat auf den [¹⁴C]Glu_{in}/Glu_{ex}-Rücktausch zeigt Abb.9B. Ähnlich wie in Abb.9A ergaben sich Geraden, die auf der Ordinate aufeinander trafen. Dies belegt ein kompetitives Verhalten von Aspartat und Glutamat auch auf der Innenseite der Membran. Dementsprechend stimmte der K_i -Wert für internes Aspartat (2.8 mM) gut mit dessen internem K_m überein (ca. 3 mM, Tab.I).

4.3.3 Einfluß des Membranpotentials

Krämer und Klingenberg (1982) haben gezeigt, daß der Einfluß eines elektrischen Gradienten ($\Delta\Psi$) auf die Transportaktivität des rekonstituierten ADP/ATP-Carriers erklärt werden kann durch die elektrophoretische Modulation der Transportrate geladener Carrier-Substrat-Komplexe. Folglich kann die Ladungsverteilung im translozierenden Carrier-Substrat-Intermediat beurteilt werden, wenn man die elektrischen Eigenschaften der Austauschreaktion kennt. Im Falle des Nucleotid-Antiports beschrieb das kinetische Modell, das theoretisch abgeleitet und experimentell verifiziert wurde (Krämer & Klingenberg 1982), nicht nur den Einfluß auf den

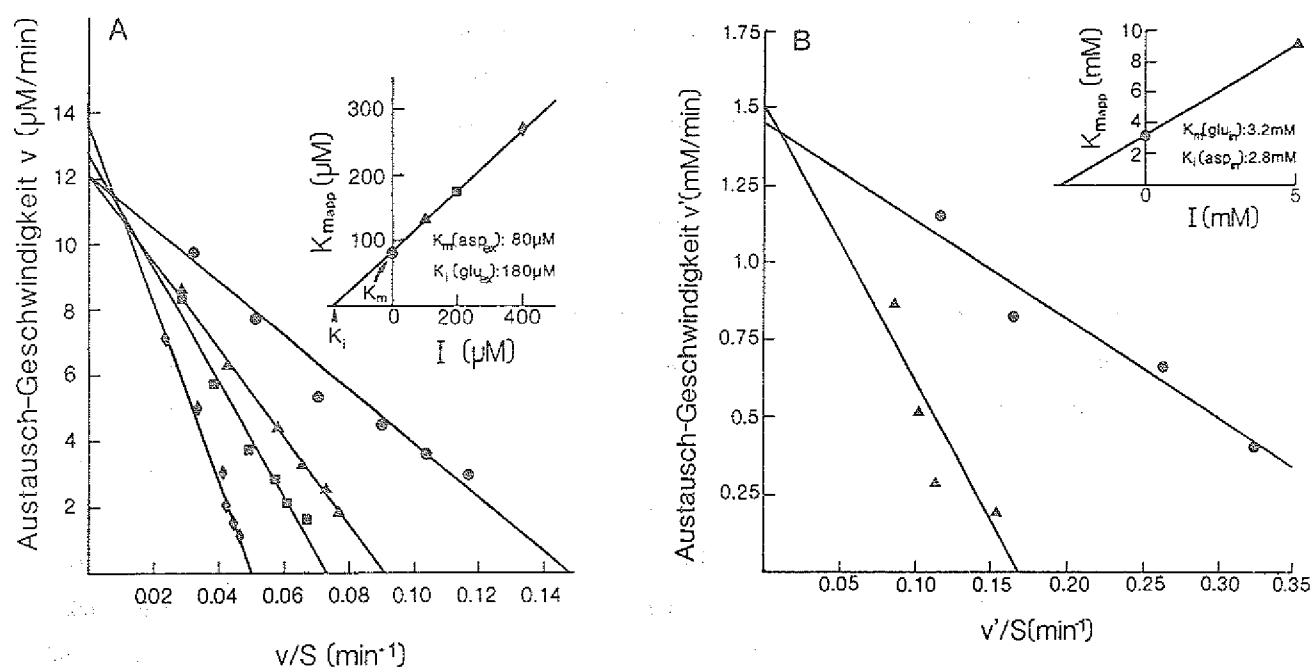


Abb.9: Einfluß von externem Glutamat auf die Aufnahme von [^{14}C]Aspartat (A) und Einfluß von internem Aspartat auf den Export von [^{14}C]Glutamat (B) in/aus Liposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu-Carrier. A: Die [^{14}C]Aspartat-Aufnahme nach 20 s diente zur Berechnung von Anfangsgeschwindigkeiten des Austausches. Das Eadie-Hofstee-Diagramm zeigt die Hemmkinetik der Aspartat-Aufnahme durch verschiedene externe Glutamatkonzentrationen: 0 ($\bullet$), 100 ($\blacktriangle$), 200 ($\blacksquare$), 400 μM ($\blacklozenge$). Das externe Aspartat wurde jeweils von 25-300 μM variiert; internes Substrat: 10 mM Aspartat und 10 mM Glutamat. B: Aus Rücktausch-Messungen des [^{14}C]Glutamat-Exports wurde die Geschwindigkeitskonstante k des Glu/Glu-Austausches in Abwesenheit ($\bullet$) und Anwesenheit ($\blacktriangle$) von internem Aspartat (5 mM) bestimmt. In beiden Fällen wurde das interne Glutamat von 1.25-10 mM variiert; externes Substrat: 3 mM Glutamat. Zur Berechnung von v' aus k siehe Gl. 2.6. Die Einsätze zeigen die Extrapolation der jeweiligen K_m -Werte und kompetitiven Inhibitionskonstanten K_i .

Tab.V: Einfluß des Membranpotentials auf die Antiportaktivität des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers bei unterschiedlicher Substratverteilung. Die Transportaktivität wurde in Vortausch-Messungen der Anfangsgeschwindigkeit bestimmt (s. 4.2). Die Daten stammen aus zwei Experimenten, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden: (a) extern 50 μM Aspartat/intern 16 mM Aspartat bzw. Glutamat, pH 6.5; (b) extern 100 μM Glutamat/intern 24 mM Aspartat bzw. Glutamat, pH 7.0. Zur Präparation des Proteins und Erzeugung des K^+ -Diffusionspotentials siehe 4.2. Der angegebene Asymmetriefaktor bezeichnet das Verhältnis der Austauschaktivitäten bei Membranpotentialen entgegengesetzter Polarität (innen positiv : innen negativ).

Substrat		Austauschaktivität ($\mu\text{M}/\text{min}$) bei $\text{K}^+_{in}(\text{mM})/\text{K}^+_{ex}(\text{mM})$				Asymmetrie-faktor
intern	extern	1/100 ^a	1/1	100/100	100/1 ^a	
Aspartat	Aspartat (a)	4.4	4.0	4.6	3.6	1.2
Glutamat	Aspartat (a)	7.5	2.3	2.6	0.9	8.3
Aspartat	Glutamat (b)	0.8	n.b. ^b	2.1	3.1	0.26
Glutamat	Glutamat (b)	2.0	2.1	2.1	2.2	1.1

^a Theoretisch (nach Nernst'scher Gleichung) einem $\Delta\Psi$ von 120 mV entsprechend (innen positiv bzw. negativ).

^b Nicht bestimmt.

elektrogenen ADP/ATP-Heteroaustausch. Zusätzlich machte das Modell eine Hemmung des nicht-elektrogenen ATP/ATP-Homoaustausches durch ein Membranpotential - unabhängig von dessen Polarität - zur Bedingung. Diese Vorhersage fußte auf der asymmetrischen Ladungsverteilung binärer Translokationsintermediate, wie für einen $[\text{Carrier}^{3+}\text{-ATP}^{4-}]$ -Komplex anzunehmen ist. Solch ein Komplex würde auf die positive Seite einer energetisierten Membran verlagert. Das resultierende Ungleichgewicht der zwei entgegengesetzt ausgerichteten Carrierkonformationen hätte dann eine deutliche Hemmung der gesamten Antiportreaktion zur Folge, wie tatsächlich für den $\text{ATP}^{4-}/\text{ATP}^{4-}$ -, aber nicht für den $\text{ADP}^{3-}/\text{ADP}^{3-}$ -Homoaustausch beobachtet werden konnte (Krämer & Klingenberg 1982). Zur Gültigkeit des dabei zugrunde gelegten kinetischen Mechanismus des ADP/ATP-Carriers siehe 4.4.

Überträgt man dieses Modell der elektrophoretischen Kontrolle auf unsere Untersuchungen zum Mechanismus des Asp/Glu-Gegentauses, so sollte ein binärer $[\text{Carrier-Asp}^-]$ -Komplex, nicht jedoch ein $[\text{Carrier}/\text{H}^+ \text{-Glu}^-]$ -Komplex durch $\Delta\psi$ beeinflusst werden. Deshalb konzentrierte sich die folgende Analyse auf den Asp/Asp-Homoaustausch. Mit Hilfe des elektrogenen K^+ -Ionophors Valinomycin wurde ein K^+ -Diffusionspotential (ca. 120 mV) an die Liposomenmembran angelegt, wobei beide Polaritäten eingestellt werden konnten (s. 4.2). In Tab.V sind die Transportraten aufgelistet, die bei allen denkbaren Zusammenstellungen von internem und externem Substrat erhalten wurden. Dabei muß betont werden, daß diese Daten in zwei verschiedenen Experimenten gewonnen wurden, so daß die absoluten Werte nur innerhalb eines Experimentes verglichen werden können. Tab.V macht deutlich, daß die Energetisierung der Membran weder im Falle des Glu/Glu- noch im Falle des Asp/Asp-Homoaustausches eine signifikante Hemmung hervorrief. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei den beiden möglichen Heteroaustausch-Konstellationen klare Asymmetriefaktoren (8.3 bzw. 0.26, s. Tab.V), da sich die Austauschaktivitäten bei verschiedener Polarität des Membranpotentials stark unterschieden.

4.4 Diskussion

Ein rekonstituiertes System reduziert - besonders bei Verwendung gereinigter Carrierproteine - die Komplexität intakter Mitochondrien auf die für Transportmessungen essentiellen Bestandteile. So konnten viele Komplikationen vermieden werden, die u. a. als Ursache angeführt wurden für die grundlegende Widersprüchlichkeit der in der Literatur zu findenden Befunde zum Mechanismus des Asp/Glu-Carriers (LaNoue et al. 1979, LaNoue & Watts 1979; Murphy et al. 1979, Williamson et al. 1979; vgl. 3.1). Ungeachtet dessen ist eine solide Basis von Ergebnissen wünschenswert, die auch durch klare Experimente mit Mitochondrien, d. h. mit den ursprünglichen Membranen, gestützt werden. Daher wurden vergleichende Studien in intakten Rattenherz-Mitochondrien angestellt, um herauszufinden, inwieweit sich die beiden experimentellen Systeme gegenseitig bestätigen. Dieser neuartige Ansatz erlaubte es, aus dem artifiziellen Liposomensystem zuverlässige Schlußfolgerungen zu ziehen, die für die in-vivo-Situation des Carriers von Bedeutung sind.

Bisubstrat-Mechanismus des Asp/Glu-Antiports

Kinetisch betrachtet laufen Bisubstrat-Reaktionen katalytisch-aktiver Proteine nach einem Ping-Pong- oder einem sequentiellen Mechanismus ab. Enzyme vom Ping-Pong-Typ exponieren nur eine Bindungsstelle zur

gleichen Zeit. Übertragen auf Antiportcarrier muß diese einzelne Bindungsstelle alternierend auf beiden Seiten der Membran 'erscheinen' (zugänglich sein), um Substrate in entgegengesetzte Richtungen zu transportieren. Dieser relativ einfache Mechanismus wurde für den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier durch Klingenberg (1976, 1989) beschrieben und durch LaNoue et al. (1979) auch für den Asp/Glu-Carrier. In einer kinetischen Bisubstrat-Analyse kann der Ping-Pong-Typ an einem parallelen Geradenmuster erkannt werden, wenn zur Auswertung Lineweaver-Burk-Diagramme benutzt werden (Cleland 1970). Dies bedeutet, daß - infolge einer Erhöhung der Substratkonzentration in einem Kompartiment - der Anstieg der apparenten $V_{\max}$ einhergeht mit einer proportionalen Abnahme des apparenten K_m für das Substrat im anderen Kompartiment. Um sich dies vorzustellen, muß man berücksichtigen, daß die stimulierte Translokation des Substrats, dessen Konzentration erhöht worden ist, eine größere Verfügbarkeit von Bindungsstellen in dem Kompartiment mit sich bringt, in das das Substrat transportiert wird. Eine solche Beziehung wird immer dann zu beobachten sein, wenn keine reversible Verbindung zwischen den Assoziationsschritten der zwei Substrate mit dem Carrier besteht. Beim Ping-Pong-Mechanismus verläßt das erste (transportierte) Substrat den Carrier, bevor das zweite gebunden werden kann.

Die hier gezeigten Ergebnisse schließen ein derartiges Modell für den Asp/Glu-Carrier eindeutig aus (Abb.6). Das erhaltene intersektierende Geradenmuster ist vielmehr konsistent mit einem sequentiellen Mechanismus. Demzufolge binden die beiden zu transportierenden Substratmoleküle an zwei Bindungsstellen des Carriers unter Ausbildung eines ternären Komplexes, bevor eines der 'Transportprodukte' vom Protein wieder abgegeben wird. Es besteht also eine reversible Verbindung zwischen den beiden aufeinander folgenden Bindungsschritten, wie aus dem Effekt auf die Steigung der Geraden zu fordern ist. Die binären Intermediate mit nur einer besetzten Bindungsstelle können dissoziieren, bevor das zweite Substrat gebunden wird. Die entsprechenden Dissoziationskonstanten K_{IS} , die im letzten Term von Gl. 4.1 erscheinen, sind ein zusätzliches Charakteristikum des sequentiellen Mechanismus. Ihre Werte, wie die Auswertung in Abb.6 ergab, fallen ungefähr mit den jeweiligen Michaeliskonstanten (K_m) zusammen. Dies drückt sich auch in dem Schnittpunkt der Geraden nahe der Abszisse aus. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, daß keine obligatorische Reihenfolge bei der Bindung der beiden Substrate besteht (random-Mechanismus). Das erste Substrat - nach Bindung auf der einen Seite - übt keinen signifikanten Einfluß auf die Affinität für das zweite Substrat aus, das von der anderen Seite gebunden wird. Wie für einen random-Mechanismus zu erwarten (Cleland 1970), war das Verhältnis K_{IS}/K_m nahezu identisch, wenn diese Konstanten unabhängig voneinander für die interne und externe Seite bestimmt wurden (Abb.6 B bzw. D). Die somit erfüllte Beziehung

$$K_{iA} \cdot K_G = K_{iG} \cdot K_A \quad (\text{Gl. 4.2})$$

bedeutet gleichzeitig, daß rapid-equilibrium-Bedingungen bestehen, denn nur unter dieser Voraussetzung ist eine so einfache Behandlung der random-Reaktion überhaupt möglich (Segel 1975). Zusammengefaßt bedeutet dieser Sonderfall des sequentiellen Mechanismustyps, daß die Bindung beider Substratmoleküle sehr schnell und unabhängig voneinander erfolgt.

Dieser spezielle Mechanismus wurde durch die von uns in intakten Rattenherz-Mitochondrien erhaltenen Ergebnisse vollständig bestätigt. Auch in diesem System ergab sich ein gemeinsamer Schnittpunkt nahe der Abszisse (Abb.7 und 8). Zwar war es nicht möglich, den K_{IS} -Wert für internes Aspartat zuverlässig zu

bestimmen, doch ist Gl. 4.2 bei einem Schnittpunkt exakt auf der x-Achse ($K_m = K_{is}$) in jedem Fall erfüllt. Ein solcher Vergleich zwischen rekonstituiertem und nativem Carrierprotein wurde zum ersten Mal durchgeführt und erbringt die klare Evidenz, daß der Asp/Glu-Carrier auch in vivo einem sequentiellen Mechanismus folgt, wobei die Interaktion der Substrate mit dem Carrier unabhängig voneinander stattfindet.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Bisubstrat-Analyse von LaNoue et al. (1979), so muß in erster Linie kritisiert werden, daß ihre Messungen in submitochondrialen Partikeln nur bei zwei verschiedenen internen Glutamatkonzentrationen durchgeführt wurden (50 und 150 mM), die beide weit über dem von ihnen selbst in intakten Mitochondrien bestimmten K_m -Wert (3 mM) lagen. Dies zeigt die Schwierigkeiten, die Innenseite submitochondrialer Partikel kinetisch zu definieren, so daß, wie in diesen Experimenten erforderlich, verschiedene Partikelpräparationen miteinander verglichen werden können (zur Außenseite s. 3.4). Die publizierten Daten, die zudem noch stark streuten, waren daher völlig unzureichend, um eine Parallelität der Geraden zu belegen, und wurden dennoch als Indiz für einen Ping-Pong-Mechanismus gewertet. Dagegen stimmen die Bisubstrat-Kinetiken von Murphy et al. (1979), die wesentlich detaillierter den [^{14}C]Aspartat-Export aus intakten Rattenleber-Mitochondrien untersuchten, zumindest qualitativ mit dem von uns erhaltenen kinetischen Muster überein. Auch diese Gruppe kam zu intersectierenden Geraden mit einem Schnittpunkt nahe der Abszisse.

Bildung des ternären Komplexes

Betrachtet man ein sequentielles Antiportmodell, so erhebt sich die Frage, wie der ternäre Komplex gebildet wird. Entweder könnten zwei Bindungsstellen, eine auf jeder Membranseite, gleichzeitig exponiert werden oder aber zwei Bindungsstellen auf einer Seite oder sogar zwei Stellen auf beiden Seiten. Alle drei Möglichkeiten wurden für den Nucleotidcarrier formuliert (Duyckaerts et al. 1980, 1983, Barbour & Chan 1981, Block & Vignais 1984), zusätzlich zu dem oben erwähnten Ping-Pong-Modell (Klingenberg 1976, 1989). Zwei Bindungsstellen auf derselben Seite können kinetisch nur identifiziert werden, wenn sie verschiedene Affinitäten gegenüber dem variierten Substrat zeigen. Dies wäre an biphasischen reziproken Diagrammen zu erkennen. Ein Abknicken der Geraden zeigte sich jedoch weder in den Bisubstrat-Analysen (Abb.6-8) noch in den Rücktausch-Experimenten aus Abb.2, wo die Existenz einer einzigen kinetischen Komponente auf jeder der beiden Membranoberflächen untermauert wurde.

Es verbleibt jedoch die Möglichkeit, daß auf jeder Seite zwei Arten von Bindungsstellen existieren, die eine mit Spezifität für Aspartat und die andere für Glutamat. Dieses Modell läßt sich überprüfen, indem die Transportinhibition durch die Anwesenheit des jeweils anderen Substrats im selben Kompartiment analysiert wird. Die hier erhaltenen Inhibitionskinetiken belegen ein kompetitives Verhalten von Aspartat und Glutamat auf der Innen- wie auf der Außenseite der Liposomen (Abb.9). Beide Substrate binden also prinzipiell an die gleiche Carrierform. Es soll an dieser Stelle nicht weiter auf die in diesem Punkt extrem widersprüchlichen Befunde und sogar unterschiedlichen Interpretationen ein und derselben Inhibitionskinetik eingegangen werden, die sich in verschiedenen Publikationen der zwei bereits mehrfach erwähnten Arbeitsgruppen finden lassen (LaNoue & Tischler 1976, Tischler et al. 1976, LaNoue et al. 1979; zusammengefaßt von Dierks et al. 1988). Unsere Ergebnisse, die eine direkte Substratkompetition in beiden Kompartimenten anzeigen, lassen sich am einfachsten erklären, wenn der ternäre Komplex als transmembrane Einheit gebildet wird, wozu es der Besetzung je einer Bindungsstelle beiderseits der Membran bedarf.

Konzertierter Transport des internen und externen Substrats in einem Schritt

Die Kompetition der Substrate belegt jedoch nicht mit letzter Sicherheit, daß nur ein Konformationszustand des Carriers an der Substratbindung beteiligt ist. Eine kompetitive Inhibition wäre auch zu erwarten, wenn zwei Carrierformen mit Spezifität für Aspartat bzw. Glutamat miteinander im Gleichgewicht ständen (s. unten, Gl. 4.3). Daher kommen zwei alternative Modelle in Betracht. Einerseits kann man sich einen Austausch-Zyklus vorstellen, worin - nach Bindung je eines Substratmoleküls auf beiden Seiten der Membran - ein Konformationswechsel des so gebildeten ternären Komplexes stattfindet, so daß beide Substrate in einem konzertierten Schritt durch die Membran geschleust werden. Andererseits könnte unter bestimmten Voraussetzungen auch der einfach besetzte Carrier Aspartat bzw. Glutamat translozieren. Der ternäre Komplex hätte sich dann auf einer Seite des membranständigen Carriers zu bilden. Dies bedeutet, daß zur Entfernung des ersten Substrats - nach dessen Translokation - das zweite Substrat binden müßte (geschwindigkeitsbestimmender Schritt). Das von Murphy et al. (1979) vorgeschlagene Modell paßt dem Prinzip nach in solch ein Schema, geht man von reversiblen Translokationsschritten aus.

Die experimentelle Strategie, um zwischen diesen beiden Reaktionsmechanismen zu entscheiden, stützte sich auf Modellrechnungen zu den elektrischen Eigenschaften des rekonstituierten ADP/ATP-Carriers (Krämer & Klingenberg 1982). Der den Berechnungen zugrunde gelegte Ping-Pong-Mechanismus scheint nach neueren Untersuchungen (Sluse et al. 1989) kinetisch, d. h. hinsichtlich der Wechselwirkung der Substrate während des Antiportzyklus, zwar nicht mehr haltbar zu sein, doch widerlegt dies nicht die nachstehenden Befunde, die nur den Translokationsschritt betreffen. Der Einfluß des Membranpotentials auf diesen zweiten

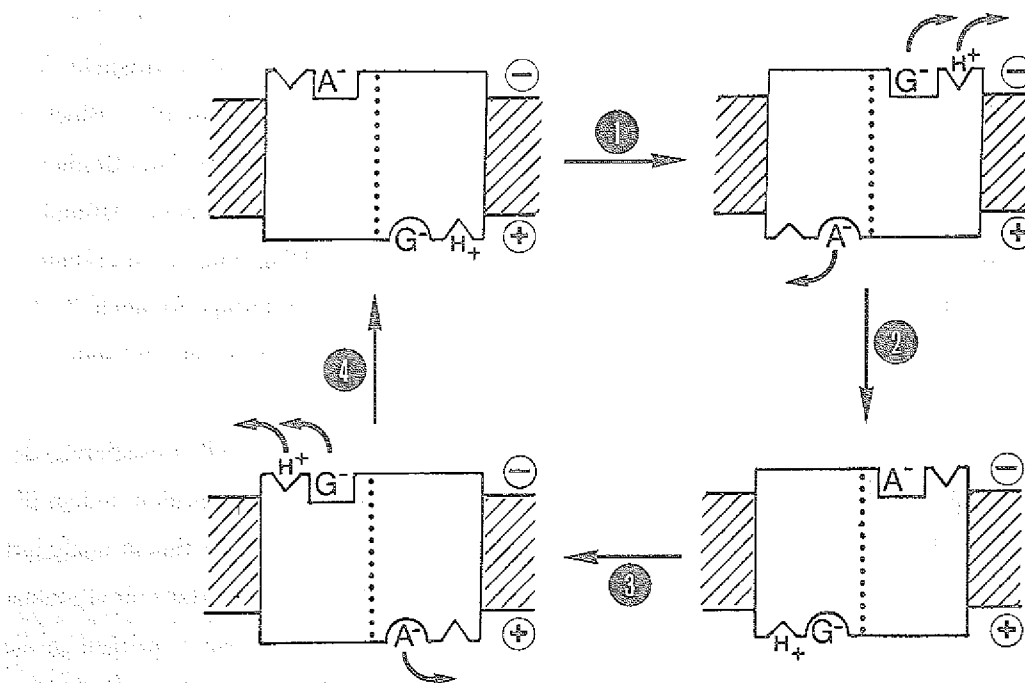


Abb.10: Funktionsmodell des Asp/Glu-Antiports. Das Carriermolekül ist schematisch als integrale Einheit in der Mitochondrienmembran dargestellt. Zwei funktionelle 'Protomere' sind angedeutet, von denen jedes eine Bindungsstelle für Aspartat (A^-) oder Glutamat (G^-) und eine für H^+ aufweist. Vier Zustände eines vollständigen Hetero-austausch-Zyklus sind festgehalten, verbunden entweder durch Translokationsschritte (1 und 3) oder durch Dissoziations/Assoziationschritte zweier Substratmoleküle (2 und 4). Die freien Carrierintermediate nach Dissoziation der transportierten Substrate wurden weggelassen. Die Translokationsschritte erfolgen in einem konzertierten Prozeß der 'Protomere' und befinden sich unter der elektrophoretischen Kontrolle des Membranpotentials.

elektrogenen Carrier aus Mitochondrien konnte in Form von Geschwindigkeitsgleichungen beschrieben werden unter Annahme einer elektrophoretischen Anziehung oder Abstoßung von geladenen Carrier-Substrat-Intermediaten während der Translokation. Um dieses sogenannte 'velocity-type'-Modell auf den Asp/Glu-Carrier übertragen zu können, mußte eine wichtige Kontrolle durchgeführt werden. Tischler et al. (1976) berichteten nämlich von einer Asymmetrie des Carriers selbst in entkoppelten Mitochondrien, die sich in einer etwa fünffachen Stimulierung des $\text{Asp}_{\text{in}}/\text{Glu}_{\text{ex}}$ -Austausches gegenüber dem $\text{Glu}_{\text{in}}/\text{Asp}_{\text{ex}}$ -Austausch ausdrückte. Unsere Daten widersprechen einer solchen intrinsischen Asymmetrie. Wie von Dicrks et al. (1988) beschrieben, waren unter deenergetisierten Bedingungen (erleichterte Diffusion) und unter Substratsättigung (V_{max}) beide Heteroaustausch- (11.6 und 12.9 $\mu\text{M}/\text{min}$) und auch beide Homoaustauschraten (11.9 und 13.5 $\mu\text{M}/\text{min}$) sehr ähnlich - im Einklang mit den energetischen Prinzipien des sekundär aktiven Transports.

Aspartat bzw. Glutamat wurden nur dann mit unterschiedlicher Rate in beide Richtungen transportiert, wenn eine transmembrane Triebkraft ($\Delta\Psi, \Delta\text{pH}$) mit dem Antiport gekoppelt war. Tab.V belegt die elektrophoretische Kontrolle des Heteroaustausches nach Erzeugung eines Membranpotentials. Entgegengesetzte Polaritäten von $\Delta\Psi$ bewirkten reziproke Effekte, wie aufgrund der oben erwähnten intrinsischen Symmetrie des Antiports zu erwarten war. Im Gegensatz dazu wurde weder der Glu/Glu- noch der Asp/Asp-Homoaustausch signifikant durch die Energetisierung der Membran beeinflusst. Für den Glu/Glu-Antiport bedeutet dies, daß Glutamat in beide Richtungen mit einem Proton transportiert wird. Besondere Bedeutung kam dem fehlenden Effekt auf den Asp/Asp-Antiport zu, denn dadurch wurde es möglich, zwischen den zwei oben diskutierten Mechanismen zu entscheiden. Das 'velocity-type'-Modell sagt eine Hemmung des Asp/Asp-Austausches voraus, wenn binäre $[\text{Carrier-Asp}^-]$ -Komplexe die Translokationsintermediate darstellten, hervorgerufen durch eine $\Delta\Psi$ -bedingte asymmetrische Verteilung der Carrier-Bindungsstellen zwischen beiden Membranseiten. Eine Stimulierung der Transport-Geschwindigkeitskonstanten (k_3) für Asp^- bedeutet nämlich gleichzeitig eine verringerte Besetzungswahrscheinlichkeit der Bindungsstellen auf der positiven Seite der Membran. Dies konnte im Falle des Adeninnucleotid-Carriers (ATP/ATP-Homoaustausch) verifiziert werden. Es ergab sich ein höherer apparenter K_{m} -Wert für ATP auf der positiven Membranseite (Krämer & Klingenberg 1982), was allein durch die Erhöhung von k_3 zu erklären war ($K_{\text{m}} = (k_2 + k_3)/k_1$). Daß im Gegensatz dazu kein Einfluß von $\Delta\Psi$ auf den Asp/Asp-Homoaustausch gefunden werden konnte, spricht klar gegen binäre Komplexe als Translokationsintermediate. Die einzig vorstellbare Alternative, die der offensichtlich symmetrischen Verteilung der Bindungsstellen Rechnung trägt, ist ein Modell, in dem der ternäre Komplex selbst als katalytisches Intermediat am Transport-Zyklus teilnimmt. Eine elektrophoretische Modulation dieser integralen Einheit ist nur im Falle des Heteroaustausches möglich, wo die durch Aspartat beigesteuerte Ladung notwendigerweise asymmetrisch lokalisiert sein muß und somit einen Angriffspunkt für das Membranpotential bietet. Ein ternärer $[\text{Asp}_{\text{in}}^- \text{-Carrier-Asp}_{\text{ex}}^-]$ -Komplex jedoch dürfte eine ungefähr symmetrische Ladungsverteilung haben. Dieses Modell impliziert, daß beide Substratmoleküle in einem Schritt transloziert werden.

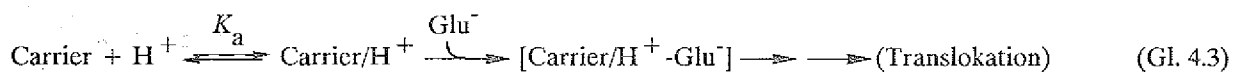
Es sei abschließend noch einmal darauf hingewiesen, daß eine Translokation in zwei Schritten, wie für den ADP/ATP-Carrier anzunehmen, einem sequentiellen Mechanismus (s. Sluse et al. 1989) nicht widerspricht. Zur Erklärung kann ein Modell mit einem ternären Komplex zwischen den Translokationsschritten herangezogen werden, wie es oben auch für den Asp/Glu-Carrier als Alternative erwogen wurde. Andererseits könnte man - in Übereinstimmung mit dem hier favorisierten Modell - einen transmembranen ternären Komplex auch für den ADP/ATP-Carrier annehmen, wobei aber die Translokation asynchron, d. h. in zwei zeitlich aufeinander-

der folgenden Schritten erfolgt (s. auch allgemeine Diskussion). Auf die Problematik des Durchschleusens der Substrate durch das Carrierprotein wird unter 8. ausführlich eingegangen.

Ein Minimalmodell des synchronen Asp/Glu-Antiports ist in Abb.10 abgesteckt. Nur die Bildung und Translokation des ternären Komplexes werden gezeigt, die freien oder einfach-besetzten Carrier-Intermediate jedoch weggelassen. Das Modell ist symmetrisch zum einen im Hinblick auf die Assoziation von Aspartat und Glutamat, die beide auf jeder Seite an die gleiche Carrierform binden können, und zum anderen im Hinblick auf die Translokation der beiden Substratspezies entsprechend den Ergebnissen der Substratinhibitionsstudien (Abb.9) bzw. dem Befund der intrinsischen Symmetrie (s. oben). Die Kopplung von einwärts- und auswärtsgerichteter Translokation ist offenbar allein konformatorischer Natur - analog zum enzymatischen Umsatz zweier Substrate in einer Bisubstratreaktion. Es ergaben sich keine Hinweise auf kooperative Wechselwirkungen. Die Aufweichung bzw. völlige Aufhebung der Kopplung konnte durch Anwendung verschiedener Cystein-Reagenzien erreicht werden. Diese Themenstellung wird ausführlich unter 7. und 8. behandelt.

H^+ , ein drittes Substrat

Im Zusammenhang mit dem Antiportmechanismus des Asp/Glu-Carriers muß auch auf die bereits früher erhaltenen Ergebnisse zum Glutamat/ H^+ -Cotransport eingegangen werden (Dierks et al. 1988, Dierks & Krämer 1989). Diese führten zu der Schlußfolgerung, daß die absolute H^+ -Konzentration die Affinität des Carriers für Glutamat reguliert. Der K_m für Glutamat stieg drastisch von 120 μM bei pH 6.2 auf 1.8 mM bei pH 7.4. Bei Sättigung mit Glutamat jedoch war der Einfluß des pH vergleichsweise gering ($V_{max} = 13-19 \mu M/min$ bei pH 6.2-7.4). In Lineweaver-Burk-Diagrammen, in denen H^+ wie ein Michaelis-Menten-Substrat behandelt werden konnte, zeigte sich dies durch Geraden, die mit steigender Glutamatkonzentration immer paralleler zur Abszisse wurden (Dierks & Krämer 1989). Dieses kinetische Muster deutet auf einen rapid-equilibrium-ordered-Mechanismus der Proton- und Glutamatbindung (Cleland 1970). Demzufolge befindet sich der freie Carrier in einem Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewicht, das wesentlich schneller als die gesamte Transportreaktion ist.



Die Dissoziationskonstante des Carrier/ H^+ -Komplexes konnte abgeschätzt werden, wobei ein pK_a -Äquivalent von ca. 6.5 erhalten wurde. Dies ist ein starkes Argument für eine separate Proton-Bindungsstelle, die etwa eine Histidinseitenkette involvieren könnte. Dem rapid-equilibrium-Mechanismus entsprechend verlagert die Bindung von Glutamat an den protonierten Carrier das Protonierungsgleichgewicht zur rechten Seite (Gl. 4.3). Folglich würde eine unendliche Glutamatkonzentration - unabhängig vom pH-Wert - alle Carriermoleküle in den ternären $[\text{Carrier}/H^+ - \text{Glu}^-]$ -Komplex überführen; (es soll hier nur eine Seite der Membran betrachtet werden).

Eine Bindung von Aspartat bzw. Glutamat an zwei verschiedene Carrierformen steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Substratinhibition. Vielmehr ist die schnelle Äquilibration der beiden Carrierformen die folgerichtige Erklärung für das kompetitive Verhalten beider Substrate. Diese Sichtweise paßt vollkommen in das oben dargelegte Funktionsmodell (Abb.10) und ist eine Alternative zu der Interpretation der Substratkompetition von LaNoue et al. (1979), die annahm, daß beide Substrate an den

protonierten wie an den deprotonierten Carrier binden könnten. Einen völlig anderen Standpunkt vertraten Murphy et al. (1979), die postulierten, daß das Proton nach Assoziation mit Glutamat binden würde. Dies ist jedoch schon allein wegen des tiefen pK_a -Wertes des Glutamats (4.3) sehr unwahrscheinlich.

Der Glutamat/ H^+ -Cotransport hängt also von der Konzentration an Glutamat und an H^+ ab. Folglich ist der pH-Wert ein Parameter, der spezifisch die Translokation von Glutamat (und nicht die von Aspartat) reguliert. Die Modulation der Transport-Affinität für Glutamat ist die Folge eines direkten (kinetischen) Einflusses auf die Bindungsstelle jedes einzelnen Carriermoleküls und beruht nicht etwa auf der Variation des (thermodynamischen) Verhältnisses von protonierten zu deprotonierten Carriern; angesichts des rapid-equilibrium-ordered-Mechanismus ist nämlich die Konzentration von Carrier/ H^+ im Vergleich mit der des funktionellen [Carrier/ H^+ -Glu $^-$]-Komplexes zu vernachlässigen. Die physiologische Signifikanz dieser Regulation mag in der Möglichkeit begründet sein, besser zwischen Glutamat und Aspartat diskriminieren zu können, um (für die Zelle) nutzlose Homoaustausch-Zyklen zu vermeiden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß das Membranpotential, wie aus dem 'velocity-type'-Modell abgeleitet, seinen Effekt nahezu ausschließlich auf die Translokationsrate, nicht jedoch auf die Bindung der Substrate ausübt. Die Bindung von Glutamat wäre auf der cytosolischen Seite mit tieferem pH begünstigt und auf der alkalischeren Matrixseite gehemmt. Detaillierte Messungen der mitochondrialen und cytosolischen pH-Werte bei verschiedenen physiologischen Bedingungen (Soboll et al. 1988) zeigten, daß der Matrix-pH um ungefähr 0.5 Einheiten schwanken kann, was für eine deutliche Regulation allein durch die H^+ -Konzentration ausreichen würde.

5. Antiportfunktion des Oxoglutarat-Carriers: Aufklärung des Reaktionsmechanismus des asymmetrisch rekonstituierten Proteins (Indiveri, Dierks, Krämer & Palmieri 1990)

5.1 Einleitung

Mit dem Oxoglutarat-Carrier untersuchten wir das Transportsystem, das zusammen mit dem Asp/Glu-Carrier den membranständigen Teil des Malat/Aspartat-Shuttles bildet, der wichtigsten Redox-Verbindung zwischen Cytosol und mitochondrialer Matrix (s. 1.2). Der Oxoglutarat-Carrier katalysiert einen elektroneutralen 1:1-Austausch von α -Ketoglutarat und einigen anderen Dicarboxylaten, von denen Malat mit der höchsten Affinität gebunden wird (Quagliariello & Palmieri 1972, Palmieri et al. 1972). Detaillierte kinetische Studien in Rattenherz-Mitochondrien von Sluse und Mitarbeitern stellten eine außergewöhnlichen Komplexität in zweierlei Hinsicht fest; (eine Übersicht geben Sluse-Goffart & Sluse 1986 sowie Sluse et al. 1989). Während die Sättigung des Carriers mit externem Malat (Sluse-Goffart et al. 1983) oder mit internem α -Ketoglutarat (Sluse et al. 1989) durch eine normale Michaelis-Menten-Kurve beschrieben werden konnte, war dies für internes Malat wegen negativer Kooperativität und wegen allosterischer Einflüsse anderer Metabolite nicht möglich (Sluse et al. 1989, 1975, 1980). Auch im Falle von externem α -Ketoglutarat wurde eine komplexe Sättigungskurve beobachtet (Sluse et al. 1979), was als Hinweis auf eine oligomere Struktur des Carrierproteins interpretiert wurde (Sluse-Goffart et al. 1986, 1983, Sluse et al. 1989).

In den letzten Jahren wurde der Oxoglutarat-Carrier aus Leber- und Herz-Mitochondrien isoliert und gereinigt (Bisaccia et al. 1985, 1988). Nach funktioneller Rekonstitution in Liposomen konnte die Transportaktivität des gereinigten Proteins gemessen werden. Es wurde bestätigt, daß die grundlegenden Eigenschaften des rekonstituierten Carriers, d. h. die Substratspezifität und Inhibitorsensitivität, mit der Situation in intakten Mitochondrien übereinstimmten (Bisaccia et al. 1985, 1988, Indiveri et al. 1987). Wegen der methodischen Vorteile eines rekonstituierten Systems, wie oben veranschaulicht (s. 4.), waren wir nun in der Lage, die Funktion des Oxoglutarat-Carriers unter genau definierten Bedingungen zu untersuchen. In diesem Fall war es wichtig, mit dem gereinigten Protein zu arbeiten, um ein Interferieren des Dicarboxylat- und des Tricarboxylat-Carriers zu vermeiden, welche ebenfalls Malat transportieren.

Mit Hilfe des kinetischen Ansatzes sollte der Mechanismus der Antiportreaktion auch für diesen Carrier aufgeklärt werden, wie unter 4. erfolgreich für den Asp/Glu-Carrier durchgeführt (sequentielle Substratbindung). Während letzterer der erste Carrier war, dessen Mechanismus in Liposomen charakterisiert wurde, so war es der Oxoglutarat-Carrier, der als erster (von insgesamt nur drei untersuchten Antiportern) in intakten Mitochondrien durch Bisubstrat-Analysen und Substrat-Kompetitionsexperimente studiert wurde (Sluse et al. 1972, 1973). Trotz des komplexen Verhaltens dieses Carriers, wie oben erwähnt, sprachen die erhaltenen Ergebnisse klar für einen sequentiellen Mechanismus. Die Entsprechung zum rekonstituierten Asp/Glu-Carrier (vgl. 4.) geht sogar noch weiter. Der für diesen Mechanismus geforderte ternäre Komplex des Proteins mit zwei Liganden, so der Befund auch beim Oxoglutarat-Carrier, wird gebildet durch Bindung von Substratmolekülen an je eine unabhängige interne und externe Bindungsstelle (rapid-equilibrium-random-Mechanismus).

Zwei sehr grundlegende Aspekte waren bei der kinetischen Analyse des rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers von übergeordnetem Interesse. Wie schon im Falle des Asp/Glu-Carriers war es auch hier wichtig zu erfahren, ob die Daten aus Proteoliposomen mit denen aus Mitochondrien vergleichbar waren. Dies half, die

Signifikanz der Schlußfolgerungen für den Carrier in der physiologischen Umgebung zu beurteilen. Weiterhin erhob sich die Frage angesichts der wachsenden 'strukturellen Familie' mitochondrialer Carrierproteine (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987, 1990, s. 1.3), ob die bisher kinetisch untersuchten Carrier auch in bezug auf ihren Transportmechanismus in eine Kategorie fallen. In dieser Hinsicht wären der Oxoglutarat-Carrier und sehr wahrscheinlich auch der ADP/ATP-Carrier (Sluse et al. 1989) die ersten Mitglieder sowohl der strukturellen als auch der 'kinetischen Familie'. Kürzlich konnten nämlich Runswick et al. (1990) durch cDNA-Sequenzierung zeigen, daß die Primärstruktur des Oxoglutarat-Carriers ebenfalls einen tripartiten Aufbau hat, wobei die sich wiederholenden Sequenzen verwandt sind zu den entsprechenden Wiederholungen des ADP/ATP-, des Phosphat-Carriers und des Uncoupling-Proteins. Hier soll nun die Evidenz erbracht werden, daß der rekonstituierte Oxoglutarat-Carrier auch im Hinblick auf seinen intrinsischen, der Antiportfunktion zugrundeliegenden Mechanismus der Carrierfamilie angehört.

5.2 Methoden

Rekonstitution des Oxoglutarat-Carriers

Der Oxoglutarat-Carrier wurde aus mit 3% Triton X-114 solubilisierten Rinderherz-Mitochondrien durch Chromatographie auf Hydroxylapatit und Celite in Gegenwart von Cardiolipin gereinigt (Bisaccia et al. 1985). Die Rekonstitution des Carriers in Liposomen erfolgte durch hydrophobe Chromatographie gemischter Mizellen, ähnlich wie es im allgemeinen Methodenteil für den Asp/Glu-Carrier beschrieben ist. Dazu wurde folgende Mischung eingesetzt (Endvolumen 700 µl): 320 µl gereinigtes Carrierprotein (10-20 µg) in 3% Triton X-114, 8.5 mg Truthahn-Eigelb-Phospholipid in Form beschallter Liposomen, α -Ketoglutarat oder Malat in angegebenen Konzentrationen, 10 mM Pipes (pH 7). Diese Mischung wurde 13 mal über Säulchen mit Amberlite XAD-2 (5 x 32 mm) gegeben, die zuvor mit 10 mM Pipes (pH 7) und derselben Konzentration an Substrat wie in den gemischten Mizellen äquilibriert worden waren. Mit Ausnahme der hydrophoben Chromatographie wurde alles bei 4°C durchgeführt.

Messung der Transportaktivität

Um das externe Substrat zu entfernen, wurden die Proteoliposomen über Sepadex G-75-Säulen gegeben, die mit 10 mM Pipes (pH 7) und einer die Osmolarität des internen Substrats ausgleichenden Konzentration NaCl äquilibriert waren. Die Transportaktivität wurde im Vortausch- oder im Rücktausch-Modus bestimmt, wie für den Asp/Glu-Carrier beschrieben (s. 2.3). Für die Rücktausch-Messungen wurde der interne Substratpool der Proteoliposomen durch carrier-vermittelte Äquilibration mit 0.5 µM ^{14}C -Substrat vormarkiert, welches in hoher spezifischer Radioaktivität zugesetzt wurde; hierbei wurden die internen Substratkonzentrationen nicht verändert (Homoaustausch-Bedingungen). Nach 30 Min wurde die nicht aufgenommene Markierung durch einen zweiten Gelfiltrationsschritt entfernt. Die Transportmessung wurde durch Zusatz von unmarkiertem (Rücktausch) oder von markiertem Substrat (Vortausch) gestartet. Bei beiden Methoden wurde der Austausch durch Gabe von 50 mM Pyridoxalphosphat und 10 mM Bathophenanthrolin, zwei wirkungsvollen Inhibitoren des Oxoglutarat-Carriers (Indiveri et al. 1987, Passarella et al. 1973) gestoppt. Schließlich wurde jede einzelne Probe (100 µl) auf Ionenaustauscher-Säulchen gegeben, analog der Beschreibung für den Asp/Glu-Carrier (s. 2.3).

Im Falle von Vortausch-Messungen wurde die Transportrate normalerweise aus der nach 60 s aufgenommenen Radioaktivität berechnet. Schnellere Kinetiken, die nicht über 1 Min linear verliefen, wurden nach Gl. 2.1 durch ein Kurvenanpassungsprogramm ausgewertet, das die Berechnung von Anfangsraten ermöglichte (s. 2.3). Vortauschraten sind in $\mu\text{mol/min pro mg Protein}$ angegeben. Im Falle von Rücktausch-Messungen wurde die Abnahme der Markierung in den Liposomen bis zum Isotopengleichgewicht durch eine einfach exponentielle Funktion angepaßt (vgl. 7.2), so daß die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k) ermittelt werden konnte. Die Rücktausch-Aktivitäten sind als relative Raten v' in mM/min ausgedrückt (Gl. 2.6).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Zuverlässigkeit der Rücktausch-Methode

Voraussetzung für detaillierte kinetische Analysen eines Antiporters ist die genaue Kenntnis seiner Transport-Affinitäten auf beiden Seiten der Membran. Zur Charakterisierung der von innen zugänglichen Bindungsstellen ist die bisher eingesetzte Vortausch-Methode aber nur begrenzt anwendbar. Wenn nämlich intern geringe und gleichzeitig extern sättigende Substratkonzentrationen eingestellt werden müssen (Bedingungen pseudo-erster Ordnung), so wird von den Proteoliposomen nur wenig ^{14}C -Substrat aufgenommen, und das erreichte Isotopengleichgewicht ($\text{dpm}_{\text{in}}/\text{dpm}_{\text{ex}}$) liegt zu stark auf der Seite des externen Substratpools (s. Gl. 2.2). In diesem Fall kann ein zuverlässigeres Signal registriert werden, wenn der interne Substratpool markiert ist, um dann durch Zugabe von unmarkiertem Substrat den Rücktausch der Radioaktivität zu messen (s. 5.2).

Tab. VI: Transport-Affinitäten des mitochondrialen Oxoglutarat-Carriers: Vergleich des nativen und des rekonstituierten Proteins.

Substrat	Membran-seite	(Gegen-substrat)	K_m (mM), (Anzahl der Experimente)		Mitochondrien
			Proteoliposomen		
			Vortausch	Rücktausch	
α -Ketoglutarat	extern	(α -Ketoglutarat)	0.31 ± 0.08 (7)	0.26 ± 0.12 (4)	$0.010-0.017^b$
		(Malat)	0.28 ± 0.07 (3)	n.b. ^a	
	intern	(α -Ketoglutarat)	0.20 ± 0.07 (3)	0.17 ± 0.06 (10)	1.0^c
		(Malat)	0.1	n.b.	
Malat	extern	(α -Ketoglutarat)	1.36 ± 0.14 (6)	n.b.	0.21^d
		(Malat)	1.4	n.b.	
	intern	(α -Ketoglutarat)	0.71 ± 0.18 (6)	n.b.	1.3^b
		(Malat)	0.6	n.b.	

^a Nicht bestimmt.

^b Sluse et al. 1979.

^c Sluse et al. 1989.

^d Sluse-Goffart et al. 1983.

Tab.VI belegt die Anwendbarkeit der Rücktausch-Technik, die im rekonstituierten System zuvor allein für den Asp/Glu-Carrier etabliert worden war (s. 3.3.1), auch für den Oxoglutarat-Carrier. Dies sei anhand des externen K_m -Werts für α -Ketoglutarat etwas genauer exemplifiziert. Die parallel in Vor- und Rücktausch-Messungen ermittelten Antiport-Raten (bzw. -Geschwindigkeitskonstanten, s. 5.2) ergaben im Lineweaver-Burk-Diagramm zwei Geraden, die über den gesamten Konzentrationsbereich (12 bis 500 μM bzw. 50 μM bis 10 mM) linear verliefen und beide zu fast demselben Abszissenabschnitt ($= K_m$) führten (nicht gezeigt). Der aus zahlreichen Rücktausch-Experimenten ermittelte K_m -Wert lag bei 0.26 ± 0.12 mM, was mit den Ergebnissen der Vortausch-Messungen (0.31 ± 0.08 mM) gut übereinstimmte (Tab.VI).

5.3.2 Bestimmung der internen Transport-Affinitäten

Der Rücktausch war also die geeignete Methode, um auch die internen Halbsättigungskonstanten zu bestimmen. In reziproken Diagrammen wurde eine lineare Abhängigkeit der Austausch-Aktivität von internem α -Ketoglutarat bis hinunter zu sehr niedrigen Konzentrationen beobachtet (40-400 μM), wobei das externe α -Ketoglutarat bei 0.5 mM konstant gehalten wurde, also etwa zweimal über seinem K_m . Aus zehn Experimenten dieser Art wurde ein interner K_m von 0.17 ± 0.06 mM berechnet (Tab.VI). Um diesen Wert durch Vortausch-Experimente bestätigen zu können, mußte die Konzentration des externen α -Ketoglutarats aus methodischen Gründen gesenkt werden (0.15 mM), wie oben erklärt. Trotzdem wurde für den internen K_m ein sehr ähnlicher Wert erhalten (0.20 ± 0.07 mM, Tab.VI).

Für eine vollständige kinetische Beschreibung fehlten noch die Transport-Affinitäten für Malat, dem zweiten Substrat des Oxoglutarat-Carriers. Es stellte sich heraus, daß der interne K_m für Malat erheblich über dem für α -Ketoglutarat lag. Daher wählten wir für weitere Analysen nur noch die Vortausch-Technik, die bei internen Konzentrationen über 0.1 mM verlässliche Transportaktivitäten lieferte. Die ermittelten Halbsättigungskonstanten für Malat lagen bei 0.71 ± 0.18 mM auf der Innen- bzw. bei 1.36 ± 0.14 mM auf der Außenseite der Liposomen (Tab.VI).

5.3.3 Symmetrie der Austauschreaktion

Wenn man den kinetischen Mechanismus des Austausches untersucht, so ist es von grundlegendem Interesse, ob der Antiporter die zwei verschiedenen Substrate in beide Richtungen symmetrisch transportiert, d. h. mit derselben $V_{\max}$ unabhängig von der Art des Gegensubstrats. Andernfalls könnten zusätzliche kinetische Parameter den Austausch-Zyklus limitieren. Um diese Frage zu klären, wurden $V_{\max}$ -Werte der α -Ketoglutarat- und Malat-Aufnahme jeweils in Homo- und Heteroaustausch-Experimenten bestimmt. Wie für die Malat-Aufnahme in Abb.12 gezeigt, konnten die beiden verschiedenen Datensätze in doppelt-reziproken Diagrammen mit zwei sehr ähnlich verlaufenden Geraden angepaßt werden. Dies belegt, daß nicht nur die $V_{\max}$, sondern auch der K_m für externes Malat sich nicht signifikant unterschieden, wenn in den Liposomen 20 mM Malat ($V_{\max}$: 11.0 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, K_m 1.4 mM) oder 20 mM α -Ketoglutarat vorlag ($V_{\max}$: 9.2 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, K_m 1.4 mM). Eine noch bessere Übereinstimmung ergab sich in einem anderen Experiment (nicht gezeigt), wo die Aufnahme von α -Ketoglutarat in Liposomen mit 20 mM α -Ketoglutarat ($V_{\max}$: 7.8 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, K_m 0.25 mM) oder mit 20 mM Malat untersucht wurde ($V_{\max}$: 7.0 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, K_m 0.23 mM). Die Symmetrie des rekonstituierten Antiporters wurde durch Bestimmungen der internen Halbsättigungskonstanten erhärtet, wobei Homo- und Heteroaustausch-Experimente zum gleichen Ergebnis führten (Tab.VI).

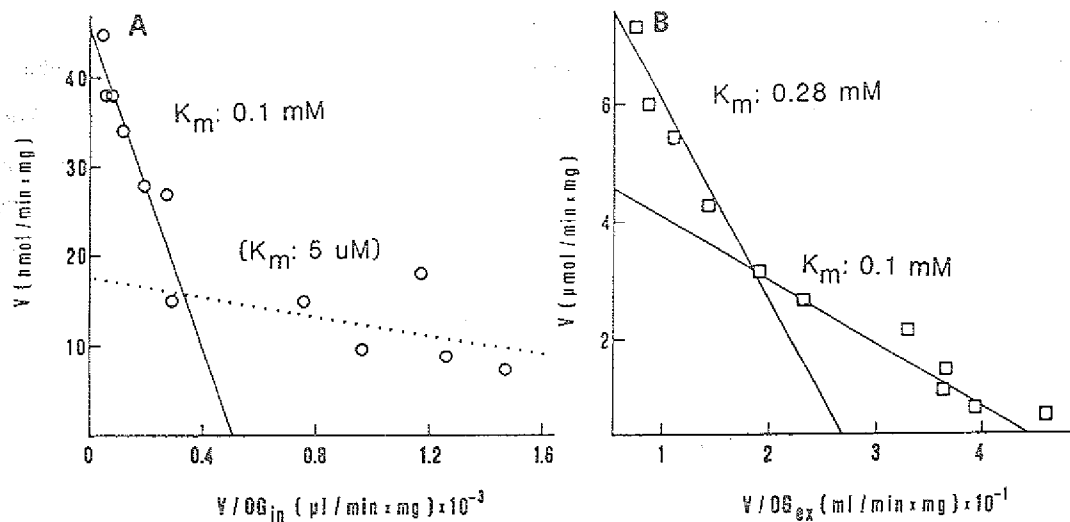


Abb.11: Vermischung der internen und externen Bindungsstellen des rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers nach Beschallung. (A) Bestimmung der apparenten Transport-Affinität für α -Ketoglutarat an der Membrannenseite (ohne Beschallung). Die angegebenen K_m -Werte errechnen sich aus den Steigungen der Geraden (Eadie-Hofstee-Auftragung). Die Relevanz der gestrichelten Linie ist im Text beschrieben. (B) Proteoliposomen wurden eingefroren, wieder aufgetaut und für 3 Min in Pulsen (0.3 s) beschallt. Dann wurde die Transport-Affinität für α -Ketoglutarat an der externen Membranseite bestimmt. Die zwei gefundenen K_m -Werte (0.28 und 0.1 mM) entsprachen dem erwarteten externen K_m (Tab.VI) bzw. dem ursprünglich internen K_m (siehe A). Alle Daten wurden mit der Vortausch-Methode ermittelt, wie in 5.2 für den Fall linearer (A) und nicht-linearer (B) [¹⁴C]Substrat-Aufnahme beschrieben. Die Konzentrationen des α -Ketoglutarats waren wie folgt: (A) 5 μ M extern, 0.005-1 mM intern; (B) 0.005-1 mM extern, 20 mM intern.

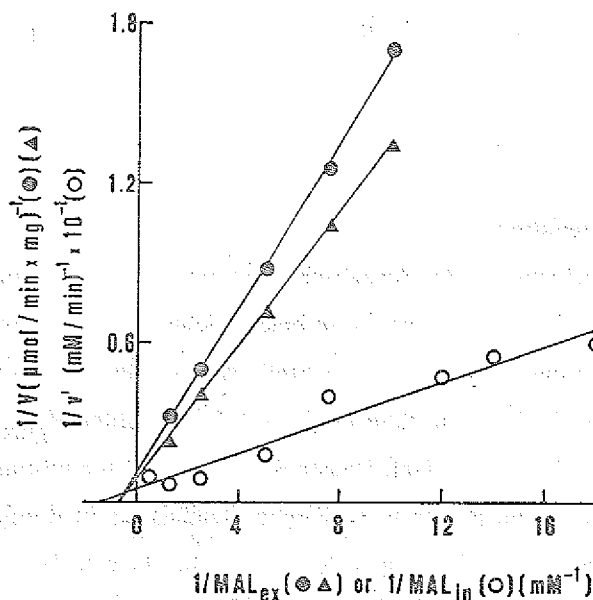


Abb.12: Funktionelle Analyse der Proteinaorientierung. Um die seitenspezifische Verteilung der unterschiedlich affinen Bindungsstellen (Tab.VI) aufzuklären, wurde die Transport-Affinität für externes Malat erneut bestimmt (●, Δ), wobei das Substrat diesmal aber im Bereich des internen K_m (0.7 mM) variiert wurde (0.1-1.0 mM). Nur niedrig-affine Bindungsstellen wurden gefunden ($K_m: 1.4 \text{ mM}$). K_m und V_{max} waren nahezu unabhängig von der Art des internen Substrats: 20 mM Malat (Δ) oder 20 mM α -Ketoglutarat (●). Auch auf der Innenseite war nur ein K_m für Malat auszumachen (0.68 mM, ○), obwohl Malat über einen Bereich variiert wurde (0.05-2 mM), der auch den externen K_m einschloß; extern 1 mM α -Ketoglutarat. Die Daten wurden einerseits mit der Vortausch- (●, Δ) und andererseits mit der Rücktausch-Methode ermittelt.

5.3.4 Orientierung des rekonstituierten Carrierproteins

In früheren Studien der Kinetik des Oxoglutarat-Translokators in intakten Mitochondrien (Sluse-Goffart et al. 1983, Sluse et al. 1979) wurden externe K_m -Werte erhalten (vgl. Tab.VI), die signifikant niedriger lagen als die hier auf beiden Seiten der Membran gefundenen. Diese Diskrepanz wird besonders deutlich im Falle des K_m -Werts für externes α -Ketoglutarat. In Mitochondrien wurde eine komplexe Sättigungskurve mit numerischer Halbsättigung bei 10-17 μM beobachtet, was mindestens eine Größenordnung von unseren K_m -Werten abweicht. Auf der exofazialen Seite des rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers konnte kein zusätzlicher K_m für α -Ketoglutarat detektiert werden, wobei das Substrat bis hinab zu Konzentrationen von 12 μM variiert wurde. Daher mußte die alternative Möglichkeit getestet werden, daß hoch-affine Bindungsstellen an der internen Seite des rekonstituierten Carriers überschen worden waren. In diesen Experimenten war es nötig, die interne Substratkonzentration unter 20 μM zu senken, was aber zu einer extrem schnellen Isotopenäquilibration sowohl in Vor- als auch in Rücktausch-Messungen führte. Nur wenn man auch das externe Substrat in seiner Konzentration stark herabsetzte (5 μM , Abb.11 A), war es möglich, einen sehr weiten Bereich interner Substratkonzentrationen zu untersuchen, wie für α -Ketoglutarat (5 μM bis 1 mM, Abb.11 A) und für Malat durchgeführt (15 μM bis 3 mM, nicht gezeigt). Tatsächlich trat in diesen Experimenten eine zusätzliche kinetische Komponente zutage, die einem tiefen apparenten K_m entsprach; doch galt dies nicht nur für α -Ketoglutarat (ca. 5 μM), sondern auch für Malat (ca. 25 μM). Die zwei internen K_m -Werte, 5 und 100 μM für α -Ketoglutarat, ergaben sich aus den unterschiedlichen Steigungen der zwei Geraden im Eadie-Hofstee-Diagramm (Abb.11 A). Nach dieser Darstellung würde die hoch-affine Komponente etwa 40% der gesamten Maximalaktivität ausmachen, wie aus den Ordinaten-Abschnitten abzuschätzen ist.

Die niedrigen internen K_m -Werte für beide Substrate könnten jedoch auf Artefakte zurückzuführen sein, einerseits als Folge fehlender pseudo-erster-Ordnung-Bedingungen (sehr geringe Substratkonzentrationen in beiden Kompartimenten) und andererseits als Folge fehlender steady-state-Bedingungen. Um das zweite Argument zu veranschaulichen, muß man sich einen oder mehr Carrier pro aktivem Proteoliposom vorstellen, das bei einer Konzentration von 20 μM nur einige, d. h. weniger als zehn Substratmoleküle enthält, wie sich einfach errechnen läßt. Um trotzdem die Existenz hochaffiner Bindungsstellen auf der Innenseite des Carriers zu bestätigen oder aber zu widerlegen, was einer Entscheidung über die seitenspezifische Ausrichtung des rekonstituierten Proteins gleichkam, wurden Proteoliposomen - nach ihrer Herstellung - mit Ultraschall behandelt, damit sich die bevorzugte Orientierung der Carriermoleküle aufhob. Nach dieser Behandlung konnten wir den niedrigen K_m auch auf der Außenseite der Liposomen erwarten, wo er ohne Einschränkungen meßbar sein sollte. Abb.11 B zeigt die Transportrate als Funktion von externem α -Ketoglutarat (5 μM bis 1 mM) nach Puls-Beschallung der Proteoliposomen für 3 Min (intern 20 mM α -Ketoglutarat). Erneut wurde eine nicht-lineare Abhängigkeit deutlich. Jedoch entsprachen diesmal die beiden beobachteten K_m -Werte, nämlich 0.28 und 0.1 mM, dem zuvor gefundenen externen K_m (Tab.VI) bzw. dem hohen internen K_m (vgl. Abb.11 A). Im mikromolaren Bereich war dagegen kein weiterer K_m auszumachen, der signifikant, d. h. mehr als 15%, zu der Gesamtaktivität beigetragen hätte. Stattdessen wurde die V_{max} durch die zwei kinetischen Komponenten in ungefähr gleich große Hälften geteilt. Offensichtlich hatte sich die Orientierung der membran-inserierten Carriermoleküle durch die Beschallung statistisch ausgeglichen.

Um ein zweites Kriterium zur Klärung der asymmetrischen Carrierorientierung zu erhalten, untersuchten wir, ob der interne K_m -Wert für Malat (0.7 mM) auch auf der Außenseite der Liposomen gefunden werden

konnte und dementsprechend der externe K_m (1.4 mM) auf der Innenseite. Der Faktor von zwei zwischen beiden Werten versprach zuverlässigere Ergebnisse als die Differenz der entsprechenden Affinitätskonstanten für α -Ketoglutarat. Abb.12 macht deutlich, daß extern erneut ein K_m für Malat von 1.4 mM gefunden wurde, obwohl das Substrat im Konzentrationsbereich des internen K_m variiert wurde, nämlich von 0.1 bis 1 mM. Ein zusätzlicher K_m unterhalb von 1 mM auf der exofazialen Seite des Carriers war also definitiv nicht vorhanden. Wie bereits oben angeführt, war dieses Ergebnis unabhängig davon, ob α -Ketoglutarat oder Malat als internes Gegensubstrat verwendet wurde (Abb.12). Damit übereinstimmend war kein zusätzlicher K_m -Wert für Malat oberhalb von 1 mM zu entdecken, als die interne Seite der Proteoliposomen über einen Konzentrationsbereich von 50 μ M bis 2 mM untersucht wurde (K_m : 0.68 mM, Abb.12).

5.3.5 Kinetischer Mechanismus des Antiports

Die asymmetrische Orientierung des Carriers in der Liposomenmembran einerseits und die intrinsische, kinetische Symmetrie der Antiportreaktion andererseits gewährleisteten klar definierte Bedingungen, um den Transportmechanismus zu studieren. Zu diesem Zweck mußten in einem Experiment die Substratkonzentrationen im inneren wie im äußeren Kompartiment variiert werden (vgl. 4.3.1.1). Abb.13 zeigt die Ergebnisse einer solchen Bisubstrat-Analyse der α -Ketoglutarat/ α -Ketoglutarat-Austauschreaktion, die unter Anwendung der Rücktausch-Methode durchgeführt wurde. Die kinetischen Daten zeigen die Abhängigkeit der Transportrate von internem α -Ketoglutarat (40-400 μ M) bei 40, 120 und 500 μ M externem α -Ketoglutarat. Analysierte man sie in Lineweaver-Burk-Diagrammen, so erhielt man daraus ein Muster von Geraden, die in einem gemeinsamen Schnittpunkt auf der Abszisse konvergierten (Abb.13 A). Stellte man dieselben Daten als Funktion der externen α -Ketoglutaratkonzentration dar (Abb.13 B), wurde ein ähnliches Bild erhalten. Dieses intersektierende Muster - im Gegensatz zu dem parallelen Muster von Ping-Pong-Reaktionen - ist bezeichnend für den sequentiellen Mechanismustyp, der immer dann zu beobachten ist, wenn beide Substratmoleküle binden, bevor die Katalyse ablaufen kann (vgl. 4.4). Demnach bildet also der Oxoglutarat-Carrier vor der Translokation einen ternären Komplex mit den zwei Gegensubstraten. Der Schnittpunkt auf der Abszisse bedeutet, daß das erste, interne (oder externe) Substrat keinen oder nur einen geringen Einfluß hatte auf die apparente Affinität für das zweite, extern (oder intern) gebundene Substrat. Nur die Transportrate wurde mit steigender Konzentration der jeweiligen Gegensubstrate stimuliert, wie an den Ordinatenabschnitten ($V_{max,app}$) und folglich auch an den unterschiedlichen Steigungen zu erkennen ist.

Diese wechselseitigen Abhängigkeiten konnten quantitativ analysiert werden durch sekundäre Auswertung der Steigungen und Ordinatenabschnitte aus Abb.13 A und B, wie es in Abb.13 C bzw. D durchgeführt wurde. Aus den linearen Beziehungen wurden K_m -Werte abgeleitet, die für unendliche Konzentration des jeweiligen Gegensubstrats extrapoliert sind (vgl. 4.3.1.1). Diese sog. 'konzentrationsunabhängigen' Transport-Affinitäten, nämlich 0.19 mM für externes und 0.15 mM für internes α -Ketoglutarat, stimmten gut überein mit den zuvor in Rücktausch-Messungen bei endlicher Konzentration bestimmten Werten (0.26 bzw. 0.17 mM, s. Tab.VI). Weiterhin konnten die Dissoziationskonstanten K_{iS} der binären Carrier-Substrat-Komplexe aus den sekundären Diagrammen gewonnen werden (vgl. 4.3.1.1). Die unabhängig aus Abb.13 C und D ermittelten Werte, nämlich 0.15 mM für externes und 0.12 mM für internes α -Ketoglutarat, waren sehr ähnlich zu den jeweiligen K_m -Werten. Dies führt zu einem konstanten Faktor zwischen K_m und K_{iS} , 0.79 für externes bzw. 0.80 für internes α -Ketoglutarat, im Einklang mit einem rapid-equilibrium-random-Mechanismus (Gl. 4.2).

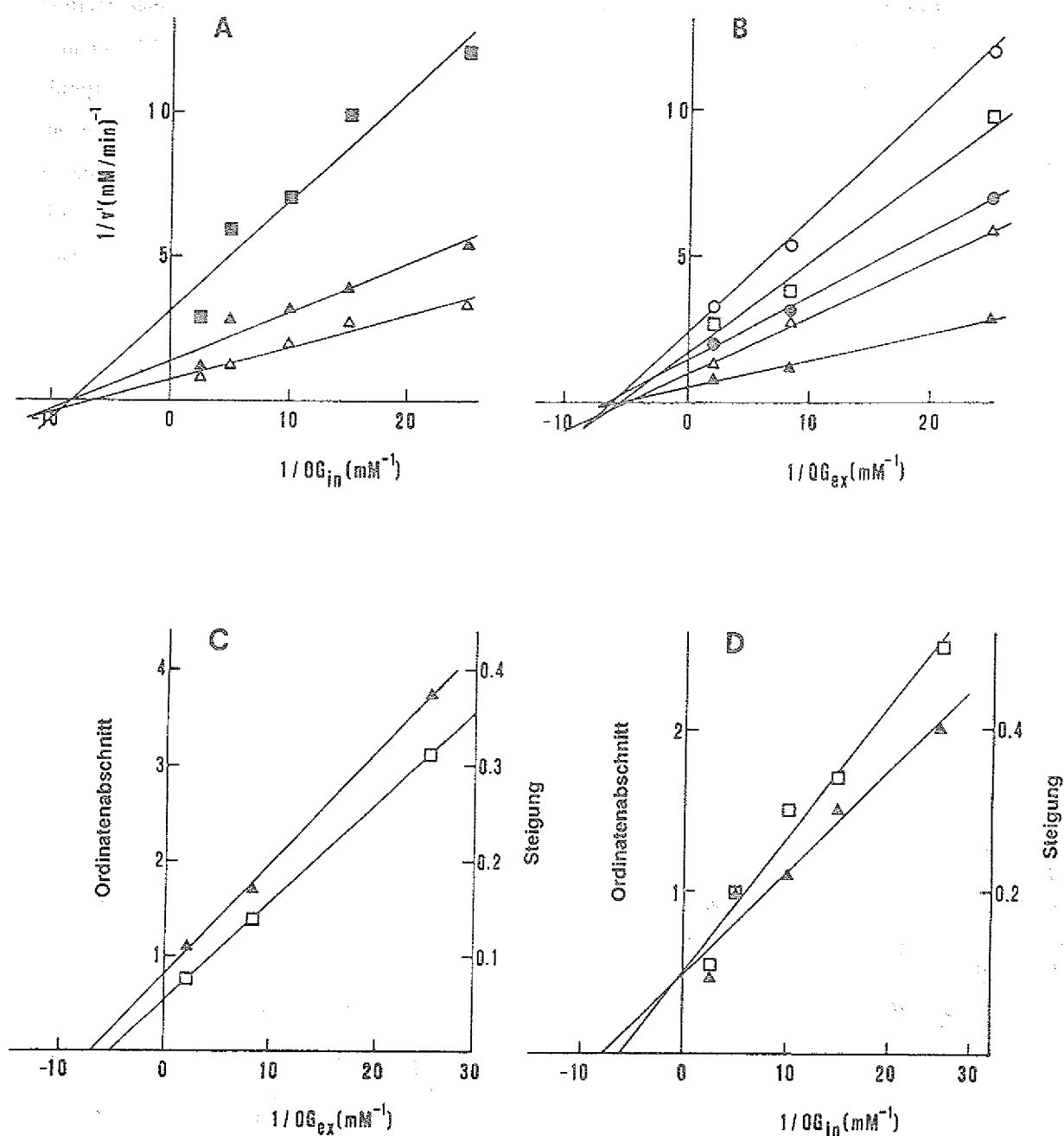


Abb.13: Bisubstrat-Analyse im Rücktausch-Verfahren der vom rekonstituierten Oxoglutarat-Carrier vermittelten α -Ketoglutarat/ α -Ketoglutarat-Homöaustauschreaktion. A, B: Lineweaver-Burk-Diagramme zeigen die Abhängigkeit der Antiportaktivität von internem (A) bzw. externem (B) α -Ketoglutarat. Die Konzentrationen an α -Ketoglutarat waren wie folgt. A: 0.04 (■), 0.12 (▲) und 0.5 mM (△) extern; B: 0.04 (○), 0.067 (□), 0.1 (●), 0.2 (△) und 0.4 mM (▲) intern. Relative Austauschraten v' wurden nach Gl. 2.6 berechnet. C, D: Sekundäre Auftragung der Steigungen (▲) und Ordinatenabschnitte (□) der primären Diagramme A bzw. B. Aus den Achsenabschnitten und Steigungen der sekundären Diagramme konnten 'konzentrationsunabhängige' K_m -Werte und K_{IS} -Konstanten (s. Text) ermittelt werden (vgl. Abb.6): K_m (extern), 0.19 (C) und 0.19 mM (D); K_m (intern), 0.15 (C) und 0.16 mM (D); K_{IS} (extern), 0.15 (D); K_{IS} (intern), 0.12 mM (C).

Es war wichtig zu zeigen, daß dieser besondere Mechanismus auch für die Malat/Malat-Austauschreaktion Gültigkeit besaß. Wegen des höheren internen K_m für Malat konnte diese Frage mit der weniger aufwendigen Vortausch-Technik angegangen werden. In einem ersten Schritt wurde der Vortausch angewendet, um die oben beschriebenen Ergebnisse zum α -Ketoglutarat/ α -Ketoglutarat-Austausch durch diese unabhängige Methode zu untermauern (Abb.14 A). Trotz der durch den Vortausch bedingten Einschränkungen bezüglich der internen Substratkonzentration wurde erneut ein kinetisches Muster vom sequentiellen Typ mit einem Schnittpunkt auf der Abszisse erhalten. Durch sekundäre Auswertung (nicht gezeigt) konnte auch der interne 'konzentrations-unabhängige' K_m bestätigt werden (0.11 mM); eine analoge Auswertung für die externe Seite war hier wenig sinnvoll. Schließlich wurde der Malat/Malat-Austausch untersucht, wie in Abb.14 B zu sehen. Auch in diesem Fall wurde ein Schnittpunkt nahe der Abszisse erhalten, wodurch angezeigt wird, daß der Reaktionsmechanismus sich nicht ändert, wenn ein anderes Substrat transportiert wird (K_m für internes Malat: 0.63 mM, für externes Malat: 1.2 mM). Die K_{IS} -Werte erfüllten erneut die Beziehung aus Gl. 4.2, wie für einen random-Mechanismus anzunehmen ist.

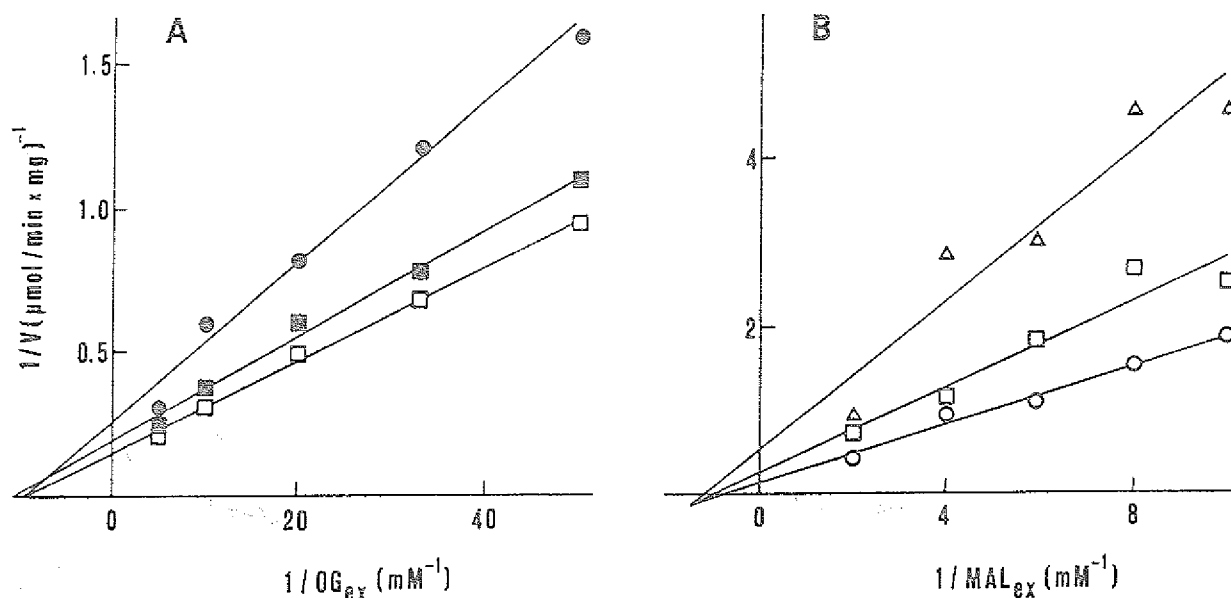


Abb.14: Bisubstrat-Analyse im Vortausch-Verfahren der vom rekonstituierten Oxoglutarat-Carrier vermittelten α -Ketoglutarat/ α -Ketoglutarat- und Malat/Malat-Homoaustauschreaktion. Lineweaver-Burk-Diagramme zeigen die Abhängigkeit der Antiporaktivität von externem α -Ketoglutarat (A) bzw. externem Malat (B). Die Konzentrationen der Gegensubstrate waren wie folgt. A: 0.1 (●), 0.2 (■) und 0.4 mM (□) internes α -Ketoglutarat; B: 0.2 (Δ), 0.6 (□) und 5 mM (○) internes Malat. Durch sekundäre Diagramme (nicht gezeigt) konnten 'konzentrationsunabhängige' K_m -Werte und K_{IS} -Konstanten ermittelt werden: K_m für internes α -Ketoglutarat 0.11 mM (A); K_m für internes Malat 0.63 mM, für externes Malat 1.2 mM (B); K_{IS} für externes Malat 0.74 mM, für internes Malat, 0.52 mM (B). Die V_{max} -Werte, extrapoliert auf unendliche Konzentration von internem und externem Substrat, lagen bei 8.3 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg (A) bzw. 8.5 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg (B).

5.4 Diskussion

Kinetische Beschreibung des rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers und Vergleich zu Mitochondrien

Das Liposomensystem bietet prinzipiell die Möglichkeit, die Substratkonzentration nicht nur im äußeren, sondern auch im inneren Kompartiment frei zu variieren. Um diesen offensichtlichen Vorteil im Vergleich zu den erheblich schwierigeren Experimenten in intakten Organellen voll nutzen zu können, war es notwendig, auch die Rücktausch-Technik einzusetzen. Die Kompatibilität der Vor- und Rücktausch-Methode zeigte sich in übereinstimmenden Ergebnissen bei der Ermittlung der Halbsättigungskonstanten (Tab.VI) und ebenso bei der Analyse des Transportmechanismus (Abb.13 und 14). So konnten die mit einer Methode erhaltenen Resultate durch die andere Methode untermauert werden. Alle kinetischen Konstanten wurden ermittelt, die nötig waren, um die beiden verschiedenen Seiten des rekonstituierten Carriers zu beschreiben. Innen fanden sich mittel-affine und außen mittel- bis niedrig-affine Bindungsstellen (Tab.VI).

Vergleicht man das hier klar umrissene kinetische Erscheinungsbild des Carriers mit Befunden ausführlicher Studien mit intakten Mitochondrien (Sluse et al. 1972, 1973, 1975, 1979, 1980, 1989, Sluse-Goffart et al. 1983, 1986), so wird deutlich, daß die Situation in Proteoliposomen wesentlich unkomplizierter ist. Wir beobachteten keine kooperativen Phänomene und brauchten wegen der Abwesenheit anderer Metabolite auch keine (möglicherweise) auftretenden allosterischen Einflüsse zu berücksichtigen (vgl. 5.1). Die reziproken Diagramme waren linear für beide Substrate auf beiden Seiten der Membran. Dagegen ergab sich in Rattenherz-Mitochondrien für externes α -Ketoglutarat ein komplexes Muster, das als Heterogenität der Bindungsstellen interpretiert wurde (Sluse-Goffart et al. 1983, 1986, Sluse et al. 1979, 1989). Sieht man einmal von dieser Ausnahme ab, so ergibt sich aber dennoch eine hinreichend gute Übereinstimmung hinsichtlich der apparenten Transport-Affinitäten, da auch in Mitochondrien mittel-affine Bindungsstellen (K_m : 0.2-1.3 mM) gefunden wurden (vgl. Tab.VI). Es wurde zuvor gezeigt, daß die Substratspezifität und die Inhibitorsensitivität des rekonstituierten und des nativen Translokators sehr ähnlich sind (Bisaccia et al. 1985, 1988, Indiveri et al. 1987); außerdem erwies sich der kinetische Mechanismus als identisch (s. unten). Daher erscheint es unangebracht, zusätzliche hypothetische Untereinheiten anzunehmen, die bei der Isolierung hätten verloren werden können. Vielmehr reflektieren die klaren Kinetiken die drastisch reduzierte Komplexität unseres Modellsystems. Zur Rekonstitution benutzten wir mehr oder weniger ungeladene Membranen und inserierten eine einzige Proteinspezies in geringer Kopienzahl pro Liposom. Spezifische Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen, die für das überraschend komplexe kinetische Verhalten unter 'physiologischen Bedingungen' verantwortlich sein könnten, spielen also im Liposomensystem keine Rolle.

Will man im Falle rekonstituierter Carrierproteine mehrdeutige Interpretationen kinetischer Analysen vermeiden, so ist es wichtig zu erfahren, ob das Protein in der Liposomenmembran unidirektional orientiert ist - es sei denn, man kann eine der beiden möglichen Orientierungen durch seiten-spezifische Inhibitoren selektiv ausschalten. Eosinmaleimid, das in Mitochondrien den Oxoglutarat-Carrier nur von der cytosolischen Seite her inhibiert (Zara & Palmieri 1988), führte zu einer vollständigen Inhibition des Austausches im rekonstituierten System. Jedoch erwies sich die Liposomenmembran als permeabel für dieses Reagens (Ergebnisse nicht gezeigt). Um die Frage der transmembranen Asymmetrie anzugehen, benutzten wir daher denselben Ansatz wie für den rekonstituierten Asp/Glu-Carrier (s. 3.3.1). Dort wurde die Unidirektionalität der Membran-Insertion

aufgezeigt, indem die seitenspezifische Ausrichtung der externen und internen Bindungsstellen, charakterisiert durch verschiedene Affinitätskonstanten, bestimmt wurde.

Wenngleich signifikant und statistisch abgesichert, so waren die Unterschiede zwischen den internen und externen Transport-Affinitäten des Oxoglutarat-Carriers tatsächlich nicht besonders groß - besonders im Falle von α -Ketoglutarat (Tab.VI). Außerdem ergaben sich aber noch zwei unabhängige Hinweise auf seiten-spezifische Halbsättigungskonstanten. Bei Anwendung beider unabhängiger Meßmethoden wurde dasselbe Verhältnis von internem und externem K_m für α -Ketoglutarat erhalten - in Vor- (1.55) wie Rücktausch-Bestimmungen (1.53). Weiterhin konnte die Carrierorientierung durch Beschallung der Proteoliposomen umgekehrt und vermischt werden, wonach sich in der Tat die beiden erwarteten K_m -Werte auf der Außenseite zeigten, und zwar in einer Stöchiometrie von annähernd 1:1 (Abb.11B). Die Seitenspezifität der zwei verschiedenen Affinitätskonstanten für Malat (ohne Beschallung) wird in Abb.12 demonstriert, wo die Substratkonzentration über einen Bereich variiert wurde, der auch den K_m der jeweils anderen Membranseite einschloß. Wie in allen anderen Experimenten so war auch hier nur eine kinetische Komponente auf jeder Seite erkennbar.

Leider konnten wir nicht herausfinden, ob die so bewiesene Orientierung 'right-side out' oder 'inside out' ist im Vergleich zu Mitochondrien. Eine überzeugende Korrelation einer mitochondrialen mit einer liposomalen Seite konnte nicht festgestellt werden, da die Differenzen der K_m -Werte zwischen den zwei Seiten in beiden Systemen zu gering waren. In dieser Hinsicht die einzige Ausnahme war die sehr niedrige halbsättigende Konzentration an externem α -Ketoglutarat (10-17 μ M), die in Rattenherz-Mitochondrien einem mittleren Plateau einer komplexen Sättigungskurve entsprach (s. oben). Dazu sollte erwähnt werden, daß in diesen Studien (Sluse et al. 1979) eine vollständige Sättigung der externen Bindungsstellen durch α -Ketoglutarat nicht erreicht wurde, da nur bis 200 μ M gemessen werden konnte. In Proteoliposomen erhielten wir einen einzigen K_m auf jeder Seite (0.31 mM für externes und 0.17 mM für internes α -Ketoglutarat). Wie bereits im Ergebnisteil diskutiert, beruhte die Beobachtung eines internen K_m von 5 μ M (Abb.11A) sehr wahrscheinlich auf einem experimentellen Artefakt, der sich nicht nur für internes α -Ketoglutarat, sondern unter entsprechenden Bedingungen auch für internes Malat zeigte. Ein tiefer K_m für Malat wurde jedoch bisher nicht berichtet. Bei den extrem geringen internen Substratmengen (s. 5.3.4) resultierten ähnlich niedrige K_m -Werte außerdem in Untersuchungen anderer Carrier in einem ähnlichen Liposomensystem (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Nach Eingriff in die Membrantopologie des rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers durch Beschallung erschien außen nur der 'normale' interne K_m (0.1 mM, Abb.11 B).

Angesichts der exzellenten Übereinstimmung der Affinitätskonstanten zwischen Proteoliposomen und Mitochondrien im Falle des Asp/Glu-Carriers (s. 3.) mögen die Unterschiede beim Oxoglutarat-Carrier verwundern, doch es gibt plausible Erklärungen. Die Herkunft des Oxoglutarat-Carriers war verschieden (Rinder- bzw. Rattenherz). Weiterhin könnte - anders als beim Asp/Glu-Carrier (s. Tab.IV) - die wesentlich tiefere Temperatur (2°C) bei den Messungen von Sluse und Mitarbeitern (1979) eine Rolle spielen, zumal schon Palmieri et al. (1972) in Rattenleber-Mitochondrien einen Anstieg des externen K_m für α -Ketoglutarat von 20 μ M bei 0°C auf 46 μ M bei 9°C beobachteten.

Abschließend soll dennoch eine Spekulation gewagt werden. Stützt man sich auf den unserer Meinung nach 'zuverlässigsten' K_m -Wert aus Rattenherz-Mitochondrien, nämlich den für externes Malat, dem einzigen Michaelis-Menten-Substrat auf der cytosolischen Seite (Sluse-Goffart et al. 1983), so ergibt sich ein Hinweis auf eine inside-out-Orientierung. Auch der Matrix- K_m für Malat bestätigt diesen Vorschlag (Tab.VI).

Der sequentielle Transportmechanismus, ein gemeinsames Charakteristikum mitochondrialer Antiportcarrier

Glücklicherweise ist die Situation hinsichtlich des kinetischen Mechanismus überaus klar und konsistent. Wie zuvor in Rattenherz-Mitochondrien (Sluse et al. 1972) offenbarten auch die hier durchgeführten Bisubstrat-Analysen einen sequentiellen Mechanismus. Für den rekonstituierten Oxoglutarat-Carrier ist dies in Abb.13 und 14 dokumentiert. Die sich schneidenden Geraden können nur im Rahmen dieses kinetischen Reaktionstyps interpretiert werden, der einen ternären Komplex des Carriers mit zwei Substratmolekülen als zentralem Intermediat des Austausch-Zyklus impliziert. Dabei scheint die Bindung der zwei Gegensubstrate keiner obligatorischen Reihenfolge zu unterliegen, worauf der gemeinsame Schnittpunkt auf der Abszisse hinweist. Weitere Beobachtungen stützen einen solchen random-Mechanismus. Die K_{iS} -Werte, die die Interaktion des Substrats mit dem unbeladenen Carrier charakterisieren, stimmen ungefähr mit den entsprechenden K_m -Werten überein (Interaktion mit dem einfach-besetzten Carrier). Der geringe Unterschied zwischen K_m und K_{iS} war zudem identisch, wenn beide Konstanten unabhängig voneinander für die interne und die externe Seite der Membran bestimmt wurden (Abb.13), so daß die rapid-equilibrium-random-Bedingung (Gl. 4.2) erfüllt ist. Diese Ergebnisse bedeuten eine schnelle und unabhängige Bindung der zwei Substratmoleküle. Eine derartige Unabhängigkeit wurde sowohl für den Homoaustausch, und zwar von α -Ketoglutarat (Abb.13) wie von Malat (Abb.14 B), als auch für den Heteroaustausch beobachtet (nicht gezeigt). Diese Symmetrie des Oxoglutarat-Carriers drückte sich ebenso hinsichtlich der maximalen Geschwindigkeit des Transports von α -Ketoglutarat und Malat aus, die unabhängig von der Art des zweiten Substrats auf der anderen Seite der Membran war.

Faßt man die folgenden Befunde zusammen, (a) die Notwendigkeit eines ternären Komplexes, (b) die Unabhängigkeit der externen und internen Bindungsstellen, (c) den fehlenden Einfluß der verschiedenen Substrate auf die Transportrate und (d) das früher beobachtete kompetitive Verhalten von α -Ketoglutarat und Malat bei Anwesenheit im selben Kompartiment (Indiveri et al. 1987), so wird ein Funktionsmodell des Oxoglutarat-Carriers offensichtlich. Nach Bindung je eines Substratmoleküls auf beiden Seiten der Membran bildet sich ein ternärer Komplex, der zugleich das katalytische, d. h. das transport-kompetente Intermediat darstellt. Folglich werden beide Substrate in einem konzertierten Schritt über die Membran hinweg ausgetauscht. In seiner völlig symmetrischen Konzeption ähnelt dieses Modell stark dem für den Asp/Glu-Carrier beschriebenen (s. 4.4, Abb.10). Allerdings brauchen im Falle des Oxoglutarat-Carriers keine unterschiedlich geladenen, durch ein cotransportiertes Proton bedingten Carrier-Substrat-Komplexe berücksichtigt werden.

Wie oben diskutiert, wurde ein sequentieller Mechanismus (rapid-equilibrium random) für den Oxoglutarat-Carrier bereits zuvor auch in intakten Mitochondrien (Sluse et al. 1972) und für den Asp/Glu-Carrier sowohl im rekonstituierten System (s. 4.3.1.1) als auch in Mitochondrien (s. 4.3.1.2, Murphy et al. 1979) nachgewiesen. Berücksichtigt man ferner die zunehmenden Evidenzen aus Studien mit intakten Mitochondrien (Duyckaerts et al. 1980, Sluse et al. 1989), daß auch der ADP/ATP-Carrier nach einem sequentiellen Mechanismus funktioniert, so scheint sich ein generelles Konzept abzuzeichnen. Demnach drückt sich die nahe Verwandtschaft der mitochondrialen 'Carrierfamilie' nicht nur in einer Ähnlichkeit der Primärstruktur und Konformation aus, sondern auch in einem gemeinsamen Typus des Antiportmechanismus.

6. Antiportfunktion des Dicarboxylat-Carriers: Reaktionsmechanismus mit zwei separaten Bindungsstellen an der Außenseite des rekonstituierten Proteins (Indiveri, Dierks, Krämer & Palmieri 1989b)

6.1 Einleitung

Die Eigenschaften des Dicarboxylat-Carriers in intakten Mitochondrien sind seit etwa 20 Jahren ausführlich untersucht worden. Dieses Transportsystem katalysiert einen elektroneutralen Austausch verschiedener Dicarboxylate wie Malat, Malonat, Succinat u. a. gegen anorganisches Phosphat (Chappell & Haarkhoff 1967, Chappell 1968, Palmieri et al. 1970, 1971, McGivan & Klingenberg 1971). Der Export von Malat aus den Mitochondrien ist vor allem für die Gluconeogenese von Bedeutung, da zugleich Oxalacetat, als Vorstufe von Phosphoenolpyruvat, und NADH in den cytosolischen Teil dieses Stoffwechselweges eingeschleust werden. Im Gegensatz zur Leber findet im Herzen keine Gluconeogenese statt; dementsprechend hoch bzw. niedrig ist die meßbare Aktivität des Dicarboxylat-Carriers in diesen Geweben.

Bereits sehr frühe Befunde aus intakten Mitochondrien von Palmieri et al. (1971) deuteten auf die Existenz zweier separater Bindungsstellen auf der cytosolischen Seite des Dicarboxylat-Carriers, davon eine mit Spezifität für Phosphat und eine mit Spezifität für Dicarboxylate. Später wurden weitere Anionen, nämlich Sulfat, Sulfit und Thiosulfat, als Substrate dieses Carriersystems entdeckt (Crompton et al. 1974a, 1974b), und es gab Hinweise, daß Sulfat mit der Dicarboxylat-Bindungsstelle interagiert (Crompton et al. 1975). Da nun das gereinigte Carrierprotein in funktionell aktivem Zustand verfügbar ist (Bisaccia et al. 1988), eröffnet sich die Möglichkeit, diese interessanten Eigenschaften des Dicarboxylat-Carriers im rekonstituierten System weiter zu erforschen, um die Anzahl und Spezifität der Bindungsstellen zu charakterisieren.

Die bereits für die Analyse des Asp/Glu- und des Oxoglutarat-Carriers erfolgreich eingesetzte Rekonstitutionsmethode (s. 3.-5.) wurde kürzlich auch für den gereinigten Dicarboxylat-Carrier adaptiert (Indiveri et al. 1989a). Dieses Meßsystem erlaubte es, zuverlässige K_m - und V_{max} -Werte zu ermitteln. Eine Übereinstimmung zwischen dem isolierten und dem nativen Carrier bezüglich seiner Substrat- und Inhibitorspezifität war bereits zuvor gezeigt worden (Bisaccia et al. 1988). Hier nun sollen die funktionellen Eigenschaften des rekonstituierten Dicarboxylat-Carriers im Hinblick auf drei chemisch recht verschiedene Gruppen von Substraten beschrieben werden: Dicarboxylate, Phosphat oder Arsenat und Schwefel-enthaltende Anionen. Zu diesem Zweck wurde der wechselseitige Einfluß der unterschiedlichen Liganden auf die Transportaktivität des Carriers untersucht. Angesichts des vergleichsweise komplexen kinetischen Erscheinungsbildes des Dicarboxylat-Carriers beschränkte sich die Analyse zunächst auf die externe Seite der Proteoliposomen.

6.2 Methoden

Reinigung des Dicarboxylat-Carriers

Kürzlich konnte der Dicarboxylat-Carrier aus Rattenleber-Mitochondrien durch Chromatographie auf Amberlite und Hydroxylapatit in Gegenwart von Cardiolipin gereinigt werden (Bisaccia et al. 1988). Dazu wurden Rattenleber-Mitochondrien, die nach Palmieri et al. (1974) präpariert wurden, in 3% Triton X-114/20 mM Na_2SO_4 /1 mM EDTA/10 mM Pipes (pH 7) solubilisiert und nach Supplementierung mit Cardiolipin (4 mg/ml) und Reduzierung des Detergens durch Amberlite XAD-2 (10 g/g Triton) auf trockenes Hydroxylapatit aufgetragen (1 ml/2 g). Die mit 0.1% Triton X-114 (sonst wie Solubilisierungspuffer) eluierende Durchlaufraction wurde gesammelt. Dabei wurde das Protokoll von Bisaccia et al. (1988) genau eingehalten. Das Vorgehen entspricht in weiten Zügen der Reinigung des Oxoglutarat-Carriers aus Rinderherz-Mitochondrien (s. 5.2). Die Unterschiede liegen in der zusätzlichen Anwendung von Amberlite im Falle des Dicarboxylat-Carriers bzw. von Celite (im Gemisch mit Hydroxylapatit) im Falle des Oxoglutarat-Carriers sowie in der viel höheren Detergensenkonzentration (3%) bei der Elution des Oxoglutarat-Carriers. Die Reinheit des Dicarboxylat-Carriers betrug mindestens 95% und wurde stets durch SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. Kontaminationen durch andere mitochondriale Carrier konnten ausgeschlossen werden.

Rekonstitution des Dicarboxylat-Carriers

Die Rekonstitution des isolierten Proteins in Liposomen wurde wiederum durch hydrophobe Chromatographie gemischter Mizellen erreicht, ähnlich wie es im allgemeinen Methodenteil für den Asp/Glu-Carrier beschrieben ist. Vor diesem Schritt wurde das Protein über DOWEX 1-X8 (Acetat-Form) gegeben, um Sulfat und Phosphat zu entfernen, das aus dem Solubilisierungspuffer bzw. dem Hydroxylapatit stammte (Indiveri et al. 1989a). Folgende Mixtur wurde dann zur Rekonstitution eingesetzt (Endvolumen 680 μl): 200 μl gereinigtes Carrierprotein (7.5-15 μg) in 0.1% Triton X-114, 60 μl 10% Triton X-114, 6.7 mg Truthahn-Eigelb-Phospholipid in Form beschallter Liposomen, 15 mM Phosphat, 10 mM Pipes (pH 7). Diese Mischung wurde 13 mal über Säulchen mit Amberlite XAD-2 (5 x 32 mm) gegeben, die zuvor mit 10 mM Pipes (pH 7) und 15 mM Phosphat äquilibriert worden waren. Mit Ausnahme der hydrophoben Chromatographie wurde alles bei 4°C durchgeführt.

Messung der Transportaktivität

Um das externe Substrat zu entfernen, wurden die Proteoliposomen über Sepadex G-75-Säulen gegeben, die mit 50 mM NaCl/10 mM Pipes (pH 7) äquilibriert waren. Die Transportaktivitäten wurden mit der Vortausch-Methode bestimmt, wie für den Asp/Glu-Carrier beschrieben (s. 2.3). Die Messung wurde durch Zusatz von markiertem Substrat ($[^{14}\text{C}]$ Malat oder $[^{32}\text{P}]$ Phosphat) in angegebenen Konzentrationen gestartet und durch Gabe von 20 mM Butylmalonat gestoppt. Schließlich wurde jede einzelne Probe (100 μl) auf Ionenaustauscher-Säulchen gegeben. Dabei wurde analog der Beschreibung für den Asp/Glu-Carrier vorgegangen (s. 2.3). Die Transportaktivitäten wurden aus dem linearen Bereich der Aufnahme von markiertem Substrat berechnet. Alle in den Abbildungen gezeigten Geraden wurden durch lineare Regression ermittelt und die so berechneten Parameter zur kinetischen Auswertung herangezogen. Die Bestimmung der angegebenen K_i -Werte erfolgte durch Auftragung der Daten nach Dixon (1953) (nicht gezeigt).

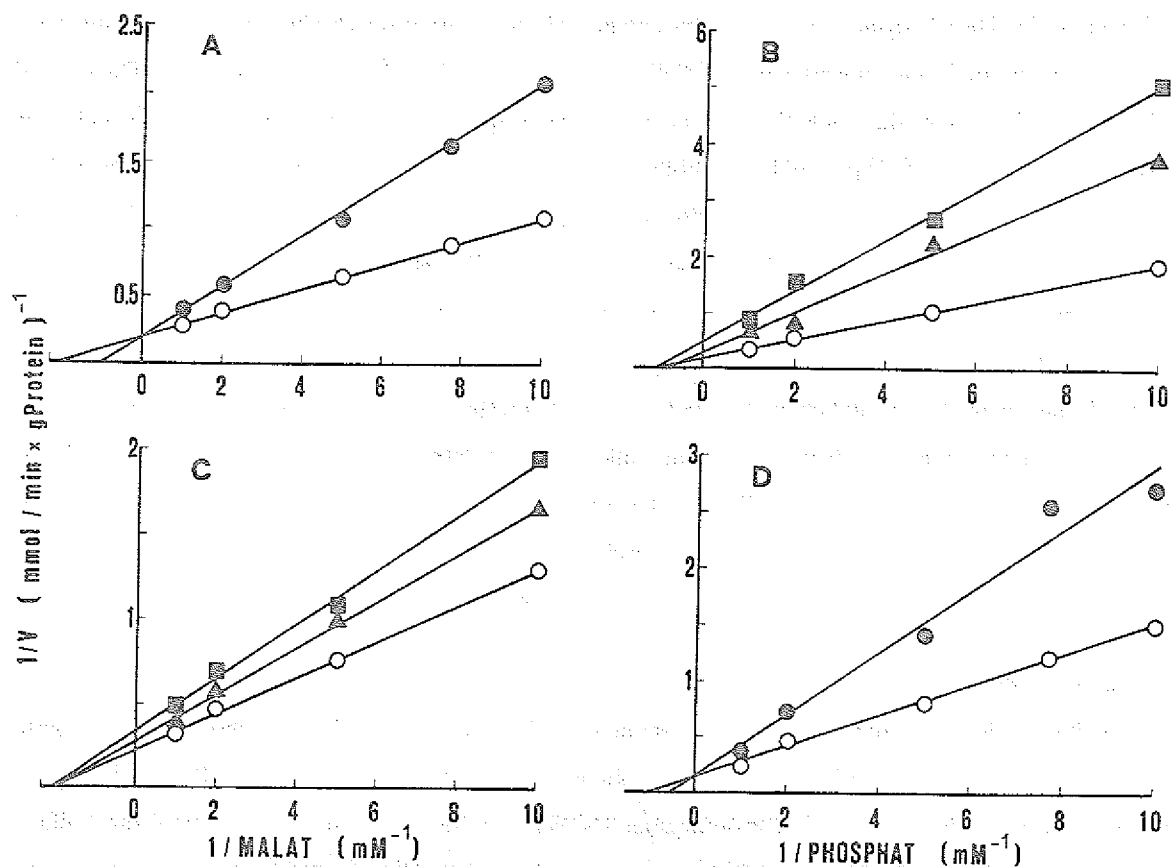


Abb.15: Inhibition der Malat- und der Phosphat-Aufnahme in Phosphat-beladene Liposomen durch Butylmalonat (A bzw. B) sowie durch Arsenat (C bzw. D). Zugaben: (○) keine; (●) 0.4 mM, (▲) 0.3 mM oder (■) 0.6 mM Butylmalonat; (▲) 0.4 mM, (■) 0.8 mM oder (●) 0.6 mM Arsenat.

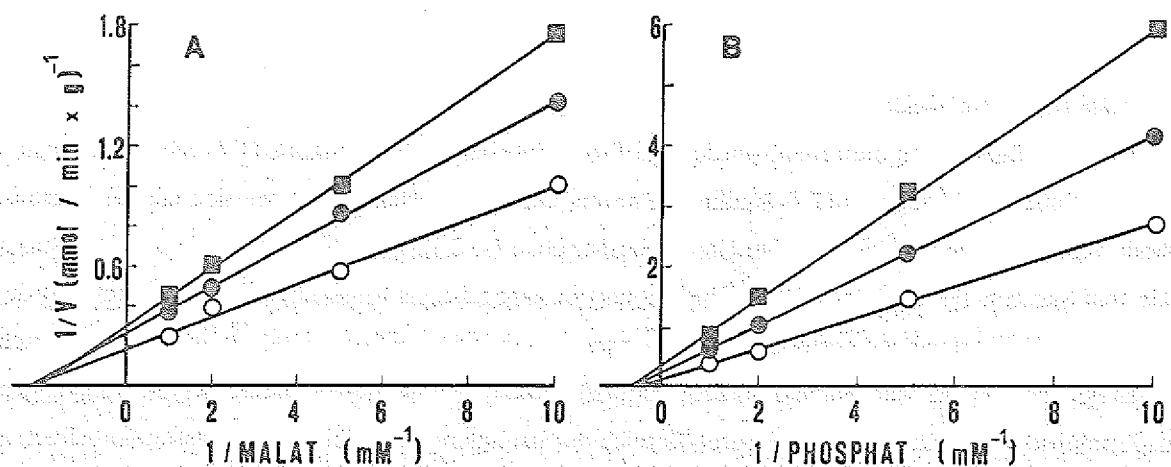


Abb.16: Inhibition der Malat- (A) und der Phosphat-Aufnahme (B) in Phosphat-beladene Liposomen durch Phosphat (A) bzw. Malat (B). Zugaben: (○) keine; (●) 0.3 mM oder (■) 0.6 mM Phosphat; (●) 0.2 mM oder (■) 0.4 mM Malat.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Inhibition durch Substratanaloga

In einem ersten Schritt der kinetischen Analyse wählten wir die zwei Inhibitoren Arsenat und Butylmalonat als repräsentative Analoga der Substrate Phosphat bzw. Dicarboxylat. Die Hemmung des Austausches Malat (extern)/Phosphat (intern) und Phosphat/Phosphat durch diese Analoga wurde bei verschiedenen externen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen untersucht. Wie in Abb.15 A gezeigt, inhibierte Butylmalonat die Aufnahme von Malat rein kompetitiv. Der K_i für Butylmalonat lag bei 0.4 mM. Auch alle anderen getesteten Dicarboxylate konnten als kompetitive Inhibitoren des Malat/Phosphat-Austausches identifiziert werden, nämlich Malonat (K_i 0.44 mM), Benzylmalonat (0.43 mM), Succinat (0.82 mM), Phenylsuccinat (1.6 mM) und Phthalat (0.95 mM). In allen Fällen war lediglich ein Effekt auf den K_m , nicht aber auf die V_{max} der Malat-Aufnahme zu beobachten.

Wenn dagegen die Aufnahme von Phosphat durch Butylmalonat (Abb.15 B), Malonat oder Succinat gehemmt wurde, war der Typ der Inhibition klar nicht-kompetitiv. Für Butylmalonat wurde erneut ein K_i von 0.4 mM erhalten. Exakt die gegenteilige Situation war zu beobachten, als die Hemmung durch Arsenat analysiert wurde. Arsenat inhibierte die Phosphat-Aufnahme kompetitiv (Abb.15 D) und zeigte einen rein nicht-kompetitiven Hemmtyp bei der Aufnahme von Malat (Abb.15 C). In beiden Fällen nicht-kompetitiver Interaktion mit dem Carrier (Abb.15 B und C) lag der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden auf der Abszisse. Dies bedeutet, daß der Inhibitor an das freie wie an das Substrat-beladene Carrierprotein mit derselben Halbsättigungskonstante bindet.

6.3.2 Wechselseitige Inhibition der Substrate Malat und Phosphat

Für eine direktere Charakterisierung der Transportkinetik des Dicarboxylat-Carriers wurden Malat und Phosphat, die bisher nur einzeln als Transportsubstrate eingesetzt worden waren, gleichzeitig zu den Liposomen gegeben, um sie als gegenseitige Inhibitoren agieren zu lassen. Während Dicarboxylate, wie oben gezeigt, die Malat-Aufnahme kompetitiv inhibierten, führte die Gabe von Phosphat zu einem rein nicht-kompetitiven Hemmtyp (Abb.16 A). Wenn umgekehrt der Phosphat/Phosphat-Austausch verfolgt und den rekonstituierten Liposomen Malat zugesetzt wurde, so enthüllte die kinetische Analyse ebenso eine nicht-kompetitive Beziehung dieser zwei Liganden (Abb.16 B). Die K_i -Werte der Inhibitoren Phosphat bzw. Malat konnten durch Auswertung der Daten aus Abb.16 nach Dixon (1953) bestimmt werden (nicht gezeigt). Die Inhibitions-konstante K_i für Phosphat hinsichtlich der Malat-Aufnahme lag bei 0.8 mM, also im Bereich seines K_m -Werts als Substrat (etwa 1.4 mM). Dasselbe galt für Malat als Inhibitor der Phosphat-Aufnahme. Der in diesem Fall erhaltene K_i -Wert von 0.5 mM entsprach der dazugehörigen Halbsättigungskonstante K_m (0.49 mM).

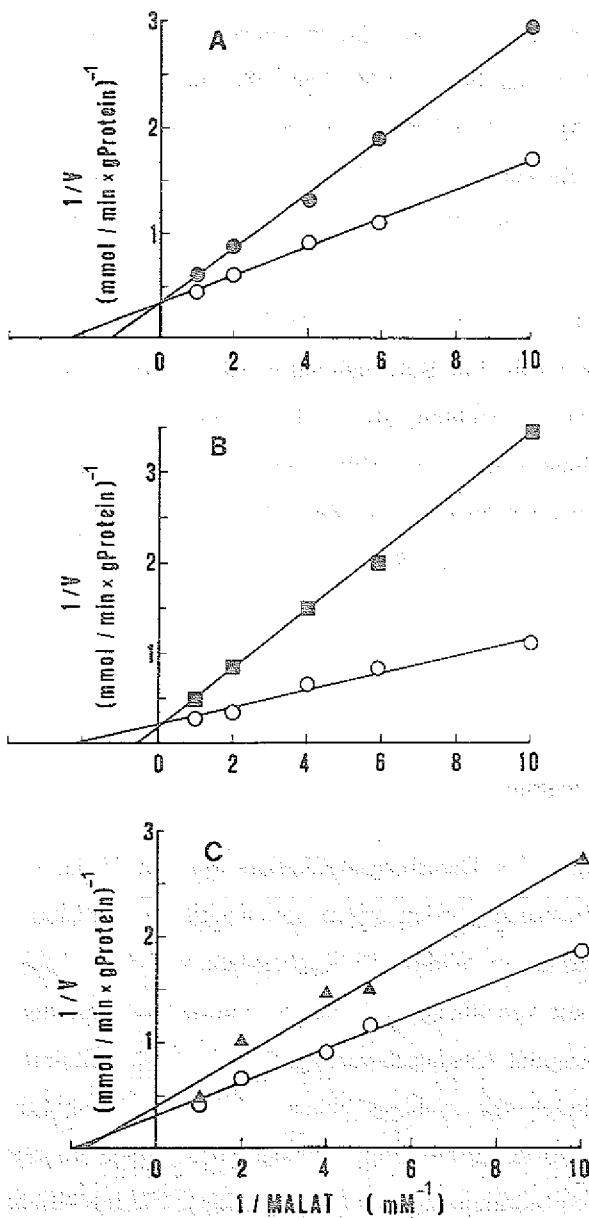


Abb.17: Inhibition der Malat-Aufnahme in Phosphat-beladene Liposomen durch Sulfat (A), Sulfit (B) und Thiosulfat (C). Zugaben: (○) keine; (●) 0.6 mM Sulfat; (■) 0.6 mM Sulfit; (▲) 0.6 mM Thiosulfat.

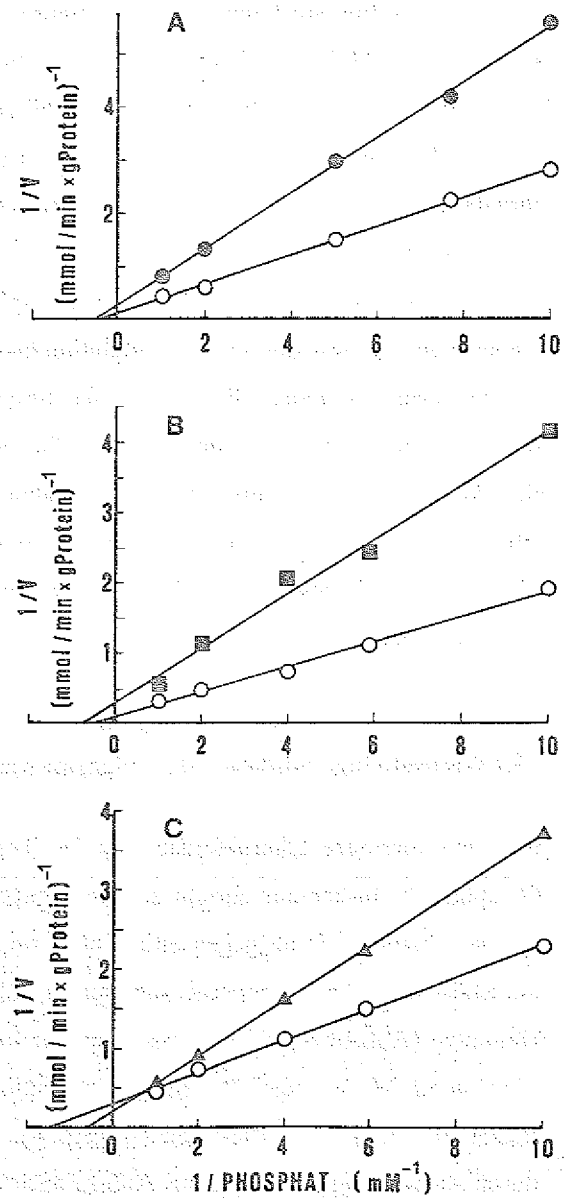


Abb.18: Inhibition der Phosphat-Aufnahme in Phosphat-beladene Liposomen durch Sulfat (A), Sulfit (B) und Thiosulfat (C). Zugaben: (○) keine; (●) 0.6 mM Sulfat; (■) 0.6 mM Sulfit; (▲) 0.6 mM Thiosulfat.

6.3.3 Inhibition durch Schwefel-enhaltende Anionen

Das relativ breite Substratspektrum des Dicarboxylat-Carriers bot die Möglichkeit, auch 'nicht-physiologische' Substrate einzusetzen. Aus Experimenten mit Mitochondrien war geschlossen worden, daß Sulfat, Sulfit und Thiosulfat ebenfalls transportiert werden (Crompton et al. 1974a, 1974b). Im rekonstituierten System inhibierten alle drei Schwefel-haltigen Anionen die Malat-Aufnahme. Unterschiede ergaben sich jedoch hinsichtlich der Art der Interaktion mit dem Carrier. Sulfat und Sulfit hemmten kompetitiv, während die Inhibition durch Thiosulfat nicht-kompetitiv war (Abb.17). Die K_i -Werte dieser Liganden wurden mit 0,6, 0,2 bzw. 0,8 mM berechnet.

Wie zu erwarten, konnten gerade die gegenteiligen Effekte beobachtet werden, als diese drei Anionen auf ihre Hemmung der Phosphat-Aufnahme getestet wurden (Abb.18). Thiosulfat stellte sich als kompetitiver Inhibitor heraus, während Sulfat und Sulfit nicht-kompetitiv wirkten. In diesem Fall betrugen die K_i -Werte für Sulfat, Sulfit und Thiosulfat 0,5, 0,3 bzw. 0,4 mM.

6.3.4 Analyse des Mechanismus der Transportinhibition

Um Einblick in die wechselseitige Interaktion zwischen Substrat und Inhibitor am Carrierprotein zu bekommen, ist es hilfreich, wenn man zwischen vollständiger und partieller Hemmung unterscheiden kann. Zu diesem Zweck variierten wir die Inhibitorkonzentration bei einer konstanten Substratkonzentration. Die erhaltenen Aktivitätsdaten wurden dann nach Webb (1963) analysiert, indem die fraktionelle Inhibition (i) gegen die Konzentration des Inhibitors doppelt-reziprok aufgetragen wurde (Abb.19). Die fraktionelle Inhibition ist definiert als $i = 1 - (v_i / v)$, worin v_i und v die Aufnahmeraten in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors bedeuten. Vollständige Hemmungen - kompetitiver oder nicht-kompetitiver Natur - führen zu Geraden, die die Ordinate bei 1 schneiden, während partielle Hemmtypen zu Abschnitten mit höherem Wert führen. Im Falle beider Substrate, Malat und Phosphat, schnitten die jeweils für die verschiedenen Liganden erhaltenen Geraden die Ordinate nahe bei 1, wie in Abb.19 für Sulfat, Thiosulfat, Malonat und Phosphat zu sehen ist.

Die kinetische Analyse des nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus konnte noch weiter vertieft werden. Dazu wurde untersucht, ob der Hemmeffekt darauf zurückzuführen ist, daß die beiden Substrate, Malat und Phosphat, gleichzeitig die zwei verschiedenen Bindungsstellen desselben Carriermoleküls besetzen und dabei einen nicht-katalytischen Komplex bilden. Falls solch ein Komplex aufträte, könnte eine Translokation weder des einen noch des anderen Substrats stattfinden, wenn Malat und Phosphat sättigend vorlägen. Folglich wurde die totale Transportaktivität, d. h. die Summe der [^{32}P]Phosphat- und [^{14}C]Malat-Aufnahme, bestimmt, wenn beide Substrate in unterschiedlichen Verhältnissen und bei unterschiedlichem Sättigungsgrad (0,4 und 4 mM) an der Außenseite der Proteoliposomen anwesend waren. Die in Abb.20 dargestellten Ergebnisse belegen, daß der Gesamtumsatz des Carriers keinesfalls konstant blieb bei unterschiedlichen Verhältnissen dieser zwei Liganden, obwohl die totale Konzentration von Malat plus Phosphat nicht verändert wurde. Interessanterweise wurde die geringste Aktivität bei einem Malat : Phosphat-Verhältnis von etwa 1:1 beobachtet. Weiterhin war der Hemmeffekt wesentlich deutlicher, wenn die jeweiligen Bindungsstellen zu einem höheren Grad gesättigt wurden (4 mM, Abb.20 B). Das Ausmaß der Inhibition, das bei 2 mM Phosphat/2 mM Malat erzielt wurde, betrug 40-60% (fünf Experimente).

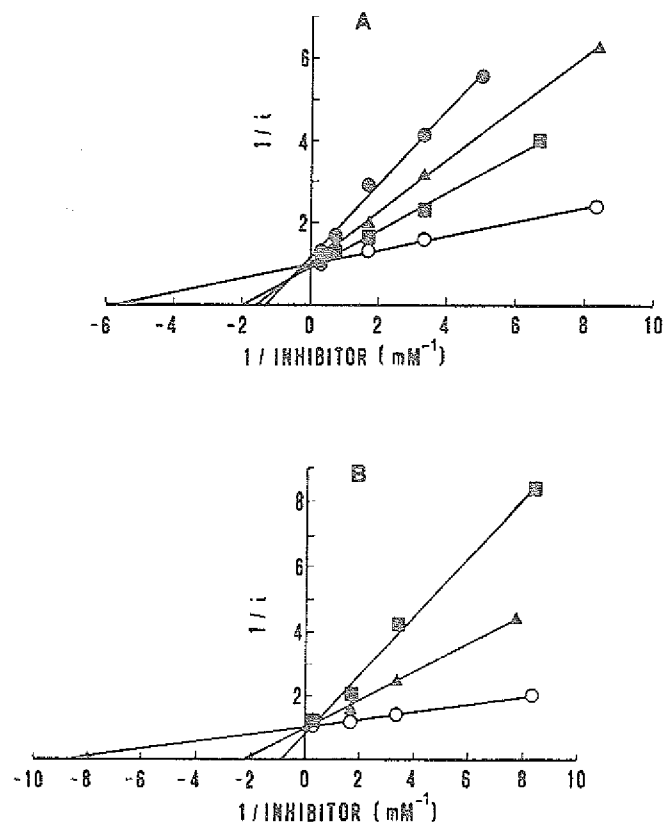


Abb.19: Inhibition der Malat- (A) und der Phosphat-Aufnahme (B) in Phosphat-beladene Liposomen durch unterschiedliche Konzentrationen an Sulfat, Thiosulfat, Malonat und Phosphat. Die Raten der Aufnahme von 0.1 mM Malat (A) und 0.1 mM Phosphat (B) wurden gemessen. Alle Inhibitoren wurden gleichzeitig mit dem markierten Substrat zugesetzt: (O) Malonat; (■) Thiosulfat; (▲) Sulfat; (●) Phosphat. Zur Erklärung der fraktionellen Inhibition i siehe Text.

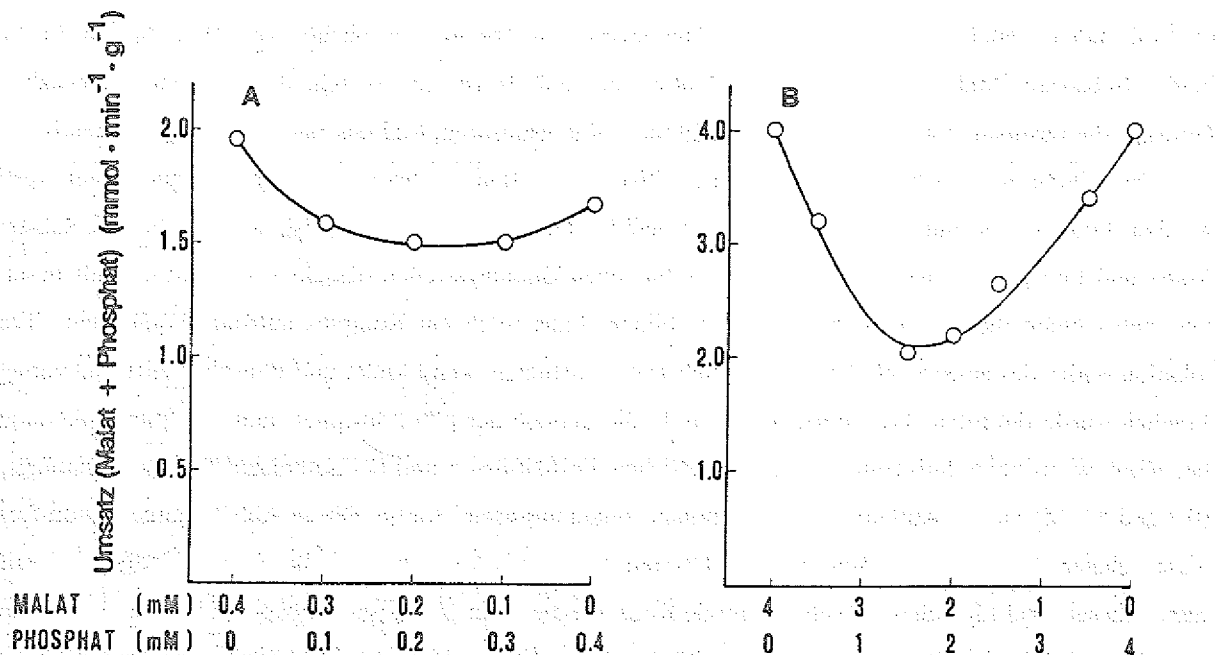


Abb.20: Inhibition des Carrier-Umsatzes durch gleichzeitige Bindung von Phosphat und Malat an den rekonstituierten Dicarboxylat-Carrier. [¹⁴C]Malat und [³²P]Phosphat wurden gleichzeitig in den angegebenen Konzentrationen zu Phosphat-beladenen Liposomen zugesetzt. Die Gesamtkonzentration beider Substrate lag bei 0.4 mM (A) oder 4 mM (B).

6.4 Diskussion

Für die Analyse eines carrier-vermittelten Transportprozesses, der separate Bindungsstellen für verschiedene Substrate involviert, mußten die kinetischen Parameter zunächst für jedes einzelne Substrat ermittelt werden. Diese Untersuchungen wurden bereits zuvor von Indiveri et al. (1989a) ausführlich beschrieben. Dabei war das für die hier durchgeführten Studien wichtigste Ergebnis, daß die $V_{\max}$ -Werte der Phosphat- bzw. Malat-Aufnahme in mit Phosphat beladene Proteoliposomen exakt übereinstimmten. Diese intrinsische Symmetrie der Antiportreaktion ist eine wichtige Voraussetzung, wenn man das kompetitive oder nicht-kompetitive Verhalten zweier Substrate analysieren will, die gleichzeitig auf derselben Seite der Membran anwesend sind.

Experimente mit intakten Mitochondrien führten schon sehr früh zu Hinweisen, daß der Dicarboxylat-Carrier zwei verschiedene Bindungsstellen besitzt (Palmieri et al. 1971). Die hier berichteten Daten zum rekonstituierten Carrier stützen diesen Vorschlag. Die wesentliche Evidenz für ein derartiges Modell ist die nicht-kompetitive Natur der Hemmung der Phosphat-Aufnahme durch Malat oder Butylmalonat einerseits und die nicht-kompetitive Hemmung der Malat-Aufnahme durch Phosphat oder Arsenat andererseits.

Aufgrund dieses Befundes konnten wir die genannten sowie verschiedene andere Substrate und Inhibitoren des Dicarboxylat-Carriers in zwei einander ausschließende Klassen von Liganden einteilen. Dazu mußten ihre inhibitorischen Beziehungen zueinander kinetisch analysiert werden. Liganden derselben Klasse zeigten - bei simultaner Anwesenheit auf der Membranaußenseite - eine kompetitive Interaktion mit dem Carrier, während Vertreter aus den zwei verschiedenen Klassen eindeutig auf nicht-kompetitive Weise wechselwirkten. Es ist allgemein anerkannt, daß eine nicht-kompetitive Inhibition auf (zumindest teilweise) verschiedene Bindungsstellen zurückzuführen ist. Folglich wurden die Liganden Malat, Succinat, Phenylsuccinat, Malonat, Butylmalonat, Benzylmalonat, Phthalat, Sulfat und Sulfid einerseits und Phosphat, Arsenat und Thiosulfat andererseits mit den zwei verschiedenen Bindungsstellen an der äußeren Oberfläche des Dicarboxylat-Carriers korreliert. Es muß dabei berücksichtigt werden, daß eine detailliertere Charakterisierung des Transportmechanismus von der Orientierung des rekonstituierten Carrierproteins in der Membran abhängt. Diese Frage wird zur Zeit untersucht. Da aber Malat und Phosphat in beide möglichen Richtungen transportiert werden (Indiveri et al. 1989a), die zwei Bindungsstellen also vermutlich auch auf der Membraninnenseite vorhanden sind, würde selbst eine gemischte Orientierung des Carrierproteins die hier gezogenen Schlußfolgerungen nicht wesentlich beeinträchtigen. Die Beobachtung von nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismen kann in jedem Fall nicht das Ergebnis verschiedener Bindungsstellen auf unterschiedlich orientierten Carrierproteinen sein. Dies hat zur Konsequenz, daß die beiden Bindungsstellen auf einer Membranseite desselben Carriermoleküls lokalisiert sein müssen.

Wenn die Aktivitätsdaten in den Fällen nicht-kompetitiver Inhibition in reziproken Diagrammen analysiert wurden, also nach Lineweaver-Burk und nach Dixon, so war der Schnittpunkt der erhaltenen Geraden jedesmal auf der Abszisse zu finden. Dies bedeutet rein formal, daß $K_i = K_{ii}$. Man kann demnach davon ausgehen, daß die Bindung (nicht der Transport!) des Substrats an den Carrier nicht durch die Anwesenheit des betreffenden Inhibitors beeinflusst wird und umgekehrt. Das Auftreten der nicht-kompetitiven Inhibition, wie hier für den rekonstituierten Dicarboxylat-Carrier beschrieben, kann man sich am einfachsten als Folge der Bildung eines nicht-katalytischen, d. h. nicht-transport-kompetenten, ternären Komplexes erklären. Dieser entsteht durch simultane und schnelle Bindung von Substrat und Inhibitor an die externe Seite des Carrier-

proteins. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der bisher aus formalen Gründen als Inhibitor betrachtete Ligand selbst ein Substrat ist. Dieses Modell wird durch Abb.20 unmittelbar veranschaulicht. Nicht nur die Transportaktivität bezüglich eines einzelnen (markierten) Substrats war klar reduziert, sondern der gesamte Umsatz des Dicarboxylat-Carriers, d. h. die Summe der Transportaktivitäten für $[^{14}\text{C}]$ Malat und für $[^{32}\text{P}]$ Phosphat, wenn beide Liganden in etwa derselben Konzentration anwesend waren. Bei Sättigung der zwei verschiedenen Bindungsstellen kann man davon ausgehen, daß der gebildete ternäre Komplex vollständig inaktiv ist, wie tendenziell zu erkennen war, als die Konzentration der Substrate von 0.4 auf 4 mM angehoben wurde (Abb.20). Aus methodischen Gründen konnte dieses Experiment nicht bei Konzentrationen durchgeführt werden, bei denen beide Bindungsstellen vollkommen gesättigt wären. Daher wurde die maximale Hemmung auch nicht erreicht. In ähnlichen Studien, wo der Effekt von ATP plus ADP auf die Translokationsrate des rekonstituierten ADP/ATP-Carriers untersucht wurde, war keine signifikante Erniedrigung der Umsatz-Zahl festzustellen (R. Krämer, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die hier mit dem rekonstituierten Dicarboxylat-Carrier erhaltenen Resultate stehen im Einklang mit einem nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus, der die Bildung eines nicht-translozierenden ternären $[\text{Phosphat}_{\text{ex}}\text{-Carrier-Malat}_{\text{ex}}]$ -Komplexes beinhaltet. Es muß hervorgehoben werden, daß diese Interpretation der Interaktion von Substrat und/oder Inhibitor mit dem Dicarboxylat-Carrier sich nicht nur von der Situation beim ADP/ATP-Carrier unterscheidet, sondern auch von der bei anderen mitochondrialen Transportsystemen. Die kinetische Analyse des Asp/Glu-Carriers (s. 4.3.2) und auch des Oxoglutarat-Carriers (Indiveri et al. 1987, vgl. 5.) führte zu einer gemeinsamen Bindungsstelle für alle spezifisch durch diese Carrier transportierten Substrate. Das insofern komplexere kinetische Verhalten des Dicarboxylat-Carriers läßt schwierige, aber umso interessantere Untersuchungen des Bisubstrat-Mechanismus erwarten, wobei die internen Bindungsstellen des Carriers in die Analyse mit einbezogen werden müssen. Mögliche Konsequenzen aus den hier beschriebenen Befunden für das generelle Carrierkonzept werden in der allgemeinen Diskussion (10.2) näher erläutert.

7. Effluxfunktion des rekonstituierten Asp/Glu- und ADP/ATP-Carriers:

Modifizierung durch SH-Reagenzien führt zum Umschalten von obligatem Gegentauch zu unidirektionalem Transport (Dierks, Salentin, Heberger & Krämer 1990a; Dierks & Krämer 1989a)

7.1 Einleitung

Um weiteren Einblick in den Mechanismus carrier-vermittelten Transports zu erlangen, ist es - nach der kinetischen Beschreibung der Transportfunktion (s. 3.-6.) - von grundlegendem Interesse, auch strukturelle Aspekte dieses Prozesses zu untersuchen. Das rekonstituierte System bietet die Möglichkeit, recht selektiv das interessierende Carrierprotein an spezifischen Aminosäuren zu modifizieren, danach die Effekte auf die Transportfunktion zu analysieren, um schließlich beides miteinander zu korrelieren. Durch Verwendung verschiedener SH-Reagenzien konnten in vielen Carrierproteinen Cysteine von funktioneller Bedeutung nachgewiesen werden. Von den mitochondrialen Carriern werden der Phosphat-Carrier (Fonyó & Bessmann 1968, Tyler 1968, Coty & Pedersen 1974, Fonyó 1979, Hüther & Kadenbach 1984), der Oxoglutarat-Carrier (Quagliariello & Palmieri 1972, Bisaccia et al. 1985), der Pyruvat-Carrier (Papa & Paradies 1974, Halestrap 1976, Thomas & Halestrap 1981) und der Carnitin-Carrier (Pande & Parvin 1976) sowohl durch Hg-Verbindungen wie Mersalyl gehemmt als auch durch alkylierende Maleimide wie N-Ethylmaleimid (NEM) oder, im Falle des Oxoglutarat-Carriers, Eosinmaleimid (Zara & Palmieri 1988). Der Tricarboxylat- (Bisaccia et al. 1989) und der Dicarboxylat-Carrier (Meijer & Tager 1969, Meijer et al. 1970, Palmieri et al. 1974, Coty & Pedersen 1974, Bisaccia et al. 1988) sowie das Uncoupling-Protein (Jezek 1987) sind sensitiv gegenüber Hg-Reagenzien, der ADP/ATP-Carrier (Leblanc & Clauser 1972, Vignais & Vignais 1972, Aquila et al. 1982) und der Glutamat-Carrier gegenüber NEM (Meijer et al. 1972, Meyer & Vignais 1973). Die Aktivität des Asp/Glu-Carriers wird nach Behandlung mit DTNB (Dierks & Krämer 1988) und NEM stark reduziert und kann, wie hier gezeigt, durch Hg-Verbindungen vollständig blockiert werden (Tab.VII).

Seit mehr als 20 Jahren beschreiben zahlreiche Publikationen einen Efflux verschiedener Solute aus Mitochondrien infolge unterschiedlicher Behandlungen. Von den angewendeten Agenzien induzierten insbesondere solche Efflux, die ihre Wirkung auf Cysteine ausübten, und zwar direkt (Scott & Gamble 1961, Knight et al. 1968, Scott et al. 1970, Siliprandi et al. 1973, Bogucka & Wojtczak 1979, Harris et al. 1979, Beatrice et al. 1980, Novgorodov et al. 1987, Rizzuto et al. 1987, Chávez et al. 1989) oder indirekt über Glutathion (Harris et al. 1979, Beatrice et al. 1984, Vercesi 1984). Folglich wurde der Redoxzustand von SH-Gruppen in die Argumentation eingebracht, um den generellen Permeabilitätsanstieg der Mitochondrienmembran zu erklären. Proteine, die die für diesen Effekt relevanten Sulfhydryl-Gruppen enthielten, wurden jedoch nicht identifiziert. Eine wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin zu klären, ob der Asp/Glu-Carrier - als ein Vertreter der mitochondrialen Transportsysteme - an der Efflux-Induktion durch SH-Reagenzien beteiligt ist. Diese Fragestellung konnte im rekonstituierten System zielgerichtet angegangen werden. In der Tat war ein reversibles Umschalten des Asp/Glu-Carriers und ebenso des ADP/ATP-Carriers von der Antiport-Funktion zu unidirektionaler Effluxaktivität zu beobachten, hervorgerufen durch Modifizierung der Carrierproteine mit Hg^{2+} oder organischen Hg-Verbindungen.

7.2 Methoden

Reinigung des Asp/Glu- und des ADP/ATP-Carriers

In den meisten Experimenten wurde die nach Hydroxylapatit-Zentrifugationschromatographie und Entsalzung erhaltene Proteinfraction zur Rekonstitution eingesetzt (G-25-Protein) (s. 2.2). Eine weitere Reinigung des Asp/Glu- und des ADP/ATP-Carriers, die beide in dieser Präparation vorhanden waren, wurde durch HPLC auf einer Hydroxylapatit-Säule erreicht (s. 2.2). Es wurden 2.5 mg G-25-Protein injiziert (0.64% $C_{12}E_8$ / 600 mM Ammoniumacetat). Nach einem Natriumphosphat- und einem Cardiolipingradienten führte schließlich ein Ammoniumacetatgradient bei einer Konzentration von etwa 800 mM zu Fraktionen mit nahezu reinem Asp/Glu-Carrierprotein. Die genaue Durchführung ist in 2.2 beschrieben.

Zur Reinigung des ADP/ATP-Carriers wurden 1.7 mg G-25-Protein (0.64% $C_{12}E_8$ /300 mM Ammoniumacetat) auf die gleiche HPLC-Säule aufgetragen. Die mit 0.4% $C_{12}E_8$ /300 mM Ammoniumacetat/10 mM Natriumphosphat eluierende Durchlauf-Fraktion wurde gesammelt (vgl. Abb.27 A). Die in Abb.27 B gezeigte Proteinpräparation wurde erhalten, wenn der Säulendurchlauf von 2.5 mg aufgetragenem Protein gesammelt wurde, der mit 0.4% $C_{12}E_8$ /750 mM Ammoniumacetat/10 mM Natriumphosphat eluierte.

Reinigung des Porins

Porin wurde aus mit 3% Triton X-100 solubilisierten Rinderherz-Mitochondrien durch Chromatographie auf Hydroxylapatit/Celite (2:1) isoliert, wobei die Vorschrift von De Pinto et al. (1987) angewendet wurde. Der Auftrag auf die Säule (3 mg Protein/0.6 g Säulenmaterial) darf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml nicht übersteigen, da sonst das endogene Cardiolipin der solubilisierten Mitochondrien ausreicht, um die Elution des Porins von der Säule zu verhindern. Bei Elution mit Solubilisierungspuffer, der kein Salz enthalten darf, passiert Porin als einziges Protein die Säule im Durchlauf (1.2 ml) (vgl. Abb.23).

Präparation der Proteoliposomen

Die verschiedenen Proteinpräparationen wurden erneut durch hydrophobe Chromatographie gemischter Mizellen in Liposomen inkorporiert (s. 2.2). Auch zur Rekonstitution von Porin wurden die Bedingungen angepaßt, wobei ein Verhältnis von 1.7 mg Triton X-100/mg Phospholipid eingestellt wurde. In den Porin-Korekonstitutionsexperimenten (Abb.24) wurden nur 8 statt 12 mg/ml Phospholipid eingesetzt und 1.6 mg Triton X-100 plus 0.1 mg $C_{12}E_8$ pro mg Phospholipid. Das Protein/Phospholipid-Verhältnis lag im Falle von G-25-Protein bei etwa 0.04 mg/mg, war aber viel geringer im Falle der HPLC-Fraktionen (0.002-0.004 mg/mg) und im Falle von Porin (0.00065-0.0026 mg/mg).

Die in Abb.27 B analysierte Proteinfraction wurde wiederholt in liposomale Membranen inseriert, um die Proteinmenge pro Liposom zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden Proteoliposomen bei 140000 x g sedimentiert (40 Min, 4°C), erneut in gemischten Protein/Detergens-Mizellen solubilisiert und dann ein zweites und drittes Mal auf Amberlite rekonstituiert unter Anpassung aller Substrat- und Puffer-Konzentrationen.

Messung der Transportaktivitäten

Um die Antiportaktivität des Asp/Glu-Carriers zu verfolgen, wurde in den allermeisten Fällen die Rücktausch-Methode eingesetzt (s. 2.3). Bei Benutzung der Vortausch-Methode ist dies ausdrücklich erwähnt. Alle Transportmessungen (Antiport wie Efflux) wurden bei pH 6.5 durchgeführt mit Ausnahme der Experimente mit Proteinasen, wo pH 7 während des gesamten Experimentes gewählt wurde: zunächst bei der Inkubation

vormarkierter Proteoliposomen für 1 h mit Subtilisin, Trypsin oder Pronase (1 mg/ml, 25°C), dann während der Gelfiltration zur Entfernung der Proteinasen und schließlich bei der Efflux- bzw. Rücktausch-Messung.

Um den unidirektionalen Transport (Efflux) mit ausreichender kinetischer Auflösung messen zu können, wurde eine dem Rücktausch-Verfahren sehr ähnliche Inhibitor-Stopp-Technik entwickelt. Nach Gelfiltration der vormarkierten Proteoliposomen wurde der Efflux des radioaktiven Substrats durch Zugabe von SH-Reagenzien gestartet, wie im Zusammenhang jedes einzelnen Experimentes angegeben ist. Als Stopp-Lösung wurde eine Mischung aus 5 mM DTE und 40 mM Pyridoxalphosphat angewendet, zwei Inhibitoren der Aspartat-Effluxaktivität (s. Ergebnisse). Die Vormarkierung des internen Substratpools (normalerweise 16 mM Aspartat) geschah gewöhnlich unter Ausnutzung der Carrieraktivität, wie in 2.3 für die Rücktausch-Methode beschrieben wurde. In den Experimenten aber, in denen die Effluxaktivität von Liposomen überprüft wurde, die kein Protein, inaktiviertes Protein oder Porin enthielten, wurde das markierte Substrat (0.3 $\mu\text{Ci/ml}$) während der Rekonstitution in die Liposomen eingeschlossen.

Genau dieselbe experimentelle Vorgehensweise wurde angewendet, um den Transport von ATP quantitativ zu erfassen. ATP/ATP-Antiport wurde im Rücktausch-Modus gemessen, indem der Export von [^{14}C]ATP aus vormarkierten Proteoliposomen (10 mM ATP) nach Zusatz von unmarkiertem ATP verfolgt wurde. In den ATP-Efflux-Experimenten wurde das Ausschleusen des markierten ATP (10 mM, wenn nicht anders angegeben) durch Zufügen von 5 μM HgCl_2 oder 100 μM Mersalyl initiiert - also in Abwesenheit von externem Substrat. Der Antiport wurde durch eine Mischung aus 33 μM CAT und 5 μM BKA gestoppt, während 5 mM DTE und 40 mM Pyridoxalphosphat angewendet wurden, um den Efflux von ATP zu stoppen.

Bei Antiport- und Efflux-Messungen wurde der zeitliche Verlauf des Isotopenflusses durch ein Computerprogramm (ENZFITTER, Biosoft) nach einer einfachen Exponentialgleichung ausgewertet (vgl. Gl. 2.1 und Gl. 2.4). Für die Ermittlung der Rücktausch- wie der Effluxaktivitäten ließ man das Programm die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k berechnen (1/min). Diese waren innerhalb jedes einzelnen Experiments direkt miteinander vergleichbar, solange Liposomen mit identischem Substratpool verwendet wurden (Dierks & Krämer 1988). In Tab.VII wurde die Rücktausch-Geschwindigkeit (v) entsprechend Gl. 2.5 berechnet (vgl. Tab.II), wozu es einer Abschätzung des aktiven Innenvolumens der Liposomen gemäß Gl. 2.7 bedurfte. Wenn man die Geschwindigkeitskonstanten aus Rücktausch- oder Effluxkinetiken ermittelt, die nach Einwirkung von Inhibitoren oder Proteinasen gemessen wurden, so muß gewährleistet werden, daß der Computer auf den Endwert der unbehandelten Kontrolle extrapoliert, der dem Isotopengleichgewicht (Rücktausch) oder dem chemischen Gleichgewicht (Efflux) der transportierten Substrate entspricht.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinproben wurden mit Desoxycholat und Trichloressigsäure präzipitiert (Peterson 1977) und mit 90% Ether/100 mM Tris (pH 9) oder, bei Extraktion aus Proteoliposomen (Abb.27 B), mit 90% Aceton/100 mM Tris (pH 9) gewaschen, um das kopräzipitierte Detergens und Phospholipid zu entfernen. Die elektrophoretische Trennung in Gegenwart von SDS wurde in 10-15% Acrylamid-Gradientengelen (Phast Gel) unter Benutzung eines automatisierten Systems durchgeführt (Phast System, Pharmacia). Die Gele wurden einer Silberfärbung nach dem Protokoll von Olsson et al. (1988) unterzogen, jedoch unter Anwendung von 0.25% Silbernitrat für 13 Min.

Immunologischer Nachweis des ADP/ATP-Carriers und des Porins

Für Western-Analysen der getrennten Proteinbanden wurden die ungefärbten Gele mit einem in Wasser angefeuchteten Stück Nitrocellulose (Schleicher & Schüll BA 85) bedeckt und auf dem Trennbett des Phast-systems für 20 Min auf 70°C erhitzt. Nach Blockierung des Nitrocellulose-Filters für 2 h mit 2% Gelatine in Phosphat-gepufferter Saline (pH 7.3) und 0.05% Tween 20 wurde die Immunodekoration durchgeführt. Dazu bedurfte es einer einstündiger Inkubation zunächst mit polyclonalen Antikörpern gegen Porin (1:300 in Blockierungspuffer) bzw. gegen den ADP/ATP-Carrier (1:1000) und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (Fc) aus Ziege (1:5000 in Blockierungspuffer). Daraufhin wurde der Nitrocellulose-Filter durch die Peroxidase-Reaktion unter Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin als Substrat in Gegenwart von Kobalt- und Nickelionen entwickelt (De Blas & Cherwinski 1983).

Tab.VII: Inhibition des Aspartat-Antiports und Induktion des Aspartat-Effluxes durch unterschiedliche SH-Reagenzien. Proteoliposomen wurden mit den genannten SH-Reagenzien in angegebenen Konzentrationen versetzt. Nach 30 s wurde die Restaktivität im Vortausch gemessen (Zugabe von 100 μM [^{14}C]Aspartat). Die Fähigkeit dieser Reagenzien, Efflux zu induzieren, wurde in Abwesenheit von externem Substrat getestet. Die Messung startete also direkt mit der Zugabe des jeweiligen Reagenzes zu vormarkierten Proteoliposomen. Für den Efflux wurden apparente Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (k) ermittelt (s. 7.2). Zum Vergleich von Efflux- und Antiportgeschwindigkeiten wurde k auch für den Rücktausch bestimmt nach Zusatz von 100 μM Aspartat anstelle des SH-Reagenzes. Alle Daten wurden mit Proteoliposomen identischer Zusammensetzung erhalten (16 mM internes Aspartat). Zur Vormarkierung des internen Substratpools siehe Abb.21.

SH-Reagens	Angewendete Konzentration	Vortauschaktivität ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Efflux-Geschwindigkeitskonstante k (1/min)
		12.1	0.006
DTE	2000 μM	11.0	0.008
NEM	5000 μM	2.1	0.004
DTNB	200 μM	3.0	< 0.003
PCMB	20 μM	< 0.6	0.004
PCMS	20 μM	< 0.4	0.018
HgCl_2	5 μM	< 0.7	0.075
Mersalyl	5 μM	< 0.5	0.004
Mersalyl	100 μM	< 0.3	0.105
Mersalyl/DTE ^a	100 μM	11.9	0.007
Mersalyl/PLP ^b	100 μM	< 0.3	0.007
Mersalyl/EDC ^c	100 μM	< 0.2	0.012
Mersalyl/DEPC ^c	100 μM	< 0.2	0.010
Rücktausch-Kontrolle			0.340 ^d

^a Proteoliposomen wurden mit 2 mM DTE versetzt nach Vorinkubation mit 100 μM Mersalyl für 30 s.

^b Proteoliposomen wurden gleichzeitig mit Mersalyl und 20 mM Pyridoxalphosphat (PLP) versetzt.

^c Proteoliposomen wurden für 20 Min mit 5 mM EDC bzw. 100 μM Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Nicht gebundenes Reagens wurde während der Gelfiltration der Liposomen entfernt, die stets der Zugabe der SH-Reagenzien voranging (s. 7.2).

^d Einer Austauschaktivität von 11.8 $\mu\text{M}/\text{min}$ entsprechend (s. 7.2).

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Grundlegende Eigenschaften der Efflux-Induktion

Die Zugabe unterschiedlicher Cystein-modifizierender Reagenzien zu Proteoliposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu-Carrier führte zu zwei grundlegend verschiedenen Beobachtungen. Auf der einen Seite konnte eine mehr oder weniger vollständige Inhibition der Antiportaktivität durch verschiedenen Klassen von Reagenzien erreicht werden, wie sich in Vortausch-Messungen zeigte (Tab.VII). Die jeweiligen IC_{50} -Werte (Inhibitor-konzentrationen bei halbmaximaler Hemmung) lagen um $2 \mu M$ für $HgCl_2$, Mersalyl, PCMS und PCMB, waren aber erheblich höher für DTNB (etwa $125 \mu M$) und NEM (etwa $1 mM$). Wurden auf der anderen Seite Proteoliposomen mit markiertem Aspartat vorbeladen, um danach den Antiport als Export von Markierung messen zu können (Rücktausch), so wurde nach Zugabe von Hg-Verbindungen ein drastischer Efflux von internem Aspartat detektiert. Dieser Efflux war aber nicht auf die Antiportaktivität des Asp/Glu-Carriers zurückzuführen, trat er doch in Abwesenheit von externem Gegensubstrat auf, sondern stellte einen unidirektionalen Flux von Aspartat dar.

Die Konzentration an Reagenzien, die für die Induktion dieses Effluxes mit halbmaximaler Rate benötigt wurde, schwankte beträchtlich zwischen $HgCl_2$ ($2 \mu M$), Mersalyl ($100 \mu M$), PCMS (etwa $40 \mu M$) und PCMB (etwa $1 mM$). Bei maximaler Induktion durch Mersalyl, dem effektivsten Reagens (Tab.VII), wurden Efflux-raten gemessen, die im Bereich der Antiportaktivität lagen (Abb.21), d. h. 20- bis 60-mal höher verglichen mit dem langsamen Efflux, der stets nach Entfernung des externen Substrats zu beobachten war - ohne Zugabe irgendeines Reagenzes. DTNB hemmte diese Grundefflux-Komponente (Abb.21), wie bereits früher beobachtet wurde (Dierks & Krämer 1988). Es mußten also völlig verschiedene Effekte der einzelnen SH-Reagenzien auseinandergehalten werden. Alle diese Effekte konnten durch einen Überschuß an DTE unterbunden werden, wie Tab.VII und Abb.30 (s. unten) zu entnehmen ist. Folglich wurde DTE für die kinetische Analyse des Hg-induzierten Effluxes (s. 7.2) als Stoppreagens eingesetzt, und zwar in Kombination mit Pyridoxal-phosphat, dem wirkungsvollen, aber unspezifischen Inhibitor des Asp/Glu-Carriers (Tab.VII, Abb.25).

Obwohl der Hg-induzierte Efflux von Aspartat stets mit einer Hemmung des Asp/Asp-Antiports gekoppelt war, bedeutete dies nicht notwendigerweise, daß der Efflux - wie der Antiport - dem rekonstituierten Asp/Glu-Carrier zuzuschreiben war. Daher galt es zu beweisen, daß der unidirektionale Efflux nicht auf ein unspezifisches Auslaufen der Liposomen zurückzuführen war, sondern einen carrier-vermittelten Prozeß repräsentierte.

7.3.2 Abhängigkeit von aktivem Protein

Um die Stabilität der Liposomen in Anwesenheit der angewendeten Reagenzien zu überprüfen, wurde markiertes Aspartat während der Rekonstitution in die Vesikel eingeschlossen. Anders als bei der sonst benutzten Markierungsmethode über die Antiportaktivität (s. 7.2) wurden hier alle Liposomen mit [^{14}C]Aspartat beladen, inklusive derer ohne Carrierprotein. Nach Entfernung des externen Aspartats durch Passage über Sephadex G-75 wurde Mersalyl in einer Konzentration von $1 mM$ zugesetzt, also mindestens dreimal höher als für maximale Efflux-Induktion notwendig. Abb.22 zeigt, daß die Integrität von Liposomen

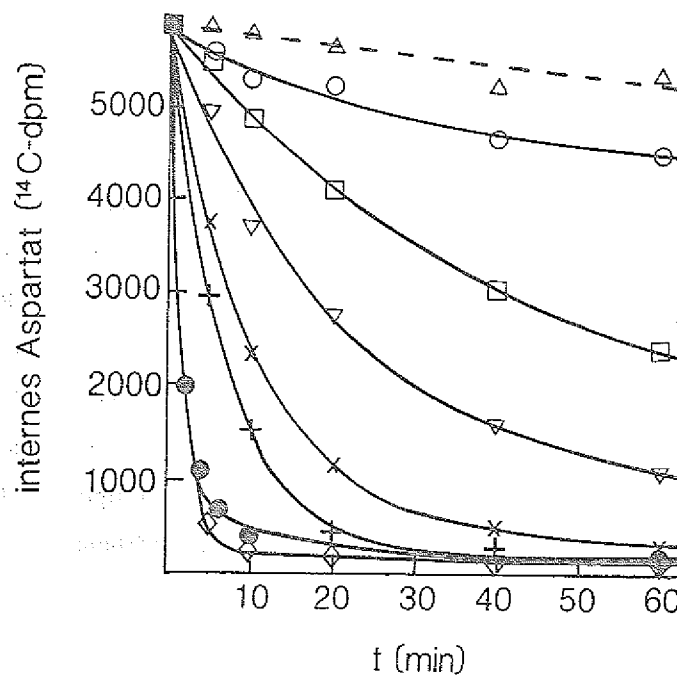


Abb.21: Induktion des Aspartat-Effluxes durch Mersalyl. Der interne Substratpool von Proteoliposomen (16 mM Aspartat) wurde durch carrier-vermittelte Äquilibration mit externem [^{14}C]Aspartat markiert (s. 7.2). Nach Gelfiltration der Liposomen zur Entfernung des externen Substrats wurde die Abnahme der internen Markierung verfolgt. Die Messungen wurden durch verschiedene Zugaben initiiert: O, Puffer (Grundefflux); Δ, 200 μM DTNB; □, 10 μM , ▽, 26 μM , X, 64 μM , +, 160 μM und ◇, 400 μM Mersalyl. Zum Vergleich wurde auch die Antiportaktivität (Rücktausch) nach Zugabe von 3 mM Aspartat in Abwesenheit von SH-Reagenzien (●) gemessen.

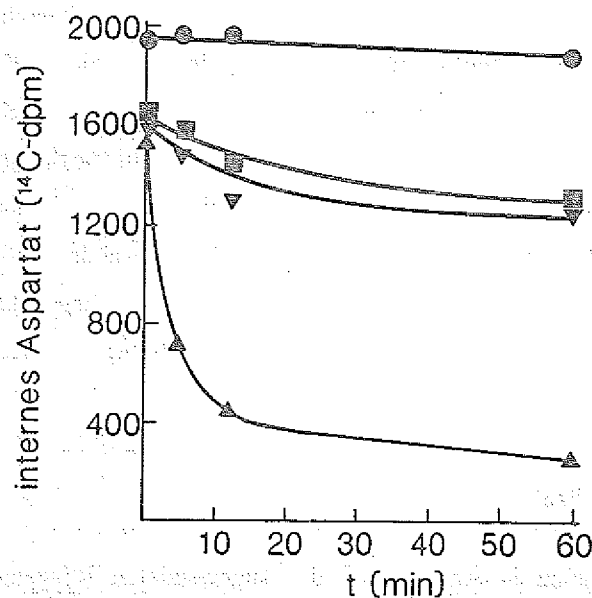


Abb.22: Abhängigkeit des Effluxes von aktivem Carrierprotein. Während der Rekonstitution wurde markiertes Aspartat (16 mM) in die Liposomen eingeschlossen (s. 7.2), die danach einer Gelchromatographie unterzogen und mit 1 mM Mersalyl behandelt wurden. Liposomen ohne Protein (●) oder mit Protein, das zuvor durch 4% SDS bei pH 9 denaturiert worden war (■), zeigten keinen bzw. nur geringen Efflux im Vergleich zu Liposomen mit intaktem Protein (Δ). Die Effluxaktivität konnte gehemmt werden, indem die Proteoliposomen mit Subtilisin (1 mg/ml) bei 25°C für 1 h vorinkubiert wurden (▽).

ohne Protein durch diese Behandlung überhaupt nicht beeinträchtigt wurde. Ebenso behielten Proteoliposomen ihre interne Markierung nahezu vollständig, wenn zu ihrer Herstellung durch SDS denaturiertes Protein verwendet wurde. Abb.22 macht außerdem deutlich, daß die Effluxaktivität von Liposomen mit intaktem Asp/Glu-Carrierprotein gehemmt werden konnte, wenn zuvor Proteinasen wie Subtilisin eingewirkt hatten. Auch der Asp/Asp-Antiport war dann auf eine geringe Restaktivität reduziert (s. unten). Eine ähnliche Inaktivierung beider Transportfunktionen wurde nach Vorbehandlung der Proteoliposomen mit den Aminosäure-reaktiven Reagenzien EDC und Diethylpyrocarbonat beobachtet (Tab.VII, Abb.25), die Proteine an Lysin- bzw. Histidin-Resten modifizieren (s. 9.3.3). Folglich beruht der Efflux von Aspartat essentiell auf aktivem Protein in der Liposomenmembran.

7.3.3 Ausschluß einer Beteiligung von Porin

Die für die Rekonstitution eingesetzte Proteinpräparation enthielt angereicherte Aktivitäten des Asp/Glu- und des ADP/ATP-Carriers. Auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abb.23 A, Spur 1) wurden diese beiden Proteine der 68 kDa-Bande bzw. der Doppelbande bei etwa 30 kDa zugeordnet (Krämer et al. 1986). Die zusätzliche Bande bei 44 kDa wurde bisher nicht identifiziert, kann aber nicht an der Effluxinduktion beteiligt sein, wie sich bei Benutzung gereinigter Proteine herausstellte (s. unten). Auf demselben Gel (Spur 2) wird gereinigtes Porin, der spannungsabhängige Anionenkanal der äußeren Membran (35 kDa), mit der Präparation des Asp/Glu-Carriers verglichen, um zu verdeutlichen, daß letztere Proteinfraction kein 35 kDa-Porin enthielt. Dies konnte durch Western-Analyse mit anti-Porin-Antikörpern untermauert werden (Abb.23 B). Auch diese sensitive Methode färbte keine Bande im 35 kDa-Bereich. Allerdings reagierten die Antikörper in der Kontrolle mit Porin (Spur 2) zusätzlich mit einer schwachen Bande von etwa 66 kDa. Auch in Spur 1 wurde eine Bande dieser Größe gerade noch sichtbar angefärbt, die auf dem SDS-Gel nicht vom Asp/Glu-Carrier unterschieden werden konnte, da er ungefähr die gleiche Mobilität zeigte. Zu unserer Überraschung erkannten die eingesetzten Antikörper die 66 kDa-Bande aber auch in Präparationen des Oxoglutarat-Carriers und des ADP/ATP-Carriers, die nach Bisaccia et al. (1988) bzw. Krämer (1986) gereinigt worden waren (nicht gezeigt). Demnach scheint die Immunofärbung der 66 kDa-Bande auf einer gewissen unspezifischen Reaktivität der Antikörper zu beruhen und nicht auf der Anwesenheit von möglicherweise undissoziierten Porin-Dimeren.

Evidenzen gegen eine Beteiligung von Porin erbrachte auch ein zweiter, funktioneller Ansatz. Angesichts der hohen Leitfähigkeit von Porin mag man einwenden, daß ein einziges Molekül pro Liposom zu einem Verlust des internen Aspartats führen würde. In den untersuchten Proteoliposomen jedoch konnte keine Aktivität von Porin entdeckt werden, obwohl nach verschiedenen Aspekten seiner Funktion gesucht wurde: (a) Porin geht bei einem Membranpotential von 10-30 mV in geschlossene Zustände über (Schein et al. 1976, Benz 1985). Im Gegensatz dazu konnte keine Inhibition des induzierten Effluxes oder des Grundeffluxes festgestellt werden, wenn die Liposomenmembran durch ein K^+ -Diffusionspotential beiderlei Polaritäten energetisiert wurde (nicht gezeigt). (b) Ein polyanionischer Inhibitor von Porin (Benz et al. 1988) hemmte den Hg-induzierten Efflux nicht. In Kontroll-Liposomen mit gereinigtem Porin dagegen verzögerte das Polyanion den schnellen Efflux via Porin (zumindest im Falle von ATP, nicht gezeigt). (c) In Abwesenheit des Inhibitors verloren diese Liposomen ihr internes Aspartat, ATP oder $^{22}Na^+$, sobald ein transmembraner Konzentrationsgradient erzeugt wurde; dies konnte kinetisch nicht aufgelöst werden. Der schnelle, von Porin vermittelte Efflux

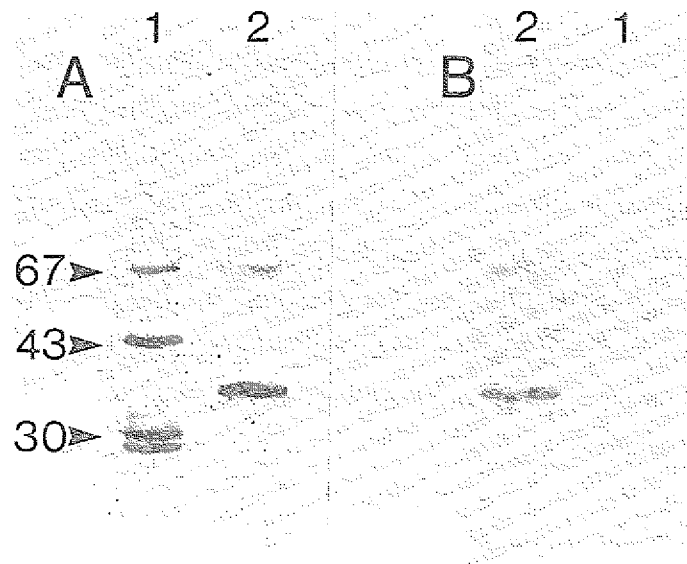


Abb.23: Abwesenheit von Porin in der Asp/Glu-Carrierpräparation. Die für die Efflux-Experimente verwendete Proteinpräparation (G-25-Protein, Spur 1) wurde mit gereinigtem Porin aus Rinderherz-Mitochondrien verglichen (Spur 2): (A) durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und (B) durch Western-Analyse. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine und Diffusionstransfer auf einen Nitrozellulose-Filter wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht: (A) durch Silber-Färbung des Gels bzw. (B) durch Immunofärbung des Filters unter Anwendung von Antikörpern gegen Porin aus Rattenleber. Zur Präparation der Proteinproben sowie zu den Färbeprozeduren siehe 7.2. Pfeile markieren die Position von Molekulargewicht-Standardproteinen (M_r in kDa).

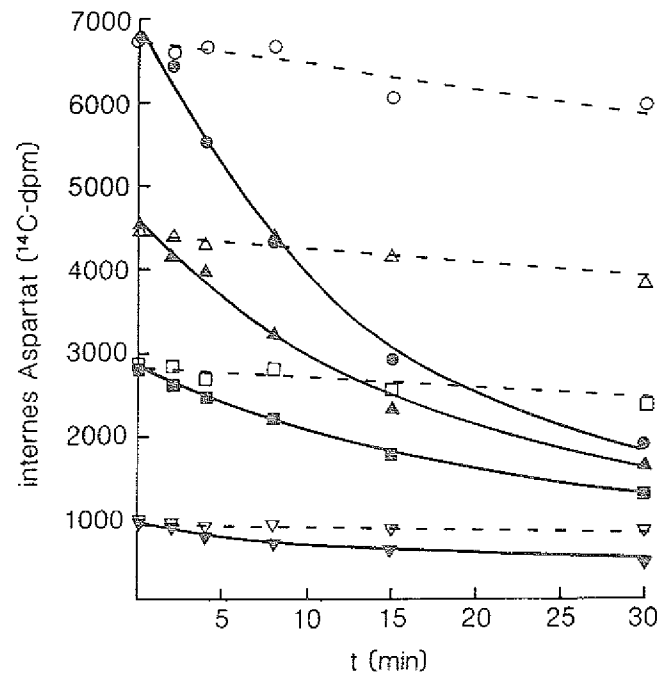


Abb.24: Der Porin-vermittelte Efflux unterscheidet sich grundlegend von der Hg-induzierten Effluxaktivität. Eine konstante Menge an Asp/Glu-Carrier (0.012 mg/mg Phospholipid) und verschiedene Mengen gereinigten Porins (0-0.0026 mg/mg Phospholipid) wurden zusammen rekonstituiert (s. 7.2), wobei die (monomere) Porinkonzentration im Rekonstitutionsansatz 0 (○, ●), 150 (△, ▲), 375 (□, ■) bzw. 525 nM (▽, ▼) betrug. Nach Vormarkierung des internen Aspartatpools durch die Aktivität des Asp/Glu-Carriers (s. Abb.21), wurde der Efflux durch 100 μM Mersalyl induziert (geschlossene Symbole). Parallel dazu wurde der uninduzierte Grundefflux verfolgt (offene Symbole) nach Zugabe von Puffer. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des Effluxes (k) für die verschiedenen Präparationen an Proteoliposomen waren sehr ähnlich: 0.005 (○), 0.004 (△), 0.005 (□), 0.004 min^{-1} (▽); 0.072 (●), 0.061 (▲), 0.057 (■), 0.061 min^{-1} (▼).

differierte also fundamental von der erheblich langsameren Kinetik des Hg-induzierten Effluxes (s. auch Abb.24). (d) Der Porin-vermittelte Efflux wurde durch Hg-Verbindungen nicht beeinflusst (Abb.24).

Schließlich wurden auch Positivkontrollen durchgeführt. Durch Korekonstitution von Asp/Glu-Carrier (etwa 300 nM während der Rekonstitution) und gereinigtem Porin (0-600 nM) in dieselben Liposomen simulierten wir eine Kontamination durch Porin. Wie in Abb.24 zu erkennen, sank das zum Zeitpunkt null meßbare interne [^{14}C]Aspartat mit zunehmender 'Kontamination'. Die Beladung der Liposomen mit markiertem Substrat verlor an Effizienz, da Porin - bei Anwesenheit im selben Liposom - sofort wieder zum Verlust der durch den Asp/Glu-Carrier importierten Markierung führte. Dies hatte zur Konsequenz, daß nach Induktion durch Mersalyl nur die Liposomen mit Carrier, aber ohne Porin am unidirektionalen Transport teilnahmen. Dies wird aus Abb.24 anhand zweier Beobachtungen offenkundig. Erstens waren die Geschwindigkeitskonstanten (nicht die Raten!) des Hg-induzierten Effluxes nahezu identisch in Proteoliposomen mit oder ohne kontaminierendem Porin ($k = 0.061 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$, $n = 5$). Zweitens wurden auch die Geschwindigkeitskonstanten des Grundeffluxes, die in Abwesenheit von Mersalyl gemessen wurden, nicht durch Porin erhöht ($k = 0.005 \text{ min}^{-1}$). Weiterhin belegt Abb.24, daß eine beträchtliche Menge Porin zugesetzt werden mußte, um eine signifikante Portion der Liposomen mit zumindest einem Porin-Molekül zu rekonstituieren, was dann zu einem Abfall des Nullwerts führte. Daher kann eine geringfügige Kontamination der Asp/Glu-Carrierpräparation mit Porin, die in der Western-Analyse von Abb.23 hätte übersehen werden können, nicht den Efflux von Aspartat aus 80-90% aller Liposomen erklären, wie generell nach Zugabe der Hg-Verbindungen zu beobachten war (vgl. Abb.21). Selbst eine Anwesenheit von Spuren von Porin würde nicht im geringsten mit der Kinetik des Hg-induzierten Effluxes interferieren.

7.3.4 Identifizierung des Efflux-vermittelnden Proteins

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse untersuchten wir, ob der unidirektionale Efflux tatsächlich durch ein Carrierprotein vermittelt wurde. Die einzigen in der verwendeten Proteinpräparation (s. Abb.23) identifizierten Carrier, der Asp/Glu- und der ADP/ATP-Carrier, wurden bis dato als obligate Antiporter klassifiziert. Interessant genug war daher die Feststellung, daß Mersalyl und HgCl_2 auch Efflux von ATP induzierten, wenn auch mit erheblich geringeren Raten, verglichen mit dem Efflux von Aspartat (Tab.VIII). Für eine eindeutige Korrelation der Effluxaktivitäten mit dem Asp/Glu- bzw. dem ADP/ATP-Carrier wäre es angebracht, Experimente mit gereinigten Carrierproteinen durchzuführen. Unglücklicherweise war aber in den Fraktionen, die durch HPLC auf Hydroxylapatit erhalten wurden (s. unten), das reine Carrierprotein sehr verdünnt. Dies hatte zur Folge, daß die rekonstituierten Transportaktivitäten zwar ausreichten, um genau quantifiziert werden zu können (Tab.IX), aber dennoch zu gering waren für eine kinetische Analyse der Transportinhibition, wie unten beschrieben. Deshalb fand weiterhin die bisher eingesetzte Proteinpräparation Verwendung, als es darum ging, die Efflux-vermittelnden Carrier durch vergleichende Untersuchungen der Efflux- und Antiportfunktion zu charakterisieren.

7.3.4.1 Kompetitionsstudien

Die Substratspezifität des Aspartat- und/oder des ATP-Effluxcarriers war im Vergleich zu den entsprechenden Antiportcarriern stark reduziert, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird. Um trotzdem zwischen dem vom Asp/Glu- und vom ADP/ATP-Carrier vermittelten Efflux zu diskriminieren, wurden verschiedene kinetische Ansätze unternommen. Es stellte sich heraus, daß der Efflux von Aspartat und Glutamat ein ausgeprägtes pH-Optimum im Bereich von pH 6.5-6.8 aufweist, während der Efflux von ATP unterhalb von pH 6.0 stimuliert wurde (nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, daß unterschiedliche SH-Gruppen modifiziert werden müssen, um den Efflux von Aspartat bzw. ATP zu induzieren. Da der Efflux von Aspartat im Vordergrund des Interesses stand, wurde der pH von 6.5 beibehalten.

In Kompetitionsstudien war gleichzeitig je ein spezifisches Substrat der beiden (Antiport-) Carrier, Aspartat bzw. ATP, in unterschiedlichen Verhältnissen in den Liposomen anwesend. Ein Substrat wurde jeweils markiert eingesetzt und untersucht, ob das zweite (unmarkierte) Substrat den Efflux der Markierung inhibierte, was einen gemeinsamen Effluxcarrier für Aspartat und ATP anzeigen würde. Eine kinetische Analyse der Efflux-Inhibition, die zwischen Effekten auf K_m und V_{max} differenziert, konnte nicht durchgeführt werden, da der Effluxprozeß keine Michaelis-Menten-Eigenschaften zeigte (s. 8.3.1). Dennoch wäre ein Hemmeffekt von Aspartat auf den ziemlich langsamen Efflux von ATP (und umgekehrt) zu erwarten, wenn beide Substrate denselben Weg durch die Membran nehmen und an einem gemeinsamen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt kompetieren würden. Jedoch belegt Tab.VIII eindeutig, daß weder der Efflux von Aspartat noch der von ATP signifikant durch die Anwesenheit des jeweils anderen Substrats verlangsamt wurde.

Tab.VIII: Wechselseitiger Einfluß von internem ATP und Aspartat auf den Efflux von Aspartat bzw. ATP. Proteoliposomen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Aspartat und ATP präpariert, wie angegeben. Nach Vormarkierung des internen Aspartat- oder ATP-Pools durch die Antiportaktivität des konstitutierten Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carriers (s. 7.2) wurde der Efflux beider Substrate durch Gabe von 100 μ M Mersalyl initiiert. Die Geschwindigkeitskonstanten (k) für den Efflux des ersten (markierten) Substrats wurden in An- oder Abwesenheit des jeweils zweiten (unmarkierten) Substrats bestimmt. In allen Fällen waren iso-osmotische Bedingungen durch Anpassung der externen Sucrosekonzentration gewährleistet (vgl. 8.3.5).

Erstes Substrat	Zweites Substrat	Efflux des ersten Substrats k (1/min)
10 mM Aspartat	-	0.153
	2.5 mM ATP	0.172
	5 mM ATP	0.156
	10 mM ATP	0.187
10 mM ATP	-	0.040
	4 mM Aspartat	0.053
	8 mM Aspartat	0.048
	16 mM Aspartat	0.046

7.3.4.2 Inhibitorstudien

Mehrere Inhibitoren des ADP/ATP-Carriers wie CAT, BKA, Palmityl-CoA, NEM, Agaricin, Cibacron Blue 3GA und Pyridoxalphosphat wurden mit der Intention eingesetzt, den Efflux von ATP möglichst selektiv zu hemmen. Aus dieser Reihe bewirkten die hochspezifischen Inhibitoren CAT (50 μ M) und BKA (17 μ M) eine 50-prozentige Hemmung des ATP-Effluxes, während der Efflux von Aspartat nicht eingeschränkt wurde (Abb.25, Daten für BKA nicht gezeigt). Am effektivsten waren Cibacron Blue, ein als spezifisch für den ADP/ATP-Carrier beschriebener Inhibitor (Boos & Schlimme 1981), und Pyridoxalphosphat, das den ADP/ATP- (Bogner et al. 1986) und den Asp/Glu-Carrier hemmt (Krämer 1984). Dementsprechend zeigte Pyridoxalphosphat (20 mM) einen ähnlichen Effekt auf Aspartat- und ATP-Efflux (95% Hemmung), während Cibacron Blue (0.1-0.25 mM) nur den Efflux von ATP hemmte ($75 \pm 10\%$, Abb.25). Überraschend war der Befund, daß Cibacron Blue auch die Asp/Asp-Antiportaktivität beeinträchtigte ($83 \pm 5\%$), wenn auch schwächer als den Antiport von ATP ($94 \pm 7\%$). Trotzdem ermöglichte die Hemmung durch diesen Anthrachinon-Farbstoff eine klare Differenzierung hinsichtlich der zwei Effluxprozesse.

Weiterhin belegt Abb.25, daß Diethylpyrocarbonat und EDC, zwei effektive Inhibitoren des Asp/Glu-Carriers (s. 9.3.3), den Efflux von Aspartat, aber nicht den von ATP inaktivierten. Eine Behandlung mit 80 μ M Diethylpyrocarbonat vor Zugabe von Mersalyl führte zu einer deutlichen Hemmung des Aspartat-Effluxes ($77 \pm 4\%$) und -Antiports ($96 \pm 2\%$), während der ATP-Efflux und -Antiport nahezu unbeeinflusst blieben. Ähnliche Ergebnisse wurden mit EDC erhalten.

7.3.4.3 Sensitivität gegenüber Proteinasen

Weitere Evidenzen für die Beteiligung zweier verschiedener *Proteine* am Efflux von Aspartat bzw. ATP lieferten Untersuchungen zur differenziellen Inaktivierung der beiden Carrier durch Proteinasen. Eine Inkubation der Proteoliposomen mit Trypsin oder Pronase (s. 7.2) reduzierte die Asp/Asp-Antiportaktivität um ca. 85%, während der ATP/ATP-Antiport höchstens zu 25% beeinträchtigt wurde (Abb.26). Dementsprechend wurde auch der Efflux von Aspartat viel stärker inhibiert - besonders durch Pronase ($65 \pm 10\%$) - als der Efflux von ATP (etwa 15%). Subtilisin führte zu einer noch stärkeren Hemmung des Effluxes und Antiports von Aspartat (etwa 75%), doch war die Diskriminierung zwischen Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier nicht verbessert (Abb.26).

Generell wurde der Antiport stärker inaktiviert als der Efflux, wie für die Proteinasen und auch für die unterschiedlichen Inhibitoren aus Abb.25 zu beobachten war. Dieser Befund läßt sich leicht erklären, da alle angewendeten Agenzien die Liposomenmembran nicht permeieren und somit nur externe Teile des Carrierproteins angreifen konnten. Diese Domänen sind offensichtlich für den Antiport essentiell, aber weniger bedeutsam für die Effluxfunktion. Als übereinstimmendes Ergebnis dieser Untersuchungen soll daher hervorgehoben werden, daß die Sensitivität des Transports von Aspartat, Antiport wie Efflux, gegenüber Pronase, Trypsin, Subtilisin, EDC und Diethylpyrocarbonat in allen Fällen ausgeprägter war als die Sensitivität der entsprechenden ATP-Transportvorgänge.

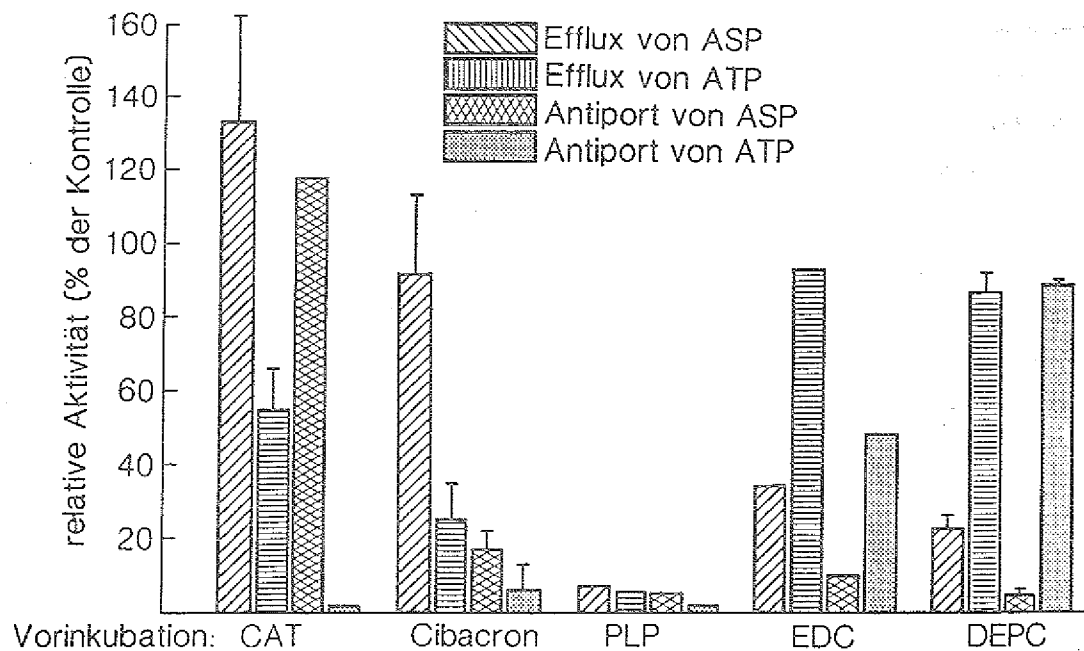


Abb.25: Differentielle Hemmung des vom Asp/Glu- und vom ADP/ATP-Carrier vermittelten Transports durch verschiedene Inhibitoren. Efflux- und Antiportaktivitäten der zwei korekonstituierten Carrier wurden ermittelt, nachdem Proteoliposomen, vorbeladen mit markiertem Substrat, für 10 Min mit 20 mM Pyridoxalphosphat (PLP) oder Cibacron Blue 3GA (0.1-0.25 mM) bzw. für 15 Min mit 80 μ M Diethylpyrocarbonat (DEPC) oder 3 mM EDC inkubiert worden waren (7.5 Min mit EDC im Falle der Antiport-Bestimmungen). Nicht abreagiertes DEPC oder EDC wurde durch Gelfiltration der Liposomen entfernt. CAT (50 μ M) war bereits während der Rekonstitution der Carrierproteine anwesend. Efflux und Rücktausch wurden durch 100 μ M Mersalyl bzw. 1 mM externes Substrat (Aspartat oder ATP) initiiert. Zur Vormarkierung des internen Substratpools (16 mM Aspartat und 10 mM ATP) siehe Tab.VIII. Da alle Aktivitäten in wenigstens zwei unabhängigen Experimenten bestimmt wurden, sind sie in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Standardabweichungen der Hemmung durch CAT (n=4), Cibacron Blue (n=8) und DEPC (n=3) wurden berechnet.

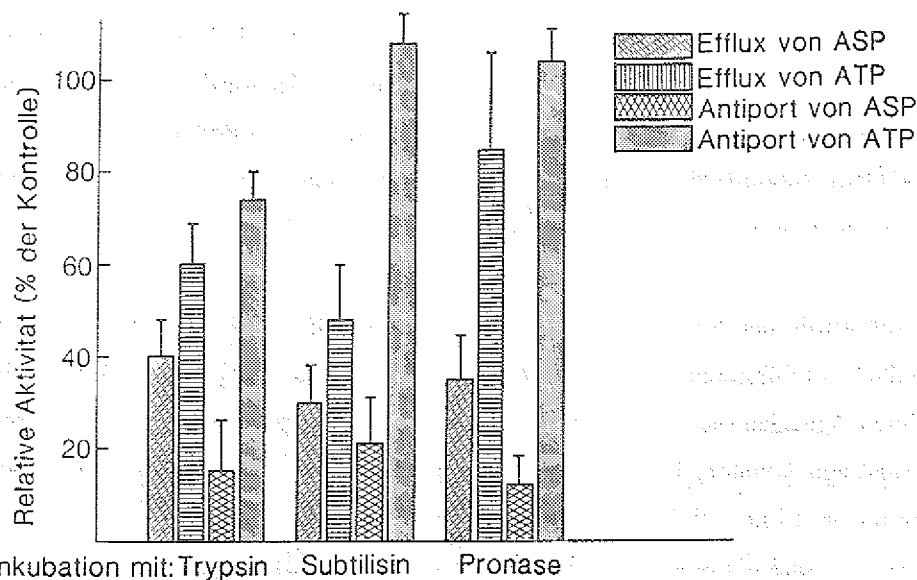


Abb.26: Differentielle Inaktivierung des vom Asp/Glu- und vom ADP/ATP-Carrier vermittelten Transports durch Proteinasen. Efflux- und Antiportaktivitäten der zwei korekonstituierten Carrier wurden ermittelt, nachdem Proteoliposomen, vorbeladen mit markiertem Substrat, für 1 h (25°C, pH 7) mit Trypsin, Subtilisin oder Pronase (1 mg/ml) inkubiert worden waren. Das experimentelle Vorgehen entsprach dem in Abb.25 beschriebenen. Nach der Proteolyse wurden die Liposomen über eine Gelfiltrationssäule gegeben, um die Proteinasen zu entfernen. Mehrere unabhängige Bestimmungen wurden durchgeführt (pH 7), die die Berechnung von Standardabweichungen der Hemmung durch Trypsin (n=3), Subtilisin (Transport von Aspartat, n=6 und von ATP, n=3) sowie Pronase (n=5 (Aspartat), n=3 (ATP)) erlaubten. Zur Normierung der Daten siehe Abb.25.

7.3.4.4 Untersuchungen mit gereinigten Carrierproteinen

Wenn Antiport- und Effluxaktivität intrinsische Funktionen desselben Carriers sind, dann sollten beide Modi des Transports während der Reinigung des jeweiligen Proteins (des Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carriers) eng miteinander korreliert sein. In Tab.IX werden die spezifischen Geschwindigkeitskonstanten (k) der Efflux- und Rücktausch-Aktivitäten verschiedener Proteinfractionen miteinander verglichen. In Liposomen, die mit der angereicherten Proteinpräparation (G-25-Protein) rekonstituiert wurden, war der ATP-Efflux in den zwei gezeigten Experimenten 6.5- bzw. 10.6-fach langsamer als der ATP/ATP-Austausch; dagegen unterschieden sich die k -Werte für den Aspartat-Efflux und -Antiport nicht wesentlich voneinander (Tab.IX). Nach Reinigung des Asp/Glu-Carriers auf einer Hydroxylapatit-HPLC-Säule stellte sich heraus, daß beide Transportaktivitäten (mit Spezifität für Aspartat) im gleichen Ausmaß zusammen gereinigt worden waren und wiederum ähnliche Geschwindigkeitskonstanten für Antiport und Efflux zeigten. Von den Aktivitätsdaten konnte ein Kopurifikationsfaktor berechnet werden (s. Tab.IX), der nahe bei 1 lag (0.82). Auch der ADP/ATP-Carrier wurde auf der gleichen HPLC-Säule (in einer anderen Fraktion) gereinigt. In diesem Fall wurde ebenfalls eine gemeinsame Reinigung von Efflux- und Antiportaktivität (mit Spezifität für ATP) beobachtet (Kopurifikationsfaktor 1.11). Die SDS-Gele der gereinigten Proteinfractionen sind in Abb.27 A zu sehen.

Tab.IX: Kopurifikation der Efflux- und Antiport-Aktivität des Asp/Glu- und des ADP/ATP-Carriers. Ausgehend von der sonst verwendeten Proteinpräparation (G-25-Protein, vgl. Abb.23) wurden beide Carrier auf einer Hydroxylapatit-HPLC-Säule gereinigt (s. Abb.27 A), wobei der ADP/ATP-Carrier in der Durchlauf-fraction (HPLC Durchl.) und der Asp/Glu-Carrier während eines Salzgradienten bei ca. 800 mM Ammonium-acetat eluierte (HPLC AA800). A: Nach Rekonstitution der verschiedenen Fraktionen mit 10 mM ATP und 16 mM Aspartat als internen Substraten wurden die Aktivitäten des Effluxes und Rücktausches gemessen unter Zugabe von 100 μ M Mersalyl bzw. 1 mM externem Substrat (Aspartat oder ATP). Um zwischen den verschiedenen Proteinfractionen vergleichen zu können, wurden spezifische Geschwindigkeitskonstanten (k) berechnet. Zwei separate Datensätze sind wiedergegeben. B: Auf der Grundlage der Werte aus A wurden Reinigungsfaktoren für den Asp/Glu- und den ADP/ATP-Carrier jeweils bezüglich ihrer Antiport- und Effluxaktivität berechnet. Außerdem wurde gemäß $[\text{Antiport(HPLC)} \cdot \text{Efflux(G-25)}] / [\text{Antiport(G-25)} \cdot \text{Efflux(HPLC)}]$ ein Faktor ermittelt, der die Kopurifikation der zwei verschiedenen Transport-Modi mit Spezifität für Aspartat oder ATP angibt. Ein Wert um 1 belegt, daß Antiport und Efflux zusammen gereinigt wurden.

Protein- präparation	Transport von Aspartat			Transport von ATP		
	Antiport	Efflux	Antiport/Efflux	Antiport	Efflux	Antiport/Efflux
A: k	$\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$			$\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$		
G-25	12.76	10.13	1.26	25.16	3.87	6.50
HPLC AA800	115.1	111.6	1.03	4.72	n.b. ^a	-
G-25	12.53	8.40	1.49	14.09	1.33	10.59
HPLC Durchl.	2.93	n.b. ^a	-	80.11	6.84	11.71
B: Reinigungsfaktoren	fach			fach		
HPLC AA800	9.02	11.02	0.82 ^b	0.19	-	-
HPLC Durchl.	0.23	-	-	5.67	5.14	1.11 ^b

^a Nicht bestimmbar (s. Text).

^b Kopurifikationsfaktor, d. h. Reinigungsfaktor (Antiport) / Reinigungsfaktor (Efflux).

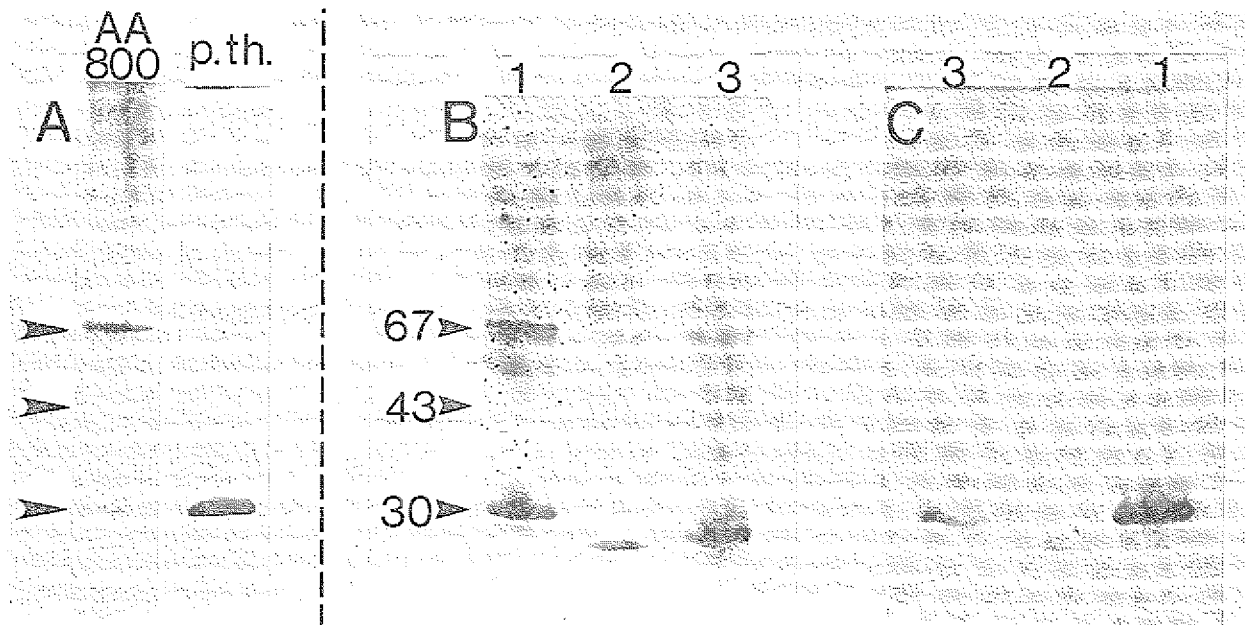


Abb.27: Immunologische Identifizierung des Proteinase-resistenten ATP-Effluxcarriers. Die G-25-Proteinpräparation (vgl. Abb.23) wurde einer weiteren Reinigung durch HPLC auf Hydroxylapatit unterzogen (s. 7.2). Auf dem SDS-Gel in Teilbild A sind die Fraktion AA800 und der Säulendurchlauf (p.th.) gezeigt, die gereinigten Asp/Glu-Carrier (68 kDa) bzw. gereinigten ADP/ATP-Carrier (30 kDa) enthielten (vgl. Tab.IX). Die Proteinfraktion aus Teilbild B enthielt sowohl Asp/Glu- als auch ADP/ATP-Carrier (Spur 1). Nach wiederholter Rekonstitution (s. 7.2) dieser Proteinfraktion und Inkubation der Proteoliposomen mit Trypsin (1 mg/ml) sowie anschließender Gelfiltration zur Entfernung der Proteinase, wurden die Proteine wieder aus den Liposomen extrahiert (s. 7.2) und elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 2). Die extrahierten, aber unbehandelten Kontrollen zeigt Spur 3. Vor der Silberfärbung des Gels (B) wurden die Proteine durch Diffusionstransfer auf einen Nitrozellulose-Filter übertragen, um eine Western-Analyse durchzuführen (C). Zur Immunofärbung des Nitrozellulose-Filters wurden polyclonale Antikörper gegen den ADP/ATP-Carrier aus Rinderherz-Mitochondrien eingesetzt. Zur Präparation der Proteinproben sowie zu den Färbeprozeduren siehe 7.2. Pfeile markieren die Position von Molekulargewicht-Standardproteinen: Rinderserumalbumin (67kDa), Ovalbumin (43kDa) und Carboanhydrase (30kDa).

Ein direkter Test, ob Efflux von Aspartat auch durch den ADP/ATP-Carrier vermittelt werden kann oder ob Efflux von ATP auch via Asp/Glu-Carrier stattfindet, konnte nicht durchgeführt werden. Für solche Experimente mußte das markierte Aspartat (bzw. ATP) während der Rekonstitution in die Liposomen eingeschlossen werden, da eine spezifische Vormarkierung durch die Aktivität des Asp/Glu- (bzw. ADP/ATP-) Carriers, der ja während der Reinigung entfernt worden waren, nicht mehr möglich war. Die Proteinkonzentration in den HPLC-Fractionen war aber äußerst niedrig. Daher war in diesen Experimenten der insgesamt meßbare Efflux - entsprechend dem sehr kleinen Anteil aktiv transportierender Proteoliposomen - zu gering, um signifikante Effluxraten berechnen zu können.

In einem völlig anderen Ansatz benutzten wir HPLC-Protein aus einer Fraktion, die sowohl den Asp/Glu- als auch den ADP/ATP-Carrier, aber keine weiteren Kontaminationen enthielt (Abb.27 B). Um ausreichende Transportaktivität zu erlangen, wurde diese Proteinfraktion wiederholt in dieselben Liposomen eingebaut (s. 7.2). Eine Inkubation dieser Proteoliposomen mit Trypsin führte zu einer nahezu totalen Hemmung des Aspartat-Transports (Antiport wie Efflux), während der ATP-Transport nur zu 42% betroffen war (nicht gezeigt). Nach Extraktion der Proteine aus den Liposomen und SDS-Gelelektrophorese war sowohl die 68 kDa-Bande (Asp/Glu-Carrier) als auch die 30 kDa-Bande (ADP/ATP-Carrier) verschwunden und nur ein

tryptisches Fragment von 27-28 kDa sichtbar (Abb.27 B). In einer Western-Analyse wurde dieses Fragment noch durch spezifische Antikörper als ADP/ATP-Carrier identifiziert, wenn auch mit geringerer Sensitivität (Abb.27 C). Diese Resultate lassen sich unter der Annahme erklären, daß der Nucleotid-Carrier durch Behandlung mit Trypsin nur in geringem Ausmaß angegriffen wurde, ohne dadurch vollständig inaktiviert zu werden. Legt man diese Korrelation zugrunde, so muß der Proteinase-empfindliche Efflux (und Antiport) von Aspartat dem Asp/Glu-Carrier zugeschrieben werden, da nur die 68 kDa-Bande durch Trypsin komplett abgebaut wurde.

7.4 Diskussion

Robillard und Konings (1982) stellten eine Hypothese zur Regulation energie-umwandelnder Membranproteine - unter besonderer Berücksichtigung der Carrier - vor, worin Thiol-Gruppen eine entscheidende Bedeutung zukam. Obwohl das Hauptprinzip dieser Hypothese, nämlich die Modulation der Substrat-Affinitäten durch $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ -induzierte Dithiol-Disulfid-Redoxwechsel, in darauffolgenden Studien widerlegt wurde (Neuhaus et al. 1983, Viitanen et al. 1985, Menick et al. 1987), so bleibt doch die Tatsache, daß Cysteine in Carrierproteinen nahezu ubiquitär funktionelle Bedeutung besitzen. Um essentielle Aminosäuren zu identifizieren, behandelten wir daher den mitochondrialen Asp/Glu-Carrier insbesondere mit SH-modifizierenden Reagenzien. Das rekonstituierte System bot dabei den Vorteil, das isolierte Protein nach Wiedereinbau in eine Lipid-Doppelschicht recht selektiv modifizieren und Effekte auf seine funktionellen Eigenschaften untersuchen zu können. In diesem Kapitel wird die Sensitivität des Asp/Glu-Antiports gegenüber Sulfhydryl-Reagenzien beschrieben, womit ein weiteres Transportsystem der Liste der mitochondrialen Carrier hinzugefügt wird, die durch diese Verbindungen gehemmt werden (s. 7.1). Das wesentlichere Ziel jedoch bestand darin, eine fundamentale Umwandlung der Carrierfunktion aufzuzeigen, nämlich das Umschalten von gekoppeltem Gegentransport zweier Substrate zu unidirektionalem Netto-Flux, ausgelöst durch Modifizierung mit bestimmten Hg-Verbindungen.

Phänomen des carrier-vermittelten Effluxes

Mehrere Argumente beweisen, daß der Hg-induzierte Efflux nicht auf eine unspezifische Permeabilität der Proteoliposomen zurückzuführen ist. Efflux beruhte eindeutig auf funktionell aktivem Carrierprotein (Abb.22). Die Induktion der Netto-Fluxaktivität ging einher mit einer Hemmung des Asp/Glu-Antiports und wurde nahezu völlig verhindert, wenn Proteinasen auf das intakt rekonstituierte Carrierprotein eingewirkt hatten. Beide Transportaktivitäten waren außerdem sensitiv gegenüber EDC, Diethylpyrocarbonat und Pyridoxalphosphat, drei Reagenzien, die Proteine an anderen Aminosäure-Resten als an Cysteinen modifizieren (Tab.VII). In der Literatur wurde ein Modell für den passiven Efflux aus Erythrocyten beschrieben, das auf einem Ausfließen durch Protein-Lipid-Grenzschichten beruht, hervorgerufen durch ein Quervernetzen von SH-Gruppen des Cytoskeletts und anderer integraler Proteine (Deuticke 1986). Diese Möglichkeit kann für den rekonstituierten Asp/Glu-Carrier ausgeschlossen werden. Um die Efflux-Hemmung zu erklären, müßte man sonst annehmen, daß die hypothetischen Undichtigkeiten an den Kontakt-Stellen spezifisch durch die angewendeten Inhibitoren oder Proteinasen verschlossen würden. Auch die Aktivierungsenergie des Effluxprozesses (s. 8.3.3) spricht klar gegen eine Diffusion durch wassergefüllte Poren jeglicher Art.

Eine mögliche Kontamination der Proteinpräparation durch Porin, was zur Erklärung unserer Ergebnisse hätte vorgebracht werden können, wurde gründlich untersucht und eindeutig durch immunologische und funktionelle Analysen zurückgewiesen (Abb.23 und 24). Ein weiterer Kandidat für mögliche Artefakte wäre der Anionenkanal der inneren Mitochondrienmembran (IMAC) (Selwyn et al. 1979, Garlid & Beavis 1986). Während jedoch der durch Mersalyl induzierbare Efflux von Aspartat ein pH-Optimum unter pH 7 zeigt, wird der IMAC bei alkalischem pH aktiviert und durch eine Mersalyl-Dosis über 10 nmol pro mg mitochondrialem Protein inhibiert (Beavis 1989). Außerdem zeigten Inhibitoren des IMAC wie Palmityl-CoA (Halle-Smith et al. 1988) oder Agaricin (Murray et al. 1988) keinen hemmenden Effekt auf den Hg-induzierten Efflux.

Faßt man die Argumente zusammen, so deutet alles auf den Asp/Glu-Carrier als das Protein, das für das Efflux-Phänomen verantwortlich ist. Diese Sichtweise stützt sich vor allem darauf, daß die Induktion des Aspartat-Effluxes mit der Inhibition des Aspartat-Antiports gekoppelt war und daß - umgekehrt - die Antiport-Hemmung durch Proteinasen oder Inhibitoren auch zu einer Hemmung des Effluxes führte.

Zwei unabhängige, vom Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier vermittelte Efflux-Wege

Da zusätzlich zum Efflux von Aspartat (und Glutamat) auch ein langsamer Efflux von ATP durch HgCl_2 oder Mersalyl induziert wurde, mußte die Möglichkeit überprüft werden, ob neben dem Asp/Glu- auch der ADP/ATP-Antiporter in einen unidirektionalen Carrier umgewandelt wurde. Eine klare Korrelation des Aspartat- bzw. des ATP-Effluxes mit dem jeweiligen Carrier wurde jedoch durch zwei Befunde erschwert: (a) Die Hg-Verbindungen reduzierten die Substrat-Spezifität und -Affinität beträchtlich (s. 8.3.1), so daß die Effluxcarrier nicht aufgrund ihrer Substratspektren oder Affinitätskonstanten identifiziert werden konnten. (b) Eine Untersuchung der Elektrogenität (Aspartat) oder Proton-kompensierten Elektroneutralität (Glutamat) des Effluxes war ebenfalls nicht möglich, da infolge der Substrat-Unspezifität ein (proteinabhängiger) Efflux kleiner Ionen auftrat (s. 8.), der in diesen Experimenten zu instabilen Kalium- bzw. Protonengradienten führte.

Trotzdem konnte der Aspartat- wie auch der ATP-Effluxcarrier identifiziert werden, wobei die unterschiedlichen Sensitivität des Asp/Glu- bzw. des ADP/ATP-Carriers gegenüber verschiedenen Inhibitoren oder Proteinasen ausgenutzt wurde (Abb.25, 26). In diesen Untersuchungen ließen sich die (unspezifischen) Effluxaktivitäten eindeutig den (spezifischen) Antiportaktivitäten zuordnen. Alle getesteten Inhibitoren oder Proteinasen, die präferenziell den Efflux von Aspartat (ATP) inaktivierten, hemmten ohne Ausnahme auch den Antiport von Aspartat (ATP) stärker als den Antiport von ATP (Aspartat). Insbesondere Diethylpyrocarbonat und EDC inhibierten fast ausschließlich den Transport von Aspartat (Efflux und Antiport), der andererseits nicht eingeschränkt wurde durch CAT, BKA oder Cibacron Blue, drei Inhibitoren des ATP-Transports. Demnach wird der Efflux von Aspartat allein vom Asp/Glu-Carrier vermittelt, und es gibt keine Hinweise für eine Beteiligung des Nucleotid-Carriers. Die entsprechenden Daten für den ATP-Effluxcarrier stimmen mit diesem Modell überein. Wie die Experimente mit Cibacron Blue zeigen, werden mindestens 75% des gesamten ATP-Netto-Fluxes vom ADP/ATP-Carrier vermittelt.

Um zu beweisen, daß die Antiport- und Effluxfunktion beide demselben Protein innewohnen, erhob sich die Notwendigkeit, die beiden Carrier zu reinigen. Dies wurde durch HPLC auf Hydroxylapatit erreicht. Dabei reduzierte sich die kontaminierende Aktivität des jeweils zweiten Carriers auf weniger als 5% (Tab.IX). Sowohl die Aspartat- als auch die ATP-Effluxaktivität wurden zusammen mit dem Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carrier

gereinigt, womit klar belegt wäre, daß beide Carrier vom Antiport- zum unidirektionalen Efflux-Zustand konvertiert werden können.

HPLC-Protein wurde weiterhin eingesetzt, um den Aspartat- oder ATP-Transport distinkten Banden auf einem SDS-Gel zuzuweisen (Abb.27). Die unterschiedliche Proteinase-Sensitivität der zwei Carrier, die Antiport- wie die Effluxfunktion betreffend, wurde auch nach Elektrophorese der aus den Liposomen extrahierten Proteine deutlich. Der Asp/Glu-Carrier wurde durch die Proteinase-Behandlung vollständig abgebaut, während der weniger sensitive ADP/ATP-Carrier offensichtlich nur an einem seiner Enden proteolytisch angegriffen wurde, wie aus 'Immunoblots' zu schließen. Es läßt sich also eine Konsistenz struktureller und funktioneller Daten konstatieren. Dabei sollte aber erwähnt werden, daß andere, vermutlich kleinere Proteinfragmente bei der Extraktion aus den Proteoliposomen anscheinend nicht zurückgewonnen wurden.

Trotz der Einschränkungen hinsichtlich der Möglichkeit, die Spezifität eines jeden der beiden Effluxcarrier zu testen (s. 7.3.4), wurden also in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen schlüssige Daten zusammengetragen. Diese sprechen einerseits klar für einen Aspartat-Effluxcarrier, der Aspartat, Glutamat und wahrscheinlich andere Metabolite angemessener Größe (s. 8.) 'transloziert', und belegen andererseits einen zweiten Effluxcarrier für ATP. Diese unidirektionalen Transportaktivitäten werden vom Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carrier nach Modifizierung mit bestimmten Hg-Verbindungen katalysiert.

SH-induzierter Efflux aus Mitochondrien

Die hier im rekonstituierten System erhaltenen Ergebnisse dürften auch für viele Beobachtungen relevant sein, die in den letzten 20-30 Jahren in Mitochondrien gemacht wurden. Eine Reihe unterschiedlicher Behandlungen wurde beschrieben, die zum Efflux einer Vielfalt von Soluten aus dem Matrixraum führten. Nach Anwendung verschiedener SH-Reagenzien (Mersalyl, Hg^{2+} , p-Hydroxymercuribenzoat, PCMB, NEM, DTNB, Diamid, Hydroperoxide, Arsenit oder Phenylarsinoxid) resultierte eine erhöhte Permeabilität für Anionen wie Cl^- (Knight et al. 1968, Scott et al. 1970, Bogucka & Wojtczak 1979, Rial et al. 1989), Phosphat (Kaplan & Pedersen 1983, Rial et al. 1989) und Sulfat (Rial et al. 1989), aber auch für Kationen wie K^+ (Scott & Gamble 1961, Knight et al. 1968, Scott et al. 1970, Bogucka & Wojtczak 1979, Rizzuto et al. 1987, Novgorodov et al. 1987) und insbesondere Ca^{2+} (Harris et al. 1979, Beatrice et al. 1980, Rizzuto et al. 1987, Novgorodov et al. 1987, Sokolove 1988, Chávez et al. 1989). Im Zusammenhang mit den hier beschriebenen Befunden ist ein Bericht von besonderer Bedeutung, wonach Mersalyl auch einen Efflux der erheblich größeren Verbindungen ADP und ATP aus Mitochondrien induzierte (Harris et al. 1979). Eine direkte Beteiligung des ADP/ATP-Carriers wurde jedoch nicht ins Auge gefaßt, obwohl BKA den Verlust der Adennucleotide verminderte. Stattdessen wurden mehrere verschiedene Hypothesen aufgestellt, um die Effluxphänomene zu erklären. Aus offenkundigen Gründen wurde der Redoxzustand von SH-Gruppen der inneren Mitochondrienmembran als zentraler Punkt bei der Effluxinduktion angesehen (Knight et al. 1968, Scott et al. 1970, Siliprandi et al. 1973, Bogucka & Wojtczak 1979, Harris et al. 1979, Beatrice et al. 1980, Novgorodov et al. 1987, Rizzuto et al. 1987). Eine Abgabe von Ca^{2+} aus den Mitochondrien konnte auch herbeigeführt werden, indem Bedingungen einer erhöhten Oxidation von Nicotinamid-Nucleotiden geschaffen wurden. Dies ließ vermuten, daß SH-Gruppen infolge eines Abfalls an reduziertem Glutathion oxidiert werden (Harris et al. 1979, Beatrice et al. 1984, Vercesi 1984). Eine andere Gruppe erhob jedoch den Anspruch, daß dieser Efflux von Ca^{2+} auf eine ADP-Ribosylierung eines spezifischen Membranproteins zurückzuführen sei, die eine Hydrolyse von NAD^+ bedinge (Lötscher et al. 1979, Richter et al. 1983). Ein weiterer hypothetischer Mechanismus impliziert die

Beteiligung freier Radikale (Novgorodov et al. 1987), möglicherweise Sauerstoffradikale (Carbonera & Azzone 1988, Augustin et al. 1979), die nach Modifizierung von reduzierenden SH-Gruppen nicht mehr ausreichend entfernt werden können (Carbonera & Azzone 1988) und somit zu Lipidperoxidation führen. Bei einer anderen Erklärung für das Auftreten von Efflux wird eine Akkumulation von Lysophospholipiden in der Membran gefolgert aufgrund einer Hemmung von Enzymen, die für die Reacylierung oder vollständige Deacylierung der Lysolipide notwendig sind (Pfeiffer et al. 1979, Beatrice et al. 1980). Es sollte erwähnt werden, daß diese und andere in der Literatur beschriebene Effluxphänomene besonders in Anwesenheit von Ca^{2+} und/oder Phosphat beobachtet wurden.

Anders als diese divergierenden Hypothesen, die zumeist den Efflux der Solute auf eine geänderte osmotische Integrität der Mosaik-Doppelschicht zurückführen, zogen wir eine Beteiligung von Carrierproteinen in Betracht. Tatsächlich konnte ein carrier-vermittelter Efflux von Aspartat und ATP aufgezeigt werden, der durch Behandlung des rekonstituierten Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carriers mit bestimmten Hg-Verbindungen induzierbar war. Da diese zwei Carrier im Antiportzustand spezifisch Aspartat und Glutamat bzw. ADP und ATP transportieren, scheint es, daß die Hg-induzierten Netto-Fluxaktivitäten nur den berichteten Efflux von Adeninnucleotiden erklären können, nicht aber den von K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Phosphat oder Sulfat. Wie jedoch im nächsten Kapitel gezeigt wird, kann durch Modifizierung der rekonstituierten Carrierproteine nicht nur ein Efflux von Aspartat, Glutamat und ATP induziert werden, sondern ebenso ein Efflux anderer Solute, worunter sich auch anorganische Anionen und Kationen finden. Die Richtung des in Mitochondrien und in unserem rekonstituierten System gemessenen Netto-Fluxes ist identisch, da zumindest im Falle des Asp/Glu-Carriers die Orientierung des Proteins in der Liposomenmembran 'right-side out' ist, wie unter 3. beschrieben wurde. Darüber hinaus muß aus Studien des Phosphat-Carriers (Kaplan & Pedersen 1983), des Uncoupling-Proteins (Rial & Nicholls 1986, Rial et al. 1989), des ADP/ATP-Carriers (Lê Quôc & Lê Quôc 1988, Meisner & Klingenberg 1968, Wilson & Asimakis 1987), des Carnitin-Carriers (Pande & Parvin 1980; Indiveri et al., unveröffentlichte Ergebnisse) und des Ca^{2+} -Uniporters (Nicholls & Brand 1980, Broekemeier et al. 1985) geschlossen werden, daß auch noch andere mitochondriale Transportproteine in Effluxcarrier-Systeme überführt werden können.

8. Antiport-Efflux-Interkonversion des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers:

Porenartige Eigenschaften lassen einen präformierten Kanal als strukturelle

Voraussetzung carrier-vermittelter Transports erkennen (Dicrks, Salentin & Krämer 1990b)

8.1 Einleitung

Im vorangegangenen Kapitel wurde eine interessante und zuerst recht überraschende Entdeckung geschildert, wonach der Transportmechanismus des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers sich grundlegend ändert, wenn Cysteine des Carrierproteins durch bestimmte Hg-Reagenzien modifiziert werden. Mikromolare Konzentrationen an Hg^{2+} , Mersalyl oder PCMS blockierten den Asp/Glu-Antiport vollständig, induzierten aber gleichzeitig eine unidirektionale Transportaktivität, die als Efflux von Aspartat aus Proteoliposomen in Abwesenheit von externem Substrat gemessen werden konnte. Die elementaren Eigenschaften dieses Phänomens (s. 7.) ließen eindeutig erkennen, daß der Asp/Glu-Antiporter in ein Effluxsystem umgewandelt wurde. Dieser Funktionswechsel bedurfte weiterer Aufklärung. Ihm mußte auch deshalb ein besonderes Interesse zukommen, da Mersalyl und Hg^{2+} außerdem einen Efflux von ATP induzierten, der dem ADP/ATP-Carrier zugeschrieben werden konnte.

Die Antiport- und Effluxaktivitäten des jeweiligen Translokators wiesen mehrere gemeinsame Eigenschaften auf - so die Sensitivität gegenüber Inhibitoren oder Proteinasen (s. 7.3). Jedoch gab es auch schwerwiegende Unterschiede zwischen den zwei Modi des Transports. Wie hier gezeigt werden soll, wurden im Efflux-Zustand porenartige Charakteristika festgestellt, obwohl auch wesentliche Carrier-Charakteristika nach SH-Modifizierung erhalten blieben. Durch diesen Vergleich funktioneller Eigenschaften war es möglich, grundlegende Aspekte der Antiport-Kopplung und auch der Kanalisierung des Substrats durch das Carrierprotein zum Vorschein zu bringen. Ein Modell der Antiport-Efflux-Interkonversion wurde erarbeitet, das auf der Basis des etablierten Antiport-Mechanismus (s. 4.) auch den Efflux-Vorgang - zumindest ansatzweise - beschreibt. Berücksichtigt man ferner Befunde aus der Literatur, so trägt die vereinfachte Funktionsweise des Effluxcarriers zu einem tieferen Verständnis der Transportkatalyse im allgemeinen bei.

8.2 Methoden

Messung der rekonstituierten Transportaktivitäten

Proteoliposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier (G-25-Protein) wurden präpariert und zur Messung der Rücktausch- bzw. Effluxaktivität eingesetzt, wie in 7.2 für den Asp/Glu-Carrier beschrieben wurde. Die Markierung des internen Substratpools (16 mM Aspartat) wurde normalerweise mit Hilfe der Antiportaktivität durch Vortausch-Beladung mit [^{14}C]Aspartat erreicht. In den Experimenten aber, wo die Spezifität des Effluxcarriers analysiert wurde, mußten die markierten Substanzen während der Rekonstitution in die Liposomen eingeschlossen werden (0.3 $\mu\text{Ci/ml}$). Der Rücktausch bzw. Efflux der internen Markierung wurde initiiert und gestoppt, wie in 7.2 beschrieben. Zur Abtrennung der exportierten von der innen verbliebenen Radioaktivität wurde normalerweise ein Anionen-Austauscher benutzt (s. 2.3). Bei kationischen Substraten hingegen wurde Kationen-Austauschermaterial verwendet (Dowex 50 W-X8, Lithium-Form). Im Falle von Glucose wurden die Liposomen (50 μl) über kleine Säulen (7 x 65 mm) mit Sephadex G-50 gegeben.

Apparente Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (k) von Antiport und Efflux wurden ermittelt, wie in 7.2 beschrieben. Wenn die interne Substratkonzentration variiert werden mußte (Abb.28), so wurden relative Geschwindigkeiten (v') nach Gl. 2.6 berechnet. Die Vortausch-Technik (s. 2.3) kam lediglich zur Bestimmung der externen K_m -Werte zum Einsatz (Tab.X).

Inhibition des Effluxes von α -Ketoglutarat durch Diethylpyrocarbonat

Für diese Untersuchungen wurden Liposomen hergestellt, die neben dem Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier auch noch den Oxoglutarat-Carrier enthielten. Dieser wurde nach Bisaccia et al. (1985) präpariert (s. 5.2). Im Vergleich zu den anderen Experimenten wurden die Rekonstitutionsbedingungen nur bezüglich des Detergens geändert, wobei 0.05 mg Triton X-114 plus 1.7 mg $C_{12}E_8$ pro mg Phospholipid eingesetzt wurden. Dazu mußte die Konzentration an Triton X-114 in der Präparation des Oxoglutarat-Carriers auf etwa 0.4% reduziert werden, indem das Protein sechsmal über Amberlite XAD-2 gegeben wurde (etwa 20 mg/mg Triton). Der Oxoglutarat-Carrier ermöglichte die Beladung der Proteoliposomen (innen 20 mM α -Ketoglutarat und 16 mM Aspartat) mit markiertem α -Ketoglutarat. Dies führte zu zuverlässigeren Inhibitionskinetiken, verglichen mit Experimenten, in denen die Markierung während der Rekonstitution eingeschlossen wurde (s. oben). Nach Zugabe von 6 μ M $HgCl_2$ oder 100 μ M Mersalyl war ein Efflux von α -Ketoglutarat nur in Liposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu-Carrier zu beobachten. Dieser Efflux wurde gehemmt, wenn die Proteoliposomen mit 80 μ M Diethylpyrocarbonat für 15 Min vorinkubiert wurden. In Liposomen, die nur den Oxoglutarat-Carrier trugen, sonst aber unter identischen Bedingungen hergestellt worden waren, trat nahezu kein Efflux auf.

8.3 Ergebnisse

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde, konnten sowohl der Aspartat- als auch der ATP-Effluxcarrier gereinigt und identifiziert werden. Aus dort erläuterten, methodischen Gründen waren die reinen Proteinfractionen jedoch ungeeignet für eine detailliertere kinetische Analyse. Um die efflux-vermittelnden Carrier hinsichtlich ihres Transportmechanismus zu charakterisieren, mußten die Experimente daher wiederum mit G-25-Protein durchgeführt werden, das den Asp/Glu- und auch den ADP/ATP-Carrier enthielt (vgl. Abb.23).

8.3.1 Substrat-Spezifität und -Affinität

Die bisher vorgestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit zwei Effluxcarrier-Systemen, die einerseits Aspartat und Glutamat transportieren und andererseits ADP und ATP - entsprechend den Spezifitäten der jeweiligen Antiporter. Die weitere Analyse der funktionellen Eigenschaften brachte jedoch mehrere bedeutende Unterschiede zwischen Efflux und Antiport zum Vorschein, die eine Veränderung der internen Substrat-Bindungsstelle anzeigten: (a) Der Aspartat-Effluxcarrier ließ sich über einen Konzentrationsbereich von 1-50 mM nicht mit internem Aspartat sättigen, wie man direkt der Steigung des Eadie-Hofstee-Diagramms aus Abb.28 entnehmen kann. Zum Vergleich ist die ursprüngliche Transport-Affinität des Antiporters dargestellt (K_m : 2.8 mM). Ähnliche Ergebnisse wurden für den ATP-Effluxcarrier erhalten (nicht gezeigt). (b) Auch die Substrat-Spezifität war nach Effluxinduktion mit Hg-Verbindungen drastisch reduziert. Durch Mersalyl konnte

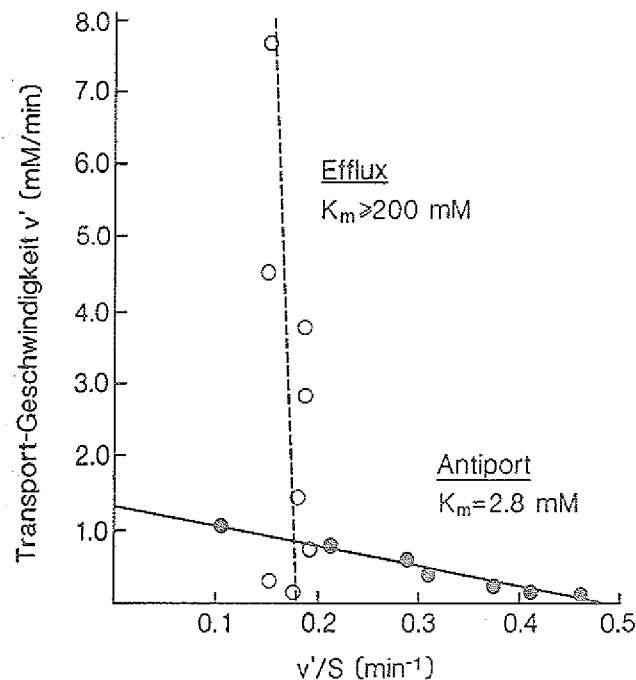


Abb.28: Transport-Affinitäten des Asp/Glu-Antiporters und des Aspartat-Effluxcarriers. Mehrere Liposomenpräparationen mit verschiedenen internen Aspartatkonzentrationen (●, 0.25-10 mM; O, 1-50 mM) wurden im Vortauschverfahren mit [14 C]Aspartat beladen (s. 2.3). Nach Gelfiltration der Liposomen unter isosmotischen Bedingungen wurde der Rücktausch mit Zugabe von 8 mM Aspartat (●) gestartet bzw. der Efflux durch 100 μ M Mersalyl induziert (O). Relative Transportgeschwindigkeiten (v') wurden nach Gl. 2.6 berechnet und in einem Eadie-Hofstee-Diagramm aufgetragen. Die aus den Steigungen der Geraden abgeleiteten K_m -Werte sind angegeben.

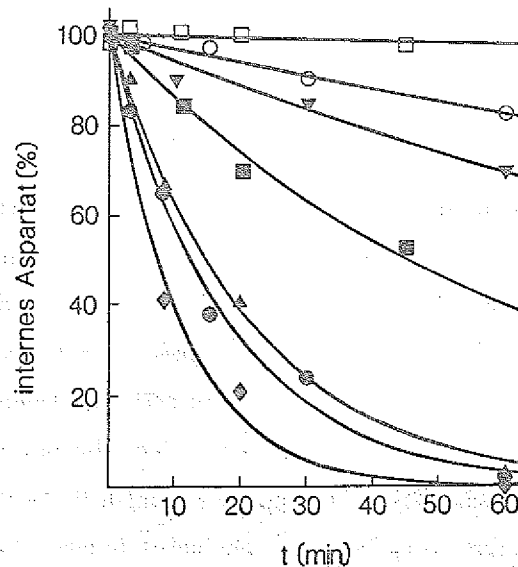


Abb.29: Efflux verschiedener Solute aus Proteoliposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier. Während der Rekonstitution wurde markiertes Substrat (O, ●, 16 mM [14 C]Aspartat; ▲, 16 mM [14 C] α -Ketoglutarat; ◆, 16 mM Natrium[35 S]sulfat; ▼, 16 mM [14 C]Lysin; □, ■, 10 mM [14 C]ATP) in Liposomen eingeschlossen (s. 8.2). Nach Gelfiltration wurde die Effluxaktivität durch Gabe von 100 μ M Mersalyl induziert. Zum Vergleich ist auch der nicht-induzierte Efflux von Aspartat (O) und ATP (□) nach Zusatz von Puffer gezeigt. Da die Messungen aus vier verschiedenen Experimenten stammen, wurde das interne Substrat in Prozent der anfänglich innen vorhandenen Radioaktivität ausgedrückt, die sich nach Anpassung der Daten mit einer einfachen Exponentialgleichung errechnete (s. 7.2). Die erhaltenen Werte wurden auf der Grundlage der Aspartat-Effluxkontrolle (●) normiert, die in jedem Experiment mitgemessen wurde. Dazu wurde das interne Aspartat, das für $t = \infty$ extrapoliert wurde, gleich 0% gesetzt. So wurden die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten des Effluxes direkt miteinander vergleichbar: <0.001 (□), 0.003 (O), 0.006 (▼), 0.015 (■), 0.048 (▲), 0.056 (●), 0.094 min^{-1} (◆).

neben dem Efflux von Aspartat oder Glutamat ebenso ein Efflux von α -Ketoglutarat (Abb.29), Malat, Malonat und selbst Glucose induziert werden, wobei sich in allen Fällen eine ähnliche Geschwindigkeitskonstante ergab. Sogar höhere k -Werte wurden für Sulfat (Abb.29), Na^+ und besonders für Cl^- gemessen. Dagegen war der Efflux der kationischen Aminosäuren Lysin und Ornithin nur geringfügig erhöht, verglichen mit dem Grundefflux von Aspartat (Abb.29), jener sehr langsamen Netto-Fluxaktivität, die immer zu messen war, auch ohne Anwendung von Hg-Reagenzien (vgl. 7.3.1).

Der beobachtete Efflux all dieser Ionen war nicht etwa auf eine erhöhte Permeabilität der Membran zurückzuführen, wie durch Liposomen ohne Protein überprüft wurde. Diethylpyrocarbonat, ein wirksamer Inhibitor des Asp/Glu-Carriers (s. Abb.25), verminderte klar den Efflux von α -Ketoglutarat ($67 \pm 17\%$ Hemmung); die Hemmung des Aspartat-Effluxes unter diesen Bedingungen (s. 8.2) betrug $76 \pm 12\%$. Folglich wird der unspezifische Efflux zumindest des α -Ketoglutarats vom Asp/Glu-Carrier vermittelt und nicht vom korekonstituierten ADP/ATP-Carrier, der gegenüber Diethylpyrocarbonat insensitiv ist (Abb.25). Abb.29 zeigt auch den erheblich langsameren Efflux von ATP. Dieses voluminöse Substrat wird vom Aspartat-Effluxcarrier eindeutig nicht akzeptiert, wie oben mehrfach belegt ist (s. 7.). Als Substrat vergleichbarer Größe wurde noch UDP-Glucose getestet, deren Efflux 5- bis 10-mal langsamer als der Efflux von ATP ablief und damit gerade noch meßbar war (nicht gezeigt).

Eine Konsequenz dieser Unspezifität des Effluxcarriers war eine Anzahl vergeblicher Versuche, den unidirektionalen Transport durch Energetisierung der Membran zu modulieren. Die in diesen Experimenten erzeugten K^+ -, Na^+ - und H^+ -Gradienten waren nach Effluxinduktion äußerst instabil. Somit konnten auch keine Kriterien erhalten werden, die die elektrischen Eigenschaften des Effluxes von Aspartat, Glutamat, ATP oder ADP betreffen.

8.3.2 Reversibilität der Effluxinduktion

In Anbetracht dieser offensichtlich porenartigen Charakteristika mußte die Möglichkeit erwogen werden, daß die angewendeten Hg-Reagenzien solch drastische Effekte auf die Proteinstruktur ausübten, daß aufgrund einer partiellen Denaturierung sich für verschiedene Solute ein Weg durch die Membran öffnete. Daher testeten wir, ob der Effluxcarrier nach Induktion mit Hg-Verbindungen wieder in den Antiport-Zustand zurückversetzt werden konnte. Zu diesem Zweck benutzten wir das Dithiol DTE, das keinen hemmenden oder efflux-induzierenden Einfluß zeigte (Tab.VII). DTE entfernt bekanntermaßen gebundenes DTNB von Proteinen und überführt Cysteinyl-Mercaptide in cyclische DTE-Dimercaptide (Wolman 1974). Abb.30 zeigt den Efflux von Aspartat nach Gabe von $5 \mu\text{M}$ HgCl_2 (erste Zugabe, offene Dreiecke). In einem Parallelansatz wurde 2.5 Min nach der Effluxinduktion DTE zugesetzt (zweite Zugabe), das das gebundene Quecksilber offensichtlich entfernte, denn der Efflux von internem Aspartat wurde auf eine sehr geringe Aktivität reduziert (offene Quadrate); die Geschwindigkeitskonstante sank auf den Wert der nichtinduzierten Grundefflux-Kontrolle (offene Kreise). Wenn nun diesen Liposomen Substrat angeboten wurde (dritte Zugabe), so wurde der Antiport reaktiviert. Dies ging aus dem erneut einsetzenden Export von Markierung hervor (gefüllte Quadrate), der mit nahezu derselben Geschwindigkeitskonstante wie die unbehandelte Rücktausch-Kontrolle ablief (gefüllte Kreise). Abb.30 belegt also, daß die modifizierten Cysteine, die an der Induktion der Netto-Fluxaktivität und an der Hemmung des Antiports beteiligt sind, durch Anwendung von Dithiolen wie DTE in den Ausgangszustand zurückgeführt werden können.

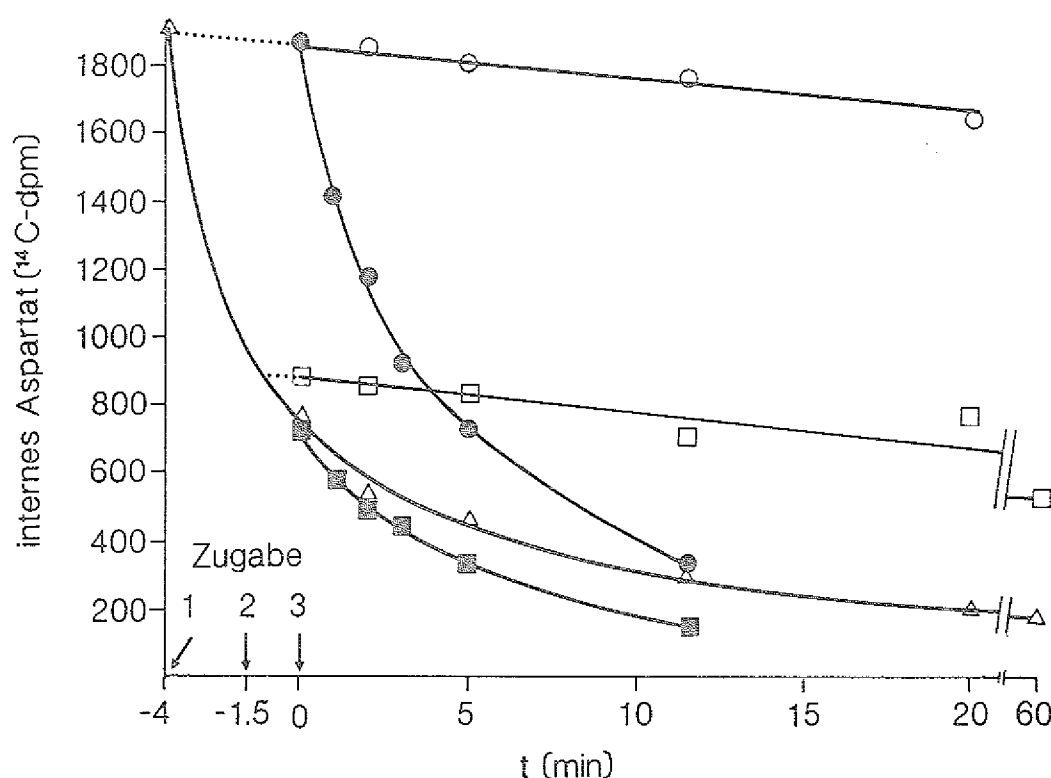


Abb.30: Reversible Antiport-Efflux-Umwandlung. Nach drei aufeinander folgenden Zugaben zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Efflux (offene Symbole) und der Rücktausch (gefüllte Symbole) von [^{14}C]Aspartat aus vormarkierten Proteoliposomen gemessen. $\circ$, Grundefflux (Zugabe von Puffer); Δ , Efflux-induktion durch $5\ \mu\text{M}\ \text{HgCl}_2$ (erste Zugabe); $\square$, Stopp des Effluxes nach Entfernung des gebundenen Quecksilbers mit $4\ \text{mM}\ \text{DTE}$ (zweite Zugabe); $\blacksquare$, Reaktivierung des Antiports (Rücktausch) durch $2.5\ \text{mM}\ \text{Aspartat}$ (dritte Zugabe); $\bullet$, Rücktausch-Kontrolle ($2.5\ \text{mM}\ \text{Aspartat}$ nach zwei Zugaben von Puffer). Die folgenden Geschwindigkeitskonstanten wurden berechnet: $0.007\ (\circ)$, $0.265\ (\Delta)$, $0.011\ (\square)$, $0.307\ (\blacksquare)$ und $0.284\ \text{min}^{-1}\ (\bullet)$. Vormarkierung des internen Substratpools wie in Abb.28.

Tab.X: Transport-Affinitäten des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers nach Revertierung vom Efflux- zum Antiport-Zustand. Externe und interne Transport-Affinitätskonstanten (K_m) wurden aus Vortausch- bzw. Rücktausch-Messungen der Antiportaktivität ermittelt (Lineweaver-Burk-Auswertung). Die Substratkonzentrationen wurden wie folgt variiert: externe K_m -Bestimmungen, $20\text{--}140\ \mu\text{M}$ Aspartat ($16\ \text{mM}$ internes Aspartat); interne K_m -Bestimmungen, $1\text{--}15\ \text{mM}$ Aspartat ($1\ \text{mM}$ externes Aspartat). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den K_m -Werten, die in Liposomen mit unbehandeltem Protein erhalten wurden oder aber in Liposomen, deren Carrierprotein durch HgCl_2 (erste Zugabe) zunächst in den Efflux-Zustand überführt und nach $1\ \text{Min}$ durch DTE (zweite Zugabe) wieder zum Antiporter revertiert worden war.

Erste Zugabe	Zweite Zugabe	$K_m\ (\text{mM})$ für	
		externes Aspartat	internes Aspartat
Puffer	$5\ \text{mM}\ \text{DTE}$	0.045	2.7
$10\ \mu\text{M}\ \text{HgCl}_2$	$5\ \text{mM}\ \text{DTE}$	0.042	2.4

Der revertierte Asp/Glu-Antiporter, d. h. nach Behandlung zunächst mit HgCl_2 (1 Min) und dann mit DTE, akzeptierte nicht mehr α -Ketoglutarat als Substrat. Darüber hinaus ließ er sich wieder durch Transport-Affinitätskonstanten charakterisieren. Wie Tab.X zeigt, waren die ermittelten K_m -Werte nahezu identisch mit denen des unbehandelten Carriers, und zwar im Hinblick auf die interne und die externe Seite der Membran. Es muß also gefolgert werden, daß durch spezifische Cystein-Modifizierung ein völlig reversibles Umschalten zwischen Antiport- und Effluxfunktion ausgelöst wurde.

8.3.3 Aktivierungsenergie des Effluxes

Efflux-Vorgänge durch transmembrane Poren sind durch niedrige Aktivierungsenergien charakterisierbar (16 kJ/mol im Falle von Porin, R. Benz, persönliche Mitteilung). Um dieses Kriterium für den Mersalyl-induzierten Effluxcarrier zu überprüfen, wurde die Temperaturabhängigkeit des Aspartat-Effluxes untersucht. Aus dem Arrhenius-Diagramm der Abb.31 ließ sich eine Aktivierungsenergie von 86 kJ/mol (15-30°C) ermitteln, was im Bereich der Werte liegt, die allgemein für carrier-vermittelte Prozesse gefunden werden. Wurden dieselben Proteoliposomen für die Messung des Asp/Asp-Antiports eingesetzt, so ergab sich eine Aktivierungsenergie von 77 kJ/mol (15-30°C) (Abb.31).

8.3.4 Einfluß des externen Substrats auf Effluxinduktion und Effluxaktivität

Weiterhin wurde untersucht, ob die externe Bindungsstelle des Carriers, die ja Voraussetzung für die Antiportfunktion ist, auch an der Effluxfunktion teilnimmt. Da im Efflux-Zustand die Interaktion des Substrats mit der internen Bindungsstelle unspezifisch war, mußten wir die Möglichkeit überprüfen, ob auch die externe Stelle ihre Spezifität verloren hatte und ob 'unspezifischer Antiport' auftrat. Ein solches Konzept könnte Efflux als Austausch von internem Aspartat gegen irgendeine noch nicht identifizierte Komponente des Inkubationsmediums erklären. Aufschluß darüber sollte der Einfluß von externem Substrat auf die Effluxaktivität geben.

Die Anwesenheit von externem Aspartat könnte einerseits den hypothetischen 'unspezifischen Antiport' stimulieren, könnte andererseits aber auch eine eventuell verbliebene spezifische Antiportaktivität (unmodifizierter Carriermoleküle) reaktivieren. In beiden Fällen wäre ein schnellerer Export der Markierung aus den Proteoliposomen zu erwarten. Wie aber Abb.32 zeigt, führte der Zusatz von Aspartat zusammen mit Mersalyl nicht zu einer Stimulierung des 'Efflux-Austausches' im Vergleich zu der Efflux- bzw. Rücktausch-Kontrolle; stattdessen war die Transportaktivität klar reduziert. Selbst wenn man externes Aspartat dem bereits induzierten Effluxcarrier anbot, also 1.5 Min nach Zusatz von Mersalyl, so wurde die Effluxaktivität auf relativ geringe Raten erniedrigt (Abb.32). Diese Effekte waren offenbar spezifisch für Aspartat, wie Kontrollen mit α -Ketoglutarat erkennen ließen. Die Abwesenheit eines einwärtsgerichteten Substratflusses wurde durch weitere Experimente bestätigt. Weder ein Influx noch ein 'Influx-Austausch' von externem [^{14}C]Aspartat in Liposomen ohne Aspartat bzw. mit [^3H]Aspartat konnte gemessen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Zusammengefaßt machen diese Befunde deutlich, daß (a) die angewendeten Hg-Verbindungen den unidirektionalen Transport nur in Abwesenheit von externem Substrat induzieren; andernfalls wird der Carrier gehemmt. (b) Nach Effluxinduktion kann keine Antiportaktivität mehr stattfinden. (c) Externes Aspartat reduziert die Effizienz selbst des induzierten Effluxcarriers. Folglich kann die zweite (externe) Bindungsstelle, obwohl nicht direkt am unidirektionalen Transport beteiligt, dennoch nachgewiesen werden, da ihre Besetzung mit Aspartat zu einer *trans*-Inhibition der Effluxfunktion führt.

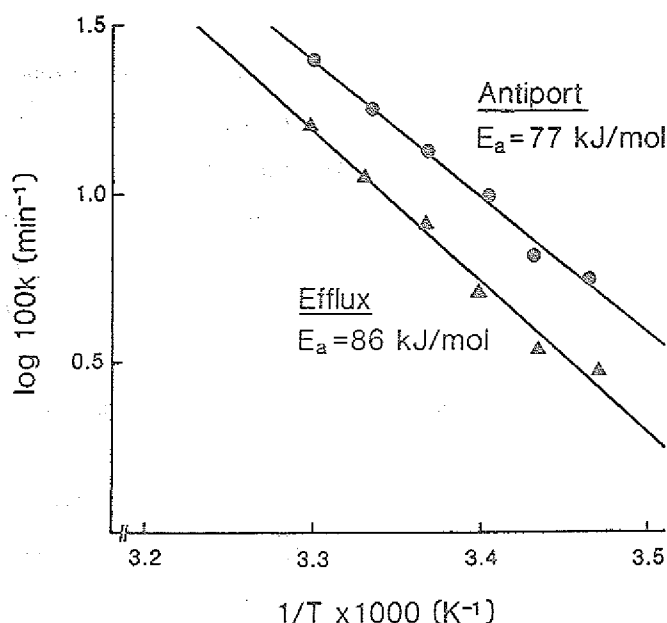


Abb.31: Temperaturabhängigkeit des Effluxes und Antiports von Aspartat. Efflux- (Δ) und Antiportaktivitäten ($\odot$) wurden bei verschiedenen Temperaturen (15-30°C) gemessen. Dazu wurden vormarkierte Proteoliposomen mit 200 μ M Mersalyl bzw. 200 μ M Aspartat versetzt. Die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten sind in einem Arrhenius-Diagramm dargestellt. Aus den Steigungen der Geraden wurden Aktivierungsenergien von 86 und 77 kJ/mol für den Efflux bzw. Rücktausch errechnet. Zur Vormarkierung des internen Substratpools siehe Abb.28.

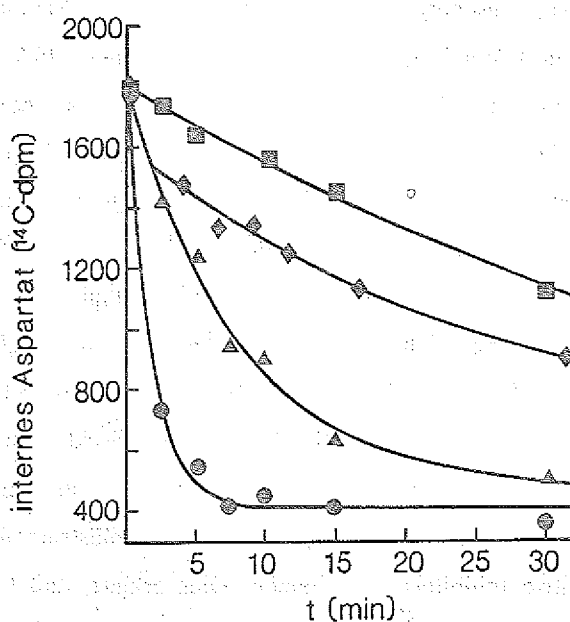


Abb.32: Wechselseitige Interaktion von Aspartat und Mersalyl mit dem Asp/Glu-Carrier. Efflux von [14 C]-Aspartat aus vormarkierten Proteoliposomen wurde durch 100 μ M Mersalyl induziert. Dies geschah in Ab- (Δ) oder Anwesenheit von 5 mM Aspartat, das gleichzeitig mit Mersalyl ($\blacksquare$) oder 1.5 Min später zugesetzt wurde ($\diamond$). Die Rücktausch-Kontrolle wurde nach Zusatz von 5 mM Aspartat in Abwesenheit von Mersalyl gemessen ($\odot$). In allen Fällen bestand der Stopp-Inhibitor aus einer Mischung von 60 mM Pyridoxalphosphat und 5 mM DTE. Zur Vormarkierung des internen Substratpools siehe Abb.28.

8.3.5 Einflüsse der Membran auf Efflux und Antiport (unveröffentlicht, Kurzbericht in Dierks & Krämer 1989b)

Der unidirektionale Flux des Aspartats reagierte äußerst empfindlich auf osmotische Gradienten. Hypo-osmotische Bedingungen (außen erniedrigte Osmolarität) bewirkten einen stimulierenden, hyper-osmotische Bedingungen hingegen einen inhibitorischen Effekt (Abb.33). Ein völlig anderes Bild ergab sich für den Antiport. Dieser war osmotisch nur wenig zu beeinflussen und zeigte optimale Aktivität bei iso- bis hyper-osmotischen Verhältnissen (Abb.33). Unspezifische Effekte durch Instabilitäten der Liposomen konnten in Kontrollen mit inaktiviertem Asp/Glu-Carrier ausgeschlossen werden. Auch die Wahl des Osmotikums war nicht entscheidend.

Osmotische Gradienten bewirken primär ein Schwellen oder Schrumpfen der Liposomen, wodurch sich vor allem die Fluidität der Membran ändert. Bei Auftragung der Effluxaktivitäten aus Abb.33 gegen die reziproke äußere Osmolarität ergab sich eine lineare Abhängigkeit, die aber im hyper-osmotischen Bereich abknickte (nicht gezeigt). Letzteres läßt sich durch ein partielles Kollabieren der Liposomen erklären.

Eine Erhöhung der Membranfluidität kann auch durch Einlagerung von Benzylalkohol in die Lipid-Doppelschicht hervorgerufen werden (Armstrong et al. 1982). Tatsächlich ließen sich so hypo-osmotische Bedingungen simulieren. 0.25% (v/v) Benzylalkohol bewirkte eine etwa dreifache Stimulierung der Effluxaktivität, während der Antiport nahezu unbeeindruckt blieb (Tab.XI). Benzylalkohol und osmotischer Druck wirkten dabei synergistisch oder - bei hyper-osmotischen Bedingungen - kompensatorisch. Diese Einflüsse über die Membran auf das Carrierprotein bringen also die durch die Hg-Modifizierung aufgeweichte Kopplung des Antiporters (s. 8.4) noch deutlicher zum Vorschein. Die Fluidisierung der Membran wirkte sich offensichtlich auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Effluxes aus, da unter hypo-osmotischen Bedingungen (-70 mosM) eine Erniedrigung der Aktivierungsenergie von 81 ± 5 kJ/mol (vgl. Abb.31) auf 54 ± 9 kJ/mol zu messen war (drei Bestimmungen, nicht gezeigt). Wiederum handelte es sich um einen Effekt, der für die Antiportaktivität nicht festgestellt werden konnte (77 und 79 kJ/mol bei iso- bzw. hypo-osmotischen Bedingungen).

Auch eine veränderte Oberflächenladung der Membran beeinflusste den Efflux und Antiport von Aspartat sehr unterschiedlich. Geringe Konzentrationen amphiphiler Polyanionen wie Palmityl-CoA (≥ 20 μ M), Cibacron Blue 3GA (≥ 250 μ M) oder der polyanionische Inhibitor des Porins (≥ 5 nM), ein Copolymer aus Methacrylat, Malcat und Styrol (1:2:3), inhibierten den Asp/Asp-Antiport (vgl. auch 7.3), stimulierten aber den Efflux von Aspartat bis um das Dreifache (nicht gezeigt). Man kann davon ausgehen, daß diese Ionen von außen mit der Membran assoziieren, wie von König et al. (1982) für das Polyanion beschrieben wurde. Die so erhöhte negative Oberflächenladung begünstigt offensichtlich den unidirektionalen Efflux, möglicherweise aufgrund einer beschleunigten Abgabe des exportierten (anionischen) Substrats. Unter Antiport-Bedingungen jedoch überwiegt der abstoßende Effekt bei der Bindung des externen Substrats an den Carrier, so daß die amphiphilen Anionen als kompetitive Inhibitoren erscheinen. Dies erklärt, daß Cibacron Blue neben dem ADP/ATP- auch den Asp/Glu-Antiporter hemmte (Abb.25) und daß Palmityl-CoA und das Polyanion auf nahezu alle Anionencarrier wirken (König et al. 1982). Eine Stimulierung des ATP-Effluxcarriers konnte allerdings nur in erheblich geringerem Ausmaß beobachtet werden, und Cibacron Blue war sogar ein drastischer Inhibitor (Abb.25). Dies mag auf die spezifische Wechselwirkung mit dem ADP/ATP-Carrierprotein zurückzuführen sein, die für Cibacron Blue (Boos & Schlimme 1981), für Palmityl-CoA (Lerner et al. 1972) und auch für das Polyanion (König et al. 1982) beschrieben wurde.

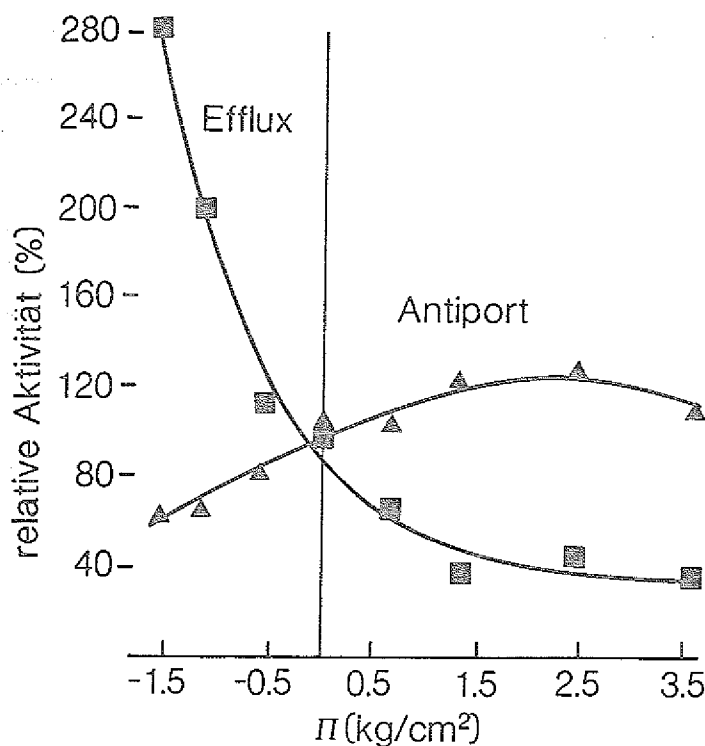


Abb.33: Einfluß osmotischer Gradienten auf Efflux und Antiport von Aspartat. Vormarkierte Proteoliposomen (innen: 30 mM Aspartat/ 100 mM MOPS) wurden über Sephadex G-75 gegeben (0-250 mM Sucrose/ 100 mM MOPS), um osmotische Gradienten zu erzeugen. Der osmotische Druck π ist in kg/cm² angegeben (positiv: $osM_{ex} > osM_{in}$, negativ: $osM_{ex} < osM_{in}$). Der Efflux (■) wurde durch 100 μ M Mersalyl, der Rücktausch (▲) durch 300 μ M Aspartat gestartet. Zur Vormarkierung des internen Substratpools siehe Abb.28.

Tab.XI: Einfluß der Membranfluidität auf Efflux und Antiport von Aspartat. Vormarkierte Proteoliposomen (innen: 25 mM Aspartat/ 100 mM MOPS) wurden über Sephadex G-75 gegeben (5, 75 oder 145 mM Sucrose/ 100 mM MOPS), um hypo-, iso- bzw. hyper-osmotische Bedingungen einzustellen. Benzylalkohol wurde zugesetzt, um die Membranfluidität zu erhöhen. Etwa 4 Min später wurde der Efflux mit 100 μ M Mersalyl und der Rücktausch mit 2.5 mM Aspartat gestartet, deren Geschwindigkeitskonstanten (k) angegeben sind. Alle Ansätze erhielten 1.5% (v/v) Ethanol. Unspezifische Effekte auf die Stabilität der Liposomen waren nicht zu beobachten. Zur Vormarkierung des internen Substratpools siehe Abb.28.

Benzylalkohol (%, v/v)	Efflux, k (1/min)			Antiport, k (1/min)	
	hypo-	iso-	hyper-	hypo-	iso-osmotisch
-	0.237	0.069	0.048	0.199	0.224
0.10	0.297	0.122	0.077	0.215	0.209
0.25	0.447	0.205	0.090	0.205	0.198

8.4 Diskussion

Zwei Antiporter der inneren Mitochondrienmembran, der Asp/Glu- und der ADP/ATP-Carrier, konnten in unidirektionale Efflux-Systeme umgewandelt werden. Dies legt nahe, daß ein gemeinsames 'Struktur-Funktionsprinzip' mitochondrialer Carrier durch die angewendeten Hg-Verbindungen getroffen wurde. Diese Schlußfolgerung wird durch andere Arbeitsgruppen gestützt, die die Existenz von Effluxcarriern in intakten Mitochondrien annahmen. Um den Efflux von Phosphat in Gegenwart von Mersalyl zu erklären, wurde ein anderer Konformationszustand des Phosphat-Carriers postuliert (Kaplan & Pedersen 1983). Die durch NEM stimulierte Permeation von Cl^- und H^+ wurde dem Uncoupling-Protein zugeschrieben (Rial & Nicholls 1986, Rial et al. 1989). Außerdem wurde die Möglichkeit betrachtet, daß der ADP/ATP-Carrier in den Phosphat-induzierten Efflux von Adeninnucleotiden verwickelt ist (Meisner & Klingenberg 1968, Wilson & Asimakis 1987). Auch von einer durch Mersalyl induzierten Abgabe von ADP und ATP aus Mitochondrien wurde berichtet (Harris et al. 1979). Von besonderem Interesse scheint der Carnitin-Austauscher zu sein, der sowohl in Mitochondrien (Pande & Parvin 1980) als auch im rekonstituierten System (Indiveri et al., unveröffentlichte Ergebnisse) eine Netto-Transportaktivität sogar im physiologischen Zustand zeigt, die durch SH-Reagenzien nicht stimuliert, sondern inhibiert wird. Aus dieser Liste von Beispielen (s. auch Lê Quôc & Lê Quôc 1988, Panov et al. 1980, Davidson & Halestrap 1987, Nicholls & Brand 1980, Broekemeier et al. 1985) mag geschlossen werden, daß unterschiedliche Behandlungen zu einer Änderung des Transportmechanismus verschiedener Carrier führen.

In der vorliegenden Arbeit über den rekonstituierten Asp/Glu-Carrier werden Fragestellungen behandelt, die mit dem Transportmechanismus des Netto-Fluxes (im Vergleich zum Antiport) und mit der Antiport-Efflux-Interkonversion zusammenhängen. Dabei sollte hervorgehoben werden, daß dieser fundamentale Wechsel funktioneller Eigenschaften vollständig reversibel war (Abb.30, Tab.X), was belegt, daß der induzierte Effluxcarrier in enger Beziehung zu dem ursprünglichen Protein steht.

Porenartige und carrierartige Eigenschaften

Zu unserer Überraschung änderten die angewendeten Hg-Verbindungen nicht nur den Mechanismus des Transports, sondern zeigten außerdem - infolge Reaktion mit exofazialen Sulfhydryl-Gruppen - einen *trans*-Effekt auf die interne Bindungsstelle des Carriers. Dies war zum einen an einer unmeßbar geringen Transport-Affinität (Abb.28) zu erkennen und zum anderen an einer drastisch erniedrigten Substrat-Spezifität (Abb.29). Im Efflux-Zustand konnte die interne Bindungsstelle also nicht mehr über ihre Spezifität und Halbsättigungskonstante identifiziert werden, was mit einem klassischen carrier-vermittelten Mechanismus (Uniport) unvereinbar ist. Die Beobachtung, daß ATP und die Kationen Lysin und Ornithin keine - oder nur sehr schlechte - Efflux-Substrate waren, während die viel kleineren Ionen Cl^- , SO_4^{2-} und Na^+ akzeptiert wurden, kann als Hinweis gelten, daß die Selektion geeigneter Substrate vor allem durch Größenausschluß und elektrostatische Wechselwirkung erfolgte, was eher an eine Pore erinnert. Verglichen mit normalen Poren oder Kanälen war der Substratfluß jedoch verschwindend gering, und die Effluxraten übertrafen die Antiportraten nur bei sehr hohen internen Substratkonzentrationen (Abb.28). Weiterhin war die Aktivierungsenergie für den unidirektionalen Flux genauso hoch wie für den Gegentauch (Abb.31), was klar gegen eine einfache Diffusion durch wässrige, vom Carrierprotein gebildete Poren spricht.

Ein Nettoflux von Soluten könnte ebenso durch einen unspezifischen Antiport zustande kommen, wie angesichts der fehlenden Spezifität des Aspartat-Effluxcarriers vermutet werden mußte. Ein solches Konzept

würde, wie im Ergebnisteil erklärt, eine Stimulation des 'Efflux-Austausches' bei Gegenwart von externem Substrat voraussagen; stattdessen wurde eine Hemmung beobachtet (Abb.32). Diese *trans*-Inhibition durch externes Substrat deutet auf eine indirekte Beteiligung der (unbeladenen) externen Bindungsstelle auch am unidirektionalen Transport. Dafür sprechen auch die Befunde mit jenen Protein-modifizierenden Reagenzien, die den Antiport und auch den Efflux inhibierten, nämlich Diethylpyrocarbonat, EDC und Pyridoxalphosphat (s. 7.3). Alle drei reagierten nahe der externen Bindungsstelle des Carriers, wie in Substratschutz-Experimenten deutlich wurde (s. 9.3). Der Asp/Glu-Carrier behält also auch nach Modifizierung mit Hg-Verbindungen typische Merkmale des Antiportcarriers. Zu einer möglichen molekularen Erklärung der *trans*-Effekte siehe 10.

In diesem Zusammenhang mag von Interesse sein, daß eine SH-abhängige Änderung der Transport-Affinität auch bei anderen Transportsystemen gefunden wurde (Robillard & Konings 1982 und Referenzen darin). Außerdem ergaben Studien zur Nettoflux-Aktivität des Anionenaustauschers aus Erythrocyten (s. unten), daß diese Aktivität - anders als der Austausch - nicht mit Substrat gesättigt werden konnte und daß auch die Anionen-Selektivität verändert war (s. Zitate in Fröhlich 1988).

ANTIORT

Kein Transport

EFFLUX

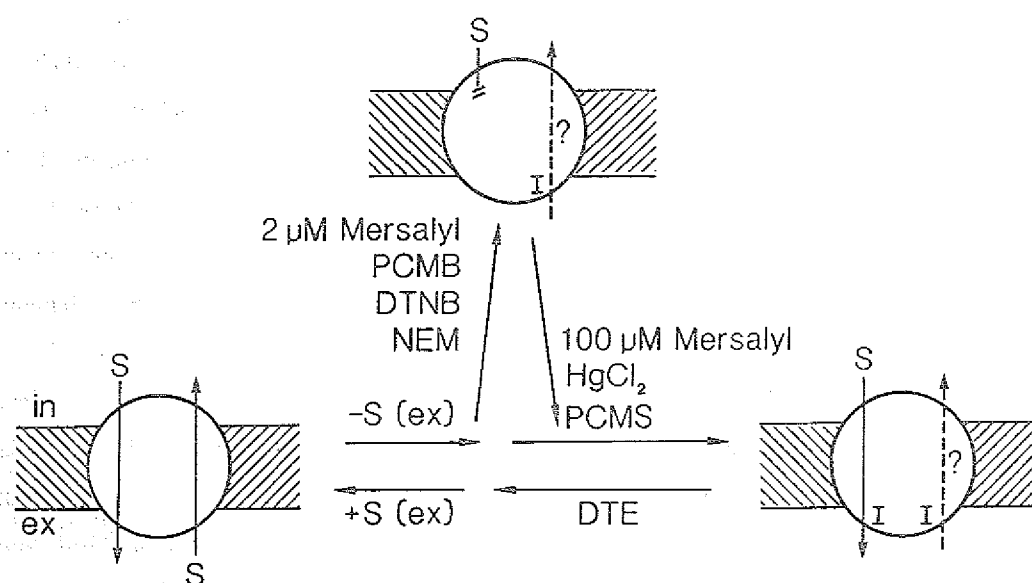


Abb.34: Funktionelles Modell der Antiport-Efflux-Interkonversion des Asp/Glu-Carriers. Der Antiporter katalysiert einen konzentrierten Gegentransport von internem und externem Substrat (S), der mit einem Konformationswechsel des strikt gekoppelten $[S_{in}\text{-Carrier-S}_{ex}]$ -Komplexes einhergeht (vgl. Abb.10). Nach Entfernung des externen Substrats führt eine Zugabe der angegebenen SH-Reagenzien (I) zu einer Lockerung der Kopplung von einwärts- und auswärtsgerichtetem Transport. Mindestens zwei Sulfhydryl-Gruppen des Carrierproteins müssen modifiziert werden, um entkoppelte Transportaktivität zu erreichen (Efflux). Im Efflux-Zustand zeigte der Carrier keinerlei Antiportaktivität mehr, wenn externes Substrat anwesend war. Jedoch könnte während des Effluxes auch die unbeladene externe Bindungsstelle an den Konformationsübergängen bei der Translokation beteiligt sein ('slippage', gestrichelter Pfeil). Einige SH-Reagenzien (DTNB, NEM, PCMB und geringe Konzentrationen von Mersalyl) sind nicht in der Lage, Efflux zu induzieren, hemmen aber - genau wie die effluxinduzierenden Hg-Verbindungen - den Antiport vollständig (kein Transport). Dieser blockierte Carrier kann, genau wie der unbehandelte Antiporter, durch HgCl₂, PCMS oder höhere Konzentrationen von Mersalyl in den Efflux-Zustand überführt werden. Der Effluxcarrier und auch das blockierte Intermediat (außer nach NEM-Modifizierung) werden zum anfänglichen Antiportzustand revertiert, wenn das gebundene Reagens durch DTE entfernt wird.

Antiport-Efflux-Interkonversion

Alle Hg-Verbindungen mit der Fähigkeit zur Effluxinduktion hemmten obligatorisch auch den Asp/Glu-Antiport. Dagegen induzierten einige Reagenzien nicht den Efflux (DTNB, NEM), sondern übten nur den inhibitorischen Effekt aus (Tab.VII). Weiterhin blockierten alle eingesetzten Hg-Verbindungen den Antiport bereits in einer Konzentration von 2 μM , induzierten aber - mit der Ausnahme von Hg^{2+} - den Efflux nur bei Anwendung in erheblich höherer Konzentration, wie vor allem für Mersalyl (100 μM) und PCMB (1 mM) beobachtet wurde. Demnach müssen mindestens zwei verschiedene Klassen von reaktiven Cysteinen modifiziert werden, um den Antiporter in einen unidirektionalen Effluxcarrier umzuwandeln. Dies ist in Abb.34 schematisch dargestellt. Wenn das Reagens nur Zugang zu einer Klasse hatte, resultierte eine Hemmung der Transportfunktion. Somit wurde ein Zustand zwischen dem Antiport- und dem Effluxcarrier identifiziert, der durch HgCl_2 , PCMS oder 100 μM Mersalyl ebenfalls in den Efflux-Zustand überführt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Interessanterweise wurde kürzlich eine solche Zweistufen-Modifizierung mit einem nicht transportierenden Intermediat auch für das Uncoupling-Protein vorgeschlagen, um den Maleimid-induzierten Übergang in einen Zustand höherer Leitfähigkeit zu erklären (Rial et al. 1989).

Die Entfernung der gebundenen Reagenzien (alle außer NEM) durch DTE versetzte das Transport-System stets zurück in den ursprünglichen Zustand, wobei sämtliche Antiport-Eigenschaften wiederhergestellt wurden (Abb.30, Tab.X). Folglich müssen die reaktiven Cysteine in einer hydrophilen Umgebung am von außen zugänglichen (cytosolischen) Teil des Carrierproteins lokalisiert sein, das ja orientiert rekonstituiert wurde (s. 3.). Anders als PCMS rief PCMB keine Effluxaktivität hervor (Tab.VII), vermutlich weil das hydrophobere PCMB schneller mit zusätzlichen, eventuell verborgeneren Cysteinen reagierte und dadurch die Effluxinduktion behinderte. Dazu sollte auch angemerkt werden, daß nach Vorbehandlung mit PCMB nur Hg^{2+} , nicht aber Mersalyl den Efflux in vollem Ausmaß stimulierte (nicht gezeigt); (siehe ebenso 9.3.3.2).

Die zweite, für die Effluxinduktion entscheidende SH-Gruppe wird nur in Abwesenheit von externem Substrat exponiert. Dagegen war die erste SH-Gruppe für alle getesteten Reagenzien auch in Gegenwart von Aspartat erreichbar (vgl. auch 9.3.3.2). Wenn das Substrat nach der Effluxinduktion zugefügt wurde, was prinzipiell eine eventuell noch vorhandene Antiportaktivität initiieren sollte, so war der Flux der Markierung von innen nach außen nicht stimuliert, sondern eindeutig reduziert (Abb.32). Demnach wird keine Antiportaktivität mehr katalysiert, sobald der Carrier einmal im Efflux-Zustand ist. Die Antiport-Efflux-Umwandlung muß also als ein vollständiges funktionelles Umschalten zwischen zwei ausschließlichen Transport-Modi verstanden werden. Die Beobachtung, daß externes Substrat sogar den induzierten Effluxcarrier inhibiert, legt nahe, daß die auswärts-gerichtete Bindungsstelle an den Konformationswechseln während des Effluxprozesses teilnimmt, auch wenn sie nicht mit Substrat besetzt ist ('slippage'). Diese Möglichkeit ist in Abb.34 mit einem gestrichelten Pfeil angedeutet. Folgt man diesem Modell, so könnte die Anwesenheit externen Substrats eine *trans*-Inhibition des 'slippage'-Schrittes bewirken, wodurch der Carrier seine Kompetenz zu unidirektionalem Transport mehr oder weniger vollständig verlieren würde. Solch eine Darstellung des Effluxcarriers erinnert an das Modell des Asp/Glu-Antiporters mit je einer Bindungsstelle auf beiden Seiten der Membran (vgl. Abb.10). Um aus dem Antiportcarrier einen Effluxcarrier zu machen, müssen die angewendeten Hg-Verbindungen zunächst einmal die einwärts- von der auswärts-gerichteten Komponente des Antiports entkoppeln. Nach der Theorie des Übergangszustands hängt der Grad der Kopplung vom Anstieg der Bindungsenergie im Übergangsintermediat während der Translokation ab (Krupka 1989). Folglich könnte jegliche Störung der intrinsischen Bindung zu entkoppeltem Transport und vermutlich auch zu porenartigen Eigenschaften führen (s. 10.3).

Konsequenzen für carrier-vermittelten Transport im allgemeinen

'Slippage' erklärt entkoppelten Antiport unter Annahme von Konformationsübergängen unbeladener - oder zumindest teilweise unbeladener - Transportproteine. Dieser Ausdruck wird seit frühen Untersuchungen des Anionenaustauschers aus Erythrocyten benutzt (Vestergaard-Bogind & Lassen 1974), der im physiologischen Zustand Netto-Fluxaktivität zeigt. Gründliche Studien dieser Aktivität führten jedoch zu neueren Modellen, 'transit' (Knauf et al. 1983), 'tunneling' (Fröhlich et al. 1983) oder 'diffusive flow' (Kaplan et al. 1983) genannt, die alle einen eher kanalartigen Transportweg beinhalteten. Die Hauptkomponente des Netto-Fluxes - neben 'slippage' - wurde als Transport ohne Konformationswechsel beschrieben ('tunneling'). Es müssen also zwei Arten des molekularen Entgleitens der Antiport-Kopplung unterschieden werden (Fröhlich 1988). Da carrier-vermittelter Transport auf einem Konformationswechsel beruht, mag das 'tunneling' als eine funktionelle Verbindung zwischen einem Carrier und einem Kanal angesehen werden. Trotz mehrerer Gemeinsamkeiten (s. oben) kann der Netto-Flux des Anionen-Carriers aber nicht in jeder Hinsicht mit der artifiziell induzierten Effluxaktivität des Asp/Glu-Carriers verglichen werden. Dies wird durch die reduzierte (aber dennoch hohe!) Aktivierungsenergie im Erythrocyten-System verdeutlicht, wo 70 kJ/mol (Fröhlich et al. 1983) anstelle von 96-136 kJ/mol (Brahm 1977) gemessen wurden. Außerdem war die *trans*-Inhibition durch externes Substrat weniger vollständig (Fröhlich et al. 1983), was jedoch durch die unterschiedlichen Modelle für die jeweilige Antiportaktivität erklärt werden kann: durch das "Ein-Bindungsstellen-Modell" des Anionenaustauschers (Passow 1986) bzw. das "Zwei-Bindungsstellen-Modell" des Asp/Glu-Carriers (s. 4.).

Auf der Basis unserer Daten muß für die Effluxaktivität ein Mechanismus ins Auge gefaßt werden, der Aspekte des Uniport/'slippage'-Modells einerseits und des Pore/Kanal-Modells andererseits kombiniert. Hohe Aktivierungsenergie und *trans*-Inhibition sind gute Argumente zugunsten von 'slippage'. Folgt man hingegen der alternativen Kanal-Hypothese, so könnte man argumentieren, daß das externe Substrat einen Konformationswechsel in einen Efflux-inkompetenten Zustand herbeiführe. Die hohe Aktivierungsenergie ließe sich erklären, wenn nach Änderung des Transportmechanismus zusätzliche Transferschritte des Substrats auf seinem Weg von der oberflächlichen Bindungsstelle zu Stellen im Kanal geschwindigkeitsbestimmend würden (vgl. Sluse-Goffart & Sluse 1986). Als Kompromiß kann man sich den Asp/Glu-Carrier mit einem schmalen Kanal vorstellen, der einen Teil des gesamten Transportweges überspannt. Dieser hybride Carrier-Kanal kann nur von Substraten penetriert werden, die von einer spezifischen Bindungsstelle erkannt werden, was dann einen carrierartigen 'gating'-Mechanismus auslöst. Eine ähnliche Sichtweise liegt dem 'gated-pore'-Modell des ADP/ATP-Carriers zugrunde (Klingenberg 1981, 1989), wobei man in unserem Fall allerdings zwei Bindungsstellen anzunehmen hätte (vgl. 4.). Die SH-Modifizierung des Carrierproteins könnte mit dem 'gating' des Kanals interferieren. Aufgrund der erniedrigten Spezifität und Affinität der internen Bindungsstelle würde so der protein-immanente Kanal transient für unterschiedliche Solute geöffnet. Die Öffnungswahrscheinlichkeit hängt dabei möglicherweise von der Rigidität der Kanalstruktur in der Membran ab. Eine Fluidisierung der Membran, hervorgerufen durch ein Schwellen der Liposomen (Abb.33) oder aber durch Einlagerung von Benzylalkohol in die Lipid-Doppelschicht (Tab.XI), stimulierte den Efflux - im Gegensatz zum Antiport - drastisch. Nichtsdestoweniger zeigte dieser Flux Eigenschaften eines carrier-vermittelten Transports, da die Kanalfunktion auch für den normalen katalytischen Antiport-Zyklus eine essentielle Voraussetzung ist.

Am Ende muß betont werden, daß - wie der Anionencarrier aus Erythrocyten und außerdem der nahe verwandte Carnitin-Carrier aus Mitochondrien (s. oben) - auch der unmodifizierte Asp/Glu-Carrier einen Netto-Flux katalysierte, wenngleich sehr langsam (Abb.21). Diese Grundefflux-Aktivität beruhte eindeutig auf

aktiv rekonstituiertem Asp/Glu-Carrierprotein, benötigte eine hohe Aktivierungsenergie und konnte durch Proteinase, DTNB (Abb. 21) und andere Inhibitoren gehemmt werden (nicht gezeigt). Obwohl dieser Netto-Flux vermutlich für die physiologische Funktion des Carriers nicht sehr bedeutungsvoll ist, so geben die hier beschriebenen Efflux-Eigenschaften doch einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Transportkatalyse durch biologische Membranen, zumal der Efflux einen gegenüber dem Antiport deutlich vereinfachten Modus des Transports darstellt. Die dadurch zutage tretenden neuen Aspekte sollen in der allgemeinen Diskussion auch vor einem theoretischen Hintergrund betrachtet werden (s. 10.3).

9. Strukturelle Aspekte der Transportfunktionen des Asp/Glu-Carriers: Modifizierung und Markierung funktioneller Gruppen der aktiven Bindungsstelle (Kurzberichte in Dierks & Krämer 1989b, 1989c, 1990)

9.1 Einleitung

Die chemische Modifizierung ist - neben der Mutagenese - die aussichtsreichste Methode, um strukturelle Aspekte von Membranproteinen zu erhellen, denn nur in Ausnahmefällen können spektroskopische Techniken oder gar Röntgen- bzw. Elektronenstreuung angewendet werden. Die Modifizierung allein kann immer nur zu einem funktionell-deskriptiven Modell und weniger zu der räumlichen Struktur des Proteins führen, wozu es der Kombination mit Sequenzierungs- und eventuell mit immunologischen Methoden bedürfte. Eine spezifische Modifizierung und Markierung essentieller Aminosäuren ist jedoch stets der erste Schritt, der es bereits bei einer Vielzahl von Membranproteinen ermöglichte, wesentlichen Gesichtspunkten der Proteinfunktion eine elementare strukturelle Grundlage zu geben. Derartige Struktur-Funktionskorrelationen wurden in den vorangegangenen Kapiteln (7., 8.) auch für den Asp/Glu- und den ADP/ATP-Carrier beschrieben. Durch Anwendung Cystein-modifizierender Reagenzien konnte ein grundlegender Funktionswechsel induziert werden, wobei die Antiportcarrier in unidirektionale Transportsysteme umgewandelt wurden. Um die strukturellen Aspekte dieser dualen Funktion besser verstehen zu können, wurde der Einfluß weiterer spezifischer Aminosäure-Reagenzien sowohl auf den physiologischen Antiportzustand als auch auf den SH-induzierten Effluxzustand des Asp/Glu-Carriers untersucht. Der Wirkungsmechanismus der verwendeten Reagenzien und die wechselseitige Interaktion von Reagens und Substrat mit dem Carrierprotein sollte Aufschluß geben über die funktionellen Aminosäure-Seitenketten vor allem am aktiven Bindungszentrum des Carriers. In der Absicht, das Protein selektiv zu markieren, wurden außerdem Experimente mit radioaktiven Reagenzien durchgeführt. Gewissermaßen als Grundlage für die erzielten Ergebnisse soll zunächst aber das Asp/Glu-Carrierprotein durch seine Aminosäure-Zusammensetzung charakterisiert werden.

9.2 Methoden

Reinigung des Asp/Glu-Carriers

Die Reinigung des Asp/Glu-Carriers über HPLC auf Hydroxylapatit wurde in 2.2 beschrieben. Zur Trennung von Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier durch HPLC auf einer Gelchromatographic-Säule (LKB TSK-G4000SW, 7.5 x 600 mm) wurden 500 µl G-25-Protein (ca. 400 µg Protein) oder 1 ml verschiedener Fraktionen der Hydroxylapatit-HPLC-Säule (≤ 50 µg Protein) injiziert. Die Elution erfolgte mit 0.4% $C_{12}E_8$ /500 mM Ammoniumacetat (pH 6.5) bei einem Fluß von 0.8 ml/min.

Elektrophorese und Elektrotransfer auf Membranen

Für analytische Zwecke (Proteinauftrag ≤ 1 µg), aber auch zur Kontrolle bei den Markierungsexperimenten (s. unten) wurde das automatisierte Phast System (Pharmacia) und die dazu erhältlichen SDS-Gele (10-15% Acrylamid) eingesetzt, wie in 7.2 beschrieben. Für die Aminosäure-Analyse und die Proteinsequenzierung sowie für die Markierungsexperimente wurden präparative Gele mit 10% Acrylamid/ 0.3% Bisacrylamid (10% T/ 3% C), gegossen (55 mm Trennstrecke, 1.5 mm dick). Das komplette Gelsystem wurde von Schagger & Von Jagow

(1987) beschrieben, wobei teilweise Glycerin durch 6 M Harnstoff ersetzt wurde. Die Proteinproben, d. h. Proteoliposomen oder gemischte Mizellen mit hohen Salzkonzentrationen, wurden gewöhnlich mit Trichlor-essigsäure/Desoxycholat ausgefällt (s. 7.2). Kopräzipitiertes Lipid und Detergens wurde mit Ether/Tris bzw. Aceton/Tris (s. 7.2) oder, wo angegeben, mit Hexan/Isopropanol (3:2) (Rodríguez-Vico et al. 1989) extrahiert. Auf die in Abb. 39 A und 40 D gezeigten Gele wurden Proteoliposomen direkt in Probenpuffer (Schägger & Von Jagow 1987) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung (10°C) in einer LKB 2050 Midget-Kammer bei 30 mA (konstant). Zur Silberfärbung der analytischen Gele siehe 7.2. Alle anderen Gele wurden nach der Vorschrift von Schägger & Von Jagow (1987) mit Coomassie Blue gefärbt.

Zum Elektrotransfer der Proteinbanden wurde ein halbtrockenes Verfahren angewendet. Das unfixierte, in Transferpuffer (10 mM 3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure/10% Methanol, pH 11) getauchte Gel wurde auf eine mit Methanol (10 Min) und dann mit Transferpuffer vorbehandelte PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) luftblasenfrei aufgelegt. Auf Kathoden- und Anodenseite dieses Sandwich befanden sich je drei Lagen mit Transferpuffer getränktes Filterpapier (Whatman 3MM). Der Elektrotransfer erfolgte zwischen den Graphitelektroden eines LKB Multiphor II Nova Blot-Systems für 30-50 Min bei 1.3-1.7 mA/cm². Nach Färbung von Membran und Gel in 0.1% Amidoschwarz (5 Min) und Entfärbung mit 10% Essigsäure/25% Methanol zeigte sich, daß die Proteinbanden nahezu vollständig (z. T. aber bis aufs Filterpapier!) übertragen worden waren.

Aminosäure-Analyse

Die mit Amidoschwarz gefärbten Proteinbanden von 6-10 Spuren (Proteinmengen in 9.3.1.3) wurden aus der PVDF-Membran mit einem sauberen Skalpell knapp ausgeschnitten. Sie wurden in ausgeglühte Hydrolyse-Röhrchen überführt und mit 6 N HCl/5% Thioglykolsäure benetzt. Die Röhrchen wurden zusammen mit 700 µl 6 N HCl in ein Vakuumgefäß mit Teflon-Dichtung gegeben. Nach Evakuierung erfolgte die Hydrolyse in der Gasphase bei 110°C für 24-26 h. Das Hydrolysat wurde mit 3 x 200 µl 0.1 N HCl/30% Methanol extrahiert (Tous et al. 1989) und in einem Speed-Vac-Konzentrator getrocknet. Die Aminosäuren wurden auf einer Kationenaustauscher-HPLC-Säule, gefüllt mit MCI-Gel CK 10F (Mitsubishi, Tokyo), mit Hilfe eines Aminosäure-Analysator (Biotronik LC 5001) gemäß der Vorschrift des Herstellers getrennt und nach "Derivatisierung" mit Ninhydrin photometrisch bei 570 nm detektiert (Prolin bei 440 nm). Die Berechnung der Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins aus den gefundenen Mengen der einzelnen Aminosäuren wurde durch ein Rechnerprogramm erleichtert, das außerdem eine statistische Auswertung ermöglichte.

Chemische Modifizierung des Carrierproteins

Die in Tab. XIII aufgelisteten Modifizierungsreagenzien wurden mit Ausnahme von DTNB, PCMB, PCMS, HgCl₂ und Mersalyl für jedes Experiment frisch angesetzt. Als Lösungsmittel dienten absoluter Ethanol (DEPC, NBD-Cl), 50% Ethanol (SITS, DIDS), Acetonitril (BPAB), Dimethylsulfoxid (Fluoresceinisothiocyanat), 50 mM Phosphatpuffer (pH 7) (DTNB), der jeweils verwendete Gelfiltrationspuffer (100 mM MOPS, 50-80 mM Sucrose, pH 6.5) (PLP) oder Wasser. Die Modifizierung des Asp/Glu-Carriers erfolgte in fast allen Fällen durch Inkubation von rekonstituiertem G-25-Protein mit diesen Reagenzien. Die Wirkung auf den korekonstituierten ADP/ATP-Carrier wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden Proteoliposomen mit den internen Substraten Aspartat (16 mM) - bei Substratschutz-Experimenten 8 mM Aspartat/8 mM Glutamat - und gegebenenfalls auch ATP (10 mM) hergestellt, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben wurde. Für die Experimente mit Woodward's Reagens K wurde das verwendete G-25-Protein in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.5) statt in

Ammoniumacetat präpariert, um zu verhindern, daß möglicherweise bis zum Inkubationsschritt verschlepptes Acetat die Wirkung dieses Carboxylreagenzes blockiert.

Vor der Inkubation mit den einzelnen Reagenzien wurde das externe Substrat stets durch Gelfiltration der Liposomen auf Sephadex G-75 abgetrennt (s. 2.3). In den Experimenten zum Substratschutz wurde das Substrat (bzw. der Protektor) in gewünschter Konzentration vor dem Reagens zugefügt. Das gilt auch für die zur Modifizierung mit EDC benötigten Carbonsäuren (s. 9.3.3.1.2) sowie für die blockierenden Aminosäuren und Nukleophile. Die Reagenzien wurden stets aus einer ca. 50-fach konzentrierten Stammlösung zugesetzt, Kontrollen erhielten das entsprechende Lösungsmittel (Endkonzentration $\leq 2.5\%$). In Konkurrenzexperimenten wurde das zweite Reagens direkt nach kurzer Vorinkubation mit dem ersten Reagens zugegeben. Die genauen Bedingungen sind in den jeweiligen Legenden beschrieben. Die Modifizierungsreaktionen wurden meist durch Zusatz der entsprechenden Aminosäuren oder durch Nukleophile, spätestens aber mit der Abtrennung der Reagenzien durch eine zweite Gelfiltration gestoppt. Die Revertierung der SH-Modifizierung durch DTE (vgl. 7., 8.) wurde vor (Tab.XV, XVII) oder nach der Gelfiltration (Tab.XIX) vorgenommen.

Um den Einfluß der Reagenzien auf die Effluxaktivität zu testen, mußten die Proteoliposomen mit [^{14}C]Aspartat (bzw. [^{14}C]ATP) beladen werden (s. 7.2), bevor dann die Inkubation in Gegenwart der Radioaktivität (etwa $0.5\ \mu\text{M}$ Aspartat bzw. ATP) erfolgen konnte. In entsprechenden Kontrollen wurde die Wirkung auf die Antiportaktivität in dem methodisch ähnlichen Rücktauschverfahren bestimmt (vgl. 7.2). Die Transportmessungen (Vortausch, Rücktausch und Efflux) wurden gewöhnlich nach Abtrennung aller Reagenzien, d. h. nach der zweiten Gelfiltration, durchgeführt, wie bereits unter 2.3 bzw. 7.2 (Efflux) beschrieben wurde. Um die volle Hemmwirkung von PLP zu bestimmen (Abb.35), fanden die Transportmessungen in Gegenwart des Reagenzes statt (s. 9.3.3.1.1). Die Auswertung erfolgte stets mit Hilfe eines Computerprogramms, wie im allgemeinen Methodenteil beschrieben (s. auch 7.2).

Radioaktive Markierung der Carrierproteine

Die EDC-vermittelte Modifizierung mit [^{14}C]Succinat entsprach dem gerade erläuterten Vorgehen. Genauere Angaben finden sich in 9.3.3.1.2. In dem in Abb.40 D gezeigten Experiment wurde der Markierungsschritt nach einer Vorbehandlung mit EDC und unmarkiertem Succinat durchgeführt. Zwischen beiden Schritten erfolgte eine Gelfiltration. Die Markierung mit [^{14}C]DEPC wurde zunächst mit Proteoliposomen, später aber mit solubilisiertem G-25-Protein durchgeführt (s. 9.3.3.3.1). Zur Abtrennung von überschüssigem DEPC wurde dann eine Gelfiltration der gemischten Mizellen auf Sephadex G-25 herangezogen (PD10-Säulen, Pharmacia).

Der Einbau der Radioaktivität in die Proteoliposomen (oder Protein/Detergens-Mizellen) wurde durch fraktionierte Elution von der Gelfiltrationssäule kontrolliert und bilanziert. Die Markierung im Protein konnte in den meisten Fällen bei der Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese durch Ausfällung des Proteins und Extraktion des Lipids (s. oben) quantifiziert werden. Je nach Gelsystem (s. oben) wurden $< 1\ \mu\text{g}$ oder aber $3\text{--}20\ \mu\text{g}$ markiertes Protein elektrophoretisch aufgetrennt. Die gefärbten Gele wurden zur fluorographischen Detektion der Radioaktivität mit 5% Glycerin (15 Min) und ENHANCER (NEN Du Pont) (1 h) oder direkt, d. h. ohne Glycerin, mit AMPLIFY (Amersham) (30 Min) vorschriftsgemäß vorbehandelt. Danach wurden die Gele auf Filterpapier im Vakuum getrocknet (70°C , 90 Min). Im Falle der analytischen Gele geschah dies auf dem thermostatisierten Trennbett des Phast Systems (ohne Vakuum). Die fluorographische Belichtung eines nicht vorgeblitzten Röntgenfilms (Fuji RX) erfolgte während einer Exposition für 1-6 Wochen bei -70°C .

Proteinbestimmung und Transportmessungen wurden unter 2.3, die *Western-Analyse* unter 7.2 beschrieben.

9.3 Ergebnisse und Diskussion

9.3.1 Aminosäure-Zusammensetzung des Asp/Glu-Carriers

9.3.1.1 Identifizierung des Asp/Glu-Carrierproteins

Eine Methode, den Asp/Glu-Carrier in funktionell aktivem Zustand über HPLC auf Hydroxylapatit zu reinigen, war bereits zuvor von Krämer et al. (1986) beschrieben worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf einer verbesserten Hydroxylapatit-Säule jeder der einzelnen Elutionsschritte optimiert (s. 9.2). Nach einem Phosphat- und einem Cardiolipingradienten eluierte die Hauptaktivität des Asp/Glu-Carriers während eines Ammoniumacetat-Gradientens, wie bereits bei der Identifizierung des Aspartat-Effluxcarriers unter 7. näher ausgeführt wurde (Tab.IX). Die Fraktionen mit höchster Asp/Glu-Carrieraktivität enthielten neben einem 68 kDa-Protein (s. Abb.27 A) zusätzlich eine 30 kDa-Bande, die sich durch eine sensitive Silberfärbung der SDS-Gele nachweisen ließ (s. 9.2). Obwohl in diesen Fraktionen nahezu keine ADP/ATP-Carrieraktivität festgestellt werden konnte, identifizierten Antikörper die 30 kDa-Bande als ADP/ATP-Carrier. Durch den kombinierten Einsatz proteolytischer und immunologischer Methoden (Abb.27) konnte der Proteinase-empfindliche Asp/Glu-Transport dem 68 kDa-Protein zugeschrieben werden (s. 7.3.4). Dieses Ergebnis wurde auch durch weitere Protein-Analytik auf einer Gelfiltrations-HPLC-Säule (s. 9.2) bestätigt, wobei die eluierte Asp/Glu-Carrieraktivität recht gut mit der Stärke einer Proteinbande bei ca. 70 kDa im SDS-Gel korrelierte (nicht gezeigt).

9.3.1.2 Aminosäure-Analyse

Die ideale Basis für strukturelle Untersuchungen eines Proteins ist die Kenntnis seiner Aminosäure-Sequenz. Bevor man versuchen konnte, diese auf molekularbiologischem Weg über die cDNA-Sequenz zu ermitteln, mußte zumindest ein kurzes Stück des Proteins ansequenziert werden. Die vielen vergeblichen Versuche, das über präparative Elektrophorese gereinigte 68 kDa-Protein in einem Liquid Pulse Sequencer (Applied Biosystems 477A) einem Edman-Abbau zu unterziehen, führten jedoch lediglich zu der Feststellung, daß der N-Terminus blockiert sein muß. Eine Behandlung zur Deformylierung mit Acetylchlorid/Methanol nach der Vorschrift von Haiker (1988) änderte daran nichts. Demnach dürfte, wie aufgrund der Befunde bei anderen mitochondrialen Carriern zu erwarten war, eine N-Acetylierung vorliegen. Diese läßt sich jedoch bisher mit keiner Methode beseitigen, ohne daß dabei gleichzeitig auch die anderen Peptidbindungen angegriffen würden.

Die Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung des 68 kDa-Proteins stützte sich auf eine neu entwickelte Methode (Tous et al. 1989), die es ermöglichte, auf PVDF-Membranen transferierte Proteinproben zu hydrolysieren (s. 9.2). Es mußten ca. 125 µg Asp/Glu-Carrier (ca. 1.8 nmol) eingesetzt werden, da laut Literaturangaben nur ca. 20% des Proteins nach Elektrotransfer und Hydrolyse als freie Aminosäuren wiedergefunden werden. Das Proteinhydrolysat wurde von der Membran extrahiert und getrocknet. Nach Trennung mit Hilfe eines Aminosäure-Analysators wurden die Aminosäuren als Ninhydrin-"Derivate" detektiert. Es ergaben sich Mengen zwischen 1.3 nmol (Methionin) und 7.4 nmol (Glycin). Wie Stöchiometrie-Berechnungen zeigten, mußte von etwa 10-70 Resten einer jeden Aminosäure ausgegangen werden, um auf ein Molekulargewicht von ca. 70000 zu kommen (Tab.XII). Der Vergleich mit der eingesetzten Proteinmenge belegt, daß nicht 20%, sondern weniger als 10% im Hydrolysat zurückgewonnen wurden. Dies könnte auf einen verringerten Proteintransfer aus den überladenen Gelen auf die Membran zurückzuführen sein.

Die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode sollte sich erweisen, indem mehrfach die Aminosäure-Zusammensetzung des auf denselben Gelen vorhandenen ADP/ATP-Carriers (30 kDa-Bande) bestimmt und mit der tatsächlichen Zusammensetzung verglichen wurde (Tab.XII). Sieht man von den stets zu beobachtenden Unterbestimmungen von Isoleucin und Valin und der Unsicherheit beim Prolin ab, so zeigte sich doch eine so gute Übereinstimmung zwischen theoretischen und gemessenen Werten, daß eine klare Identifizierung des ADP/ATP-Carriers möglich war. Hinsichtlich der verzweigtkettigen Aminosäuren brachte eine 48- bzw. 72-stündige Hydrolyse keine besseren Ergebnisse. Daher wurde für Isoleucin und Valin aus dem Verhältnis von theoretischem und gemessenem Wert im Falle des ADP/ATP-Carriers ein Korrekturfaktor ermittelt, der bei den Angaben für den Asp/Glu-Carrier (68 kDa-Bande) berücksichtigt wurde (Tab.XII). Aus den aufgelisteten Werten ergibt sich ein 70 kDa-Protein mit ca. 633 Aminosäuren (ohne Cystein und Tryptophan). Darin enthalten sind relativ viele geladene Reste: 14(-16) Histidine, 30-33 Lysine, 34-38 Arginine, also ca. 82 positive Ladungen, sowie 54-58 Aspartate/Asparagine und 61-66 Glutamate/Glutamine. Dementsprechend resultiert aus der Gesamtzusammensetzung ein leicht negativer Hydropathie-Index von -0.151 (GRAVY-Score, nach Kyte & Doolittle 1982), ein für Membranproteine recht tiefer Wert. Aber auch der ADP/ATP-Carrier weist einen Index um null auf (+0.052). Damit liegen beide Carrier im Überlappungsbereich der gewöhnlich für Membranproteine (-0.22 bis +1.4) und lösliche Proteine (-0.9 bis +0.2) gefundenen Werte.

9.3.2 Bindungsstellen- und Translokationsinhibitoren des Asp/Glu-Carriers:

Klassifizierung nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten

Die in diesem Kapitel beschriebenen Modifizierungsreagenzien ließen sich aufgrund ihres Einflusses auf die zwei verschiedenen Transportfunktionen des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers in drei verschiedene Klassen einteilen (Tab.XIII). Alle Reagenzien zeigten einen mehr oder weniger vollständigen Hemmeffekt auf die Antiportfunktion. Neben den Verbindungen, die ausschließlich diese Wirkung ausübten (Klasse A), gab es auch solche, die zusätzlich die Effluxfunktion des Carriers beeinträchtigten (Klasse B), nämlich Pyridoxalphosphat (PLP), EDC und Diethylpyrocarbonat (DEPC). Ihre Anwendung interferierte mit der Wirksamkeit der Reagenzien aus Klasse C, den Effluxinduktoren, deren gravierender Einfluß auf den Transportmechanismus in Kapitel 7 und 8 ausführlich beschrieben wurde. Die Zuordnung von 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonat (DIDS) und 4-Bromphenacylbromid (BPAB) zu Klasse C ließ sich nicht eindeutig klären, wie unten erläutert wird.

Eine strukturelle bzw. topologische Einteilung der aufgelisteten Reagenzien ist den zwei letzten Spalten aus Tab.XIII zu entnehmen. Die genannten Wirkungen beruhten auf der kovalenten Modifizierung bestimmter Aminosäure-Reste des Carrierproteins. Diese Aminosäuren chemisch zu identifizieren, war aufgrund von Literaturbefunden sowie eigener experimenteller Daten zumeist mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich (s. 9.3.3). Von besonderem Interesse waren jene Reagenzien, deren Wirkungen durch die Gegenwart der Substrate Aspartat und Glutamat unterdrückt wurden, was auf eine Reaktion an der aktiven Bindungsstelle schließen ließ. Zu diesen Bindungsstellen-Inhibitoren gehörten alle Klasse B-Reagenzien, die Hg-Verbindungen aus Klasse C - allerdings nur hinsichtlich ihrer effluxinduzierenden Wirkung (s. 9.3.3.2) - sowie aus Klasse A 4-Acetamido-4'-isothiocyanostilben-2,2'-disulfonat (SITS), 4-Chlor-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) und wahrscheinlich DTNB. Inwieweit sich aus den Wirkungen dieser Lysin-, Cystein- und Histidin-Reagenzien ein Bild der exofazialen Bindungsstelle des Carriers ableiten läßt, soll nachfolgend ausführlich dargelegt und diskutiert werden (s. 9.3.3).

Tab.XII: Aminosäurezusammensetzung des Asp/Glu- und des ADP/ATP-Carrierproteins. Nach Hydrolyse membran-fixierter Proteinproben wurde eine Aminosäure-Analyse durchgeführt (s. 9.2). Im Falle des ADP/ATP-Carriers (30 kDa-Bande) konnte auch Tryptophan quantifiziert werden. Die gemessene und die aus der Sequenz bekannte Aminosäure-Zusammensetzung sind einander gegenübergestellt. Im Falle der 68 kDa-Bande (Asp/Glu-Carrier) wurde bei der Berechnung ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa vorausgesetzt. Die Anzahl der Aminosäurereste ist mit der bei mehrfacher, unabhängiger Auswertung gefundenen Schwankungsbreite angegeben.

Aminosäure	ADP/ATP-Carrier		Asp/Glu-Carrier	
	Mol% (gemessen)	Reste (gemessen/theoretisch)	Mol%	Reste
Asx	8.7	24 / 23	8.8	54 - 58
Glx	7.3	20 / 20	10.0	61 - 66
His	1.8	5 / 3	2.4	14(- 16)
Lys	7.5	21 / 23	4.9	30 - 33
Arg	6.2	17 / 17	5.7	34 - 38
Thr	4.7	13 / 12	5.4	33 - 36
Ser	4.9	14 / 14	5.6	32 - 37
Tyr	4.3	12 / 12	3.6	22 - 24
Phe	6.6	19 / 21	4.4	27 - 29
Gly	10.6	30 / 30	10.5	64 - 70
Ala	11.1	31 / 33	8.7	53 - 58
Leu	8.1	23 / 22	8.5	51 - 56
Ile	4.3	12 / 19	7.0 ^a	43 - 46 ^a
Val	6.5	18 / 24	7.8 ^a	48 - 52 ^a
Met	2.5	7 / 7	1.8	11 - 12
Pro	4.9	13 / 8	4.7	28(- 31)
Trp	1.2	4 / 5	n.b. ^b	n.b.
Summe	100 (ohne Trp)	283 / 293	99.8	605 - 662
Mol.gewicht (Da)	31307 / 32255 (ohne Cys)		ca. 69000 (ohne Cys und Trp)	

^a nach Korrektur (s. Text) ^b nicht gefunden

Tab.XIII: Klassifizierung der beschriebenen Reagenzien nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten. Alle Angaben beziehen sich auf den rekonstituierten Asp/Glu-Carrier. Proteoliposomen wurden bei pH 6.5 (EDC: pH 6.2) und in Abwesenheit von externem Substrat (Pyridoxalphosphat: 50 μ M Aspartat) mit den verschiedenen Reagenzien für unterschiedliche Zeiten inkubiert, wie in 9.3.3 beschrieben. Zur Einteilung in die Klassen A bis C sowie zur Definition des Bindungsstelleninhibitors siehe Text.

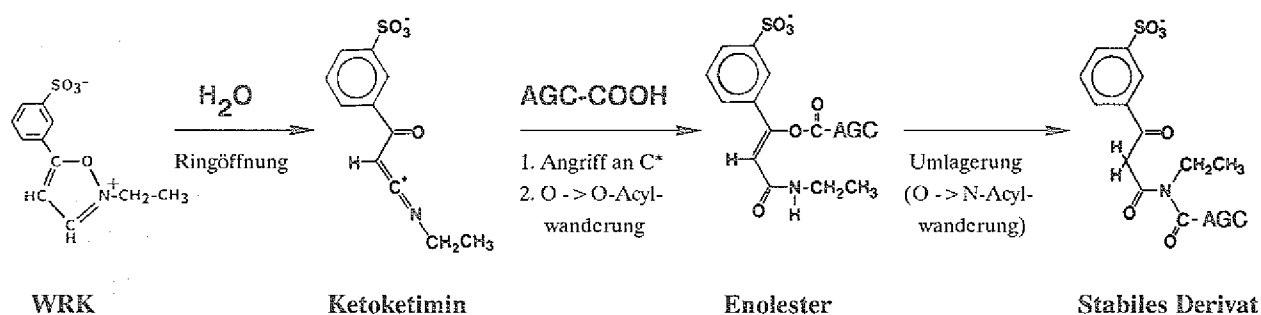
Klasse	Reagens	IC ₅₀		Effluxinduktion (Konzentration)	Bindungsstellen- inhibitor	modifizierter Rest
		Antiport	Efflux			
A:	DTNB	200 μ M	-	nein	ja	Cys
	NBD-Cl	50 μ M	-	nein	ja	Cys
	PCMB	2 μ M	-	nein	nein	Cys
	N-Ethylmaleimid	1 mM	-	nein	nein	Cys
	Woodward's Reagents K	220 μ M	-	nein	nein	Glu (Asp)
	SITS	300 μ M	-	nein	ja ^a	Lys
	Fluoresceinisothiocyanat	80 μ M	-	n.b. ^b	n.b.	Lys
B:	Pyridoxalphosphat	0.9 mM	> 1 mM	nein	ja	Lys
	EDC/50 mM Acetat	0.5 mM	4 mM	nein	ja	Lys
	Diethylpyrocarbonat	20 μ M	80 μ M	nein	ja	His / Lys
C:	HgCl ₂	2 μ M	-	ja (2 μ M)	ja ^a	Cys
	Mersalyl	2 μ M	-	ja (100 μ M)	ja ^a	Cys
	PCMS	2 μ M	-	ja (40 μ M)	ja ^a	Cys
	(DIDS)	8 μ M	100 μ M	schwach (50 μ M)	ja ^a (?)	Lys
	(Bromphenacylbromid)	3 μ M	n.b.	schwach (50 μ M)	ja (?)	His (?)

^a zusätzliche Wirkorte ^b nicht bestimmt

Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Bindungsstellen-Reagenzien. Die anderen, nicht dort wirkenden Hemmstoffe, auch als Translokationsinhibitoren bezeichnet (Falke & Chan 1986b), seien kurz aufgezählt. Darunter fallen auch solche, die mehrere Wirkorte haben. Die bereits unter 7. besprochenen SH-Reagenzien HgCl_2 , Mersalyl, PCMB, PCMS und NEM hemmten den Antiport sehr effektiv und nahezu unabhängig von der Anwesenheit von Aspartat. Folglich muß mindestens ein weiteres essentielles Cystein existieren (vgl. 8.4). Ebenso ließ die Analyse der Inaktivierung durch die Isothiocyanate DIDS, SITS und Fluorescein-5-isothiocyanat auf mindestens ein weiteres Lysin schließen. Auf die meisten dieser Reagenzien wird unten genauer eingegangen, da sie eingesetzt wurden, um eine Differenzierung zu dem Lysin bzw. Cystein an der aktiven Bindungsstelle vornehmen zu können. Ein reiner Translokationsinhibitor war das sehr spezifische Carboxylreagens (mit Präferenz für Glutamat) N-Ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat (Woodwards Reagens K, WRK). Es inaktivierte die Antiportfunktion des Asp/Glu-Carriers bei pH 6.5 (10 Min Inkubation) mit einer IC_{50} von 220 μM . Das nachstehende Reaktionsschema (Gl. 9.1) beruht auf den Arbeiten von Woodward (1961), Woodward & Olofson (1966), Dunn et al. (1974) sowie Jennings & Andersen (1987).

Wegen ihrer geringen Effizienz wurden das Arginin-Reagens Phenylglyoxal (IC_{50} ca. 10 mM) und das Lysin-Reagens Phenylisothiocyanat (IC_{50} ca. 3 mM) nicht weiter untersucht.

Gl. 9.1:



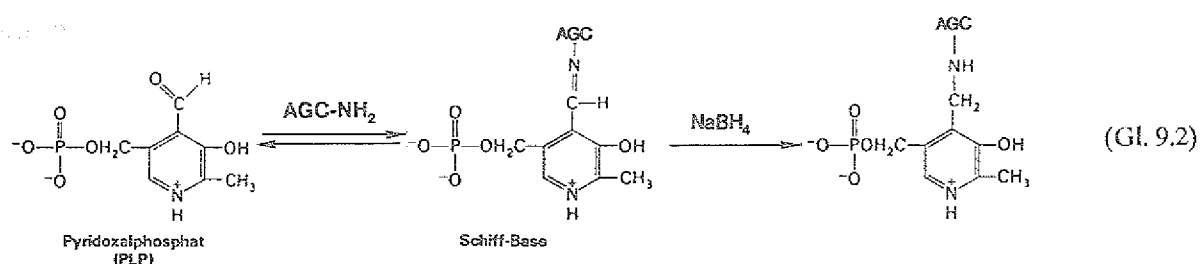
9.3.3 Funktionelle Gruppen an der exofazialen Bindungsstelle

Die negative Ladung der Substrate des Asp/Glu-Carriers lassen in den aktiven Bindungszentren basische Gruppen vermuten. Die in Tab.XII aufgelistete Aminosäure-Zusammensetzung zeigt, daß dieses Protein eine Vielzahl basischer Seitenketten enthält. Positive Ladungen sind in Membranproteinen häufig auch in den Grenzbereichen von transmembranen Helices anzutreffen (Dalbey 1990), so auch beim ADP/ATP-Carrier (Klingenberg 1989). Dies könnte für den Transportvorgang von Bedeutung sein, nimmt man an, daß die Ladungen den Eingang zu dem postulierten Kanal des Carriers auskleiden, wodurch dessen Affinität zum Substrat erhöht würde. Vor allem Lysin- und Histidin-modifizierende Reagenzien führten zu einer Hemmung der Asp/Glu-Carriers. In vielen Fällen waren sowohl die Antiport- als auch die Effluxaktivität betroffen (Tab.XIII). Dies impliziert bereits, daß die unter 8. funktionell charakterisierten Cysteine zu diesen basischen Aminosäuren in einer strukturellen Beziehung stehen (s. 9.3.3.2). Ob die modifizierten Gruppen der aktiven Bindungsstelle des Carriers zuzuordnen waren, ließ sich aus Substratschutz-Experimenten und aus der Konkurrenz verschiedener Bindungsstelleninhibitoren schließen. Leider war es aus methodischen Gründen nicht möglich, Substratbindung an den modifizierten und dadurch inaktivierten Carrier zu messen.

9.3.3.1 Modifizierung von Lysin

9.3.3.1.1 Modifizierung mit Pyridoxalphosphat

Pyridoxalphosphat (PLP) ist ein klassisches und hoch-spezifisches Lysin-Reagens (Churchich 1965, Rippa et al. 1967). In millimolaren Konzentrationen inhibierte es sehr effektiv den Asp/Glu- und auch den ADP/ATP-Carrier (Abb.25), wie bereits zuvor beschrieben wurde (Krämer 1984 bzw. Bogner et al. 1986). Da PLP in allen aufgeklärten Fällen mit ϵ -Aminogruppen von Lysinen reagierte (s. Zitate in Hartman & Norton 1977), konnte es als eine Art Referenz-Reagens dienen. Alle hier gezeigten Ergebnisse beruhen auf der reversiblen Kondensationsreaktion von PLP mit Lysin-Seitenketten zu Schiff'schen Basen (Anderson et al. 1966, Rippa et al. 1967):



Das Kondensationsprodukt liegt - je nach pH-Wert - protoniert vor und kann deshalb unter Addition von H₂O zurückreagieren. Auf die dargestellte Möglichkeit, die Schiff'sche Base durch Reduktion mit NaBH₄ in ein stabiles Modifizierungsprodukt zu überführen, wurde verzichtet. Die Reversibilität der Reaktion (und Wirkung) von PLP, auf deren Vorteil auch Cabantchik et al. (1975) hinwiesen, wurde ausgenutzt, um in funktionellen Messungen zu untersuchen, inwieweit durch Modifizierung von Lysinen die Wechselwirkung anderer Reagenzien mit dem Protein eingeschränkt wurde. Daraus ließen sich Schlußfolgerungen hinsichtlich Art und Lage der beteiligten funktionellen Gruppen ziehen. Bei hohen PLP-Konzentrationen war die Reversibilität allerdings eingeschränkt. So verblieb nach Inkubation (5-10 Min) der Proteoliposomen mit 20 mM PLP und anschließender Gelfiltration zur Entfernung des Reagenzes eine Hemmung von ca. 50%. Ähnliches wurde auch mit anderen Proteinen festgestellt (vgl. Piskiewicz & Smith 1971). Die revertierbare Transportaktivität reichte aber in jedem Fall aus, um die Wirkung eines zweiten, in Anwesenheit von PLP eingesetzten Reagenzes genau quantifizieren zu können. Bevor diese Experimente im Zusammenhang mit den jeweiligen Reagenzien beschrieben werden, soll der Bindungsstelleninhibitor PLP und seine Wirkung auf den Asp/Glu-Carrier vorgestellt werden.

Die vollständige Hemmwirkung des PLP wurde bestimmt, indem die Transportmessungen ohne vorherige Abtrennung des Reagenzes durchgeführt wurden (vgl. Rippa et al. 1967), also unter vergleichbaren Bedingungen wie bei den oben in ihrer Konzeption geschilderten Wettbewerbsversuchen. Der Asp/Glu-Antiport wurde bei pH 6.5 mit einer IC₅₀ von 0.9 mM gehemmt (in Gegenwart von 50 μ M Aspartat). PLP erwies sich außerdem als der effektivste Inhibitor der Aspartat-Effluxaktivität. 20 mM PLP hemmte den Efflux (wie auch den Antiport) zu 95% (Abb.25). Die genaueren Umstände dieser Wirkung werden in 9.3.3.2.1 beschrieben. Die gleiche Effizienz bewies PLP jedoch auch bezüglich der beiden Transportaktivitäten des ADP/ATP-Carriers (Abb.25). Ein weiteres wichtiges Kriterium war der Schutz vor Inaktivierung durch die Anwesenheit von Substrat. Wie Abb.35 zeigt, verhinderten sättigende Aspartatkonzentrationen (≥ 300 μ M) die Wirkung von 2.5 mM PLP so gut wie vollständig. Aus diesem kompetitiven Verhalten des reversibel bindenden PLP und Aspartat ist auf eine Interaktion des Inhibitors an der Substrat-Bindungsstelle zu schließen. Der apparente K_i für PLP betrug etwa 0.4 mM. Eine Reaktion von PLP mit der α -Aminogruppe von Aspartat (pK 9.8) dürfte bei pH 6.5 kaum möglich sein und kann schon allein wegen des Überschusses an PLP für den Schutzeffekt nicht verantwortlich sein.

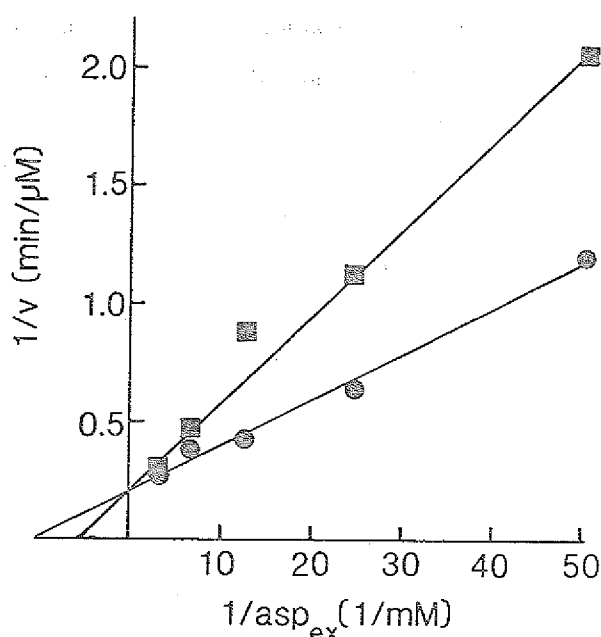


Abb.35: Kompetitive Interaktion von Pyridoxalphosphat und Aspartat mit dem Asp/Glu-Carrier. Die Asp/Asp-Antiportaktivität (16 mM intern/20-320 μM extern) wurde in Ab- (●) und Anwesenheit (■) von 2.5 mM PLP bestimmt (Vortauschmessung). Die Ergebnisse sind in einem Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Für Aspartat wurde ein K_m -Wert von $85 \pm 19 \mu\text{M}$, für PLP ein K_i -Wert von etwa 0.4 mM ermittelt.

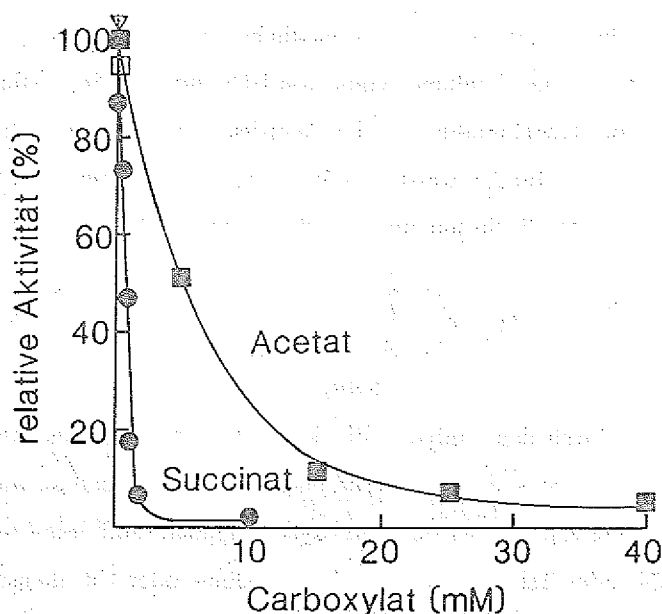
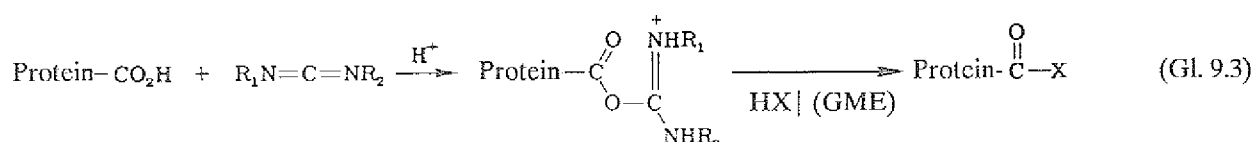


Abb.36: Abhängigkeit der Inaktivierung durch EDC von Carbonsäuren. Proteoliposomen wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen an Acetat (■, 0 - 40 mM) oder Succinat (●, 0 - 10 mM) mit 20 bzw. 10 mM EDC für 6 Min inkubiert. Nach Abtrennung überschüssiger Reagenzien durch Gelfiltration wurde die restliche Austauschaktivität des Asp/Glu-Carriers gemessen. In Abwesenheit von Acetat oder Succinat zeigte EDC keine Wirkung; die gemessenen Transportaktivitäten unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollen ohne EDC (□, 40 mM Acetat; ▽, 0 mM Acetat). Da die Daten aus zwei verschiedenen Experimenten (mit Acetat oder Succinat) stammen, wurden sie auf die Aktivität in Abwesenheit der jeweiligen Carbonsäure normiert.

9.3.3.1.2 Carbodiimid-katalysierte Acylierung

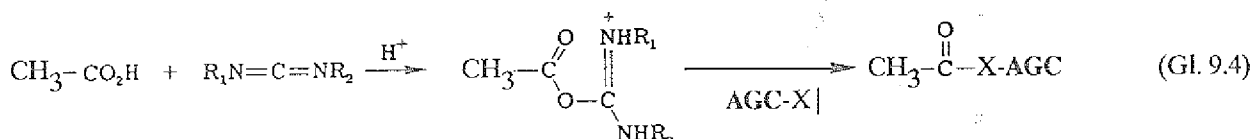
Proteoliposomen wurden in MOPS/Acetat-Puffer mit dem hydrophilen Carbodiimid EDC inkubiert. Nach Einwirkung von 10 mM EDC für 20 Min bei pH-Werten unterhalb 6.5 resultierte eine vollständige Hemmung des Asp/Glu-Carriers, die sich sowohl auf dessen Antiportaktivität als auch - allerdings mit geringerer Effizienz - auf die Induzierbarkeit seiner Effluxaktivität erstreckte (Abb.25). Die Geschwindigkeit des Antiports und auch der erreichte Wert der Isotopenäquilibration (Gl. 2.1) wurde mit steigender EDC-Konzentration zunehmend reduziert, was auf eine totale Inaktivierung der modifizierten Carriermoleküle schließen ließ.

Die Wirkung von EDC hing obligatorisch von der Gegenwart von Acetat im Inkubationsmedium ab. Nur bei mindestens äquimolaren Acetatkonzentrationen war der maximale Hemmeffekt von EDC zu erzielen (Abb.36). Geht man von der in der Literatur beschriebenen Reaktion des Carbodiimids mit intrinsischen, d. h. proteinständigen, Carboxylgruppen aus (Carraway & Koshland 1972),



so sollten zugesetzte (extrinsische) Carbonsäuren die Wirkung des EDC auf das Protein aber gerade aufheben, da sie mit den intrinsischen Carboxylen kompetieren. Folglich mußte die Inaktivierung des Asp/Glu-Carriers durch EDC nach einem anderen Wirkungsmechanismus ablaufen. Als reaktives Zwischenprodukt wurde ein O-Acetylisoharnstoffderivat (aktivierte Essigsäure) gefordert (s. Gl. 9.4).

Glycinmethylester (GME) wird bei klassischer Wirkungsweise als extrinsisches Nukleophil benutzt (HX in Gl. 9.3), um es an die durch EDC aktivierte Carboxylgruppe des Proteins zu kuppeln, wodurch Glutamat- oder Aspartat-Seitenketten unter Knüpfung einer Säureamidbindung stabil modifiziert werden. Die Inaktivierung des Asp/Glu-Carriers jedoch wurde durch GME nicht erst ermöglicht, sondern - im Gegenteil - verhindert, wie in Abb.38 A daran zu erkennen ist, daß bei simultaner Gabe von EDC und GME (0 Min Inkubation) die Transportaktivität nicht gehemmt wurde. GME mußte also das Acetylisoharnstoffderivat ohne Beteiligung des Proteins abreagieren lassen. Aus diesen Befunden wurde der Wirkungsmechanismus einer Carbodiimid-aktivierten Acetylierung abgeleitet, welcher zur Modifizierung nukleophiler Gruppen (X) des Asp/Glu-Carriers führt:



Dieser Mechanismus sollte durch den Einbau radioaktiv markierter Carbonsäuren in das Carrierprotein bewiesen werden. Da hierfür die Carbonsäure limitierend eingesetzt werden mußte, wurde in Vorexperimenten die Abhängigkeit der Inaktivierung von der Art der Carboxylkomponente und deren Konzentration untersucht. Es stellte sich heraus, daß Di- oder Tricarbonsäuren wie Bernstein- oder Citronensäure erheblich effektiver waren als Essig- oder Propionsäure (Tab.XIV A, Abb.36). Dies ließ eine Korrelation zu der mit der Modifizierung ins Protein eingebrachten Ladung vermuten. Entscheidend aber war offenbar die bei pH 6.2 bessere Aktivierbarkeit von Bernsteinsäure ($\text{pK}_2=5.7$) im Vergleich zu Essigsäure ($\text{pK}=4.76$), denn nur ein protoniertes Carboxyl geht eine Additionsreaktion mit dem Diimidsystem ein. Sowohl mit Succinat als auch mit Acetat war eine klar differentielle Inaktivierung der beiden korekonstituierten Carrier festzustellen. So wurde für die Hemmung des Asp/Glu-Antiports bei Inkubation für 10 Min mit 10 mM EDC eine IC_{50} von 0.5 mM Succinat ermittelt (Abb.36), während die IC_{50} für den ADP/ATP-Antiport etwa zehnmal höher lag (nicht gezeigt).

Tab.XIV: Einfluß von Carboxylaten und Nukleophilen auf die Hemmung des Asp/Glu-Carriers durch EDC. Die Hemmung der Antiportaktivität des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers durch EDC wurde in Gegenwart der aufgeführten Carbonsäuren und Aminosäuren bzw. deren Derivate bei pH 6.2 bestimmt. Experiment A und B, Inkubation mit 5 mM EDC für 15 Min; Experiment C, Inkubation mit 2.5 mM EDC für 6 Min.

	Carboxylat	pK _s	Nukleophil	% Hemmung
A	-		-	0
	10 mM Ammoniumacetat	4.8	-	70
	10 mM Natriumacetat	4.8	-	67
	10 mM Propionat	4.9	-	67
	10 mM Oxoglutarat	≤ 5 ^a	-	65
	10 mM Succinat	5.7 ^a	-	100
	10 mM Citrat	6.4 ^a	-	99
	10 mM Ammoniumacetat	4.8	5 mM Lysin	0
B	50 mM Ammoniumacetat		-	98
	50 mM Ammoniumacetat		5 mM Lysin	88
C	15 mM Succinat		-	77
	15 mM Succinat		5 mM Lysin	67
	15 mM Succinat		5 mM Lysin-OMe	23
	15 mM Succinat		5 mM Glycin-OMe	9
	15 mM Succinat		5 mM Cystein	34
	15 mM Succinat		5 mM N-Acetyl-Cystein	48

^a letzte Ionisierungsstufe

Tab.XV: Durch DTNB, PCMB oder HgCl₂ modifizierbare Cysteine sind nicht an der Inaktivierung des Asp/Glu-Carriers durch EDC beteiligt. Proteoliposomen wurden zunächst mit 50 µM PCMB, 5 µM HgCl₂, 200 µM DTNB oder Wasser bei pH 6.2 für ca. 0.5 Min vorbehandelt. Ein Teil der Ansätze (c) wurde dann mit 15 mM EDC/3 mM Succinat inkubiert. Die EDC-Reaktion wurde nach 2.5 Min mit 50 mM Glycinmethylester (GME) gestoppt und gleichzeitig gebundenes SH-Reagens mit 5 mM DTE entfernt (Ansätze b, c). Die nach Gelfiltration im Vortausch gemessene Antiportaktivität war bei EDC-Behandlung stets inhibiert. Nur die vorherige SH-Modifizierung mit DTNB reduzierte die Wirksamkeit des EDC (s. 9.3.3.2.1). Die unvollständige Revertierung der HgCl₂-Wirkung ist auf den Efflux während der Inkubation zurückzuführen (s. 7.).

Ansatz	SH-Reagens	EDC	GME	DTE	Aktivität (µM/min)
(a)	-	-	+	-	1.17
(b)	-	-	+	+	1.12
(c)	-	+	+	+	0.09
(a)	50 µM PCMB	-	+	-	0.03
(b)	50 µM PCMB	-	+	+	1.22
(c)	50 µM PCMB	+	+	+	0.15
(a)	5 µM HgCl ₂	-	+	-	0.04
(b)	5 µM HgCl ₂	-	+	+	0.57
(c)	5 µM HgCl ₂	+	+	+	0.06
(a)	200 µM DTNB	-	+	-	0.05
(b)	200 µM DTNB	-	+	+	0.75
(c)	200 µM DTNB	+	+	+	0.22

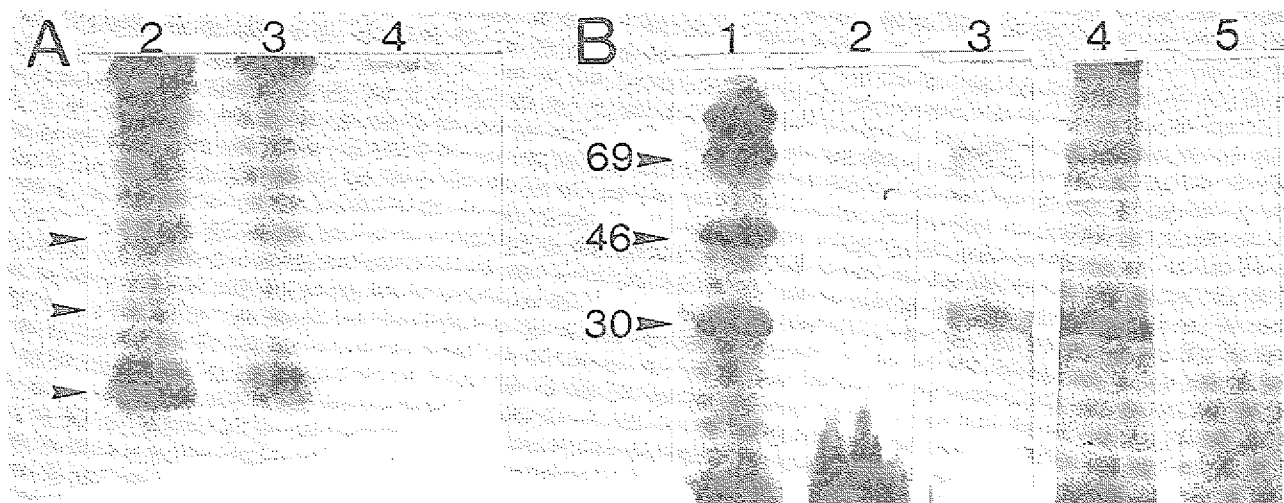


Abb.37: EDC-katalysierter Einbau von $[^{14}\text{C}]$ Succinat in das Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrierprotein. A: Proteoliposomen (intern 16 mM Aspartat/10 mM ATP) wurden in Abwesenheit von externem Substrat mit 20 mM EDC/0.47 mM (Spur 2, 4) bzw. 4.82 mM $[^{14}\text{C}]$ Succinat (Spur 3) für 30 Min bei pH 6.2 inkubiert. Die Reaktion wurde durch 30 mM Glycinmethylester (GME) gestoppt. Bei dem in Spur 4 gezeigten Ansatz war GME bereits vor Zusatz von EDC anwesend. Nach Abtrennung überschüssiger Reagenzien durch Gelfiltration wurden die Proteine aus den Liposomen extrahiert (s. 9.2) und jeweils ca. 12 μg auf einem SDS-Gel (10% T, 3% C) elektrophoretisch aufgetrennt. Die markierten Banden wurden durch Fluorographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (s. 9.2). B: In einem ähnlichen Experiment wurden Proteoliposomen mit 10 mM EDC/0.25 mM $[^{14}\text{C}]$ Succinat für 4 (Spur 2), 8 (Spur 3) bzw. 15 Min (Spur 4, 5) inkubiert. Die Reaktion wurde durch 38 mM GME gestoppt bzw. durch vorherige Gabe (Spur 5) gar nicht erst ermöglicht (vgl. A, Spur 4). Zur weiteren Behandlung der Proben siehe A. In Spur 1 wurden ^{14}C -markierte Molekulargewicht-Standardproteine aufgetragen (M_r in kDa).

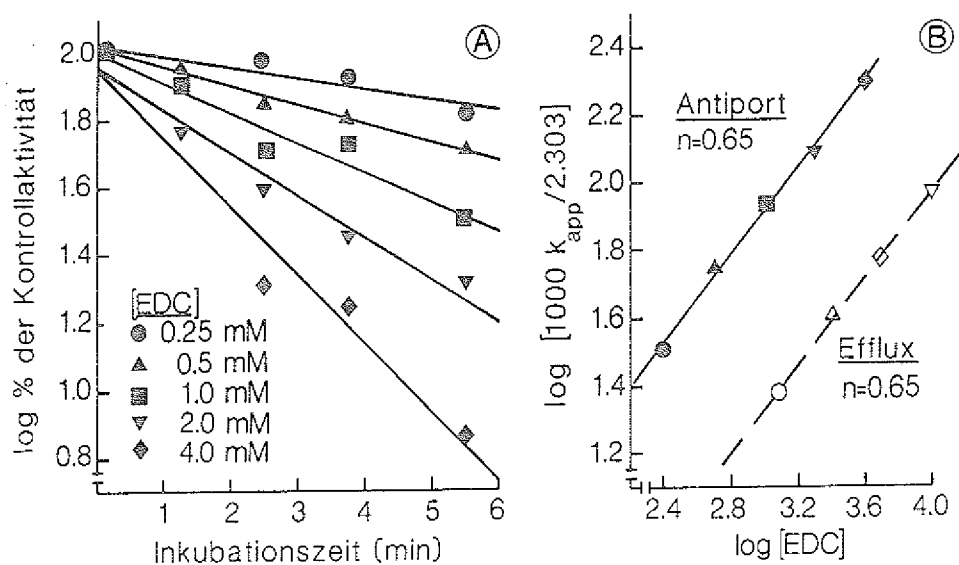


Abb.38: Kinetik der Carrierinaktivierung durch EDC/Acetat. Mit $[^{14}\text{C}]$ Aspartat vorbeladene Proteoliposomen wurden mit verschiedenen EDC-Konzentrationen für die angegebenen Zeiten inkubiert (s. A). Die Acetylierungsreaktion (50 mM Acetat) wurde durch Zugabe von EDC initiiert und durch 20 mM Glycinmethylester gestoppt. Kontrollproben wurden beide Verbindungen gleichzeitig zugesetzt ($t=0$). Nach Gelfiltration wurde die restliche Austauschaktivität gemessen (Zugabe von 1.5 mM Aspartat). Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrollen angegeben (A). In einem doppelt-logarithmischen Sekundärdiagramm (B) der apparenten Inaktivierungskonstanten k_{app} ($2.303 \times$ Neigung der Geraden aus A) gegen die eingesetzte EDC-Konzentration wurde entsprechend Gl. 9.6 eine lineare Beziehung erhalten. Aus der Steigung dieser Geraden ließ sich die durchschnittliche Reaktionsordnung n des geschwindigkeitsbestimmenden Inaktivierungsschritts (bezüglich EDC) ableiten (geschlossene Symbole). Außerdem sind die Ergebnisse der Inaktivierung der Effluxaktivität gezeigt (offene Symbole).

Abb.37 zeigt den EDC-katalysierten Einbau von [^{14}C]Succinat in das Protein. Proteoliposomen wurden mit 0.5 bzw. 5 mM Succinat (63 bzw. 16 dpm/pmol) und 20 mM EDC für 30 Min inkubiert. Dadurch wurde der Asp/Glu-Antiport zu 96% bzw. 100% inhibiert bei ca. 30% bzw. 70% Hemmung des ADP/ATP-Carriers. Nach Abtrennung überschüssiger Reagenzien über Gelfiltration, Präzipitation des Proteins und zwei Waschschritten (s. 9.2) fanden sich 4.3 bzw. 23.7 nmol [^{14}C]Succinat in der Protein-Probe. Jeweils 12 μg markiertes Protein wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die Radioaktivität fluorographisch detektiert (Abb.37 A). Wie von der Hemmung der zwei korekonstituierten Carrier her zu erwarten war, waren sowohl die 68 kDa- als auch die 30 kDa-Bande markiert worden, letztere sogar sehr kräftig. Der Einbau der Markierung wurde bei beiden Banden durch einen Überschuß an extrinsischem Nukleophil wie Glycinmethylester vollständig unterbunden (Spur 4).

Aber auch unter selektiveren Bedingungen (10 mM EDC/0.25 mM Succinat für 4-15 Min), unter denen nur der Asp/Glu-, nicht aber der ADP/ATP-Carrier signifikant gehemmt wurde, ergab sich keine differentielle Markierung der entsprechenden Banden auf dem Gel (Abb.37B). Der Einbau von [^{14}C]Succinat stieg insgesamt von 86 (4 Min) auf 390 pmol (15 Min) an - mit einem für das 68 kDa-Protein etwas schnelleren Verlauf. Die Markierung des nicht inhibierten ADP/ATP-Carriers bedeutet, daß EDC auch mit nicht-essentiellen Gruppen dieses Proteins reagiert. Ebenso muß es im Asp/Glu-Carrier zusätzliche Succinylierungsstellen geben, deren Modifizierung nicht zur Hemmung führt, denn in Anwesenheit von 2 mM Aspartat, welches diesen Carrier nahezu vollständig vor Inaktivierung schützte (s. unten), erfolgte dennoch eine Markierung der 68 kDa-Bande (Abb.39 B).

Durch Anwendung von GME als Stoppreagens der oben aufgeklärten Modifizierungsreaktion konnte die Kinetik der Carrier-Inaktivierung genauer untersucht werden. Die Carboxylkomponente wurde dabei nicht-limitierend eingesetzt (50 mM Acetat). Die apparente Inaktivierungskonstante (k_{app}) erster Ordnung (in bezug auf das Carrierprotein) ist eine Funktion der Inhibitorkonzentration. Für niedrige EDC-Konzentrationen gilt:

$$k_{\text{app}} = c[\text{EDC}]^n \quad (\text{Gl. 9.5}),$$

wobei n die durchschnittliche Reaktionsordnung bezüglich EDC bedeutet und c den Proportionalitätsfaktor zwischen echter und apparter Inaktivierungskonstante darstellt (vgl. Levy et al. 1963). Die k_{app} -Werte ließen sich aus den Steigungen der in Abb.38 A logarithmisch aufgetragenen Inaktivierungskinetiken ableiten. Die erhaltenen Daten ergaben im direkten Diagramm eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten EDC-Konzentration (zumindest im Bereich bis 1 mM, nicht gezeigt). Folglich verlief die Reaktion des geschwindigkeitsbestimmenden Inaktivierungsschrittes erster Ordnung auch in bezug auf EDC ($n \approx 1$). Durch Logarithmieren obiger Gleichung kann die Proportionalitätskonstante c aus dem rechten Term eliminiert werden:

$$\log k_{\text{app}} = \log c + n \log [\text{EDC}] \quad (\text{Gl. 9.6}),$$

so daß n durch doppelt-logarithmische Sekundärauftragung der apparenten Inaktivierungskonstanten gegen die eingesetzte EDC-Konzentration ermittelt werden kann. Wie Abb.38 B zeigt, ergab sich bei der Inaktivierung des Antiports und auch des Effluxes für n ein Wert von etwa 0.7, was darauf schließen läßt, daß die Modifizierung eines Aminosäurerestes pro funktionellem Carriermolekül zur Inaktivierung führt (Levy et al. 1963, Scrutton & Utter 1965). Insgesamt handelt es sich um eine Reaktion zweiter Ordnung ($k_2 \approx 260 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Genaugenommen müßten sich all diese Angaben auf die aktivierte Essigsäure beziehen (vgl. Gl. 9.4). Deren Konzentration dürfte jedoch bei Sättigung mit Acetat proportional zur eingesetzten EDC-Konzentration sein.

Trotz gleicher Inaktivierungskinetik - zumindest im Hinblick auf die Reaktionsordnung (Abb.38 B) - wurde zur Hemmung des Effluxes eine deutlich höhere EDC-Konzentration benötigt als zur Hemmung des Antiports.

Die Inaktivierungskonstante k_2 lag bei etwa $40 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Dies dürfte allerdings nicht auf die Modifizierung unterschiedlicher Seitenketten zurückzuführen sein. Angesichts der geringeren Effektivität auch anderer Inhibitoren bezüglich der Efflux- im Vergleich zur Antiport-Aktivität (Tab.XIII) ist es plausibler anzunehmen, daß die modifizierten exofazialen Proteindomänen für den unspezifischen Efflux-Transport (vgl. 8.3.1) nicht mehr die Bedeutung haben wie für den spezifischen Antiport (s. auch 10.3 und 10.4).

Nach der mechanistischen und kinetischen Beschreibung der Inaktivierungsreaktion stellte sich vor allem die Frage nach der funktionellen Gruppe des modifizierten Nukleophils (X in Gl. 9.4). Die Beobachtung, daß (a) EDC einer Effluxinduktion nicht förderlich war (Tab.XIII), und daß (b) Hg-Reagenzien selbst bei fast vollständiger Hemmung des Antiports durch EDC noch eine meßbare Effluxaktivität induzieren konnten (Abb.25), sprach gegen eine Beteiligung von Cysteinen. Tab.XV bestätigt, daß es sich weder um die durch HgCl_2 noch um die durch DTNB oder PCMB modifizierbaren SH-Gruppen handeln konnte (vgl. Abb.34). Trotz Blockierung dieser Cysteine durch jeweils eines der Reagenzien konnte durch EDC durchaus noch eine Inaktivierung der Asp/Glu-Carrieraktivität erzielt werden. Diese Konkurrenzexperimente konnten eindeutig gestaltet werden, da die Hemmwirkung der genannten SH-Reagenzien zum überwiegenden Teil durch DTE revertiert wurde (Tab.XV, Ansätze b). Folglich wurde nach Inkubation mit SH-Reagens, EDC/Succinat, GME und DTE (Ansätze c) vor allem die durch EDC bedingte Inhibition gemessen.

Derartig kovalente und trotzdem revertierbare Modifizierungsreagenzien sind jedoch für andere nukleophile Aminosäuren wie Lysin, Histidin, Arginin oder Tyrosin kaum bekannt. Von diesen Kandidaten war Arginin ($\text{pK } 12.5$) wegen seiner bei pH 6.2 wohl kaum zum Tragen kommenden Nukleophilie der unwahrscheinlichste. Hinzu kam, daß Phenylglyoxal, ein Arginin-spezifisches Reagens, selbst bei pH 7.2 nur sehr schlecht wirkte ($\text{IC}_{50} \approx 10 \text{ mM}$). Eine Modifizierung von Tyrosin ließ sich ebenfalls ausschließen: (a) Das Tyrosin-Reagens Acetylimidazol zeigte keine inhibierende Wirkung. (b) 4-Chlor-7-nitrobenzofurazan, das in mehreren Membranproteinen spezifisch mit Tyrosin-Seitenketten reagiert, hemmte zwar die beiden untersuchten Carrier, jedoch aufgrund einer Reaktion mit SH-Gruppen (s. 9.3.3.2.2). (c) Die Modifizierung mit EDC und Succinat ließ sich nicht durch $100 \text{ mM NH}_2\text{OH}$ (45 Min) revertieren. Dies schließt zumindest die Bildung eines O-Tyrosylharnstoffderivates aus (Carraway & Koshland 1968). Literaturbefunde (Miles 1977, vgl. 9.3.3.3.1) belegen außerdem, daß eine Tyrosylester-Bindung und auch ein N^{imi} -Histidyl-Säureamid durch diese Behandlung eher angegriffen wird als ein N^{ϵ} -Lysyl-Säureamid (Ergebnisse nicht gezeigt).

Verschiedene Lysin-Reagenzien, nämlich PLP (9.3.3.1.1) und mehrere Isothiocyanate (9.3.3.1.3), erwiesen sich - ebenso wie EDC - selbst bei pH-Werten zwischen 6 und 7 als sehr effektive Inhibitoren des Asp/Glu-Carriers. Demnach mußte die modifizierte Seitenkette des Proteins einen relativ niedrigen pK -Wert aufweisen, um deprotoniert als Nukleophil zu reagieren. Für freies Lysin wird der pK -Wert der ϵ -Aminogruppe mit 10.5-10.9 angegeben, für Lysyllysin mit 9.5 (pK_3). Im Protein können pK -Werte sich jedoch durchaus um mehrere Einheiten verschieben. Dies muß berücksichtigt werden, wenn man die Experimente aus Tab.XIV interpretieren will, in denen verschiedene Nukleophile dem Inkubationsansatz zugesetzt wurden, um die Konkurrenz mit dem zu modifizierenden Nukleophil des Proteins zu untersuchen. 5 mM Lysin schützte vollständig vor Inaktivierung, wenn weniger effektive Carboxylkomponenten in nicht allzu hohem Überschuß verwendet wurden (Tab.XIV: 10 mM Acetat/ 5 mM EDC). Mit Lysinmethylester (Lysin-OMe) hingegen konnte die Inaktivierung des Carriers unter fast allen Bedingungen recht effektiv verhindert werden. Dies läßt darauf schließen, daß bei limitierender Carboxylkomponente die ungeschützte COOH -Gruppe des freien Lysins durch EDC aktiviert wird, was entwe-

Tab.XVI: Wirkung von EDC/Succinat, SITS, DIDS, DEPC und PCMB auf den Asp/Glu-Carrier nach Modifizierung mit PLP. Proteoliposomen wurden zunächst mit 10 mM PLP oder mit Inkubationspuffer bei pH 6.5 für 2 Min vorbehandelt und direkt danach mit den genannten Reagenzien inkubiert (3-5 Min). Nach Gelfiltration wurde die restliche Antiportaktivität im Vortausch gemessen. Die aus mehreren Experimenten erhaltenen Ergebnisse (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) sind in Prozent der PLP-behandelten bzw. der unbehandelten Kontrolle angegeben. Die Hemmung durch PLP wurde durch die Gelfiltration zu ca. 40% revertiert (s. 9.3.3.1.1). Wegen der relativ kurzen Inkubationszeiten war die Wirksamkeit einiger Reagenzien auch in Abwesenheit von PLP nicht vollständig.

Zugabe (vor Gelfiltration)	Antiportaktivität nach Gelfiltration (% der Kontrolle)	
	PLP anwesend	PLP abwesend
10 mM EDC / 2.5 mM Succ	83 $\pm$ 16	14 $\pm$ 9 (n=3)
20 μ M PCMB	23 $\pm$ 6	5 $\pm$ 4 (n=3)
800 μ M SITS	86 $\pm$ 16	44 $\pm$ 13 (n=4)
10 μ M DIDS	67 $\pm$ 13	57 $\pm$ 13 (n=3)
50 μ M DEPC	96 $\pm$ 6	16 $\pm$ 11 (n=5)

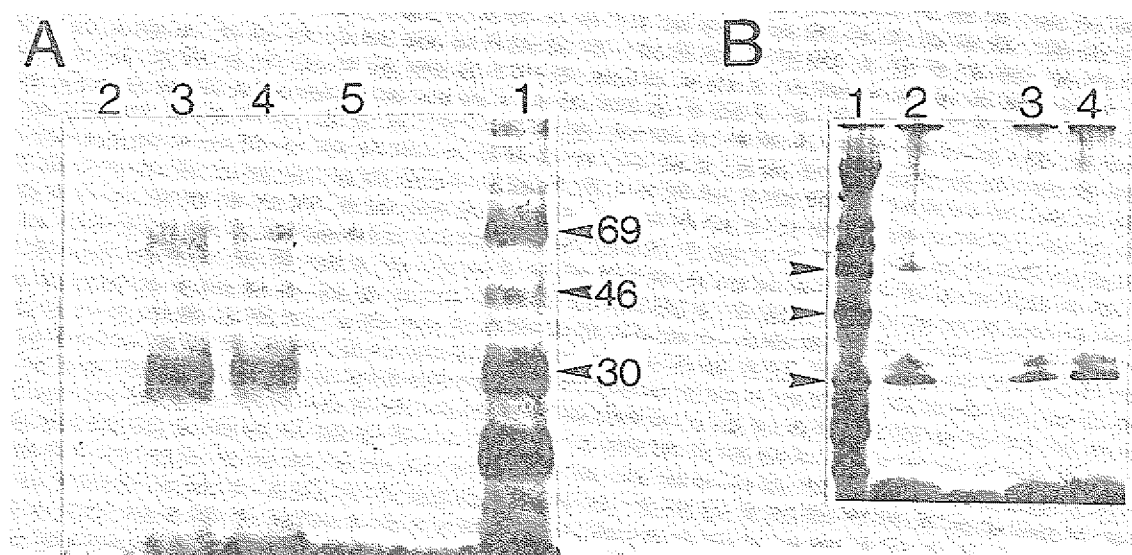


Abb.39: 14 C-Succinylierung von Lysin-Resten des Asp/Glu- und ADP/ATP-Carriers. A: Proteoliposomen (intern 16 mM Aspartat/10 mM ATP) wurden in Abwesenheit von externem Substrat mit 10 mM PLP (Spur 2), Wasser (Spur 3), 25 μ M Diethylpyrocarbonat (DEPC, Spur 4) oder 1 mM SITS (Spur 5) für 10 Min bei pH 6.2 vorbehandelt und danach mit 12 mM EDC/0.12 mM [14 C]Succinat inkubiert (10 Min). Die Reaktion wurde durch 40 mM Glycinmethylester gestoppt. Nach Gelfiltration wurden die rekonstituierten Proteine (etwa 3 μ g) elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb.37), ohne das Lipid vorher zu entfernen. Die Radioaktivität wurde fluorographisch auf einem Röntgenfilm detektiert. B: In einem ähnlichen Experiment wurden Proteoliposomen zunächst mit 10 μ M DIDS (Spur 3) oder mit Wasser (Spur 2, 4) vorinkubiert (10 Min, pH 6.2) und danach mit 10 mM EDC/0.32 mM [14 C]Succinat für 10 Min markiert. Das erhaltene Ergebnis wurde weder durch die Vorbehandlung mit DIDS noch durch die Anwesenheit von 2 mM Aspartat während des Markierungsschrittes (Spur 4) beeinflusst. Die Proteine wurden aus den Proteoliposomen extrahiert und jeweils etwa 0.3 μ g auf einem Gradientengel (10-15% T) aufgetrennt. A, B: In Spur 1 wurden 14 C-markierte Molekulargewicht-Standardproteine aufgetragen (M_r in kDa).

der zu einer Synthese von Polylysin führen kann (ohne Beteiligung des Proteins) oder zu einer Lysylierung des proteinständigen Nukleophils. Im letzteren Fall bliebe die positive Ladung des modifizierten Restes erhalten.

Der Befund, daß Glycinmethylester mindestens genauso gut vor EDC-Inaktivierung schützte wie Lysinmethylester (Tab.XIV), reflektiert die bei pH 6.2 höhere Reaktivität der α -Aminogruppe (pK 9-9.8 in freien Aminosäuren). Auch Cystein und N-Acetylcystein zeigten einen deutlichen Schutzeffekt, da der pK -Wert ihrer SH-Gruppe ebenfalls tiefer liegt (7.5-8.4). Die so erhaltenen Ergebnisse entsprechen also denen von Modellreaktionen. Sie bestätigen, daß eine Modifizierung von Aminogruppen durchaus wahrscheinlich ist. Für Acylierungen ist die Nukleophilie von $-NH_2$ zwar schwächer als die von $-SH$, $-OH$ und N^{imi} , doch unterliegt diese Reihenfolge starken Einflüssen durch die Proteinumgebung (Cohen 1970). In jedem Fall muß man voraussetzen, daß im Protein NH_2 -Gruppen mit tiefem pK vorliegen. Für das durch DIDS bei neutralem pH-Wert modifizierbare Lysin a im Anionenaustauscher aus Erythrocyten wurde ein pK von 7-8 angegeben (Kampmann et al. 1982).

Der Beweis, daß durch EDC tatsächlich Lysin-Seitenketten des Asp/Glu-Carriers acyliert wurden, konnte mit Hilfe des reversibel bindenden PLP (s. 9.3.3.1.1) erbracht werden. Nach Behandlung mit 10 mM PLP war eine Hemmung durch 10 mM EDC/2.5 mM Succinat kaum noch meßbar (17% Hemmung gegenüber 86% in der Kontrolle, Tab.XVI). Auch SITS, ein weiteres Lysin-spezifisches Reagens (s. 9.3.3.1.3), kompetierte - zumindest teilweise - mit PLP (Tab.XVI) und, wie unten gezeigt wird (Abb.39 A), mit EDC/Succinat. Demnach kann davon ausgegangen werden, daß alle drei Reagenzien mit demselben Lysin reagieren. Tab.XVI belegt außerdem, daß PCMB, das nicht mit EDC kompetierte (Tab.XV), auch in Gegenwart von PLP noch drastisch wirkte.

Die wechselseitige Verdrängung von PLP, SITS und EDC von dem reaktiven Lysin konnte durch Markierungsexperimente untermauert werden (Abb.39 A). So unterdrückte eine Vorbehandlung der Proteoliposomen mit 10 mM PLP die Markierung mit 12 mM EDC/0.12 mM [^{14}C]Succinat vollständig, und zwar sowohl im Asp/Glu- (68 kDa) als auch im ADP/ATP-Carrierprotein (30 kDa). Eine Vorbehandlung mit 1 mM SITS zeigte eine ähnlich wirksame Reduktion des [^{14}C]Succinat-Einbaus nur bei der 30 kDa-Bande, während die Markierung des Asp/Glu-Carriers noch mit etwa einem Drittel der Effizienz der Kontrolle erfolgte. Diese Kombination zweier Lysin-Reagenzien scheint demnach zu einer spezifischen Markierung des untersuchten Carrierproteins zu führen. Diethylpyrocarbonat, ein weiterer Bindungsstellen-Inhibitor des Asp/Glu-Carriers (s. 9.3.3.3.1), unterdrückte die Reaktion von EDC/Succinat mit dem Protein hingegen überhaupt nicht (Abb.39 A).

Wenn PLP und EDC dieselben Lysine modifizieren, so sollte - wie im Fall von PLP (Abb.35) - auch für die Inaktivierung durch EDC nur der eine Rest am aktiven Zentrum entscheidend sein. Tatsächlich wurde die Wirkung von EDC deutlich eingeschränkt, wenn vor der Inkubation Aspartat oder Glutamat (≤ 1 mM) zugesetzt wurde (Abb.40 A). Dieser Schutzeffekt war Substrat-spezifisch. α -Aminoadipinat, das nächsthöhere Homologe von Glutamat, zeigte keinen vergleichbaren Effekt (Abb.40 C), ebenso wie Asparagin, α -Aminobutyrate, α -Ketoglutarat (Abb.40 B) oder andere chemisch ähnliche Verbindungen. Die Verhinderung der Inaktivierung ist daher auch nicht auf die nukleophile Wirkung der α -Aminogruppen von Aspartat und Glutamat zurückzuführen. Dies bestätigt erneut die bei pH 6.2 ungewöhnlich hohe Reaktivität der betroffenen ϵ -Aminogruppe. In Abb.40 B fällt auf, daß der Substratschutz bei höheren Substratkonzentrationen vermindert war. Dies könnte durch die nicht zu vernachlässigende Reaktivität des EDC gegenüber der β - (pK 4.0) bzw. γ -Carboxylgruppe (pK 4.3) der Substrate erklärt werden. Aspartat und Glutamat würden demnach auch als aktivierte Carboxylkomponenten mit dem Carrier interagieren. Die resultierende Hemmung überwog bei höheren Substratkonzentrationen offenbar die Schutzwirkung. Wurde als Carboxylkomponente nicht Acetat (pK 4.8), sondern das effek-

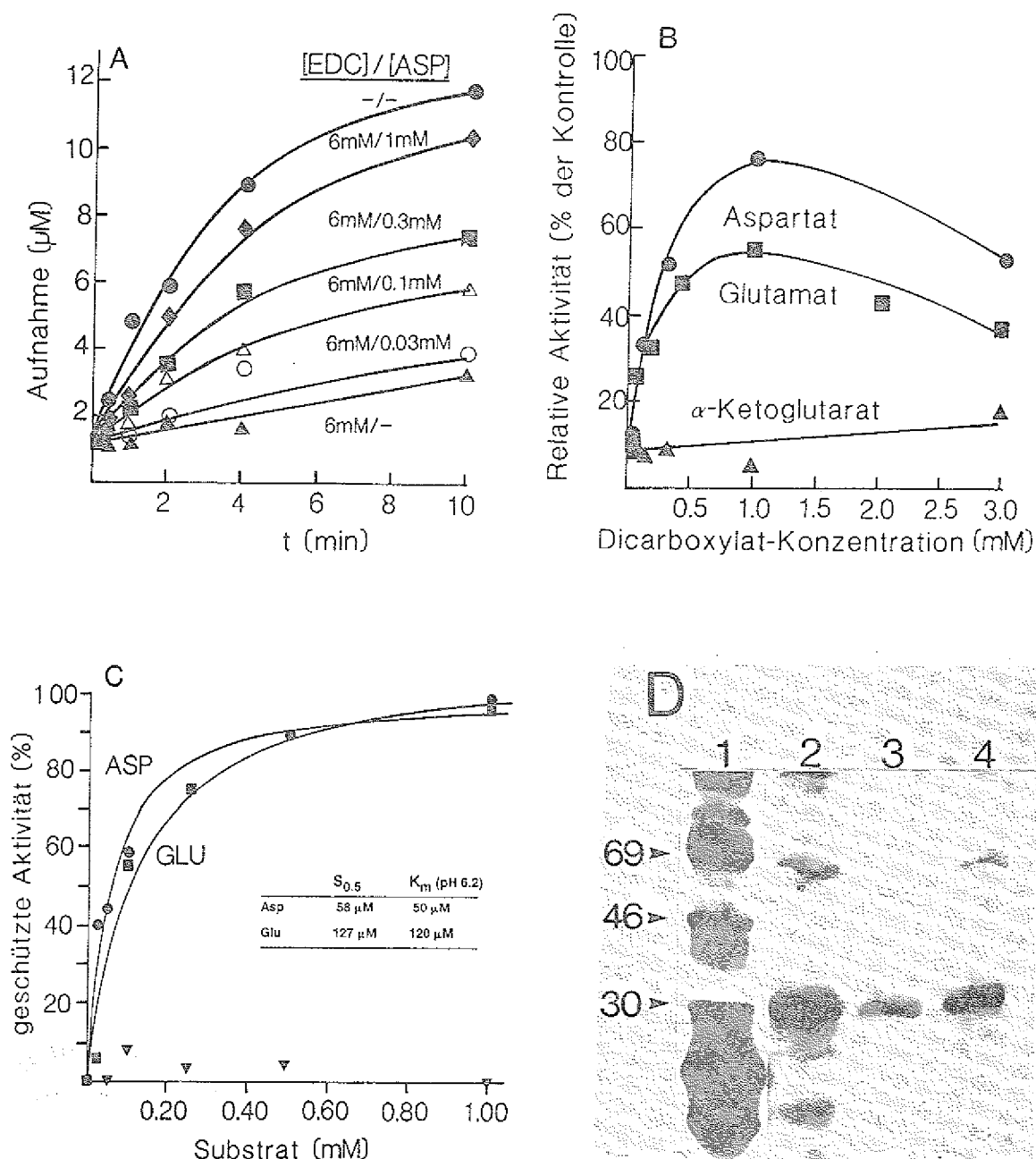
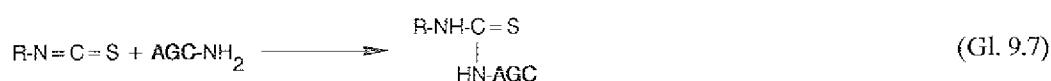


Abb.40: Substratschutz gegen Inaktivierung durch EDC. A: Proteoliposomen wurden mit 6 mM EDC/50 mM Acetat in Gegenwart von Aspartat (0 - 3 mM) für 4 Min inkubiert. Nach Gelfiltration wurde die Aufnahme von [^{14}C]Aspartat (50 μM) gemessen (Vortausch). Die berechneten Aktivitäten ($\bullet$) sind in B in Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben. Außerdem ist der Einfluß von Glutamat ($\blacksquare$) und α -Ketoglutarat ($\blacktriangle$) gezeigt. In C wurde als Carboxylkomponente Succinat (5 mM) anstelle von Acetat eingesetzt und die Hemmung durch 2 mM EDC (4 Min) in Gegenwart von Aspartat ($\bullet$), Glutamat ($\blacksquare$) oder DL- α -Aminoadipinat ($\blacktriangledown$) ermittelt. Die restliche Antiportaktivität ist diesmal in Prozent der insgesamt, d. h. ohne Substratschutz, hemmbaren Aktivität ausgedrückt (maximale Hemmung: 28% Restaktivität = 0% geschützte Aktivität). Die Abhängigkeit dieser geschützten Aktivität von der Konzentration des Protektors konnte im Falle von Aspartat und Glutamat entsprechend folgender Gleichung angepaßt werden: geschützte Aktivität (%) = $100 [\text{Substrat}] / (S_{0.5} + [\text{Substrat}])$. Die $S_{0.5}$ -Werte sind angegeben. D: Proteoliposomen wurden in einem ersten Schritt mit 2.5 mM EDC/5 mM Succinat in Gegenwart von 1.5 mM Aspartat für 4 (Spur 4) bzw. 12 Min (Spur 3) inkubiert. Nach Gelfiltration erfolgte eine zweite Inkubation (12 Min) mit 10 mM EDC/0.13 mM [^{14}C]Succinat in Abwesenheit von Aspartat. Nach Elektrophorese der rekonstituierten Proteine (3 μg) und Fluorographie war die Markierung der 68 kDa- und der 30 kDa-Bande gegenüber der Kontrolle in Spur 2 (erster Schritt ohne EDC) reduziert. Spur 1: Molekulargewicht-Standards.

tivere Succinat (pK_2 5.7) eingesetzt, so konnte ein fast vollständiger Substratschutz erzielt werden (Abb.40 C). Ein 50-prozentiger Schutz vor Inaktivierung war in diesem Fall bei einer Konzentration ($S_{0.5}$) von 58 μM Aspartat bzw. 127 μM Glutamat zu beobachten. Diese Werte korrelierten ausgesprochen gut mit den für die zwei Substrate unterschiedlichen Transportaffinitäten des Carriers, die bei pH 6.2 durch K_m -Werte von 50 μM (vgl. Tab.III) bzw. 120 μM (Dierks et al. 1988) beschrieben wurden. Diese Ergebnisse sprechen erneut für ein essentielles Lysin, das direkt an der externen Bindungsstelle des Asp/Glu-Carriers lokalisiert ist. Allerdings kann ein allosterischer Effekt der Substrate (in bezug auf die Acylierungsstelle) nicht ausgeschlossen werden. Der Substratschutzeffekt führte leider nicht zur Unterdrückung der radioaktiven Markierung einer Proteinbande (Abb.39 B). Es gelang zwar, die Markierung nicht-schützbarer Reste durch Vorinkubation mit unmarkiertem Succinat (in Gegenwart von Aspartat) zu reduzieren (Abb.40 D, Spur 3 und 4), doch wurden in dem nachfolgenden Markierungsschritt (ohne Aspartat) immer noch die 30 kDa- und die 68 kDa-Bande ^{14}C -succinyliert.

9.3.3.1.3 Modifizierung mit Isothiocyanostilbendisulfonaten

Die reaktiven Isothiocyanat-Gruppierungen des monofunktionellen SITS und des bifunktionellen DIDS sind nukleophil leicht angreifbar. Durch Reaktion mit Aminogruppen entstehen stabile Thioharnstoffderivate (vgl. Hartman & Wold 1966), wohingegen die Reaktionsprodukte mit Cystein- oder Tyrosin-Resten wieder hydrolysieren können (Maddy 1964, Miller 1942). Dies erklärt die hohe Lysin-Spezifität von Isothiocyanaten.



DIDS wurde als effektiver Inhibitor und selektives Markierungsreagens des Anionencarriers (Bande 3-Protein) aus Erythrocyten (s. Zitate in Passow 1986) sowie des Phosphatcarriers aus Chloroplasten beschrieben (Rumpho et al. 1988, Gross et al. 1990). Der Nachweis der Modifizierung eines Lysins wurde in beiden Fällen erbracht.

DIDS erwies sich auch für den Asp/Glu-Carrier als potenter, schnell wirkender (≤ 5 Min) Inhibitor (IC_{50} 8 μM , pH 6.5). Bei neutralen pH-Werten war DIDS wesentlich effektiver als Phenylisothiocyanat (IC_{50} ca. 3 mM), Fluorescein-5-isothiocyanat (IC_{50} ca. 80 μM) und auch als SITS (IC_{50} ca. 300 μM), das monofunktionelle Analoge von DIDS. 4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonat (DNDS), das keine Isothiocyanat-Gruppen besitzt, zeigte ebenfalls einen klaren Hemmeffekt auf den rekonstituierten Asp/Glu-Carrier (IC_{50} ca. 200 μM), der jedoch allein auf eine Kompetition mit dem Substrat zurückzuführen war. Dies legt nahe, daß Stilbendisulfonate eine gewisse Affinität für die Substratbindungsstelle haben. Die reversible Interaktion des DNDS schützte allerdings nicht vor der irreversiblen Inaktivierung durch DIDS oder EDC/Succinat (nicht gezeigt). Eine solche Protektion war zuvor für das Bande 3-Protein beschrieben worden (Werner & Reithmeier 1988).

DIDS inaktivierte den korekonstituierten ADP/ATP-Carrier bei pH 6.5 mit etwas geringerer Effizienz (IC_{50} 17 μM). Während dieser Carrier bei pH-Werten oberhalb von 7 deutlich besser reagierte, ergab sich im Falle des Asp/Glu-Carriers ein pH-Optimum bei 6.5-7.0. Dies überraschte, da ein alkalischer pH-Wert der Deprotonierung von Aminogruppen und auch der Reaktivität der Isothiocyanate (Kampmann et al. 1982) förderlich sein sollte. Einerseits bestätigt dies, daß der Asp/Glu-Carrier außergewöhnlich reaktive Lysin-Seitenketten besitzt (vgl. 9.3.3.1.2). Andererseits könnte die abnehmende Reaktivität bei höheren pH-Werten aber auf eine mögliche Nebenreaktion hindeuten (s. unten).

Nachdem das für die Inaktivierung durch PLP und EDC entscheidende Lysin dem aktiven Zentrum des Asp/Glu-Carriers zugeschrieben werden konnte, galt es, die durch die Isothiocyanate modifizierbaren Reste entsprechend zu charakterisieren. Einige Ergebnisse mit SITS wurden bereits vorgestellt. Sowohl die funktionellen Daten zur Wirkung von SITS nach PLP-Behandlung der Proteoliposomen (Tab.XVI) als auch die strukturellen Daten aus Markierungsexperimenten mit EDC/[^{14}C]Succinat nach Vorbehandlung mit SITS (Abb.39 A) belegen eine partielle Konkurrenz von SITS mit den beiden anderen Reagenzien. Bei DIDS war hingegen eine Verminderung seiner Wirkung nach Behandlung mit PLP überhaupt nicht zu erkennen (Tab.XVI). Ebenfalls keinen Einfluß zeigte eine Vorinkubation mit 10 μM DIDS auf die Markierung mit EDC/[^{14}C]Succinat (Abb.39 B). In einem anderen Experiment unterdrückte 100 μM DIDS die Markierung der 30 kDa-Bande (nicht gezeigt) - ähnlich wie 1 mM SITS (Abb.39 A). Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so muß man zu dem Schluß kommen, daß DIDS noch stärker als SITS neben dem Lysin an der Bindungsstelle weitere, möglicherweise essentielle Reste modifiziert. Der sehr unvollständige Substratschutz vor Inaktivierung durch beide Reagenzien bestätigt diese Sichtweise.

Daß auch Cysteine des Asp/Glu-Carriers mit DIDS reagieren, konnte zunächst ausgeschlossen werden. Die Wirkung von DIDS wurde durch eine vorherige Modifizierung mit DTNB, PCMB oder HgCl_2 nicht eingeschränkt (Tab.XVII). Einige Befunde zur Hemmung der Effluxfunktion waren daher unerwartet. Der Hg-induzierbare Efflux von Aspartat (und ATP) wurde nur durch hohe DIDS-Konzentrationen verlangsamt ($\geq 30 \mu\text{M}$, Tab.XVIII B). Nach Inkubation der Proteoliposomen mit 30 oder 80 μM DIDS war jedoch bereits vor Zugabe von Hg-Reagenzien ein Efflux von internem [^{14}C]Aspartat meßbar; [^{14}C]ATP dagegen blieb in den Liposomen (Tab.XVIII A). Da in beiden Meßansätzen identische Liposomen verwendet wurden, die sowohl Aspartat als auch ATP enthielten (eins von beiden markiert), waren unspezifische Effekte auf die Membran auszuschließen. Wie Tab.XVIII zeigt, konnte durch 80 μM DIDS in ca. 30 Min ein Efflux von etwas mehr als 50% des internen [^{14}C]Aspartats erreicht werden. Damit war dieser Efflux deutlich langsamer, verglichen mit dem Hg-induzierten Efflux. SITS bewirkte keine Effluxinduktion. Diese Ergebnisse führen zu folgenden Schlußfolgerungen. (a) Wie die Klasse B-Inhibitoren (Tab.XIII, Abb.25) beeinträchtigt DIDS nur bei drastischer Hemmung der Antiportaktivität auch die (Hg-induzierte) Effluxaktivität. (b) Die dazu notwendigen hohen DIDS-Konzentrationen führen zur Modifizierung zusätzlicher funktioneller Gruppen, wie die stimulierte Grundefflux-Aktivität (ohne Hg-Reagenzien) erkennen läßt. Der ADP/ATP-Carrier ist davon nicht betroffen, anders als mit den übrigen Effluxinduktoren (Klasse C) zu beobachten war. (c) Diese spezifische Efflux-Stimulation einerseits und die hemmende Wirkung auf die Effluxinduktion durch Mersalyl andererseits signalisieren eine 'Wechselwirkung' im Protein zwischen den durch DIDS modifizierten Resten und den mit Mersalyl reagierenden SH-Gruppen. (d) Da bei Vorinkubation mit SH-Reagens die Wirkung von DIDS (auf den Antiport) nicht eingeschränkt wurde (Tab.XVII), können beide Reagenzien jedoch nicht ausschließlich dieselben Gruppen modifizieren. Dagegen spricht auch, daß eine Behandlung von $^3\text{H}_2$ -DIDS-markiertem Protein bei pH 11 nicht zu einer signifikanten Reduktion der Markierung im Protein führte (R. Stappen, persönliche Mitteilung), wie im Falle einer Modifizierung von Cystein hätte beobachtet werden müssen (Maddy 1964). (e) Die genannte Wechselwirkung könnte eine Modifizierung des Lysins am aktiven Zentrum voraussetzen, da eine offenbar sterische Behinderung der Zugänglichkeit zu der mit Mersalyl reagierenden SH-Gruppe auch durch PLP (s. Tab.XIX) und auch durch EDC/Succinat (Abb.25) hervorgerufen wurde. (f) Angesichts des starken Unterschieds von SITS und DIDS bezüglich ihrer Effektivität der Antiporthemmung muß an die Wirkung des bifunktionellen DIDS als quervernetzendes Reagens gedacht werden. Eine Vernetzung des Lysins mit einem der Cysteine (vgl. Abb.45 C) könnte außerdem die Effluxinduktion erklären.

Tab.XVII: Cysteine sind nicht an der Inaktivierung des Asp/Glu-Carriers durch DIDS oder DEPC beteiligt. Proteoliposomen wurden zunächst mit 50 μM PCMB, 5 μM HgCl_2 , 200 μM DTNB, 100 μM NBD-Cl oder Wasser bei pH 6.5 für ca. 2 Min vorbehandelt. Ein Teil der Ansätze wurde dann mit 20 μM DIDS (Experiment 1) bzw. 30 μM DEPC (Experiment 2) inkubiert. Die Modifizierungsreaktionen wurden nach 5 Min mit 23 mM Lysin bzw. Histidin gestoppt und gleichzeitig, wo angegeben, gebundenes SH-Reagens mit 5 mM DTE entfernt (vgl. Tab.XV). Die nach Gelfiltration im Vortausch gemessene Antiportaktivität war bei Behandlung mit DIDS oder DEPC stets inhibiert. Im Fall von DEPC aber reduzierte die vorherige SH-Modifizierung vor allem mit DTNB die Wirksamkeit des Pyrocarbonats. Zur unvollständige Revertierung der HgCl_2 -Wirkung siehe Tab.XV.

SH-Reagens	DTE	Exp.1: Aktivität ($\mu\text{M}/\text{min}$)		Exp.2: Aktivität ($\mu\text{M}/\text{min}$)	
		ohne DIDS	mit DIDS	ohne DEPC	mit DEPC
-	-	0.70	-	n.b. ^a	-
-	+	0.74	<0.05	2.38	0.13
50 μM PCMB	-	<0.05	-	<0.05	-
50 μM PCMB	+	0.98	<0.05	3.10	0.43
5 μM HgCl_2	-	<0.05	-	<0.05	-
5 μM HgCl_2	+	0.28	<0.05	0.55	0.12
200 μM DTNB	-	<0.05	-	0.12	-
200 μM DTNB	+	0.20	<0.05	2.72	1.00
100 μM NBD-Cl	-	n.b.	-	0.04	-
100 μM NBD-Cl	+	n.b.	-	1.03	0.22

^a nicht bestimmt

Tab.XVIII: Wirkungen von DIDS auf Proteoliposomen mit rekonstituiertem Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier. Proteoliposomen (intern: 16 mM Aspartat/10 mM ATP, Aspartat oder ATP ^{14}C -markiert) wurden für 15 Min mit 0 (Ethanol), 30 oder 80 μM DIDS inkubiert. A: Nach Gelfiltration zeigte sich eine Reduzierung des internen Aspartat-Pools, nicht jedoch des ATP-Pools der Liposomen; dies war unabhängig davon, ob vor der Bestimmung des internen ^{14}C -Substrats (gleichzeitig) 5 mM DTE/200 μM Mersalyl (Ansatz 1) oder 60 mM PLP/2.5 mM Aspartat (Ansatz 2) bzw. 33 μM CAT/5 μM BKA/2.5 mM ATP (Ansatz 3) zugesetzt wurde B: Restliche Transportaktivitäten von Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier nach der Gelfiltration. Die Effluxaktivitäten wurden mit 200 μM Mersalyl, die Rücktauschaktivitäten mit 2.5 mM Aspartat bzw. 2.5 mM ATP initiiert. Die angegebenen k' -Werte wurden errechnet durch Multiplikation der Geschwindigkeitskonstanten k mit dem Anteil transportaktiver Liposomen $[\text{dpm}(t=0) - \text{dpm}(t=\infty)] / \text{dpm}(t=0)$; die erhaltenen Werte sind also von der Größe des internen Substratpools bei $t=0$ unabhängig.

A	DIDS (μM)	Aspartat-Pool (dpm)		ATP-Pool (dpm)	
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 3
	-	4239	4723	4806	4919
	30	2479	2851	4992	4446
	80	1923	1841	4812	4771

B	DIDS (μM)	Aspartat-Transport, k' (1/min)		ATP-Transport, k' (1/min)	
		Efflux	Rücktausch	Efflux	Rücktausch
	-	0.420	0.149	0.047	0.142
	30	0.230	0.016	0.020	0.067
	80	0.243	0.002	0.020	0.017

9.3.3.2 Modifizierung von Cystein

9.3.3.2.1 Modifizierung mit Hg-Verbindungen und DTNB

Cysteine sind für die Transportfunktion des Asp/Glu-Carriers von entscheidender Bedeutung. Die Inhibition der Antiportaktivität und die Induktion einer artifiziellen Netto-Fluxaktivität durch Hg-Verbindungen wurden in den Kapiteln 7 und 8 beschrieben. Dabei konnten zwei Klassen von SH-Gruppen unterschieden werden (Abb.34). Zumindest eine dieser SH-Gruppen scheint sich an der externen Bindungsstelle des Asp/Glu-Carriers zu befinden, da eine effektive Induktion der Effluxaktivität durch Hg-Reagenzien in Anwesenheit von Substrat nicht möglich war (Abb.32). Dagegen wurde die Antiport-inhibierende Wirkung dieser Reagenzien nicht wesentlich durch externes Aspartat beeinträchtigt (s. 8.4). Außerdem konnte aus der deutlichen Blockierung der Effluxfunktion (bzw. deren Induzierbarkeit) durch Modifizierung des Carrierproteins mit Lysin-Reagenzien wie PLP, EDC (Abb.25) oder DIDS (Tab.XVIII) auf eine Nachbarschaft des betroffenen Lysin- und Cystein-Restes geschlossen werden. Auch dieses Lysin wurde der externen Bindungsstelle zugeordnet (s. 9.3.3.1).

Die wechselseitige Interaktion von Lysin- und Cystein-Reagenzien am aktiven Zentrum des Carrierproteins wurde noch genauer untersucht. Zu diesem Zweck war PLP wegen der Reversibilität seiner Wirkung besonders geeignet (vgl. 9.3.3.1.1). So konnte in Messungen der nach Einwirkung von PLP und SH-Reagens verbliebenen Transportaktivität getestet werden, inwieweit durch Modifizierung des genannten Lysins die Zugänglichkeit zu den zwei verschiedenen SH-Gruppen eingeschränkt wurde. Vor diesen Messungen wurde durch Gelfiltration das reversibel gebundene PLP und überschüssiges SH-Reagens von den Proteoliposomen abgetrennt. Tab.XIX belegt, daß PLP die Wirkung einiger SH-Reagenzien reduzierte oder sogar verhinderte. Während Hg^{2+} und PCMS auch in Anwesenheit von PLP Efflux induzierten, war dies für Mersalyl nicht mehr möglich (Tab.XIX A). Wenn Hg^{2+} als EDTA-Komplex eingesetzt wurde, konnte ebenfalls ein Schutzeffekt durch PLP beobachtet werden. Daß Hg/EDTA (in den Kontrollen) überhaupt noch wirkt, belegt die außerordentlich hohe Affinität des Hg^{2+} (weiche Pearson-Säure) zum Schwefel (S^{II} : weiche Pearson-Base). Die Zugänglichkeit der betroffenen SH-Gruppe wurde offensichtlich durch Reaktion von PLP mit dem Lysin am aktiven Zentrum eingeschränkt, und zwar umso stärker, je größer das eingesetzte SH-Reagens war (vgl. Hg^{2+} - PCMS - Mersalyl - Hg/EDTA). Die Beobachtung unterschiedlicher Effekte von PLP auf die Wirksamkeit verschiedener Hg-Reagenzien schließt aus, daß eine direkte Interaktion des Phosphatrestes von PLP mit Hg die Ursache dieser Effekte ist.

Bei der Untersuchung der Antiporthemmung durch SH-Reagenzien war ein PLP-Schutzeffekt gegen DTNB und Hg/EDTA festzustellen, nicht aber gegen Hg^{2+} , Mersalyl, PCMB und PCMS (Tab.XIX B). Die unterschiedlichen Befunde im Falle von Mersalyl hinsichtlich seiner Wirkung auf Antiport und Efflux in Gegenwart von PLP belegen erneut, daß für die Effluxinduktion zumindest eine zusätzliche SH-Gruppe modifiziert werden muß (vgl. Abb.34). Demnach zeichnet sich folgendes Bild ab (vgl. Abb.45 C): (a) Das PLP-modifizierte Lysin führt zu einer partiellen Maskierung der SH-Gruppe an der externen Bindungsstelle und verhindert so die Effluxinduktion durch große Hg-Verbindungen (Mersalyl und Hg/EDTA). (b) Da diese die einzige für DTNB und die besser für Hg/EDTA erreichbare SH-Gruppe ist, wird auch die Fähigkeit dieser Reagenzien zur Antiporthemmung eingeschränkt. (c) Die Wirkungen der kleineren Hg-Verbindungen Hg^{2+} , PCMS und PCMB werden überhaupt nicht beeinträchtigt. (d) Für die Antiporthemmung scheint es unerheblich zu sein, welches der zwei Cysteine verändert wird. Im Falle des hydrophoberen, nicht-effluxinduzierenden PCMB besteht die Möglichkeit, daß es ausschließlich mit der zweiten, nicht schützbaeren SH-Gruppe reagiert (oder zusätzlich mit einer zu postulierenden dritten, vgl. 8.4). Diese sterische Beschreibung wird vervollständigt, wenn man die

Tab.XIX: Effluxinduktion (A) und Antiportinhibition (B) durch verschiedene SH-Reagenzien nach Modifizierung mit PLP. A: Mit [14 C]Aspartat beladene Proteoliposomen wurden zunächst mit 20 mM PLP oder mit Inkubationspuffer für 2 Min vorbehandelt und direkt danach mit den genannten Effluxinduktoren inkubiert (1-2 Min). Nach Gelfiltration wurde 5 mM DTE zugesetzt und der während der Einwirkdauer von insgesamt ca. 15 Min induzierte Aspartat-Efflux durch Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle ermittelt. B: In ähnlichen Experimenten wurden Proteoliposomen zunächst mit 20 mM PLP, dann mit den angegebenen SH-Reagenzien und nach Gelfiltration mit 5 mM DTE (bzw. DTT, Dithiothreitol) oder Puffer behandelt. Ob die SH-Reagenzien auch in Gegenwart von PLP den Antiport inhibierten, zeigt der Vergleich zur DTE-reaktivierten Antiportaktivität. Die gemessenen Aktivitäten sind in Prozent der PLP-behandelten Kontrolle angegeben. Die Hemmung durch PLP wurde durch die Gelfiltration zu 35-60% revertiert (s. 9.3.3.1.1). Nahezu alle Angaben stellen Mittelwerte aus 2-5 Experimenten dar.

A	Zugabe (vor Gelfiltration)	Effluxaktivität während Inkubation und Gelfiltration (% des internen [14 C]Aspartats / 15 Min)	
		PLP abwesend	PLP anwesend
	5 μ M HgCl ₂	76 $\pm$ 5	59 $\pm$ 9 (n = 5)
	5 μ M HgCl ₂ /50 μ M EDTA	46 $\pm$ 18	4 $\pm$ 2 (n = 4)
	50 μ M PCMS	22	25
	100 μ M Mersalyl	52	1

B	Zugaben		relative Antiportaktivität nach Gelfiltration (% der PLP-behandelten Kontrolle)
	(vor Gelfiltration)	(nach Gelfiltration)	
	1.	2.	
	PLP	10 μ M HgCl ₂	Puffer 3
	PLP	10 μ M HgCl ₂	DTE 47 ^a
	PLP	10 μ M HgCl ₂ /EDTA	Puffer 82
	PLP	10 μ M HgCl ₂ /EDTA	DTE 106 ^b
	PLP	Puffer	10 μ M HgCl ₂ /EDTA 19
	PLP	20 μ M PCMS	Puffer 24
	PLP	20 μ M PCMS	DTE 109 ^b
	PLP	20 μ M PCMB	Puffer 25 ^b
	PLP	20 μ M PCMB	DTE 137
	Puffer	20 μ M PCMB	Puffer 1 ^c
	PLP	100 μ M Mersalyl	Puffer 23
	PLP	100 μ M Mersalyl	DTT 126 ^b
	PLP	200 μ M DTNB	Puffer 75
	PLP	200 μ M DTNB	DTE 107 ^b
	PLP	Puffer	200 μ M DTNB 11
	PLP	20 μ M NBD-Cl	Puffer 53
	PLP	20 μ M NBD-Cl	DTE 75 ^b

^a Wegen starkem Efflux vor Messung der Antiportaktivität (vgl. A) keine vollständige Reaktivierung möglich.

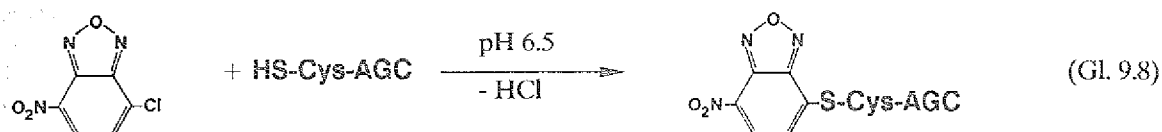
^b Kein bzw. nur schwacher Efflux vor Messung der Transportaktivität (s. auch A).

^c Bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Resultate aus Tab.XV hinzuzieht. Danach wird bei Einsatz der Reagenzien in umgekehrter Reihenfolge, d. h. nach vorheriger Modifizierung der SH-Gruppen mit HgCl_2 oder PCMB, kein Einfluß auf die Wirksamkeit von EDC beobachtet; (EDC reagiert mit demselben Lysin wie PLP (Abb.39 A)). Einen gewissen, reproduzierbaren Effekt zeigte hingegen der sperrige durch DTNB eingebrachte Nitrobenzoesäurerest (Tab.XV).

9.3.3.2.2 Modifizierung mit 4-Chlor-7-nitro-benzofurazan (NBD-Cl)

Hinweise auf ein Cystein direkt am aktiven Zentrum des Carriers ergaben sich auch durch ein anderes Reagens. NBD-Cl ist aufgrund seiner elektronenziehenden Gruppen eine sehr reaktive Substanz, dessen Chlor am Benzolring durch Tyrosin-OH-, Lysin- NH_2 - und Cystein-SH-Gruppen nukleophil substituiert werden kann (Birkett et al. 1970, Aboderin et al. 1973, Ferguson et al. 1975). Trotz dieser scheinbaren Unspezifität wurde NBD-Cl eingesetzt, da bei tiefen pH-Werten die Reaktion mit Cystein stark bevorzugt ablaufen sollte. Dies konnte in spektroskopischen Messungen mit solubilisiertem G-25-Protein bei pH 6.5 bestätigt werden. Wie für NBD-S-Cys zu erwarten (Birkett et al. 1970), lag das Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes bei 423 nm, während bei 385 nm (NBD-O-Tyr) und 475 nm (NBD-NH-Lys) keine Peaks auftraten (R. Stappen, persönliche Mitteilung).



Die Wirkung von NBD-Cl auf das solubilisierete Protein, wie nach Rekonstitution gemessen werden konnte, entsprach ungefähr der Wirkung auf Proteoliposomen. NBD-Cl inhibierte den rekonstituierten Asp/Glu-Carrier recht effektiv (IC_{50} 50 μM), den ADP/ATP-Carrier hingegen deutlich schlechter ($\text{IC}_{50} \geq 200 \mu\text{M}$). Durch DTE konnte die Hemmung zu einem großen Teil revertiert werden. Die Inaktivierung des Asp/Glu-Carriers wurde durch Anwesenheit von Substrat spezifisch unterdrückt (Abb.41), wobei - wie im Falle von EDC (Abb.40) und DEPC (Abb.43) - Glutamat einen etwas geringeren Schutzeffekt zeigte (R. Stappen, persönliche Mitteilung). Dies läßt darauf schließen, daß die modifizierte SH-Gruppe an der externen Bindungsstelle lokalisiert ist.

Um dieses Cystein in das oben entworfene Bild einordnen zu können, seien noch einige Ergebnisse erwähnt, die von R. Stappen in der Fortsetzung der Untersuchungen gewonnen wurden. Eine Modifizierung mit NBD-Cl induzierte weder den Efflux noch interferierte sie mit der Effluxinduktion durch Hg-Verbindungen. NBD-Cl gehörte also zusammen mit DTNB, PCMB und NEM in die Klasse von SH-Reagenzien, die den Carrier in ein transport-inkompetentes Intermediat überführten, das dann durch Behandlung mit Effluxinduktoren wie Mersalyl in den Efflux-Zustand gebracht werden konnte (vgl. Abb.34). NBD-Cl kann demnach nur eine SH-Gruppe, nämlich die am aktiven Zentrum, erreichen, ähnlich wie im vorangegangenen Abschnitt für DTNB aufgrund der Konkurrenz mit PLP gefordert wurde. Entsprechende Experimente mit PLP und NBD-Cl ($\leq 50 \mu\text{M}$) sprachen eher gegen eine Konkurrenz (Tab.XIX B). Bei Verwendung höherer NBD-Cl-Konzentrationen war eine Interpretation erschwert, da die Revertierbarkeit mit DTE zu gering war (vgl. Tab.XVII). Wahrscheinlich gehört NBD-Cl also noch zu den kleineren, nicht-kompetierenden Reagenzien - anders als DTNB, dessen reaktive -S-S-Gruppierung von zwei substituierten Benzolringen abgeschirmt wird. Daß NBD-Cl und DTNB dennoch an dieselbe Gruppe binden, belegten Markierungsversuche mit ^{14}C -NBD-Cl, dessen Reaktion durch vorherige Inkubation mit DTNB unterdrückt wurde. Außerdem ergaben sich Hinweise, daß NBD-Cl wie DTNB als einzige der getesteten SH-Reagenzien die nicht-induzierte Grundeffluxaktivität des Asp/Glu-Carriers hemmten.

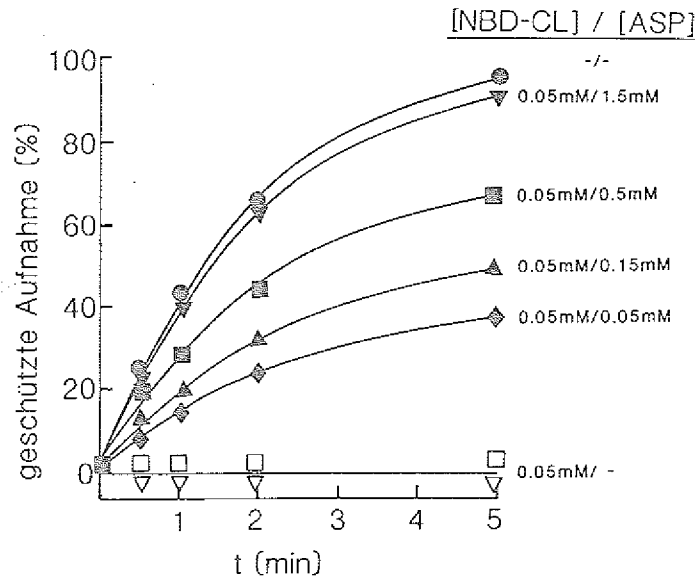


Abb.41: Substratschutz gegen Inaktivierung durch NBD-Cl. Proteoliposomen wurden mit 50 μM NBD-Cl in Gegenwart von 0 - 1.5 mM Aspartat für 20 Min bei pH 6.5 inkubiert. Nach Gelfiltration wurde die restliche Antiportaktivität als Aufnahme von [^{14}C]Aspartat (50 μM) gemessen (Vortausch). Sie ist als 'geschützte Aufnahme' in Prozent der insgesamt, d. h. ohne Substratschutz, inaktivierbaren Aufnahme angegeben. Hierzu wurde die auf $t = \infty$ extrapolierte Gesamtaufnahme der Kontrolle ohne NBD-Cl ($\bullet$) gleich 100% und die Restaufnahme bei maximaler Hemmung ($\square$, ∇) gleich 0% gesetzt. Die absoluten Aufnahmezeiten betrugen 6.79 ($\bullet$), 6.48 (∇), 5.56 ($\blacksquare$), 4.92 ($\blacktriangle$), 4.83 ($\blacklozenge$) bzw. 3.97 $\mu\text{M}/\text{min}$ ($\square$). 1.5 mM α -Ketoglutarat zeigte keinen Schutzeffekt (∇).

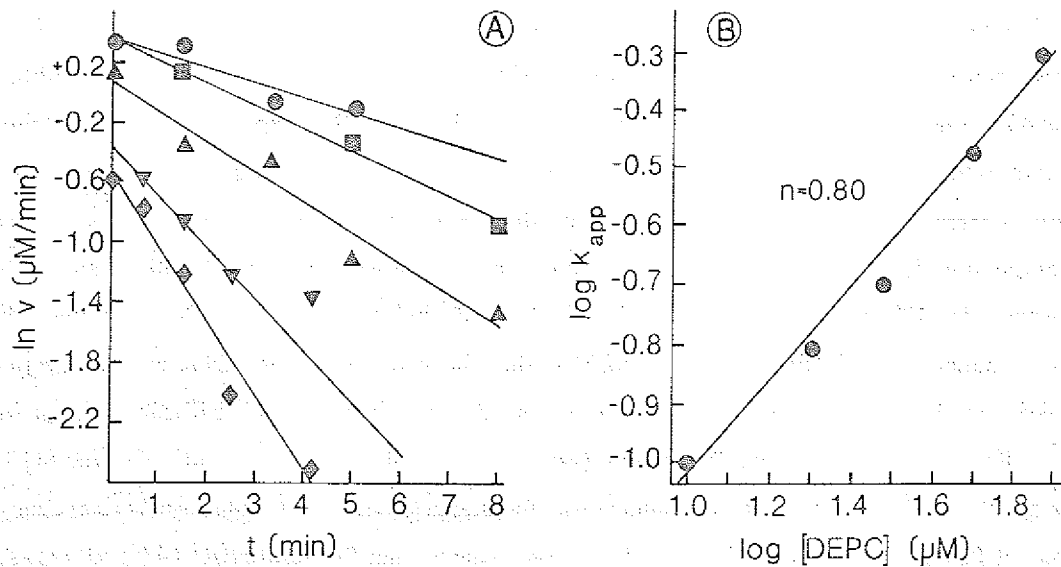
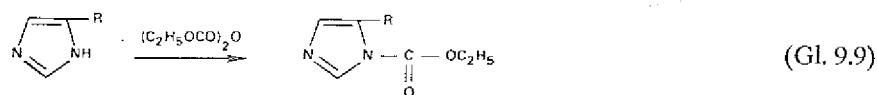


Abb.42: Kinetik der Carrierinaktivierung durch Diethylpyrocarbonat. Proteoliposomen wurden mit DEPC in verschiedenen Konzentrationen (10 ($\bullet$), 20 ($\blacksquare$), 30 ($\blacktriangle$), 50 ($\blacktriangledown$) bzw. 75 ($\blacklozenge$) μM) für die angegebenen Zeiten inkubiert (s. A). Die Modifizierungsreaktion wurde durch Zugabe von 3.75 mM Histidin gestoppt. Kontrollproben wurde DEPC und Histidin gleichzeitig zugesetzt ($t=0$). Die verbliebene Antiportaktivität v wurde im Vortausch gemessen (A). In einem doppelt-logarithmischen Sekundärdiagramm (B) der apparenten Inaktivierungskonstanten k_{app} (Neigung der Geraden aus A) gegen die eingesetzte DEPC-Konzentration wurde entsprechend Gl. 9.6 die durchschnittliche Reaktionsordnung n des geschwindigkeitsbestimmenden Inaktivierungsschritts (bezüglich DEPC) ermittelt, wie in Abb.38 für EDC erklärt.

9.3.3.3 Modifizierung mit Histidin-Reagenzien

9.3.3.3.1 Modifizierung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)

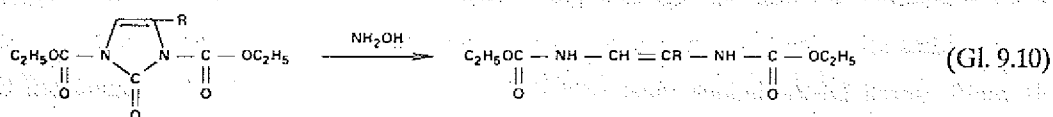
Diethylpyrocarbonat (Ethoxyameisensäureanhydrid) besitzt in wässriger Lösung nur eine recht kurze Halbwertszeit von 9 (pH 7) bis 24 Min (pH 6). Trotz seiner hohen Reaktivität modifiziert es mit beachtlicher Selektivität die nukleophilen Stickstoffatome im Imidazolring von Histidinen.



Nach Angaben von Miles (1977) erfolgt die Ethoxyformylierung von Histidin 50-mal schneller als die von Lysin und 250-mal schneller als die von Cystein. Letztere Möglichkeit konnte bisher nur in Modellreaktionen (bei Verwendung von Carboxylatpuffern) nachgewiesen werden (Osterman-Golkar et al. 1974, Garrison & Himes 1975). In Proteinen wurden Nebenreaktionen mit Lysinen, in seltenen Fällen mit Tyrosinen (Burstein et al. 1974, Bagert & Röhm 1989) und einmal auch mit einem Serin gefunden (Melchior & Fahrney 1970). Bei pH-Werten zwischen 6 und 7.5 und Anwendung von DEPC in submillimolaren Konzentrationen wurden jedoch fast ausnahmslos Histidin-Reste modifiziert (s. Zitate in Miles 1977, Ovádi et al. 1967).

Die Asp/Glu-Antiportaktivität konnte durch DEPC bei pH-Werten zwischen 6.2 und 7.0 sehr effektiv gehemmt werden. Das ausgeprägte pH-Optimum ließ sich als Überlagerung der mit dem pH steigenden Reaktivität der modifizierten Gruppen und der sinkenden Stabilität des Pyrocarbonats verstehen. DEPC erwies sich als das selektivste Reagens hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf den Asp/Glu-Carrier (IC_{50} 20 μM , pH 6.5) und den ADP/ATP-Carrier ($\text{IC}_{50} \geq 200$ μM , pH 6.5). Diese differentielle Wirkung erstreckte sich auch auf die Effluxaktivitäten der beiden Carrier, wenngleich hierfür höhere Konzentrationen nötig waren (80 μM , Abb.25). Wie bereits in 7.3.4.2 ausgeführt wurde, war es mit Hilfe von DEPC möglich, eine Korrelation von Aspartat- und ATP-Effluxaktivität mit dem Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carrier aufzuzeigen (s. auch 8.3.1).

Die Zugabe freien Histidins stoppte die Wirkung von DEPC. Für eine vollständige Blockierung war aber ein hoher Histidin-Überschuß nötig (≥ 200 -fach, vgl. Abb.42 A). Die kinetisch kontrollierte Reaktion von DEPC mit dem Protein involvierte demnach funktionelle Gruppen, deren Reaktivität bei pH 6.5 höher war als die von freiem Histidin. Die Inaktivierung des Carriers durch 20 μM DEPC war mit 100 mM NH_2OH nicht revertierbar (Inkubation für 45 Min, pH 7). Dies bestätigte einerseits, daß keine essentiellen Tyrosine (oder Serine) modifiziert wurden, wie bereits in den Untersuchungen mit NBD-Cl und mit EDC festgestellt werden konnte. Da andererseits aber auch ethoxyformyliertes Histidin durch Hydroxylamin angegriffen werden sollte (Melchior & Fahrney 1970), konnte dieser Befund als Hinweis gewertet werden, daß nicht Histidin-, sondern möglicherweise Lysin- oder Cystein-Reste umgesetzt wurden. Allerdings könnte die Nichtrevertierbarkeit der DEPC-Wirkung durch NH_2OH auch auf einer irreversiblen Zerstörung der Histidin-Seitenkette beruhen. Wie nämlich in Modellreaktionen gefunden wurde, kann NH_2OH den Imidazolring öffnen, wenn dieser zuvor an beiden Stickstoff-Atomen modifiziert wurde (Avaeva & Krasnova 1975, Miles 1977).



Eine Modifizierung von Cystein, die unwahrscheinlichste aller Möglichkeiten, ließ sich ausschließen. In einem ähnlichen Ansatz, wie bereits zuvor für EDC und DIDS beschrieben, zeigte sich, daß auch die Wirkung von DEPC durch vorherige SH-Modifizierung mit HgCl_2 oder PCMB nicht eingeschränkt wurde (Tab.XVII). Der beobachtete Effekt von DTNB dürfte sterisch begründet sein (s. unten). Gegen eine Reaktion mit Lysin sprach der bereits in Abb.39 gezeigte Befund, wonach eine Vorinkubation der Proteoliposomen mit $25 \mu\text{M}$ DEPC eine anschließend durchgeführte Lysin-Markierung mit $\text{EDC}/[^{14}\text{C}]\text{Succinat}$ nicht im geringsten beeinträchtigte. Dieses Resultat ließ jedoch keine eindeutige Aussage zu, da im Markierungsexperiment auch die Reaktion von EDC mit anderen, nicht-essentiellen Gruppen erfaßt wurde (vgl. 9.3.3.1.2)). Experimente, in denen erst EDC/Succinat und dann markiertes DEPC hätte eingesetzt werden sollen, waren nicht durchführbar, da hierzu aus technischen Gründen mit solubilisiertem Protein gearbeitet werden mußte (s. unten). In diesem Zustand ließ sich das Protein jedoch nicht mit EDC inaktivieren, und auch DEPC war nur in etwa 50-fach höherer Konzentration wirksam. Letzterer Umstand schloß gleichzeitig den Einsatz spektroskopischer Methoden aus. Die Frage nach einer möglichen Lysin-Modifizierung durch DEPC mußte daher in funktionellen Messungen angegangen werden. Hierzu konnte nur das reversibel bindende Lysin-Reagens PLP eingesetzt werden (vgl. 9.3.3.1.1). Wie Tab.XVI zeigt, war in der Tat durch PLP eine deutliche Protektion des Carriers gegen Inaktivierung durch DEPC zu erkennen. Einen vergleichbaren Effekt zeigte PLP nur noch auf die Inaktivierung durch EDC. Um diese Kompetitionsexperimente, die durchaus für eine Modifizierung von Lysin sprachen, besser beurteilen zu können, mußte(n) der/die durch DEPC modifizierte(n) Rest(e) weiter charakterisiert werden.

Zunächst wurde eine Kinetik der Antiport-Inaktivierung bei verschiedenen DEPC-Konzentrationen aufgenommen. Die Modifizierungsreaktion wurde mit 3.75 mM Histidin gestoppt. Wie Abb. 42 A zeigt, resultierte auch bei simultaner Gabe von Histidin und DEPC (0 Min Inkubationszeit) eine nicht zu vernachlässigende Inaktivierung, wenn DEPC in Konzentrationen oberhalb von $20 \mu\text{M}$ eingesetzt wurde. Dieser Fehler sollte jedoch in allen Ansätzen etwa gleich sein. Die apparenten Inaktivierungskonstanten (k_{app}) ließen sich aus den Steigungen der Geraden in Abb.42 A gewinnen (vgl. 9.3.3.1.2). Trägt man sie in einer sekundären Auswertung doppelt-logarithmisch gegen die jeweilige DEPC-Konzentration auf (Abb.42 B), so ergibt sich für die durch Histidin blockierbare Inaktivierung eine durchschnittliche Reaktionsordnung n bezüglich DEPC von 0.8 (s. Gl. 9.6). In einem anderen Experiment wurde ein Wert von 0.6-0.7 erhalten. Dies bedeutet, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt die Modifizierung durch ein DEPC pro funktionellem Carrier ausreicht, diesen zu inaktivieren. Gl. 9.10 wird dadurch aber nicht widerlegt, da überschüssiges Reagens den betroffenen Rest (im Falle eines Histidins) weiter modifizieren kann. Für die Gesamtreaktion des DEPC mit dem Protein wurde eine Inaktivierungskonstante zweiter Ordnung (k_2) in Höhe von ungefähr $6800 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ermittelt. DEPC übte seine Wirkung auf die Transportrate (V_{max}) und weniger auf die Transportaffinität (K_{m}) aus, wie eine kinetische Analyse der Restaktivität des Asp/Glu-Carriers bei etwa halbmaximaler Inhibition zeigte. Eine 100-prozentige Hemmung durch Modifizierung einer entscheidenden Aminosäure-Seitenkette ist demnach nur möglich, wenn die Modifizierungsreaktion jedes betroffene Carriermolekül vollständig inaktiviert.

Für die Protonenbindungsstelle des Asp/Glu-Carriers, Voraussetzung für den Glu/H^+ -Cotransport, war zuvor aus kinetischen Untersuchungen ein pK -Wert von 6.5 abgeschätzt worden (s. 4.4), was auf die Beteiligung eines Histidins schließen ließ. Die starke pH-Abhängigkeit des Glutamattransports bei Substratlimitierung (s. 4.4) wurde durch DEPC jedoch nicht verändert. Auch vergleichende K_{m} -Bestimmungen für Glutamat und

Aspartat mit und ohne DEPC-Behandlung (20 μ M) ergaben keine Hinweise auf einen zusätzlichen durch DEPC modifizierbaren Aminosäurerest, der nur für den Glu/H⁺-Cotransport essentiell wäre (nicht gezeigt).

DEPC reagierte ebenfalls an der externen Bindungsstelle des Asp/Glu-Carriers, wie Substratschutz-Experimente erkennen ließen (Abb.43). Die Spezifität dieses Schutzes entsprach der des Transports. α -Ketoglutarat, Asparagin und α -Aminoadipinat zeigten keinen Einfluß. Die bessere Schutzwirkung des Aspartats im Vergleich zu Glutamat reflektierte wiederum die höhere Affinität des Carriers für dieses Substrat (Abb.43). 50-prozentiger Schutz ($S_{0.5}$) wurde bei 97 μ M Aspartat (K_m : 50 μ M) bzw. 227 μ M Glutamat (K_m : 200 μ M) beobachtet. Diese Korrelation spricht stark für ein Histidin (oder Lysin) am aktiven Zentrum des Asp/Glu-Carriers und bestätigt, daß Aspartat und Glutamat beide an dieser Stelle gebunden werden.

Die funktionelle Charakterisierung des modifizierten Restes versprach nahezu ideale Voraussetzungen für eine spezifische Markierung des Carrierproteins. [¹⁴C]DEPC war jedoch nur mit sehr niedriger spezifischer Aktivität (3.8 mCi/mmol) zu beziehen. Angesichts der geringen Stabilität des ethoxyformylierten Reaktionsproduktes (Miles 1977) mußte [¹⁴C]DEPC für eine ausreichende Markierung in einer Konzentration von ca. 1 mM eingesetzt werden, was weit über dem Bereich lag, wo eine Differenzierung zwischen Asp/Glu- (98% Hemmung) und ADP/ATP-Carrier (72% Hemmung) möglich war. Aspartat schützte unter diesen Bedingungen den Asp/Glu-Carrier nur noch zu ca. 20%. Dementsprechend ließ sich der Einbau markierter Ethoxyformylgruppen in die Proteoliposomen nach Inkubation mit 1 mM [¹⁴C]DEPC kaum durch Aspartat (20 mM) unterdrücken; 20 mM Histidin reduzierte die Markierung zu 93%. Nach Elektrophorese der Proteinproben (unter hohen Markierungsverlusten) und Exposition des SDS-Gels auf einem Röntgenfilm (Fluorographic) war, wie zu erwarten, eine schwache Markierung des 68 kDa- und des 30 kDa-Proteins entsprechend ihrer Bandenstärke festzustellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Markierung wurde auch mit solubilisiertem G-25-Protein durchgeführt, da für eine Inaktivierung des Asp/Glu-Carriers in diesem Zustand etwa 50-fach höhere DEPC-Konzentrationen benötigt wurden. So inhibierte 1.5 mM DEPC zu 83% - bei nur 18% Hemmung des ADP/ATP-Carriers. Die Gegenwart von Aspartat schützte vollständig vor Inaktivierung der Asp/Glu-Antiportaktivität, wenn die Inkubation mit DEPC nach 10-20 Min durch Zugabe von Histidin und anschließender Gelfiltration gestoppt wurde (s. 9.2). Auch in den Ansätzen mit markiertem DEPC (0.9 bzw. 2.2 mM) wurde der Schutz durch 10 mM Aspartat deutlich (71 bzw. 66% geringere Markierung), während 10 mM ATP keinen klaren Effekt zeigte. Nach Elektrophorese (Abb.44 A) und Fluorographie (Abb.44 B) ergab sich in den Ansätzen mit 0.9 mM DEPC nur eine Markierung der 30 kDa-Bande - unabhängig von der Anwesenheit von Aspartat oder ATP. Bei Inkubation mit 2.2 mM DEPC waren zusätzlich die 44 kDa- und die 68 kDa-Bande markiert, was in diesem Fall aber durch 10 mM Aspartat verhindert wurde. Die Unterdrückung der Markierung zweier Banden und die verminderte Radioaktivität auch im 30 kDa-Protein lassen allerdings eher einen unspezifischen Schutzeffekt des Aspartats vermuten. Dagegen spricht jedoch zum einen, daß die Markierung der 30 kDa-Bande bei Reaktion mit 0.9 mM DEPC nicht durch Aspartat reduziert wurde (Abb.44 B, Spur 4) und zum anderen daß Aspartat und ebenso α -Aminoadipinat höchstens einen leichten Schutzeffekt bezüglich der Inaktivierung des ADP/ATP-Carriers ausübten (nicht gezeigt).

Faßt man alle genannten Befunde zusammen, so wird deutlich, daß am aktiven Zentrum des Asp/Glu-Carriers eine durch DEPC modifizierbare funktionelle Gruppe existiert. Ob es sich dabei um ein Histidin handelt, wie eingangs erwähnte Literaturbefunde wahrscheinlich machen, oder aber eventuell um das aufgrund seiner Reaktion mit PLP und EDC bereits charakterisierte Lysin, läßt sich nicht endgültig klären. Hierzu wären

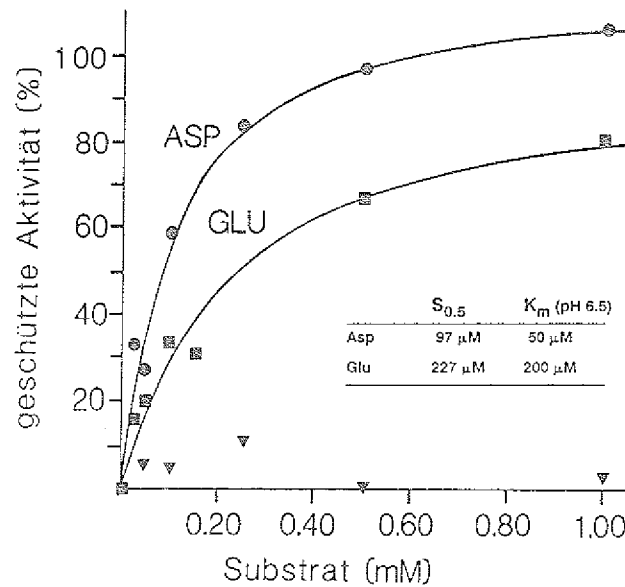


Abb.43: Substratschutz gegen Inaktivierung durch Diethylpyrocarbonat. Proteoliposomen wurden mit 20 μ M DEPC in Gegenwart von 0 - 1 mM Aspartat ($\bullet$), Glutamat ($\blacksquare$) oder DL- α -Aminoadipinat ($\blacktriangledown$) inkubiert (8 Min). Nach Gelfiltration wurde die restliche Antiportaktivität im Vortausch gemessen. Sie ist in Prozent der insgesamt, d. h. ohne Substratschutz, hemmbaren Aktivität angegeben (maximale Hemmung: 37% Restaktivität = 0% geschützte Aktivität). Zur Bestimmung der für halb-maximalen Schutz notwendigen Substratkonzentration ($S_{0.5}$) siehe Abb.40 C.

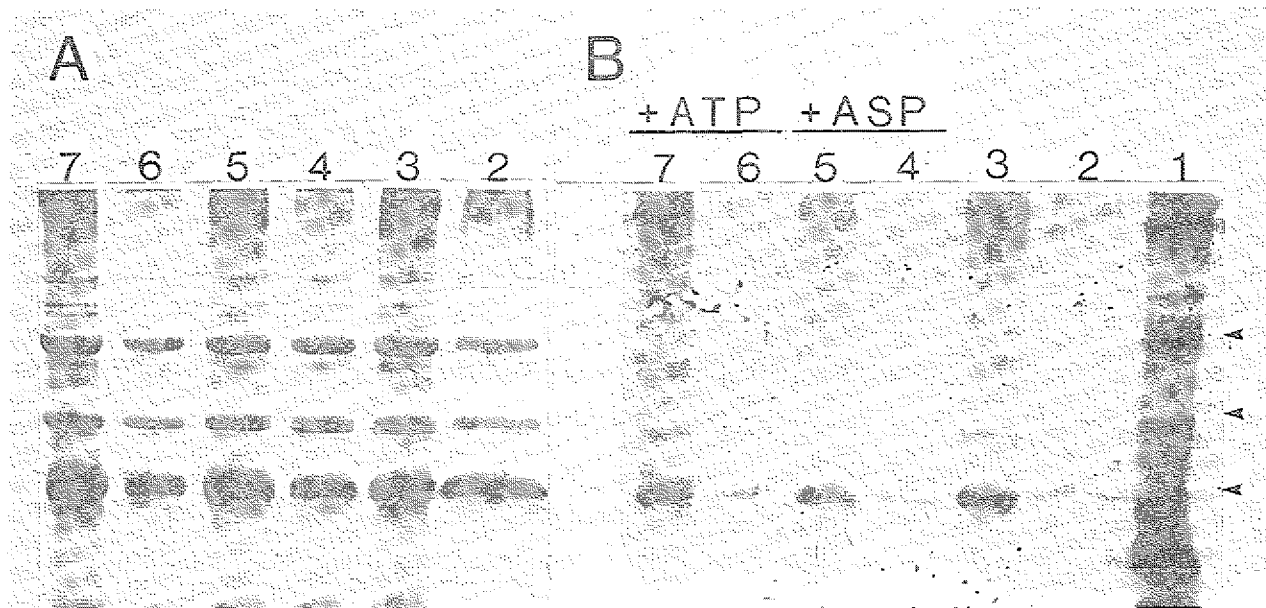
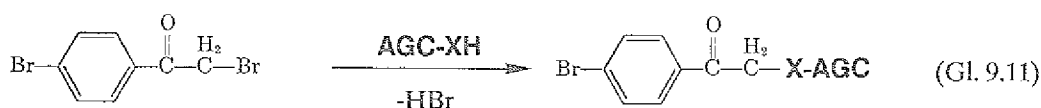


Abb.44: Ethoxy- 14 C]formylierung des Asp/Glu- und ADP/ATP-Carriers. Solubilisiertes Carrierprotein (G-25-Protein, 0.64% $C_{12}E_8$ /300 mM Ammoniumacetat, pH 6.5) wurde für 20 Min mit 0.9 mM (Spur 2, 4, 6) oder 2.2 mM [14 C]DEPC (Spur 3, 5, 7) inkubiert. In den angegebenen Fällen war 10 mM Aspartat oder 10 mM ATP anwesend. Die Modifizierungsreaktion wurde durch 5 mM Histidin gestoppt und überschüssiges DEPC durch Gelfiltration auf Sephadex G-25 entfernt. Die Proteinproben (20 μ g) wurden nach Präzipitation und Extraktion des Detergens durch Hexan/Isopropanol (s. 9.2) auf einem SDS-Gel getrennt (A) und die markierten Banden auf einem Röntgenfilm fluorographisch sichtbar gemacht (B), wie in Abb.37 beschrieben. In Spur 1 wurden Molekulargewicht-Standardproteine aufgetragen (M_r : 69, 46 bzw. 30 kDa, vgl. Abb.37 B).

aussagekräftigere Kompetitionssexperimente mit [^{14}C]DEPC notwendig. Die Nichtrevertierbarkeit durch Hydroxylamin und die Protektion durch PLP vor Inaktivierung durch DEPC sprechen eher für ein Lysin, doch gibt es alternative Erklärungsmöglichkeiten. So könnte der Schutz-Effekt von PLP auf eine sterische Wechselwirkung an benachbarten Lysin- und Histidin-Resten zurückzuführen sein. Umgekehrt schränkte DEPC die Lysinmarkierung durch EDC/[^{14}C]Succinat nicht ein (Abb.39 A). In jedem Fall kann der ethoxyformylierte Rest, der zur Inaktivierung führt, nicht allzu weit von der SH-Gruppe der externen Bindungsstelle entfernt sein, da deren Modifizierung mit DTNB die Wirkung von DEPC signifikant reduzierte (Tab.XVII). Ähnliche Effekte waren auch bei den Reaktionen von EDC (Tab.XV) und PLP (Tab.XIX) mit dem Protein zu beobachten.

9.3.3.2 Modifizierung mit 4-Bromphenacylbromid (BPAB)

Der Asp/Glu-Carrier wurde auch durch BPAB, ein zweites Histidin-Reagens (Volwerk et al. 1974, Crestfield et al. 1963), inaktiviert. Wie auch bei anderen Proteinen beobachtet (Fohlman et al. 1979, Yang & King 1980), verlief die Inaktivierungsreaktion sehr langsam.



Nach Inkubation für 30 Min bei 30°C wurde eine IC_{50} von 3 μM ermittelt; im Falle des ADP/ATP-Carriers lag sie bei $\geq 20 \mu\text{M}$. Die Differenzierung entsprach also nicht ganz der durch DEPC erreichten. Bei Inkubationszeiten von 20-30 Min schützte 1.25 mM Aspartat den Asp/Glu-Carrier nur partiell vor Inaktivierung durch 8 μM BPAB; 1.25 mM α -Ketoglutarat schützte überhaupt nicht. Dabei ist anzumerken, daß BPAB in anderen Proteinen auch Carboxylgruppen modifizierte (Gross & Morell 1966). Ein Zusatz von 5 mM Histidin unterdrückte die Wirkung von BPAB kaum, d. h. noch schlechter als im Falle von DEPC. Funktionelle Untersuchungen brachten weitere Unterschiede zur DEPC-Wirkung ans Licht. So hemmte BPAB nicht den durch Mersalyl induzierbaren Efflux. Stattdessen beobachtete man bei BPAB-Konzentrationen oberhalb von 30 μM eine schwache Effluxinduktion (vor allem von Aspartat, aber auch von ATP). Diese Beobachtungen erinnerten an die durch DIDS hervorgerufenen Effekte (Tab.XVIII). Die effluxinduzierende Wirkung von BPAB, wie die von Hg-Reagenzien, konnte durch vorherige Inkubation mit DEPC stark gehemmt werden.

Aus dieser kurzen Beschreibung der Wirkungen von BPAB auf die Transportfunktionen des Asp/Glu-Carriers wird deutlich, daß es in der oben aufgeworfenen Frage nach einem möglichen Histidin an der aktiven Bindungsstelle nicht entscheidend weiterhilft. Für ein Histidin spricht allein die Tatsache, daß ein zweites, als Histidin-spezifisch beschriebenes Reagens den Carrier aufgrund einer partiell durch Substrat schützbarer Reaktion inaktiviert. Obwohl die Unterschiede in den Wirkungen von BPAB und DEPC teilweise durch die verschiedenen chemischen Reaktionen (Alkylierung bzw. Acylierung) erklärt werden könnten, sind doch bei beiden Reagenzien Zweifel angebracht, ob sie tatsächlich mit einem Histidin des Asp/Glu-Carriers reagieren.

Wenn tatsächlich ein Histidin an der aktiven Bindungsstelle vorhanden sein sollte, so muß eine Nachbarschaft vor allem zu dem zuvor beschriebenen Lysin bestehen. Diese topographischen Beziehungen aller beschriebenen funktionellen Gruppen der aktiven Bindungsstelle werden in der allgemeinen Diskussion (10.4) in einem Arbeitsmodell zusammengefaßt (Abb.45 C).

10. Allgemeine Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transportfunktion verschiedener mitochondrialer Antiportcarrier in mechanistischer und struktureller Hinsicht untersucht. Die kapitelübergreifenden Themen waren dabei die asymmetrische Proteinorientierung in der Liposomenmembran, die Charakterisierung des kinetischen Transportmechanismus, die Induktion unidirektionaler Transportaktivität und die chemische Modifizierung funktioneller Aminosäure-Seitenketten. Diese Punkte sollen hier im Zusammenhang und insbesondere auch hinsichtlich ihrer allgemeinen Relevanz diskutiert werden.

10.1 Asymmetrische Rekonstitution von Membranproteinen

Die orientierte Rekonstitution von Membranproteinen wie dem Asp/Glu- (s. 3.) und dem Oxoglutarat-Carrier (s. 5.) ist recht außergewöhnlich, da sie im Vergleich zu anderen asymmetrisch rekonstituierten Proteinen (wie z. B. den Atmungskettenkomplexen) relativ klein sind. Dies belegt die Zweckmäßigkeit der angewendeten Rekonstitutionsmethode. Unter Anwendung von Techniken, die Einfrier-Auftau-Zyklen und/oder Ultraschall-Behandlung beinhalteten, konnten weder Carrierproteine wie der Hexose-Carrier aus Erythrocyten (Wheeler & Hinkle 1981) oder der Lactose-Carrier aus *Escherichia coli* (Seckler & Wright 1984) noch größere Proteine wie die Cytochrom c-Oxidase (Casey et al. 1982) mit signifikanter Präferenz einer Orientierung rekonstituiert werden. Im Falle des mitochondrialen ADP/ATP-Carriers schienen die zwei möglichen Orientierungen nach Einfrieren, Auftauen und Beschallung in unterschiedlichen Anteilen aufzutreten, wie sich durch Korrelation der CAT- bzw. BKA-Bindung mit dem Nucleotid-Transport aufzeigen ließ (Krämer & Klingenberg 1979). Wegen der hohen Hydrophobizität des BKA jedoch führte teilweise unspezifische Bindung vermutlich dazu, den Grad der Asymmetrie zu überschätzen (R. Krämer, unveröffentlichte Ergebnisse).

Andererseits gelang die Präparation von Proteoliposomen mit definierter Proteinorientierung in mehreren Fällen durch funktionelle Rekonstitution unter langsamer Entfernung des Detergens. Neben dem Asp/Glu- und dem Oxoglutarat-Carrier wurde durch hydrophobe Chromatographie auf Amberlite auch das Uncoupling-Protein aus Hamster-Mitochondrien unidirektional (right-side out) in Liposomen eingebaut (Klingenberg & Winkler 1986). Der Lactose-Carrier aus *E. coli* hingegen konnte durch Anwendung von Bio-Beads nicht asymmetrisch rekonstituiert werden (Seckler & Wright 1984). Die Entfernung des Detergens durch Dialyse führte bei mehreren Proteinen zu einer ausgerichteten Membran-Insertion. Auf diese Weise ließen sich verschiedene Komplexe der mitochondrialen Atmungskette vektoriell rekonstituieren. So wurde gezeigt, daß die Cytochrom c-Oxidase unter entsprechenden Bedingungen eine starke Neigung (etwa 85%) zugunsten ihrer nativen Orientierung aufweist (Casey et al. 1982). Weiterhin konnte das Anionen-Transportsystem menschlicher Erythrocyten (97 kDa) durch eine spezielle, auf Dialyse basierende Technik unidirektional rekonstituiert werden (Scheuring et al. 1986). Beide Methoden, Chromatographie auf Amberlite und Dialyse, gewährleisteten offenbar milde Bedingungen während der Rekonstitution, was die orientierte Integration des amphiphilen Proteinmoleküls in die Membran ermöglicht. Bei Beschallungsprozeduren hingegen bewirken die Kavitationskräfte ein ständiges Vermischen der zwei gegensätzlichen Proteinorientierungen, was letztlich zu einer bimodalen Insertion in die Membran führt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auch dadurch deutlich, daß sich mittels Ultraschall die Orientierung des asymmetrisch rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers wieder aufheben ließ (s. unten).

Die transmembrane Asymmetrie des rekonstituierten Asp/Glu-Carriers wird auch durch strukturelle Befunde gestützt. Die inhibitorische Wirkung des die Membran permeierenden PCMB konnte durch das nicht-permeable DTE zu 100% revertiert werden, selbst wenn man die Proteoliposomen mit hohem Überschuß an PCMB für lange Zeit inkubiert hatte (Tab.XV). Dies beweist die ausschließlich exofaziale Lage des betroffenen Cysteins. Die beschriebenen Untersuchungen zur Proteinorientierung des rekonstituierten Oxoglutarat-Carriers basierten dagegen ausschließlich auf funktionellen Eigenschaften des Translokators, nämlich seinen seitenspezifischen Transportaffinitäten. Daß diese Seitenspezifität kein Artefakt des Meßsystems war, belegten die absolut vergleichbaren K_m -Werte, die wir im Falle des Asp/Glu-Carriers auch in intakten Mitochondrien bestimmten (Tab.IV). Da für den Oxoglutarat-Carrier der Grad der Übereinstimmung mit den (publizierten) K_m -Werten intakter Mitochondrien für eine ähnlich klare Aussage nicht ausreichte, ließe sich das Argument vorbringen, daß die sich zwischen den beiden Membranseiten maximal um den Faktor zwei unterscheidenden Transportaffinitäten auf physikalische Spannungen infolge der Krümmung der Membran zurückzuführen sind. Obwohl diese Annahme ziemlich hypothetisch ist, wurden Experimente durchgeführt, um die Proteinorientierung umzudrehen bzw. zu vermischen. Nach Einfrieren und Auftauen der Proteoliposomen, gefolgt von einer Puls-Beschallung, war in der Tat eine statistische Verteilung der Proteintopologie detektierbar, wie aus dem Erscheinen der internen Bindungsstellen (mit höherer Affinität) auf der externen Membranoberfläche gefolgert werden mußte (Abb.13 B). Das beschriebene analytische System war also auch für den Oxoglutarat-Carrier ohne Einschränkung für die kinetische Untersuchung des Transportmechanismus geeignet.

10.2 Die kinetische Familie der mitochondrialen Antiporter

Aus der Reihe der spezifischen Antiportsysteme der inneren Mitochondrienmembran sind nur wenige ausreichend untersucht worden, um ihren Transportmechanismus kinetisch beschreiben zu können. Der erste Antiporter, der in intakten Mitochondrien als klassisches Bisubstratsystem analysiert wurde, war der Oxoglutarat-Carrier aus Rattenherz (Sluse et al. 1972). Die Ergebnisse führten zu dem Schluß, daß dieser Carrier einem sequentiellen Mechanismus folgt, dessen Charakteristikum das Auftreten eines ternären Komplexes des Proteins mit zwei Substrat-Liganden ist. Dabei wurde impliziert, daß dieser Komplex gleichzeitig das katalytische Intermediat darstellt, und es gab Evidenzen, daß dieses sich durch schnelle Bindung zweier Substratmoleküle (ohne strikte Reihenfolge) bildet. Trotz dieses klaren Modells ergaben nachfolgende Studien ein deutlich komplexeres Bild des Oxoglutarat-Carriers mit völlig unterschiedlichen Eigenschaften auf beiden Seiten der Membran (vgl. 5.). Weitere Versuche kinetischer Bisubstrat-Analysen in Mitochondrien hatten den Asp/Glu-Carrier (Murphy et al. 1979, LaNoue et al. 1979) und den ADP/ATP-Carrier zum Objekt (Barbour & Chan 1981, Duyckaerts et al. 1983, Sluse et al. 1989). Die Divergenz der dabei erzielten Ergebnisse wurde für den Asp/Glu-Carrier in 1.2, 3.1 und 4.1, für den ADP/ATP-Carrier in 4.4 erläutert.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des oben besprochenen Proteoliposomen-Systems (s. 10.1) der Beweis angetreten werden, daß sorgfältige kinetische Studien - in erster Linie Bisubstrat-Analysen - sehr wohl zu einer klaren Aussage über den katalytischen Mechanismus führen können. Der sequentielle Mechanismus vom rapid-equilibrium-random-Typ, der unter 4. und 5. ausführlich beschrieben wurde, erwies sich als gemeinsames Charakteristikum von Asp/Glu- und Oxoglutarat-Carrier. Das daraus abgeleitete Modell

(Abb.10, 45 A) ist deutlich einfacher (und symmetrischer) als aus den oben erwähnten Untersuchungen ganzer Mitochondrien gefordert wurde. Im Falle des Oxoglutarat-Carriers zeigte sich dennoch eine qualitative, im Falle des Asp/Glu-Carriers sogar eine quantitative Übereinstimmung zu den Befunden in Mitochondrien, wie die parallel in beiden Meßsystemen durchgeführten Experimente ergaben (s. 4.). Es fanden sich zwei unabhängige Substrat-Bindungsstellen, eine auf jeder Membranseite. Die Antiportgeschwindigkeit hing allein von der Sättigung dieser Bindungsstellen mit Substrat ab, ohne daß sich dabei die interne und die externe Stelle hinsichtlich ihrer Affinität gegenseitig beeinflussten. Kooperative oder allosterische Phänomene traten nicht auf. Während des Antiportzyklus fungiert ein ternärer Carrier-Substrat-Komplex mit je einem von beiden Seiten gebundenem Substratmolekül als Translokationsintermediat. Dieses bietet den Ansatzpunkt für die elektrophoretische Kontrolle des Asp/Glu-Antiports durch das Membranpotential.

An dieser Stelle ist zu erwähnen, daß der Transportmechanismus des ADP/ATP-Carriers, des am intensivsten studierten mitochondrialen Carriers, als 'gated-pore'-Mechanismus mit einer einzigen Bindungsstelle beschrieben wurde (Klingenberg 1976, 1981, 1989, vgl. 1.4), was kinetisch als Ping-Pong-Mechanismus zu klassifizieren wäre. Dieses Modell fußte in erster Linie auf Untersuchungen der Zugänglichkeit der Bindungsstellen in den zwei verschiedenen Konformationszuständen des Carriers, welche sich durch die seitenspezifischen Inhibitoren CAT und BKA blockieren ließen. Bindungsstudien führten allerdings auch zu alternativen Modellen mit mindestens einer Bindungsstelle auf jeder Seite der Membran (s. Block & Vignais 1984 und Zitate darin). In Übereinstimmung damit lieferten kinetische Analysen der Nucleotid-Austauschreaktion direkte Evidenzen für einen sequentiellen Mechanismus (Barbour & Chan 1981, Duyckaerts et al. 1983, Sluse et al. 1989). Somit läßt sich das generelle Konzept einer funktionellen Carrierfamilie entwickeln, die einem gemeinsamen kinetischen Transportmechanismus folgt. Aus dieser Familie, bis dato bestehend aus dem Asp/Glu-, dem Oxoglutarat- und dem ADP/ATP-Carrier, sind die zwei letztgenannten Transportsysteme gleichzeitig Mitglieder der strukturellen Familie (s. 1.3). Diese Überlappung, wenn sie sich auch für den Asp/Glu-Carrier erweisen sollte, könnte bedeuten, daß dieses Protein als Monomer funktioniert, da es ein etwa doppelt so hohes Molekulargewicht besitzt wie alle anderen bisher identifizierten Carrier aus Mitochondrien. Man hätte dann eine hexapartite Struktur zu fordern, die zur Bildung zwölf transmembraner Helizes geeignet wäre (vgl. 1.3). Eine 12-Helix-Struktur wird auch für viele (monomere) Carrier aus Bakterien sowie für andere Membranproteine mit Transportfunktion angenommen.

Die wesentlichste Aussage, die sich aus den durchgeführten Untersuchungen folgern läßt, betrifft die eingangs anhand des 'gated-pore'-Modells angestellten Betrachtungen zur Transportkatalyse (s. 1.4). Von den alternativen Varianten dieses Modells (s. S. 6) muß aufgrund der Forderung nach zwei gleichzeitig zugänglichen Bindungsstellen die Möglichkeit mit nur einem Bindungszentrum (in einem Kanal) ausscheiden. Eine solche von Klingenberg (1981) wegen einer 'half-of-the-sites-reactivity' des ADP/ATP-Carriers geforderte und bis heute verteidigte Konzeption kann zumindest für den Asp/Glu- und den Oxoglutarat-Carrier nicht zutreffen. Stattdessen müssen, will man dem 'gated-pore'-Modell weiterhin folgen, zwei Kanäle mit je einer Bindungsstelle favorisiert werden (Abb.45 A). Zwei Bindungsstellen in einem Kanal würden hingegen ein wesentlich komplexeres 'gating' als dem von Klingenberg (1981) als reziprozierend bezeichneten 'flip-flop'-Mechanismus bedingen. Diese deutlich erweiterten Vorstellungen sind mit den Vorschlägen zur Quartärstruktur mitochondrialer Carrier problemlos vereinbar (s. 1.3). Ein Zwei-Kanal-Modell setzt natürlich eine strenge Kooperativität beider Kanäle voraus. Möglicherweise ist die Beobachtung unidirektionaler Efflux-

aktivität, die in der vorliegenden Arbeit für den Asp/Glu- und den ADP/ATP-Carrier beschrieben wurde, ein Ausdruck der Störung dieser Kooperativität (vgl. 10.3 und 10.4).

Hinweise auf separate Kanäle lassen sich aus ersten Befunden zum Transportmechanismus des Dicarboxylat-Carriers ableiten. Obwohl sich hier noch erweisen muß, ob die wechselseitige Interaktion von internem und externem Substrat mit dem Carrier auch als sequentiell klassifiziert werden kann, bedeutet allein der Befund, daß auf der Membranaußenseite zwei separate Bindungsstellen existieren (s. 6.), denen auf der Innenseite ebenso zwei gegenüber stehen dürften, eine Herausforderung des generellen Carrier-Konzepts. Geht man von einem Homodimer als Funktionseinheit aus (s. 1.3), so sind zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Spezifitäten nach den bisherigen Ausführungen am ehesten mit je zwei Stellen in zwei Kanälen vereinbar. Die völlig unabhängige Besetzung dieser zwei verschiedenen Bindungsstellen durch die Substrate Malat bzw. Phosphat (s. 6.) spricht für eine oberflächliche Lokalisierung (keine 'half-of-the-sites-reactivity'). Alle vier Bindungsstellen in einem Kanal unterzubringen (zwei innen, zwei außen) bedeutete einen grundsätzlichen Widerspruch entweder zum sequentiellen Transportmechanismus, da im 'gated-pore'-Modell interne und externe Bindungsstellen eines Kanals nie gleichzeitig zugänglich sind (vgl. S. 6) oder zum 'gated-pore'-Mechanismus selbst, da das 'gating' eben nicht mehr reziprozierend ablaufen könnte.

Dies wirft Fragen auf, wie eine koordinierte Funktionsweise des Dicarboxylat-Carriers bei Anwesenheit beider Substrate der zwei unterschiedlichen Bindungsstellen möglich ist. Hier erwies es sich, daß aus der kinetischen Analyse auch Aussagen über die Regulation von Carriern gemacht werden können. Die erwähnte

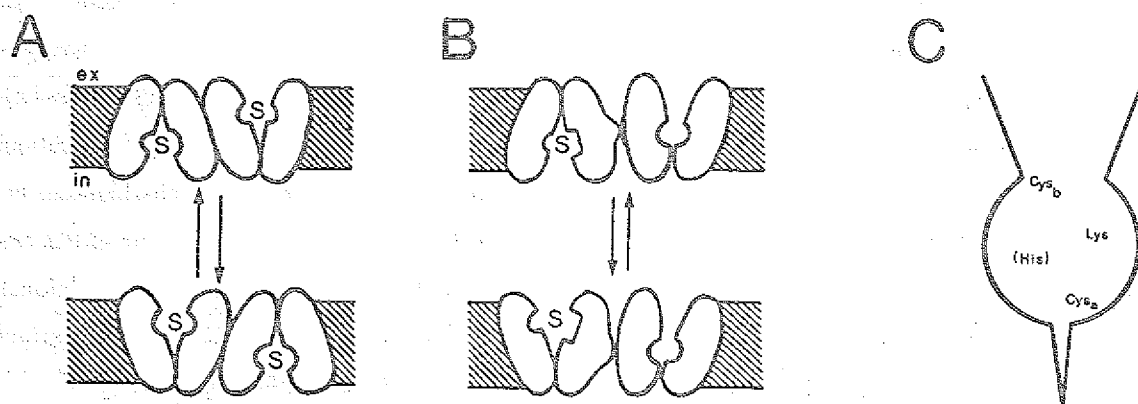


Abb.45: Erweitertes 'gated-pore'-Modell des Asp/Glu-Carriers. A: Antiportfunktion (vgl. Abb.10), B: Effluxfunktion; nur zwei Konformationszustände sind gezeigt. C: Topographisches Modell zur Lokalisierung einiger im Text näher charakterisierter funktioneller Aminosäure-Seitenketten. Nur die von außen zugängliche Bindungsstelle, die von den Modifizierungsreagenzien verändert wird, ist gezeigt. Nach Effluxinduktion durch Modifizierung von Cys_a und Cys_b ist sie - entkoppelt von der zweiten Bindungsstelle - alternierend von beiden Membranseiten aus zugänglich (vgl. B.) Die dargestellten Funktionseinheiten des Carriers (A, B) sind nicht als strukturelle Untereinheiten anzusehen.

unabhängige Besetzung beider (externer) Bindungsstellen führte zur Bildung eines transport-inkompetenten Komplexes (Abb.20). Die aus der nichtkompetitiven Hemmung (s. 6.3) zu fordernde rapid-equilibrium-Bindung der beiden externen Substrate Malat und Phosphat (zusammen mit dem internen Gegensubstrat!) verhindert jedoch, daß der inaktive Komplex die Transportfunktion in einer Art 'dead-end'-Komplex völlig blockiert (vgl. Fromm 1979). Dies dürfte auch in vivo relevant sein. Das Auftreten einer solchen Hemmung kann daher als sinnvolle Substrat- (bzw. Produkt-) Hemmung verstanden werden.

Beim Asp/Glu-Carrier gewährleistet die rapid-equilibrium-ordered-Bindung von H^+ und Glutamat (Gl. 4.3) die Kopplung dieses Cotransports auf eine Art und Weise, daß Homoaustausch-Zyklen vermindert stattfinden (s. 4.4). Diese kinetische Regulation einer beiden Substraten (Aspartat und Glutamat) gemeinsamen Bindungsstelle vermeidet Hemmeffekte, die bei zwei separaten Bindungsstellen auftreten könnten, wie gerade für den Dicarboxylat-Carrier dargelegt. Inwieweit der bei Asp/Glu- und Oxoglutarat-Carrier übereinstimmend gemachten Beobachtung einer random-Bindung der beiden Antiportsubstrate eine Bedeutung beizumessen ist, bleibt hingegen unklar. Ausschließlich vom Standpunkt der Katalyse aus betrachtet, ergibt sich kein Vorteil durch die random- gegenüber einer ordered-Bindung. Andererseits ist für einen Antiportprozess weniger das koordinierte Zusammenführen zweier Substrate, sondern vielmehr der gekoppelte Gegentransport entscheidend. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß bei dem hier abgeleiteten Modell eines konzertierten Transports beider Gegensubstrate eine schnelle, nicht-limitierende Bindung (random oder ordered) zur Ausbildung des katalytischen Komplexes möglicherweise eine wichtige Bedingung für eine effiziente Funktion ist.

10.3 Transportkatalyse nach dem erweiterten 'gated-pore'-Modell: funktionelle, energetische und strukturelle Aspekte

Die unter 7. und 8. beschriebenen Eigenschaften der unidirektionalen Effluxaktivität, die sich durch SH-Modifizierung des Asp/Glu- und des ADP/ATP-Carriers induzieren ließ, geben einen tieferen Einblick in die eigentliche Transportkatalyse, d. h. in die Translokation des einzelnen Substrats. Efflux ist ein gegenüber dem Antiport deutlich vereinfachter Modus des Transports. Einige Schritte des gesamten Translokationsvorgangs sind eliminiert, so die spezifische Bindung zweier Substratmoleküle unter Ausbildung des katalytischen ternären Komplexes und so auch der konzertierte Transport dieser Moleküle in entgegengesetzte Richtungen (vgl. 10.2). Aus dieser reduzierten Komplexität läßt sich folgern, daß neue Aspekte des Durchschleusens eines Substratmoleküls durch das Carrierprotein ans Licht gebracht wurden. Welches Modell auch immer das reversible Umschalten des Transportmechanismus auf molekularer Ebene korrekt beschreibt, unsere funktionellen Ergebnisse lassen sich folgerichtig interpretieren unter Annahme eines präformierten Kanals als struktureller Voraussetzung für die Substrattranslokation, und zwar für den Antiport wie den Efflux (vgl. 8.4).

Nach den eingangs angestellten Betrachtungen zur Energetik des 'gated-pore'-Modells bedarf es für einen effektiven Transport einer festen intrinsischen Bindung des Substrats im Übergangszustand (s. 1.4). Die dabei frei werdende Bindungsenergie bestimmt nach Krupka (1989) zugleich die Transportrate, die Substratspezifität und auch den Grad der Antiport-Kopplung. Von der SH-Modifizierung wurden offensichtlich alle drei Parameter betroffen. Beim Aspartat- und beim ATP-Effluxcarrier war die Aufhebung der Kopplung mit einer drastischen Reduktion der Substratspezifität (zumindest beim Asp/Glu-Carrier) und der Transportrate (vor allem beim ADP/ATP-Carrier) verbunden. Dies legt nahe, daß die angewendeten Reagenzien mit der intrin-

sischen Bindung des Substrats interferieren. Dementsprechend war auch die Aktivierungsenergie des Effluxes gegenüber der des Antiports eher erhöht als erniedrigt (bei iso-osmotischen Bedingungen, s. 8.3). Nimmt man entsprechend des erweiterten 'gated-pore'-Modells an, daß die modifizierte von den zwei intrinsischen Bindungsstellen selbst in Abwesenheit von externem Substrat alternierend von beiden Membranseiten aus zugänglich ist (Abb.45 B), so erklären sich auch die *trans*-Effekte der exofazial angewendeten Reagenzien auf den von innen nach außen gerichteten unidirektionalen Transport; (zur Zugänglichkeit funktioneller Gruppen von beiden Seiten der Permeabilitätsbarriere siehe auch Bogner et al. 1986 und Jennings & Al-Rhaiyel 1988). Davon zu unterscheiden ist die sogenannte *trans*-Inhibition des Netto-Fluxes durch extern anwesendes Substrat (s. 8.). Die Spezifität dieses Effektes ließ die Beteiligung der zweiten, extern zugänglichen Bindungsstelle des Asp/Glu-Carriers vermuten, was zum einen belegt, daß eine zweite Bindungsstelle existiert, und zum anderen, daß eine Kopplung noch ansatzweise vorhanden ist.

Nach dem 'gated-pore'-Modell sind die intrinsische Bindung (und damit auch die Kopplung) mit dem 'gating' der Pore eng verbunden. Beides ist ganz offensichtlich mit der korrekten räumlichen Position von Cystein-Seitenketten korreliert, von denen beim Asp/Glu-Carrier mindestens eine der aktiven Bindungsstelle zugeordnet werden konnte (s. 10.4). Das gestörte 'gating' ließ die Poren-Eigenschaften deutlicher zutage treten. Dies zeigte sich darin, daß offenbar die Größe der Pore die Selektivität des Transports bestimmte. Die Erkennung angemessener Substrate durch die Bindungsstelle auf der Membraninnenseite war nahezu ausgeschaltet (K_m unmeßbar). Möglicherweise drückt auch der nach Fluidisierung der Liposomenmembran deutlich gesteigerte Flux, begleitet von einer erniedrigten Aktivierungsenergie (s. 8.3.5), die dominierende Rolle der Kanalstruktur im Efflux-Zustand (nicht aber im Antiport-Zustand) aus.

Auch die physiologische Funktion des Asp/Glu-Carriers kann durch ein reines Carrier-Modell mit einem Übergang zwischen zwei ausschließlichen Konformationen nicht ausreichend beschrieben werden. Ein langsamer unidirektionaler Flux war auch ohne Modifizierung zu beobachten. Umfangreiche theoretische Betrachtungen von Läuger (1980, 1985) über die Dynamik und Energiebarrieren von Transportvorgängen berechtigen die Forderung nach einer kanalartigen Struktur für verschiedene Klassen von Transportproteinen. Wie in diesen Studien abgeleitet wurde, dürften viele Transportsysteme nach einem intermediären Mechanismus zwischen einem reinen Carrier und einem reinen Kanal funktionieren. Unsere experimentellen Daten führen zu ähnlichen Schlußfolgerungen für den Asp/Glu-Carrier, die höchstwahrscheinlich auch für den ADP/ATP-Carrier relevant sind und möglicherweise auch auf weitere Transportsysteme übertragen werden können (s. 8.4). Diese Sichtweise impliziert ein mobiles Substrat, das sich während der Translokation relativ zum Protein bewegt, und widerspricht somit jeglichem Modell mit mobilen Bindungsstellen, die zusammen mit dem gebundenen Substrat die Lipid-Doppelschicht überqueren - etwa infolge eines dramatischen Konformationswechsels des gesamten Proteins. Zu der Erkenntnis, daß eine Kanalstruktur für den Transport durch biologische Membranen ein generelles Prinzip zu sein scheint, kommen auch Falke & Chan (1986a) aufgrund struktureller und funktioneller Befunde zum Anionenaustauscher aus Erythrocyten. Und selbst bei einem so andersartigen Transportsystem wie dem bakteriellen Phosphotransferase-System wird eine enge, hydrophile Pore, gebildet durch die EII-Komponente, intensiv diskutiert (Lengeler 1990); die Permeabilität dieser Pore ließ sich nach molekularbiologischer Deletion der anderen Komponenten tatsächlich messen. Im Unterschied zu klassischen Kanälen überbrückt die Porenstruktur eines Carriers jedoch nicht den ganzen Transportweg, sondern nur die Distanz vor und hinter der intrinsischen Bindungsstelle.

10.4 Einblicke in die Topographie der exofazial zugänglichen Bindungsstelle

Die in den Kapiteln 7 bis 9 beschriebenen Experimente mit einer Vielzahl Aminosäure-reaktiver Modifizierungsreagenzien führten zur funktionellen Charakterisierung (a) eines essentiellen Lysins, (b) zweier essentieller Cysteine und (c) eventuell auch eines essentiellen Histidins des Asp/Glu-Carriers. Diese Seitenketten lassen sich wie folgt beschreiben und differenzieren.

Das genannte Lysin wurde eindeutig durch die Reagenzien PLP und EDC/Carbonsäure, sehr wahrscheinlich durch die Isothiocyanostilbendisulfonate SITS und DIDS sowie möglicherweise (s. unten) auch durch DEPC modifiziert (vgl. Tab.XIII). Am genauesten wurde dabei die neuartige, durch EDC katalysierte Acylierung dieses Lysins untersucht. Das Ungewöhnliche an dieser Reaktion ist die außerordentlich hohe Reaktivität der betroffenen ϵ -Aminogruppe bei pH-Werten von 6.2-6.5, was einen für Lysin sehr tiefen pK bedingt. In der Literatur wurde kürzlich eine durch ein ähnliches Carbodiimid (1-Ethyl-3-(3-trimethylaminopropyl)-carbodiimid, ETC) vermittelte Citrylierung eines Lysinrestes (pK 7-8) des Anionencarriers aus Erythrocyten beschrieben (Werner & Reithmeier 1988). Der Reaktionsmechanismus des ETC wurde - nach ersten Fehlinterpretationen (Craik & Reithmeier 1984, 1985) - analog der in Gl. 9.4 formulierten Reaktionsgleichung angegeben.

Die Modifizierung des angesprochenen Histidins durch DEPC, ein als stark Histidin-spezifisch beschriebenes Reagens, ist wegen der hohen Reaktivität des genannten Lysins anzuzweifeln. Ähnlich wie bei EDC ließ sich auch die Inaktivierung durch DEPC mit PLP stark unterdrücken. EDC, DEPC und PLP führten alle nicht nur zur Inhibition der Antiportaktivität, sondern verhinderten außerdem die Induktion der Effluxaktivität (s. unten). Da aber auch klare Unterschiede in der Reaktivität von DEPC und EDC festgestellt wurden (Abb.39 A), soll zumindest die Möglichkeit eines funktionellen Histidins in das topographische Modell aufgenommen werden (Abb.45 C).

Die zwei Cysteine ließen sich in mehrfacher Hinsicht differenzieren. Allein funktionell galt es drei Beobachtungen zu erklären: (a) die Antiportinhibition durch alle beschriebenen SH-Reagenzien (bereits bei tiefer Konzentration), (b) die Effluxinduktion durch $HgCl_2$, Mersalyl und PCMS (Mersalyl und PCMS nur bei deutlich höherer Konzentration, vgl. Tab.XIII) und (c) die Hemmung des sogenannten Grundeffluxes durch DTNB (Abb.21) und NBD-Cl. Die Zuordnung dieser Effekte zu den zwei Cysteinen (Cys_a und Cys_b) erfolgte auch unter Berücksichtigung der unten aufgeführten topographischen Kriterien. Demnach führt die Modifizierung von Cys_a oder Cys_b zur Antiportinhibition und die von Cys_a außerdem zur Grundeffluxhemmung. Sind sowohl Cys_a als auch Cys_b verändert, kommt es zur Effluxinduktion unter Beibehaltung der Antiporthemmung.

Um aus dieser funktionellen zu einer annäherungsweise topographischen Beschreibung zu gelangen, wurden folgende zwei Kriterien zugrunde gelegt. Ein spezifischer Substratschutz gegen die Wirkung des jeweiligen Reagenzes bei Anwesenheit niedriger Substratkonzentrationen (im K_m -Bereich) wurde in jedem Fall als Indiz für eine Reaktion am aktiven Zentrum angesehen. Ein solcher Schutz war für die Reagenzien PLP (Lysin), EDC (Lysin), DEPC (Lysin oder Histidin) und NBD-Cl (Cys_a) zu beobachten. Außerdem war in Anwesenheit von Substrat eine Effluxinduktion weder durch $HgCl_2$ noch durch Mersalyl (Cys_a und/oder Cys_b) möglich; (PCMS wurde nicht getestet). Ein Schutz vor irreversibler Modifizierung durch reversible Substratbindung ist bei schnell wirkenden Reagenzien nicht unbedingt zu erwarten. Als zweiter Gesichtspunkt diente daher die Konkurrenz eines Reagenzes mit den gerade genannten Bindungsstellen-Inhibitoren. Hierbei mußte

allerdings berücksichtigt werden, daß einige Reagenzien mehrere Wirkorte hatten. Außerdem war es nicht immer möglich, eine direkte Konkurrenz (um denselben Aminosäure-Rest) von sterischen Effekten (benachbarter Reste) zu unterscheiden.

Abb.45 C gibt ein Arbeitsmodell zur Topographie der genannten Aminosäure-Seitenketten wieder. Das reaktive Lysin (Lys) und Cys_a sitzen direkt benachbart am aktiven Bindungszentrum. PLP (Lys) unterdrückte die Wirksamkeit größerer SH-Reagenzien wie DTNB, Mersalyl und Hg/EDTA, nicht aber die von HgCl₂ und kaum die von PCMB, PCMS und NBD-Cl (Tab.XIX). Umgekehrt reduzierte DTNB (Cys_a) die Effektivität der Antiportinhibition durch EDC (Lys). Da diese sterischen Interaktionen von Lysin- und Cystein-Reagenzien an der externen Bindungsstelle nicht für jedes SH-Reagens und jede der beschriebenen Wirkungen eindeutig zu klären waren, wurden sowohl Cys_a als auch Cys_b der Nachbarschaft des Lysins zugeordnet, wobei jedoch deutlich wird, daß das Lysin - nach Modifizierung - das Cys_a deutlich stärker abschirmt als das Cys_b. Außerdem unterliegt nur das mehr endofazial gelegene Cys_a, nicht aber das Cys_b am exofazialen Rande der Bindungsstelle einer Protektion durch die Bindung von Substrat. Da PLP und teilweise auch DTNB vor der Wirkung von DEPC genauso schützten wie vor der des EDC, wurde das putative Histidin (His) ebenfalls in die Nähe von Lys und Cys_a gezeichnet.

Dieses relativ einfache Modell erklärt vor allem, daß die Effluxinduktion durch SH-Modifizierung mit der oben diskutierten intrinsischen Bindung des Substrats interferiert (vgl. 10.3) und weiterhin daß die Modifizierung des Lysins (und eventuell auch des Histidins) die Effluxinduktion verhindert. Dabei ist zu betonen, daß die chemischen Veränderungen nur an der exofazial zugänglichen Bindungsstelle erfolgen können (Abb.45 C). Zur Effluxinduktion bedarf es somit entweder eines *trans*-Effektes auf die endofazial zugängliche Bindungsstelle, oder aber es kommt, wie in Abb.45B dargestellt, infolge der Entkopplung zu einem unidirektionalen Transport, an dem nur die modifizierte Bindungsstelle teilnimmt. Letztere, wesentlich direktere Deutung der *trans*-Effekte bestätigt, wie bereits erwähnt wurde, prinzipiell das 'gated-pore'-Modell, wobei für den Antiport ein Zwei- und für den Efflux ein Ein-Kanal-Modell favorisiert werden muß (Abb.45).

Das vorgestellte Modell bedarf weiterer Untermuerung vor allem auf der molekularen Ebene. Dabei wird die Identifizierung der angesprochenen funktionellen Gruppen in der (zu ermittelnden) Aminosäure-Sequenz des Asp/Glu-Carriers angestrebt.

11. Zusammenfassung

Vier der wichtigsten mitochondrialen Antiportcarrier wurden in liposomale Membranen rekonstituiert. Dieses Meßsystem mit aufgereinigtem Carrierprotein ermöglichte es, mechanistische und - im Falle des Asp/Glu-Carriers - auch strukturelle Aspekte der Transportkatalyse unter definierten Bedingungen zu untersuchen.

1. Methodische Limitierungen ließen sich durch den kombinierten Einsatz von Vor- und Rücktausch-Technik weitestgehend beseitigen. Die Transportaffinitäten auf beiden Seiten der Membran wurden ermittelt und auch die Seitenspezifität der somit charakterisierten Bindungsstellen. Für den so untersuchten Asp/Glu- und Oxoglutarat-Carrier ergab sich eine asymmetrische Orientierung der Proteine in der Liposomenmembran.
2. Wie in Proteoliposomen so zeigte sich auch in intakten Mitochondrien, daß der Asp/Glu-Carrier auf seiner externen Seite eine deutlich höhere Affinität für Aspartat besitzt (K_m 123 bzw. 216 μM) als auf der internen Seite (K_m 2.8 bzw. 2.4 mM). Diese vergleichende Studie in den verschiedenen Meßsystemen belegt eine right-side-out-Orientierung des rekonstituierten Carriers sowie eine dem nativen Carrier entsprechende Funktionalität.
3. Bisubstrat-Analysen des rekonstituierten Asp/Glu-Antiports ergaben kinetische Muster, die nur mit der Bildung eines ternären Carrier-Substrat-Komplexes infolge sequentieller Besetzung zweier Bindungsstellen erklärbar sind. Kompetitionsstudien waren konsistent mit je einer Bindungsstelle auf jeder Seite der Membran. Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften des Asp/Asp-Homöo-austausches führten zu dem Schluß, daß das Translokationsintermediat eine transmembran-symmetrische Ladungsverteilung hat - im Einklang mit einem ternären Komplex mit je einem von jeder Seite gebundenen Substratmolekül. Ein solcher katalytischer Komplex sollte beide Substrate in einem konzertierten Schritt translozieren. Vergleichende Analysen in Mitochondrien bestätigten den sequentiellen Transportmechanismus vollständig. In beiden Systemen kam man zu dem Ergebnis, daß sich der funktionelle ternäre Komplex durch schnelle und unabhängige Bindung von internem und externem Substrat bildet (rapid-equilibrium-random-Mechanismus). Zur Bindung von Glutamat bedarf es zusätzlich der vorherigen (schnellen) Protonierung einer separaten H^+ -Bindungsstelle (rapid-equilibrium ordered).
4. Bisubstrat-Analysen führten auch beim Oxoglutarat-Carrier zu einem sequentiellen Mechanismus mit rapid-equilibrium-random-Bindungsschritten. Zieht man veröffentlichte Daten zum Mechanismus des ADP/ATP-Carriers hinzu, so zeichnet sich ein Konzept ab, wonach die Familie der mitochondrialen Antiporter einem gemeinsamen kinetischen Transportmechanismus folgt.
5. Im Unterschied zu Asp/Glu- und Oxoglutarat-Carrier ließen sich beim Dicarboxylat-Carrier auf der exofazialen Seite zwei Bindungsstellen kinetisch eindeutig unterscheiden. Diesen Stellen wurden die zahlreichen Substrate und Inhibitoren dieses Carriers wie folgt zugeordnet: Dicarboxylate (und deren Derivate), Sulfat und Sulfid einerseits sowie Phosphat, Arsenat und Thiosulfat andererseits. Liganden aus einer Klasse zeigten eine kompetitive Interaktion mit dem Carrier, wohingegen Liganden aus verschiedenen Klassen rein nicht-kompetitiv wechselwirkten. Wurden beide Bindungsstellen gleichzeitig mit Malat bzw. Phosphat gesättigt, so war der Gesamtumsatz des Carriers infolge Bildung eines transport-inkompetenten Komplexes beträchtlich reduziert.
6. Asp/Glu- und ADP/ATP-Carrier ließen sich durch Modifizierung mit SH-Reagenzien von obligaten Gegentauch-Carriern in unidirektionale Effluxcarrier umwandeln. Die Effluxinduktion war stets mit einer Antiportinhibition gekoppelt. Aspartat- und ATP-Efflux beruhte auf intakt rekonstituiertem Carrierprotein und konnte eindeutig mit dem Asp/Glu- bzw. ADP/ATP-Carrier korreliert werden. Antiport- und Effluxaktivität wurden jeweils zusammen gereinigt. Diese Befunde sind Indizien für die Beteiligung von Carriersystemen an dem vielfach beschriebenen Permeabilitätsanstieg der Mitochondrienmembran nach Behandlung mit SH-Reagenzien.
7. Die exofazial angewendeten Effluxinduktoren führten zu einem unmeßbar hohen K_m und zu einer drastisch reduzierten Substratspezifität der internen Bindungsstelle des Asp/Glu-Carriers. Das Substratspektrum reflek-

tierte Poren-Eigenschaften. Wichtige Carrier-Eigenschaften, die erhalten blieben, waren die niedrigen Transportraten und die hohe Aktivierungsenergie (86 kJ/mol). Die beobachtete *trans*-Inhibition des Effluxes durch externes Substrat offenbarte zudem eine Involvement auch der externen Bindungsstelle. Eine Reversion zum Antiport-Zustand wurde mit DTE erreicht, wodurch auch Substratspezifität und Sättigungskinetik wiederhergestellt wurden. Zur Antiport-Efflux-Interkonversion mußten zwei reaktive Cysteine modifiziert werden. Niedrige Reagens/Protein-Dosen führten zu einem völlig inaktiven Intermediat. Die porenartigen Charakteristika des Effluxes werden im Einklang mit theoretischen Betrachtungen als Hinweis auf eine Protein-immanente Kanalstruktur gewertet, die eine Voraussetzung auch für die physiologische Substrattranslokation (Antiport) darstellt.

8. Ein funktionelles, mit PLP reagierendes Lysin am aktiven Zentrum des Asp/Glu-Carriers konnte näher charakterisiert werden. In einer neuartigen Modifizierungsreaktion führte EDC zu einer Carbodiimid-aktivierten Acylierung dieses Lysins, wie durch radioaktive Markierung nachgewiesen wurde. Wie bei EDC so ließ sich auch die Inaktivierung durch DEPC spezifisch mit Aspartat und Glutamat sowie mit PLP unterdrücken. Ein Substratschutz von 50% wurde jeweils bei Halbsättigung der externen Bindungsstelle beobachtet. Es ergaben sich Hinweise, daß das DEPC nicht ein Histidin, sondern ebenfalls das angesprochene Lysin modifiziert. PLP, EDC und DEPC waren die einzigen Reagenzien, die neben der Antiport- auch die Effluxaktivität wirkungsvoll inhibierten.

9. Damit übereinstimmend konnte eines der an der Effluxinduktion beteiligten Cysteine der Nachbarschaft des genannten Lysins zugeordnet werden. Aspartat unterdrückte die Effluxinduktion grundsätzlich. PLP reduzierte die Wirksamkeit größerer SH-Reagenzien wie DTNB, Mersalyl oder Hg/EDTA. Umgekehrt verminderte DTNB die Effektivität von EDC. Daß sich unter diesen SH-Reagenzien auch Nicht-Effluxinduktoren befinden, belegt erneut, daß eine weitere SH-Gruppe modifiziert werden muß, um den Efflux-Zustand zu induzieren. Eine selektive Veränderung des Bindungsstellen-Cysteins gelang durch NBD-Cl.

Die genannten kinetischen, energetischen und strukturellen Befunde führten zur Entwicklung eines umfassenden Funktionsmodells für den Asp/Glu-Carrier sowie für die Familie der mitochondrialen Carrier im allgemeinen.

12. Literaturverzeichnis

- Aboderin, A.A., Boedefeld, E. & Luisi, P.L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 328, 20-30.
- Anderson, B.M., Anderson, C.D. & Churchich, J.E. (1966) *Biochemistry* 5, 2893-2900.
- Aquila, H., Eiermann, W. & Klingenberg, M. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 133-139.
- Aquila, H., Link, T. A. & Klingenberg, M. (1985) *EMBO J.* 4, 2369-2376.
- Aquila, H., Link, T. A. & Klingenberg, M. (1987) *FEBS Lett.* 212, 1-9.
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. & Klingenberg, M. (1982) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 363, 345-349.
- Armstrong, A.E., Halestrap, A.P. & Scott, R.D. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 681, 429-439.
- Augustin, W., Gellerich, F., Wiswedel, I., Evtodienko, Y. & Zinchenko, V. (1979) *FEBS Lett.* 107, 151-154.
- Avaeva, S.M. & Krasnova, V.I. (1975) *Bioorg. Khim.* 1, 1600.
- Bagert, U. & Röhm, K.H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 999, 36-41.
- Barbour, R. L. & Chan, S. H. P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1940-1948.
- Beatrice, M.C., Palmer, J.W. & Pfeiffer, D.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8663-8671.
- Beatrice, M.C., Stiers, D.L. & Pfeiffer, D.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1279-1287.
- Beavis, A.D. (1989) *Eur. J. Biochem.* 185, 511-519.
- Benz, R. (1985) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 19, 145-190.
- Benz, R., Wojtczak, L., Bosch, W. & Brdiczka, D. (1988) *FEBS Lett.* 231, 75-80.
- Birkett, D.J., Price, N.C., Radda, G.K. & Salmon, A.G. (1970) *FEBS Lett.* 6, 346-348.
- Bisaccia, F., De Palma, A. & Palmieri, F. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 171-176.
- Bisaccia, F., Indiveri, C. & Palmieri, F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 810, 362-369.
- Bisaccia, F., Indiveri, C. & Palmieri, F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 933, 229-240.
- Block, M. C. & Vignais, P. V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 767, 369-376.
- Bogner, W., Aquila, H. & Klingenberg, M. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161, 611-620.
- Bogucka, K. & Wojtczak, L. (1979) *FEBS Lett.* 100, 301-304.
- Boos, K.S. & Schlimme, E. (1981) *FEBS Lett.* 127, 40-44.
- Boulay, F., Lauquin, G. J. M., Tsugita, A. & Vignais, P. V. (1983) *Biochemistry* 22, 477-484.
- Brahm, J. (1977) *J. Gen. Physiol.* 70, 283-306.
- Broekemeyer, K.M., Schmid, P.C., Schmid, H.H.O. & Pfeiffer, D.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 105-113.
- Burstein, Y., Walsh, K.A. & Neurath, H. (1974) *Biochemistry* 13, 205.
- Cabantchik, I.Z., Balshin, M., Breuer, W. & Rothstein, A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 5130-5136.
- Carbonera, D. & Azzone, G.F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 943, 245-255.
- Carraway, K.L. & Koshland, D. E., Jr. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 160, 272-274.
- Carraway, K.L. & Koshland, D. E., Jr. (1972) *Methods Enzymol.* 25, 616-623.
- Casey, R. P., Ariano, B. H. & Azzi, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 313-318.
- Chappell, J.B. (1968) *Br. Med. Bull.* 24, 150-157.
- Chappell, J.B. & Haarhoff, K.N. (1967) in *Biochemistry of Mitochondria* (Kaniuga, Z., Slater, E. C. & Wojtczak, L., Eds.), S. 75, Academic Press, London.
- Chávez, E., Zazucta, C., Díaz, E. & Holoquín J. A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 986, 27-32.
- Chen, P. S., Jr., Toribara, T. Y. & Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
- Churchich, J.E. (1965) *Biochemistry* 4, 1405-1410.
- Cleland, W. W. (1970) in *The Enzymes*, Vol.2 (Boyer, P. D., Ed.), S. 1-65, Academic Press, New York.
- Cohen, L.A. (1970) in *The Enzymes*, Vol.2 (Boyer, P. D., Ed.), S. 147-211, Academic Press, New York.
- Coty, W.A. & Pedersen, P.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2593-2598.

- Craik, J. D. & Reithmeier, R. A. F. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 778, 429-434.
- Craik, J. D. & Reithmeier, R. A. F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2404-2408.
- Crestfield, A.M., Stein, W.H. & Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2413-2420.
- Crompton, M., Palmieri, F., Capano, M. & Quagliariello, E. (1974a) *Biochem. J.* 142, 127-137.
- Crompton, M., Palmieri, F., Capano, M. & Quagliariello, E. (1974b) *FEBS Lett.* 46, 247-250.
- Crompton, M., Palmieri, F., Capano, M. & Quagliariello, E. (1975) *Biochem. J.* 146, 667-673.
- Dalbey, R.E. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 253-257.
- Davidson, A.M. & Halestrap, A.P. (1987) *Biochem. J.* 246, 715-723.
- De Blas, A.L. & Cherwinski, H.M. (1983) *Anal. Biochem.* 133, 214-219.
- De Pinto, V., Prezioso, G. & Palmieri, F. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 905, 499-502.
- Dcuticke, B. (1986) *Membrane Biochem.* 6, 309-326.
- Dierks, T. & Krämer, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 937, 112-126.
- Dierks, T. & Krämer, R. (1989a) in *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes* (Azzi, A., Nalecz, K. A., Nalecz, M. J. & Wojtczak, L., Eds.), S. 99-110, Springer Verlag, Berlin.
- Dierks, T. & Krämer, R. (1989b) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 655.
- Dierks, T. & Krämer, R. (1989c) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 887.
- Dierks, T. & Krämer, R. (1990) *Abstr. Sixth Eur. Bioenerg. Conf.* (Noordwijkerhout), S. 30, Elsevier, Amsterdam.
- Dierks, T., Riemer, E. & Krämer, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 943, 231-244.
- Dierks, T., Salentin, A., Heberger, C. & Krämer, R. (1990a) *Biochim. Biophys. Acta* 1028, 268-280.
- Dierks, T., Salentin, A. & Krämer, R. (1990b) *Biochim. Biophys. Acta* 1028, 281-288.
- Dixon, M. (1953) *Biochem. J.* 55, 170-171.
- Dulley, J. R. & Grieve, P. A. (1975) *Anal. Biochem.* 64, 136-141.
- Dunn, B.M., Anfinsen, C.B. & Shrager, R.I. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3717-3723.
- Duszynski, J., Mueller, G. & LaNoue, K. F. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 6149-6157.
- Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M., Fux, J. P., Sluse, F. E. & Liebecq, C. (1980) *Eur. J. Biochem.* 106, 1-6.
- Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M., Fux, J. P., Sluse, F. E. & Liébecq, C. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 397-406.
- Evens, A., Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M., Dierks, T., Krämer, R. & Sluse, F. E. (1990) *Abstr. Sixth Eur. Bioenerg. Conf.* (Noordwijkerhout), S. 36, Elsevier, Amsterdam.
- Falke, J.J. & Chan, S.I. (1986a) *Biochemistry* 25, 7895-7898.
- Falke, J.J. & Chan, S.I. (1986b) *Biochemistry* 25, 7899-7906.
- Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. & Radda, G.K. (1975) *Eur. J. Biochem.* 54, 127-133.
- Fohlman, J., Eakler, D., Dowdall, M.J., Lüllmann-Rauch, R., Sjödin, T. & Leander, S. (1979) *Eur. J. Biochem.* 94, 531-540.
- Fonyó, A. (1979) *Pharmacol. Ther.* 7, 627-645.
- Fonyó, A. & Bessmann, S.P. (1968) *Biochem. Med.* 2, 145-163.
- Fröhlich, O. (1988) *J. Membrane Biol.* 101, 189-198.
- Fröhlich, O., Leibson, C. & Gunn, R.B. (1983) *J. Gen. Physiol.* 81, 127-152.
- Fromm, H. J. (1979) *Methods Enzymol.* 63, 42-53.
- Garlid, K.D. & Beavis, A.D. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 853, 187-204.
- Garrison, C.K. & Himes, R.H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1251.
- Gross, A., Brückner, G., Heldt, H.W. & Flüge, U.I. (1990) *Plant Physiol.*, im Druck.
- Gross, E. & Morell, J.L. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3638.
- Hackenberg, H. & Klingenberg, M. (1980) *Biochemistry* 19, 548-555.

- Haiker, H. (1988) Dissertation, Düsseldorf.
- Halestrap, A.P. (1976) *Biochem. J.* 156, 181-183.
- Halle-Smith, S.C., Murray, A.G. & Selwyn, M.J. (1988) *Abstr. Fifth Eur. Bioenerg. Conf. (Aberystwyth)*, S. 205.
- Harris, E.J., Al-Shaikhaly, M. & Baum, H. (1979) *Biochem. J.* 182, 455-464.
- Hartman, F.C. & Norton, I.L. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 479-498.
- Hartman, F.C. & Wold, F. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 3890-3891.
- Helenius, A. & Simons, K. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3656-3661.
- Hüther, F.J. & Kadenbach, B. (1984) *Eur. J. Biochem.* 143, 79-82.
- Indiveri, C., Capobianco, L., Krämer, R. & Palmieri, F. (1989a) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 187-193.
- Indiveri, C., Dierks, T., Krämer, R. & Palmieri, F. (1989b) *Biochim. Biophys. Acta* 977, 194-199.
- Indiveri, C., Dierks, T., Krämer, R. & Palmieri, F. (1990) *Eur. J. Biochem.*, im Druck.
- Indiveri, C., Krämer, R. & Palmieri, F. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 15979-15984.
- Indiveri, C., Palmieri, F., Bisaccia, F. & Krämer, R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 890, 310-318.
- Jennings, M. L. & Al-Rhaiyel, S. (1988) *J. Gen. Physiol.* 92, 161-178.
- Jennings, M.L. & Anderson, M.P. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1691-1697.
- Jezek, P. (1987) *FEBS Lett.* 211, 89-93.
- Jones, B. N. & Gilligan, J. P. (1983) *J. Chromatogr.* 266, 471-482.
- Kampmann, L., Lepke, S., Fasold, H., Fritzsche, G. & Passow, H. (1982) *J. Membrane Biol.* 70, 199-216.
- Kaplan, J.H., Pring, M. & Passow, H. (1983) *FEBS Lett.* 156, 175-179.
- Kaplan, R.S. & Pedersen, P.L. (1983) *Biochem. J.* 212, 279-288.
- Klingenberg, M. (1976) in *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol.3 (Martonosi, A. N., Ed.), S. 383-438, Plenum Publ. C., New York.
- Klingenberg, M. (1981) *Nature* 290, 449-454.
- Klingenberg, M. (1985) in *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol.4 (Martonosi, A. N., Ed.), S. 511-553, Plenum Publ. C., New York.
- Klingenberg, M. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 1-14.
- Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 680-684.
- Klingenberg, M. & Winkler, E. (1986) *Methods Enzymol.* 127, 772-779.
- Klingenberg, M., von Haefen, H. & Wenske, G. (1965) *Biochem. Z.* 343, 452-478.
- Knauf, P.A., Law, F.Y. & Marchant, P.J. (1983) *J. Gen. Physiol.* 81, 95-126.
- Knight, V.A., Settlemire, C.T. & Brierley, G.P. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 287-293.
- König, T., Stipani, I., Horváth, I. & Palmieri, F. (1982) *J. Bioenerg. Biomembr.* 14, 297-305.
- Koshland, D. E. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44, 98-99.
- Krämer, R. (1984) *FEBS Lett.* 176, 351-354.
- Krämer, R. (1986) *Methods Enzymol.* 125, 610-618.
- Krämer, R. & Heberger, C. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 863, 289-296.
- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1977) *FEBS Lett.* 82, 363-367.
- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1979) *Biochemistry* 18, 4209-4215.
- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1980) *Biochemistry* 19, 556-560.
- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1982) *Biochemistry* 21, 1082-1089.
- Krämer, R. & Palmieri, F. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 974, 1-23.
- Krämer, R., Kürzinger, G. & Heberger, C. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 166-174.
- Krupka, R. M. (1989) *J. Membrane Biol.* 109, 151-158.

- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- LaNoue, K. F. & Schoolwerth, A. C. (1984) in *Bioenergetics* (Ernster, L. Ed.), S. 221-268, Elsevier, Amsterdam.
- LaNoue, K.F. & Tischler, M.E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7522-7528.
- LaNoue, K. F. & Tischler, M. E. (1976) in *Mitochondria, Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure* (Packer, L. & Gomez-Puyou, A., Eds.), S. 61-78, Academic Press, New York.
- LaNoue, K. F. & Tischler, M. E. (1976) in *Regulation of Metabolism in Isolated Liver Cells* (Tager, J. M., Söling, H. D. & Williamson, J. R., Eds.), S. 106-109, North-Holland, Amsterdam.
- LaNoue, K.F. & Watts, J.A. (1979) in *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport* (Quagliariello, E., Palmieri, F., Papa, S. & Klingenberg, M., Eds.), S. 345-353, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- LaNoue, K. F., Bryla, J. & Bassett, D. J. P. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7514-7521.
- LaNoue, K. F., Duszynski, J., Watts, J. A. & McKee, E. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 578-590.
- Läuger, P. (1980) *J. Membrane Biol.* 57, 163-178.
- Läuger, P. (1985) *Curr. Top. Membr. Transp.* 21, 309-326.
- Leblanc, P. & Clausen, H. (1972) *FEBS Lett.* 23, 107-113.
- Lengeler, J. W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1018, 155-159.
- Lê Quôc, K. & Lê Quôc, D. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 249-257.
- Lerner, E., Shug, A.L., Elson, C. & Shrago, E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1513-1519.
- Levy, H.M., Leber, P.D. & Ryan, E.M. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3654-3659.
- Lötscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E. & Richter, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4340-4344.
- Maddy, A.H. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 88, 390-399.
- Mayinger, P., Winkler, E. & Klingenberg, M. (1989) *FEBS Lett.* 244, 421-426.
- McGivan, J.D. & Klingenberg, M. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 392-399.
- Meijer, A.J. & Tager, J.M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 189, 136-139.
- Meijer, A.J. & Van Dam, K. (1981) in *Membrane Transport* (Bonting, S. L. & De Pont, J. J. H. H. M., Eds.), S. 235-255, Elsevier, Amsterdam.
- Meijer, A.J., Brouwer, A., Reijngoud, D.J., Hoek, J.B. & Tager, J.M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 283, 421-429.
- Meijer, A.J., Groot, G.S.P. & Tager, J.M. (1970) *FEBS Lett.* 8, 41-44.
- Meisner, H. & Klingenberg, M. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3631-3639.
- Melchior, W. B., Jr. & Fahrney, D. (1970) *Biochemistry* 9, 251-258.
- Menick, D.R., Lee, J.A., Brooker, R.J., Wilson, T.H. & Kaback, H.R. (1987) *Biochemistry* 26, 1132-1136.
- Meyer, J. & Vignais, P.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325, 375-384.
- Miles, W.E. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 431-442.
- Miller, G.L. (1942) *J. Biol. Chem.* 146, 345-350.
- Mitchell, P. (1979) *Eur. J. Biochem.* 95, 1-20.
- Murphy, E., Coll, K. E., Viale, R. O., Tischler, M. E. & Williamson, J. R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8369-8376.
- Murray, A.G., Halle-Smith, S.C. & Selwyn, M.J. (1988) *Abstr. Fifth Eur. Bioenerg. Conf. (Aberystwyth)*, S. 206.
- Neuhaus, J.M. & Wright, J.K. (1983) *Eur. J. Biochem.* 137, 615-621.
- Nicholls, D.G. & Brand, M.D. (1980) *Biochem. J.* 188, 113-118.
- Novgorodov, S.A., Kultayeva, E.V., Yaguzhinsky, L.S. & Lemesko, V.V. (1987) *J. Bioenerg. Biomembr.* 19, 191-202.

- Olsson, I., Axiö-Fredriksson, U.B., Degerman, M. & Olsson, B. (1988) *Electrophoresis* 9, 16-22.
- Osterman-Golkar, S., Ehrenberg, L. & Solymosy, F. (1974) *Acta Chem. Scand.* B28, 215.
- Ovádi, J., Libor, S. & Elödi, P. (1967) *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 2, 455-458.
- Palmieri, F., Passarella, S., Stipani, I. & Quagliariello, E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 195-208.
- Palmieri, F., Prezioso, G., Quagliariello, E. & Klingenberg, M. (1971) *Eur. J. Biochem.* 22, 66-74.
- Palmieri, F., Quagliariello, E. & Klingenberg, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* 17, 230-238.
- Palmieri, F., Quagliariello, E. & Klingenberg, M. (1972) *Eur. J. Biochem.* 29, 408-416.
- Pande, S.V. & Parvin, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 6683-6691.
- Pande, S.V. & Parvin, R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2994-3001.
- Panov, A., Filippova, S. & Lyakhovich, V. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 420-426.
- Papa, S. & Paradies, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 49, 265-274.
- Passarella, S., Palmieri, F. & Quagliariello, E. (1973) *FEBS Lett.* 38, 91-95.
- Passow, H. (1986) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 103, 61-223.
- Peterson, G.L. (1977) *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Pfaff, E., Heldt, H. W. & Klingenberg, M. (1969) *Eur. J. Biochem.* 10, 484-493.
- Pfeiffer, D.R., Schmid, P.C., Beatrice, M.C. & Schmid, H.H.O. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11485-11494.
- Piszkievicz, D. & Smith, E.L. (1971) *Biochemistry* 10, 4538-4544.
- Quagliariello, E. & Palmieri, F. (1972) in *Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes* (Azzone, G. F., Carafoli, E., Lehninger, A. L., Quagliariello, E. & Siliprandi, N., Eds.), S. 659-680, Academic Press, New York.
- Rial, E. & Nicholls, D. G. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161, 689-694.
- Rial, E., Aréchaga, I., Sainz-de-la-Maza, E. & Nicholls, D. G. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 187-193.
- Richter, C., Winterhalter, K.H., Baumhüter, S., Lötscher, H.R. & Moser, B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3188-3192.
- Rippa, M., Spanio, L. & Pontremoli, S. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 48-57.
- Rizzuto, R., Pitton, G. & Azzone, G.F. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 239-249.
- Robillard, G.T. & Konings, W.N. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 597-604.
- Rodríguez-Vico, F., Martínez-Cayucla, M., García-Peregrín, E. & Ramírez, H. (1989) *Anal. Biochem.* 183, 275-278.
- Rumpho, M.E., Edwards, G.E., Yousif, A.E. & Kecgstra, K. (1988) *Plant Physiol.* 86, 1193-1198.
- Runswick, M. J., Powell, S. J., Nyren, P. & Walker, J. E. (1987) *EMBO J.* 6, 1367-1373.
- Runswick, M. J., Walker, J. E., Bisaccia, F., Iacobazzi, V. & Palmieri, F. (1990) *Biochemistry*, im Druck.
- Schägger, H. & Von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Schein, S.J., Colombini, M. & Finkelstein, A. (1976) *J. Membrane Biol.* 30, 99-120.
- Scheuring, V., Kollwe, K., Haase, W. & Schubert, D. (1986) *J. Membrane Biol.* 90, 123-135.
- Scott, K.M., Knight, V.A., Settlemire, C.T. & Brierley, G.P. (1970) *Biochemistry* 9, 714-724.
- Scott, R.L. & Gamble, J.L., jr. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 570-573.
- Scrutton, M.C. & Utter, M.F. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3714-3723.
- Seckler, R. & Wright, K. (1984) *Eur. J. Biochem.* 142, 269-279.
- Segel, I. H. (1975) *Enzyme kinetics*, S. 274-320, Wiley, New York.
- Selwyn, M.J., Dawson, A.P. & Fulton, D.V. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 216-219.
- Shively, J.E., Paxton, R.J. & Lee, T.D. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 246-252.
- Siliprandi, D., Siliprandi, N., Scutari, G. & Zoccarato, F. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 563-567.
- Sluse, F. E., Duyckaerts, C., Liébecq, C. & Sluse-Goffart, C. M. (1979) *Eur. J. Biochem.* 100, 3-17.

- Sluse, F. E., Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M., Fux, J. P. & Liébecq, C. (1980) *FEBS Lett.* 120, 94-98.
- Sluse, F. E., Evens, A., Dierks, T., Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M. & Krämer, R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, zur Publikation eingereicht.
- Sluse, F. E., Goffart, G. & Liébecq, C. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32, 283-291.
- Sluse, F. E., Ranson, M. & Liébecq, C. (1972) *Eur. J. Biochem.* 25, 207-217.
- Sluse, F. E., Sluse-Goffart, C. M. & Duyckaerts, C. (1989) in *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes* (Azzi, A., Nalczyk, K. A., Nalczyk, M. J. & Wojtczak, L., Eds.), S. 183-195, Springer Verlag, Berlin.
- Sluse, F. E., Sluse-Goffart, C. M., Duyckaerts, C. & Liébecq, C. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 1-14.
- Sluse-Goffart, C. M. & Sluse, F. E. (1986) in *Dynamics of Biochemical Systems* (Damjanovic, S., Keleti, T. & Tron, L., Eds.), S. 521-535, Elsevier, Amsterdam.
- Sluse-Goffart, C. M., Sluse, F. E., Duyckaerts, C., Richard, M., Hengsch, P. & Liébecq, C. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 397-406.
- Smith, A. L. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 81-86.
- Soboll, S., Link, T. A. & von Jagow, G. (1988) in *pH Homeostasis* (Häussinger, D., Ed.), S. 97-122, Academic Press, New York.
- Sokolove, P. M. (1988) *FEBS Lett.* 234, 199-202.
- Thomas, A. P. & Halestrap, A. P. (1981) *Biochem. J.* 196, 471-479.
- Tischler, M. E., Pachence, J., Williamson, J. R. & LaNoue, K. F. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 448-462.
- Tous, G. I., Fausnaugh, J. L., Akinyosoye, O., Lackland, H., Winter-Cash, P., Vitorica, F. J. & Stein, S. (1989) *Anal. Biochem.* 179, 50-55.
- Tyler, D. D. (1968) *Biochem. J.* 107, 121-123.
- Tyler, D. D. & Gonze, J. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 75-77.
- Vercesi, A. E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 305-310.
- Vestergaard-Bogind, B. & Lassen, U. V. (1974) in *Comparative Biochemistry and Physiology of Transport* (Bolis, L., Bloch, K., Luria, S. E. & Lynen, F., Eds.), S. 346-353, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Vignais, P. V. & Vignais, P. M. (1972) *FEBS Lett.* 26, 27-31.
- Viitanen, P. V., Menick, D. R., Sarkar, H. K., Trumble, W. R. & Kaback, H. R. (1985) *Biochemistry* 24, 7628-7635.
- Volwerk, J. J., Pieterse, W. A. & de Haas, G. H. (1974) *Biochemistry* 13, 1446-1454.
- Webb, L. (1963) *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 1, S. 160, Academic Press, New York.
- Werner, P. K. & Reithmeier, A. F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 942, 19-32.
- Wheeler, T. J. & Hinkle, P. C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8907-8914.
- Williamson, J. R. (1976) in *Gluconeogenesis* (Mehlman, M. A., Ed.), S. 165-220, Wiley, New York.
- Williamson, J. R., Murphy, E., Viale, R. O. & Coll, K. E. (1979) in *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport* (Quagliariello, E., Palmieri, F., Papa, S. & Klingenberg, M., Eds.), S. 355-364, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Wilson, D. E. & Asimakis, G. K. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 470-479.
- Wolman, Y. (1974) in *The Chemistry of the Thiol Group* (Patai, S., Ed.), S. 669-684, Interscience/J. Wiley, New York.
- Woodward, R. B. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 1007.
- Woodward, R. B. & Olofson, R. A. (1966) *Tetrahedron* 7 (Suppl.), 415-440.
- Yang, C. C. & King, K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 614, 373-388.
- Zara, V. & Palmieri, F. (1988) *FEBS Lett.* 236, 493-496.

13. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Asp	Aspartat
BKA	Bongkrekat
BPAB	4-Bromphenacylbromid
C ₁₂ E ₈	Octaethylenglykol-monododecylether
C ₁₃ E ₁₀	Decaethylenglykol-monotridecylether
CAT	Carboxyatractylosid
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-stilben-2,2'-disulfonat
DNDS	4,4'-Dinitrostilben-2,2'-disulfonat
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
$\Delta\psi$	elektrisches Membranpotential
E _a	Aktivierungsenergie
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Glu	Glutamat
GME	Glycinmethylester
H ₂ -DIDS	1,2-(2,2'-Disulfo-4,4'-diisothiocyano)-diphenylethan
IC ₅₀	für halbmaximale Hemmung erforderliche Inhibitorkonzentration
k	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (des Transports)
k ₃	katalytische Konstante
K _A , K _G	Michaelis-Konstanten bei Mehrsubstratreaktionen
k _{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (der Inaktivierung)
K _i , K _{ii}	Inhibitionskonstanten
K _{is}	Dissoziationskonstanten binärer Carrier-Substrat-Komplexe (bei Mehrsubstratreaktionen)
K _m	Michaelis-Konstante
Mersalyl	Mersalylsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
n	durchschnittliche Reaktionsordnung
(n)	Anzahl der Bestimmungen
NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzofurazan
NEM	N-Ethylmaleimid
PCMB	p-(Chlormercuri)-benzoesäure
PCMS	p-(Chlormercuri)-benzolsulfonsäure
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
S	Substratkonzentration
S _{0.5}	für halbmaximalen Substratschutz erforderliche Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyano-stilben-2,2'-disulfonat
T	absolute Temperatur
v	Transportgeschwindigkeit (Anfangsrate)
V _{ex} , V _{in}	Volumen des externen bzw. internen Kompartiments
V _{max}	maximale Transportgeschwindigkeit
WRK	N-Ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonat

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich danke Prof. Dr. Hermann Sahm für die freundliche Aufnahme im Institut und seine Unterstützung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Reinhard Krämer, von dessen unermüdlichem Einsatz bei der Betreuung dieser Arbeit ich wissenschaftlich und auch menschlich profitierte. Ihm verdanke ich zahlreiche konstruktive Diskussionen und die wissenschaftliche Förderung durch Kontakte mit anderen Arbeitsgruppen.

Eine große Zahl von Daten verdanke ich Dr. Cesare Indiveri und Prof. Dr. Ferdinando Palmieri (Bari), denen ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche und ebenso freundschaftliche Zusammenarbeit meinen aufrichtigen Dank aussprechen möchte.

Bedanken möchte ich mich auch für die Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Francis Sluse (Lüttich) mit seinen Mitarbeitern Alain Evens, Claire Duyckaerts und Claudine Sluse-Goffart.

Reiner Stappen danke ich herzlich dafür, mir einige Ergebnisse seiner Diplomarbeit bereitwillig zur Verfügung gestellt zu haben, die bei der Diskussion der hier vorgestellten Befunde hilfreich waren.

Ferner möchte ich Prof. Dr. Martin Klingenberg und seinen Mitarbeitern Dr. Bernhard Seitner und Peter Mayinger (München), deren wissenschaftlicher Kontakt mir sehr hilfreich war, meine Anerkennung aussprechen und mich bei Ilse Prinz für die zuverlässige Präparation der Mitochondrien bedanken.

In meinen Dank einschließen möchte ich weiterhin Frau S. Löslein, Gisela Miczka und Dr. Ulrike Jahnke (Institut für Enzymtechnologie) für die Hilfe bei der Aminosäure-Analyse und der Proteinsequenzierung sowie meinen Kollegen Stefan Bröer für die Anleitung bei den HPLC-Bestimmungen von Aspartat und Glutamat. Dr. Karl Ludwig Schimz stellte freundlicherweise die Geltrocknungsapparatur zur Verfügung. Für die ausgezeichnete Arbeit des Fotolabors möchte ich mich bei Siegfried Peters bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den nicht namentlich aufgeführten Kollegen/-innen meiner Arbeitsgruppe und Mitarbeitern/-innen des Instituts.

Besonders erwähnt sei schließlich, daß ohne die tragende und jederzeit zuverlässige Mitarbeit von Angelika Salentin und Etta Riemer diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

JH-2447

Februar 1991

ISSN 0366-0885