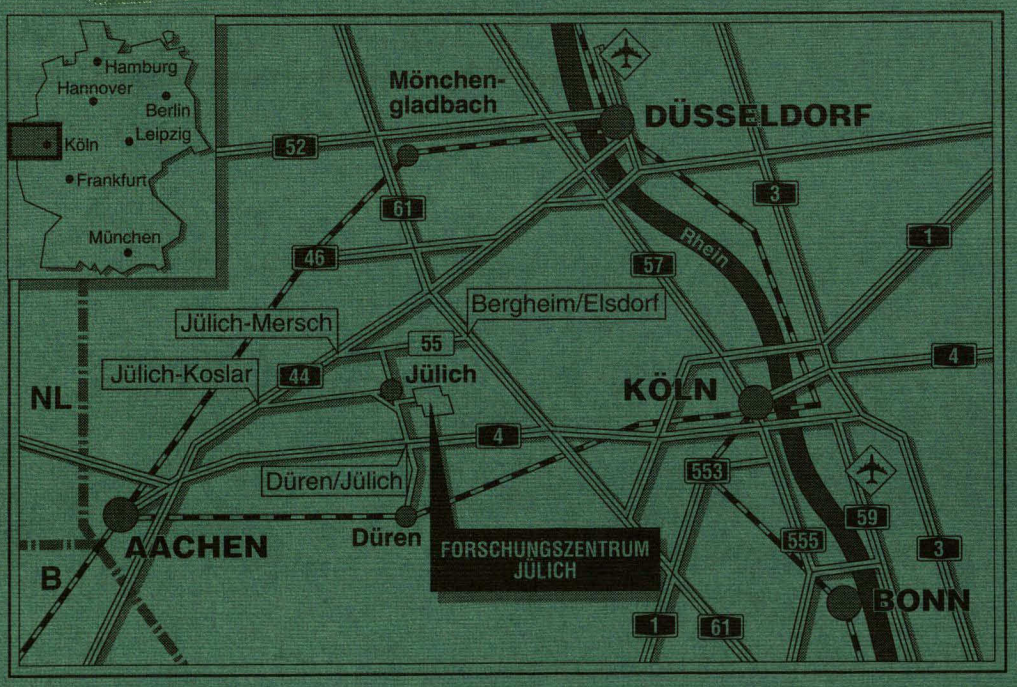
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH



Institut für Biotechnologie

Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Anionencarrier der inneren Mitochondrienmembran: Untersuchungen am Aspartat/ Glutamat-Carrier und Phosphatcarrier im rekonstituierten System

Reiner Stappen



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2930
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-2930
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Anionencarrier der inneren Mitochondrienmembran: Untersuchungen am Aspartat/ Glutamat-Carrier und Phosphatcarrier im rekonstituierten System

Reiner Stappen

Zusammenfassung

Der Aspartat/Glutamat-Carrier katalysiert sowohl einen Substrat/Substrat-Antiport, als auch einen (durch SH-Gruppen-Modifizierung induzierbaren) unphysiologischen Substratuniport. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Inhibitorstudien eine Struktur/Funktions-Korrelation des rekonstituierten Carriers durchgeführt.

① Die Bindung von 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), das in einer 1:1 Stöchiometrie zur Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers führt, erfolgt an einem Cysteinrest (Cys_a) der in exofazialen Bindungsstelle des Carriers lokalisiert ist. Die Modifikation dieses Aminosäurerestes durch NBD-Cl wird durch alle übrigen cysteinspezifischen Inhibitoren vollständig verhindert. Folglich binden diese Reagenzien an das gleiche Cystein. Der bifunktionelle Inhibitor DIDS modifiziert neben Cys_a ein Lysin (*Lys*). Befunde für eine räumliche Nähe beider Aminosäurereste wurden vorgestellt, eine intramolekulare Verbrückung von Cys_a und *Lys* durch DIDS ist wahrscheinlich.

② Die Durchführung der Modifikation unter definierten Bedingungen führte zur Identifikation eines weiteren funktionell wichtigen Cysteins (Cys_b), eines Histidins (*His*) sowie eines Arginins (*Arg*). Die Überprüfung der Zugänglichkeit der identifizierten Aminosäurereste unter verschiedenen Bedingungen ergab Hinweise auf die Lokalisation und (mögliche) Funktion der einzelnen essentiellen Gruppen in der exofazialen Bindungsstelle des Carriers.

③ Alle bekannten Modifizierungsreagenzien konnten aufgrund ihrer charakteristischen Wirkungen auf die Funktion des Aspartat/Glutamat-Carriers in vier Klassen eingeordnet werden. Reagenzien der Klasse A binden an Cys_a. Sie führen zur Inhibition der Antiportfunktion und stimulieren eine nachfolgende Effluxinduktion. Reagenzien der Klasse B binden an Cys_a und Cys_b. Diese Modifikation führt zur (reversiblen) Effluxinduktion. Reagenzien der Klasse C binden an *Lys* oder *His* und bewirken so die Inhibition sowohl der Antiport- als auch der Effluxfunktion. Die Modifikation des Carriers durch argininspezifische Reagenzien (Klasse D) führt ausschließlich zur Hemmung der Antiportfunktion. Die Effluxfunktion wird nicht beeinflußt.

④ Es wurde gezeigt, daß die Modifikation der einzelnen Aminosäurereste unterschiedliche Auswirkungen auf den physiologischen Antiport bzw. auf den unphysiologischen Uniport hat. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eigenschaften des Carriers in beiden Transportfunktionen waren Rückschlüsse auf die katalytischen Funktionen der identifizierten Aminosäurereste möglich. Abschließend wurden diese geforderten Funktionen mit dem theoretischen Modell der Transportkatalyse, dem *single binding centre gated pore model*, verglichen.

Der Phosphatcarrier katalysiert die Nettoaufnahme von Phosphat in Mitochondrien. Die ausgeführten Experimente ermöglichten eine exakte kinetische Charakterisierung des Carriers und erbrachten zudem zusätzliche Argumente für die Existenz einer universellen mitochondrialen Carrierfamilie.

⑤ Der Einsatz wichtiger methodischer Verbesserungen, wozu beispielsweise die Etablierung der Amberlite-Methode zur Rekonstitution des Phosphatcarriers zählt, ermöglichte die Bestimmung der Substrataffinitäten auf beiden Seiten der liposomalen Membran. Diese Werte erlaubten nicht nur Rückschlüsse auf den bisher unbekannten internen K_m-Wert in intakten Mitochondrien, sondern belegen zudem einen asymmetrischen (*right-side-out*) Einbau des Carriers in den Proteoliposomen. Weiterhin wurde der Einfluß des Membranpotentials, des pH-Wertes oder eines Protonengradienten über der Membran am rekonstituierten Carrier untersucht und mit den Werten aus intakten Mitochondrien verglichen.

⑥ Aufbauend auf der detaillierten kinetischen Charakterisierung des Carriers wurde der Reaktionsmechanismus in beiden physiologischen Transportfunktionen des Carriers mittels Bisubstratanalysen bestimmt. Der Phosphattransport erfolgt in beiden Funktionen entsprechend des simultanen (sequentiellen) Mechanismus. Die durchgeführten Untersuchungen belegen somit die Existenz einer universellen mitochondrialen Carrierfamilie. Ein Vergleich des Mechanismus des Phosphatcarriers mit der prokaryotischen *Lac* Permease zeigte hingegen deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Carriern auf.

⑦ Im Zusammenhang mit der Untersuchung der pH-Abhängigkeit des rekonstituierten Phosphatcarriers deuten der identische Reaktionsmechanismus und die übereinstimmenden internen K_m-Werte daraufhin, daß der Phosphatcarrier neben der bekannten P_i^-/P_i^--Antiportfunktion (mutmaßlich) auch einen P_i^-/OH^--Antiport katalysiert. Dies impliziert daß (zumindest) die externe Bindungsstelle des Carriers $H_2PO_4^-$ oder OH^- als Substrat akzeptiert.

⑧ Der Phosphatcarrier zeigt nach Zugabe von $HgCl_2$ eine unphysiologische Uniportfunktion, die durch eine geringe Spezifität und den Verlust der Substrataffinität gekennzeichnet ist. Diese Effluxfunktion wurde sowohl beim Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien als auch beim Phosphatcarrier aus Hefemitochondrien beobachtet. Vor dem Hintergrund unterschiedlicher Primärstrukturen beider Carrier konnte somit das "Efflux-vermittelnde" Cystein mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden.

⑨ Der Phosphatcarrier wird durch Anionen auf beiden Seiten der Membran (nicht-kompetitiv) inhibiert. Die Auswirkungen dieser Beobachtung in Hinsicht auf ein Funktionsmodell des Phosphatcarriers sowie eine mögliche Verwandtschaft des Phosphatcarriers mit dem mitochondrialen Protonencarrier wurden diskutiert.

Inhaltsverzeichnis

1 Allgemeine Einleitung
- 1.1 Funktion und Aufbau der Mitochondrien 1
- 1.2 Die Carrier der inneren Mitochondrienmembran 2
- 1.3 Die Strukturfamilie der Carrier der inneren Mitochondrienmembran 3
- 1.4 Funktionelle Aspekte der Transportkatalyse 6
- 1.5 Porenartige Eigenschaften mitochondrialer Carrierproteine 9
- 1.6 Zielsetzung der durchgeführten Studien 11

2 Material und Methoden
- 2.1 Material 13
- 2.2 Präparative Methoden 14
  - 2.2.1 Präparation der Rinderherzmitochondrien 14
  - 2.2.2 Anzucht und Präparation der Hefemitochondrien 14
  - 2.2.3 Präparation des Aspartat/Glutamat-Carriers aus Rinderherzmitochondrien 15
  - 2.2.4 Präparation des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien 15
  - 2.2.5 Präparation des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* 16
  - 2.2.6 Funktionelle Rekonstitution des Aspartat/Glutamat-Carriers 17
  - 2.2.7 Funktionelle Rekonstitution des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien 17
  - 2.2.8 Funktionelle Rekonstitution des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* 18
- 2.3 Analytische Methoden 19
  - 2.3.1 Bestimmung der Transportaktivitäten 19
    - 2.3.1.1 Die Vortauschtechnik 19
    - 2.3.1.2 Die Rücktauschtechnik 20
  - 2.3.2 Effluxexperimente 21
  - 2.3.3 Bestimmung des aktiven Innenvolumens der Proteoliposomen 22
  - 2.3.4 Transformation der apparenten Transportraten 22
- 2.4 Allgemeine Methoden 23
  - 2.4.1 Spektrale Bestimmungen 23
  - 2.4.2 Einstellen des internen/externen pH-Wertes 23
  - 2.4.3 Einstellen der Kaliumdiffusionspotentiale 24
  - 2.4.4 Chemische Modifikation (Inaktivierung) der Carrierproteine 24
  - 2.4.5 Überprüfung des Substrateinflusses auf die Inhibitorwirkung 25
  - 2.4.6 Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Reagenzien 25
  - 2.4.7 Modifizierung der Carrierproteine durch Einsatz [^{14}C]-markierter Inhibitoren 25
  - 2.4.8 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese des [^{14}C]-markierten Proteins 26
    - 2.4.8.1 Durchführung der Gelelektrophorese 26
    - 2.4.8.2 Färbemethoden 26

3 Struktur/Funktions-Korrelation essentieller Aminosäurereste des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers
3.1 Einleitung 28
3.2 Funktionelle Klassifizierung von Cys_a 30
3.3 Die Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch DIDS - Intramolekulare Verbrückung von Cys_a und Lys 37
3.4 Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers mit 2.3-Butandion (Diacetyl) und Phenylglyoxal (PG) - Identifikation eines Argininrestes 40
3.5 Räumliche und funktionelle Interaktion essentieller Aminosäurereste 41
3.6 Beteiligung der identifizierten Aminosäurereste am unphysiologischen Substrattransport 44
3.7 Diskussion 45
3.7.1 Struktur/Funktions-Korrelation essentieller Aminosäurereste des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers 46
3.7.2 Schlußfolgerungen zur Topologie der identifizierten Aminosäuren 49
3.7.3 Schlußfolgerungen zum molekularen Mechanismus des Substrattransports 51
4 Funktionelle Charakterisierung des rekonstituierten Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien
4.1 Einleitung 53
4.2 Optimierung des Meßsystems 54
4.3 Charakterisierung des Phosphattransports 59
4.3.1 Ermittlung der Substrataffinitäten des rekonstituierten Phosphatcarriers 61
4.3.2 Einfluß eines Membranpotentials auf den Phosphattransport 63
4.3.3 Einfluß des pH-Wertes auf den Phosphattransport 64
4.3.4 Einfluß eines Protonengradienten auf den Phosphattransport 65
4.4 Kinetische Bisubstratanalysen 68
4.4.1 Kinetische Bisubstratanalyse der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion 68
4.4.2 Kinetische Bisubstratanalyse des elektroneutralen, unidirektionalen Phosphattransports 71
4.5 Die $HgCl_2$-induzierte, unphysiologische Effluxfunktion des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien 73
4.6 Sensitivität des rekonstituierten Phosphatcarriers gegenüber Anionen 79
4.7 Funktionelle Charakterisierung des rekonstituierten Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* 81
4.7.1 Die Induktion der unphysiologischen Transportfunktion beim PIC_{SC} 84
4.8 Diskussion 86
4.8.1 Grundlegende funktionelle Eigenschaften des Phosphatcarriers 87
4.8.2 Bisubstrat-Mechanismus des Phosphattransports 91
4.8.3 Argumente für eine P_i^-/OH^--Antiportfunktion, katalysiert durch den mitochondrialen Phosphatcarrier 92
4.8.4 Bildung des (katalytisch-aktiven) ternären Komplexes 92
4.8.5 Phänomenologie der $HgCl_2$-induzierten Effluxfunktion des Phosphatcarriers 94
4.8.6 Mechanistische Studien zur Effluxinduktion beim Phosphatcarrier 96
5 Zusammenfassung 99
6 Literaturverzeichnis 101

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole*
(*: zur Abkürzung der mitochondrialen Carrierproteine, vgl. Tabelle 1.2.1)

A_{50}	Inhibitorkonzentration die eine halbmaximale Stimulation der (unphysiologischen) Effluxfunktion bewirkt
Abb.	Abbildung
app.	apparent
Asp	Aspartat
BPAB	4-Bromphenacylbromid
c	Konzentration
$C_{12}E_8$	Octaethylenglykol-monododecylether
$C_{13}E_{10}$	Decaethylenglykol-monotridecylether
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (engl: decays per minute)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonat
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
ΔpH	pH-Differenz (Protonengradient)
$\Delta\Psi$	elektrisches Membranpotential
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ext	extern
Glu	Glutamat
GME	Glycinmethylester
Hepes	4-(2-hydroxylethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
I_{50}	Inhibitorkonzentration die eine halbmaximale Hemmung bewirkt
int	intern
k	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (des Transports)
kDa	Kilodalton
K_I	Inhibitionskonstante
K_i	Dissoziationskonstante binärer Carrier-Substrat-Komplexe (bei Mehrsubstratreaktionen)
K_m	Michaelis-(Menten-)Konstante
Mersalyl.	Mersalylsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
n	durchschnittliche Reaktionsordnung
NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NEM	N-Ethylmaleimid
OD_{600}	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
*p*CMB	*p*-(Chlormercuri)-benzoesäure
*p*CMBS	*p*-(Chlormercuri)-benzolsulfonsäure
P_i	(freies) anorganisches Phosphat
PIC_{RHM}	Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien
PIC_{SC}	Phosphatcarrier aus Hefemitochondrien (*Saccharomyces cerevisiae*)
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
S	Substratkonzentration
$S_{0.5}$	für halbmaximalen Substratschutz erforderliche Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanostilben-2,2'-disulfonat
T	absolute Temperatur
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylenethylendiamin
Tricine	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
TX-114	Triton X-114
v,v´	Transportgeschwindigkeit (Anfangsrate)
V_{ex}, V_{in}	Volumen des externen bzw. internen Kompartiments
V_{max}	maximale Transportgeschwindigkeit

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien kommen in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor. Die wichtigste Funktion dieser Organellen ist die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) in der mitochondrialen Matrix, die als letzte Stufe einer komplexen Reaktionssequenz, der sogenannten *oxidativen Phosphorylierung*, stattfindet. Hierbei werden die Reduktionsäquivalente, die aus der Glykolyse, aus dem Citratzyklus bzw. aus der Fettsäureoxidation stammen, schrittweise auf ein Sauerstoffmolekül übertragen. Gleichgeschaltet mit diesem Elektronenfluß ist ein vektorieller Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran, der sich aus der transmembranen Struktur der Atmungskette ergibt. Der Rückstrom dieser Protonen durch den Protonenkanal (F_O-Teil) der ATP-Synthetase findet unter strenger Kopplung mit der ATP-Synthese aus ADP und P_i im F_1-Teil des Enzyms statt. Dieser fundamentale Zusammenhang wurde erstmalig von Mitchell unter der Bezeichnung "*chemiosmotische Hypothese*" publiziert (Mitchell 1966 & 1976).

Neben der Bereitstellung von ATP besitzen die Mitochondrien noch weitere wichtige Funktionen. Beispielsweise sind in der Mitochondrienmatrix der Tricarbonsäurezyklus und die ß-Oxidation (Abbau von Fettsäuren um C_2-Einheiten), sowie die Pyruvat-Carboxylase (als ein Teilschritt der Gluconeogenese), die Ornithin-Transcarbamoylase und die Carbamoylphosphat-Synthetase lokalisiert. Die beiden letztgenannten Enzyme katalysieren wichtige Teilreaktionen im Harnstoffzyklus.

Die Mitochondrienmatrix wird durch zwei Phospholipidmembranen vom Cytosol getrennt. Zur Gewährleistung der physiologischen Funktionen der Mitochondrien ist folglich ein ständiger Fluß der unterschiedlichen Metabolite über die beiden Membranen notwendig. Der Stofftransport durch die äußere Mitochondrienmembran wird von porenartigen Transmembranproteinen, den sogenannten *Porinen* katalysiert. Der Öffnungszustand dieser Kanäle wird vom Membranpotential sowie durch die Anwesenheit von NADH beeinflußt, jedoch sind auch makromolekulare Modulatoren der Schließfunktion bekannt (zur Übersicht s.: Benz 1985, Manella et al. 1992, Sorgato & Moran 1993, Zizi et al. 1994). Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere Membran für die meisten Stoffe vollständig impermeabel. Der Stofftransport über die innere Mitochondrienmembran wird durch eine Reihe unterschiedlicher Carrierproteine katalysiert (s.u.), die aufgrund ihrer hohen Substratspezifität die Ausbildung eines elektrochemischen Protonengradienten über der Membran nicht beeinträchtigen.

1.2 Die Carrier der inneren Mitochondrienmembran

Die innere Mitochondrienmembran trennt die mitochondriale Matrix als Kompartiment mit sehr hoher Stoffwechselaktivität vom Intermembranraum ab. Die bereits erwähnte Impermeabilität dieser Membran, in Kombination mit der metabolischen Funktion der Mitochondrien, bedingt die Existenz unterschiedlicher Transportproteine. Der Transport anionischer Substrate über diese Membran wird von einer Gruppe relativ einfach aufgebauter (vgl. Abschnitt 1.3), aber zugleich hochspezifischer, Carrierproteine katalysiert, die im allgemeinen als Antiportcarrier funktionieren (vgl. Tabelle 1.2.1, bzw. siehe Übersichtsartikel von: Meijer & Van Dam 1981, La Noue & Schoolwerth 1984, Krämer & Palmieri 1992).

Tabelle 1.2.1: **Liste der wichtigsten Carrier der inneren Mitochondrienmembran.**
Neben den katalysierten Transportfunktionen werden einige physiologische Merkmale und funktionelle Daten miteinander verglichen. Die Bezeichnung als (mögl.) besagt, daß die Effluxinduktion durch Inkubation der jeweiligen Carrier mit quecksilberhaltigen Reagenzien (vgl. Abschnitt 1.5) einwandfrei nachgewiesen wurde (C. Indiveri/F. Bisaccia; persönliche Mitteilung). Im Falle des ADP/ATP-Carriers gilt wahrscheinlich ebenfalls der simultane Transportmechanismus (vgl. Abschnitt 1.4).

Carrier (Abkürzung)	**Transportfunktion** Cytosol — Matrix	**physiologische Merkmale** Einordnung der Transportfunktion:	Verteilung im Organismus	**Transportmechanismus** (vgl. Abschnitt 1.4)	**Effluxinduktion möglich ?** (vgl. Abschnitt 1.5)
ADP/ATP-Carrier (AAC)	ADP^{3-} ⟶ ⟵ ATP^{4-}	elektrogener Antiporter	ubiquitär	(simultan)	möglich
Phosphat-Carrier (PIC)	Pi^{-} ⟶ H^{+} <- -> OH^{-}	elektroneut. Symporter/ Antiporter	ubiquitär	?	?
Aspartat/ Glutamat-Carrier (AGC)	(Glu^{-} + H^{+}) ⟶ ⟵ Asp^{-}	elektrogener Antiporter	in den meisten Zellen	simultan	möglich
Oxoglutarat/ Malat-Carrier (OGC)	OGA^{2-} ⟶ ⟵ $Malat^{2-}$	elektroneutraler Antiporter	in den meisten Zellen	simultan	(mögl.)
Pyruvat-Carrier (PYC)	$Pyruvat^{-}$ ⟶ H^{+} <- -> OH^{-}	elektroneut. Symporter/ Antiporter	ubiquitär	?	?
Dicarboxylat-Carrier (DIC)	$Malat^{2-}$ ⟶ ⟵ Pi^{2-}	elektroneutraler Antiporter	hauptsächlich in der Leber	simultan	(mögl.)
Citrat-Carrier (CIC)	$H\text{-}Citrat^{2-}$ ⟶ ⟵ $Malat^{2-}$	elektroneutraler Antiporter	hauptsächlich in der Leber	simultan	(mögl.)
Carnitin-Carrier (CAC)	Acylcarnitin ⟶ ⟵ Carnitin	elektroneutraler Antiporter	ubiquitär	Ping-Pong	möglich
Ornithin-Carrier (ORC)	$Ornithin^{+}$ ⟶ ⟵ $Citrullin^{+}$	elektroneutraler Antiporter	hauptsächlich in Leber und Niere	?	?
Glutamat-Carrier (GLC)	$Glutamat^{-}$ ⟶ H^{+} <- -> OH^{-}	elektroneut. Symporter/ Antiporter	hauptsächlich in der Leber	?	?
Uncoupling-protein (UNC)	H^{+} ⟶	elektrogener Uniporter	nur in braunem Fettgewebe	-	?

Ergänzend zur Tabelle 1.2.1 ist anzumerken, daß weitere Transportsysteme, wie z.B. der Glutamin-Carrier oder der Carrier für verzweigtkettige Ketocarbonsäuren, bekannt sind. Zusätzlich ergibt sich aus theoretischen Überlegungen, daß es weitere Carrier für den Transport von Nukleotiden und Coenzymen geben muß.

Verschiedene Klassifikationen der Carrier sind unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Eigenschaften möglich. Beispielsweise gibt es neben den elektroneutralen Antiportcarriern (OGC, DIC, CIC & ORC) weitere Carrier, bei denen der elektrogene Transport eines Metaboliten durch den simultanen Cotransport eines Protons bzw. eines Hydroxylions kompensiert wird (PIC, PYC & GLC) sowie schließlich die Gruppe der elektrogenen Carrier (AAC, AGC & UNC). Weiterhin können die Carrierproteine entsprechend ihrer physiologischen Funktionen unterteilt werden. Eine mögliche Einordnung differenziert zwischen den Carriern, die in den Wasserstoff- und Kohlenstoffmetabolismus involviert sind, von der Gruppe der Carrier, die am Energietransfer beteiligt sind (Translokation von ADP, ATP, P_i oder H^+/OH^-).

Insbesondere der Phosphat- und der Malattransport werden von unterschiedlichen Carriern gleichzeitig katalysiert, wodurch es zu einer Verknüpfung der einzelnen Transportreaktionen kommt (vgl. Tabelle 1.2.1). Beispielsweise kann so die protonenmotorische Kraft indirekt zum Citrat-Import (via den PIC, den DIC und den CIC) verwendet werden. Eine Verknüpfung der Transportreaktionen zweier Carrier kann auch auf einer engen Kopplung zwischen den betreffenden Carrier und speziellen Enzymaktivitäten beruhen. Diese Konstellation wird als Shuttle (-System) bezeichnet. Neben dem Isocitrat/Oxoglutarat-Shuttle ist insbesondere der Malat/Aspartat-Shuttle von großer Bedeutung für den Energiestoffwechsel (vgl. Harold 1986).

1.3 Die Strukturfamilie der Carrier der inneren Mitochondrienmembran

Die Primärstrukturen des AAC (Aquila et al. 1982), des UNC (Aquila et al. 1985), des PIC (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987), des OGC (Runswick et al. 1990) und des CIC (Kaplan et al. 1993) konnten mit Hilfe klassischer Aminosäureanalyse und/oder durch Sequenzierung der cDNA erhalten werden. Zusätzlich wird diese Aufzählung durch weitere Publikationen über bekannte Aminosäuresequenzen für den AAC, den PIC und den OGC aus unterschiedlichen Organismen vervollständigt (eine Übersicht geben: Walker 1992, Walker & Runswick 1993, Nelson et al. 1993). Aus diesen Primärstrukturen, in Kombination mit kürzlich ausgeführten immunologischen Studien am AAC (Brandolin et al. 1989, 1992), am PIC (Capobianco et al. 1991) sowie am UNC (Eckerskorn & Klingen-

berg 1987, Miroux et al. 1993), wird deutlich, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit bei allen Carriern der inneren Mitochondrienmembran sowohl der N-, als auch der C-Terminus zum Cytosol hin ausgerichtet sind. Kennzeichnend für diese Transportproteine ist weiterhin die Ausbildung von sechs transmembranen Helices, die in alternierender Reihenfolge hydrophoben bzw. amphipatischen Charakter besitzen (vgl. Abbildung 1.3.1/A). Offensichtlich besteht die monomere Form der einzelnen Carrier aus 3 Paaren gleichartiger Helices {sogenannte *tripartite* Struktur (Saraste & Walker 1982)}. Eine Gegenüberstellung der einzelnen Sequenzen mit Hilfe computergestützter *DotPlots* zeigt auf, daß sowohl eine hohe Homologie zwischen den einzelnen Segmenten eines Carrierproteins als auch zwischen den Segmenten verschiedener Carrier existiert. Diese klare Homologie lieferte den Anstoß zur Entwicklung eines evolutionären Konzeptes, welches besagt, daß alle mitochondrialen Carrier von einem gemeinsamen Urgen abstammen, das für ein circa 100 Aminosäuren großes Protein kodierte (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987, 1990). Bis zum heutigen Zeitpunkt werden aufgrund ihrer übereinstimmenden Sekundärstruktur insgesamt 38 verschiedene Proteine der sogenannten *MCF*-Familie {Mitochondrial Carrier Family} (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987, 1990, Klingenberg 1990, Kuan & Saier 1993) zugeordnet, wobei jedoch in einigen Fällen die genaue Funktion der Proteine noch unbekannt ist. Eine Gegenüberstellung von 8 unterschiedlichen Primärstrukturen belegt, daß in allen Sequenzen 11 Aminosäurereste völlig konserviert sind (Walker 1992). Herauszustellen sind dabei insbesondere die drei Proline am Ende der Helix I, III und V, die drei Glycine zu Beginn der Helix II, IV und VI sowie der saure Aminosäurerest, der sich jeweils 2 Aminosäuren hinter den angesprochenen Prolinen befindet. Weiterhin enthalten alle bekannten Sequenzen einen (für Membranproteine) außerordentlich hohen (≈ 40%) Anteil polarer Aminosäuren (Klingenberg et al. 1987, Klingenberg 1989). Sie zeichnen sich zudem durch eine relativ hohe positive Gesamtladung aus (vgl. Abb. 1.3.1). Ähnlich charakteristische Primärstrukturen werden auch für die bisher nicht sequenzierten mitochondrialen Carrier erwartet. Diese Auffassung stützt sich sowohl auf die nahezu identischen Molekulargewichte der einzelnen Carrier, die allesamt zwischen 28-37 kDa (bestimmt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) liegen, als auch auf die signifikanten Gemeinsamkeiten hinsichtlich der publizierten Reinigungsverfahren. Beispielsweise werden alle mitochondrialen Carrier mit Hilfe von nichtionischen Detergenzien, deren Hauptbestandteil eine lange Polyoxyethylenkette ist, solubilisiert. Weiterhin basieren alle Reinigungsverfahren zumindest auf der einmaligen Anwendung einer Hydroxylapatitsäule (einen Überblick geben: Krämer & Palmieri 1989, 1992).

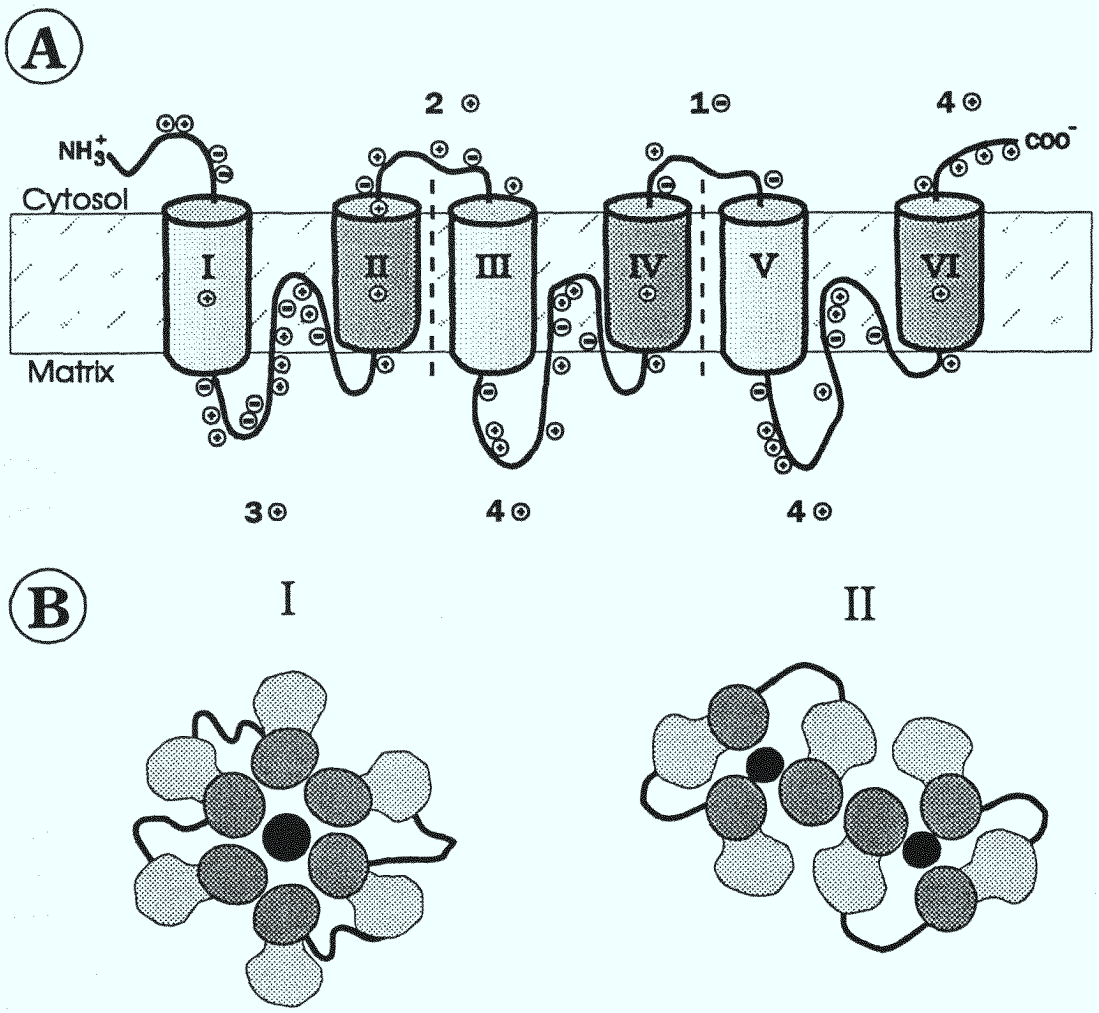


Abbildung 1.3.1: **Strukturmodelle zur Beschreibung mitochondrialer Carrierproteine.**

A) Vermutete Sekundärstruktur des ADP/ATP-Carriers (AAC 2) aus Hefemitochondrien (umgezeichnet nach Klingenberg: 1992). Die Lage der 6 transmembranen Helices sowie die "tripartide" Struktur des Carrierproteins (s. Text) sind hervorgehoben. Weiterhin ist die Ladungsverteilung im Protein eingezeichnet, um so die alternierende Abfolge der hydrophoben (helleren Helices) und amphipatischen Helices (dunkler eingezeichnet) und die hohe positive Gesamtladung des Carriers zu verdeutlichen. Insbesondere die Einzeichnung der zur Mitochondrienmatrix hin orientierten *Loops* erfolgte in Anlehnung an die Forderung nach einer großen Flexibilität dieser Domänen (Klingenberg 1989).

B) Zwei mögliche Anordnungen der transmembranen Helices (dargestellt als Aufsicht auf die Membran) der Carrier-Homodimere (umgezeichnet nach: Aquila et al. 1987). Die hydrophoben Helices (hell) sind zur Phospholipidmembran hin orientiert. Im Fall I bilden die amphipatischen Helices (dunkler) einen Translokationskanal (•) zwischen den beiden Monomeren aus, während sich aus der Anordnung der beiden Monomere entsprechend Fall II jeweils zwei Translokationskanäle (•) ergeben.

Mitochondriale Carrier liegen in der Membran mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als Homodimer vor (vgl. Abb. 1.3.1/B). Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation belegten eindeutig eine Dimerisierung des (solubilisierten) ADP/ATP-Carriers und des Protonencarriers (Hackenberg & Klingenberg 1980, Lin et al. 1980). Unterstützt wird diese Ansicht zudem durch die Möglichkeit zur chemischen Verbrückung der einzelnen Carriermonomere durch Ausbildung intermolekularer Disufidbrücken. Dieser Fall wurde für den AAC, den OGC und den Protonencarrier (UNC) beschrieben (Klingenberg 1981, Palmieri et al. 1992, Klingenberg & Appel 1989). Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß sowohl bei prokaryotischen als auch bei eukaryotischen Carriern in nahezu allen bisher untersuchten Fällen 12 transmembrane Helices als übereinstimmendes Strukturmerkmal identifiziert wurden (Henderson 1987, Maloney 1989, Henderson 1991, Saier & Reizer 1991, Marger et al. 1993). Unter Annahme eines Homodimers als katalytisch-aktive Einheit zeigen auch die mitochondrialen Carrier diese charakteristischen 12 (2•6) transmembranen Helices. Dieser Befund deutet somit auf eine strukturelle Verwandtschaft aller Carrierproteine hin.

1.4 Funktionelle Aspekte der Transportkatalyse

In Hinsicht auf ein besseres Verständnis carriervermittelter Transportprozesse ist ein Vergleich mit enzymatischen Umsetzungen sinnvoll. In beiden Fällen bildet sich nach der spezifischen Bindung des Substrates ein katalytisch-aktiver [Protein• Substrat]-Komplex aus, und in beiden Reaktionen wird die in diesem Schritt freiwerdende Bindungsenergie zur Erniedrigung der Aktivierungsenergie des eigentlichen katalytischen Schrittes eingesetzt. Weitere Punkte, die sowohl die enzymkatalysierten Umsetzungen als auch die carriervermittelten Transportprozesse charakterisieren, sind: (i) Die einzelnen Reaktionsschritte bilden einen geschlossenen Reaktionszyklus. (ii) Beide Prozesse können (in der Regel) mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. Dieser Umstand beinhaltet somit die Existenz definierter Substrataffinitäten (K_m-Werte) und spezifischer V_{max}-Werte. (iii) Das für Enzyme publizierte Modell des *induced fit* (Koshland 1958) läßt sich auch auf carriervermittelte Prozesse übertragen. Festzuhalten ist jedoch, daß bei carrierkatalysierten Transportprozessen die Interaktion zwischen Carrierprotein und Substrat im Übergangszustand maximale Werte erreicht, hingegen werden die entsprechenden (maximalen) Werte bei enzymkataylsierten Reaktionen im Grundzustand beobachtet.

Der molekulare Transportmechanismus aller Carrierproteine ist bisher mit Ausnahme des Bakteriorhodopsins und des Halorhodopsins (Oesterhelt et al. 1992, Khorana 1993) nicht bekannt, was maßgeblich auf dem Fehlen dreidimensionaler Strukturen beruht. Insbesondere auf der intensiven Analyse des ADP/ATP-Carriers (eine Übersicht gibt: Klingenberg 1985, 1989) basiert das sogenannte *single binding centre gated pore model* (vgl. Abbildung 1.4.1) das heutzutage allgemein zur Beschreibung der elementaren Eigenschaften carriervermittelter Transportprozesse angewendet wird (Klingenberg 1992). Charakteristisch für dieses Modell ist die Annahme, daß im Carrierprotein ein vorgeformter Kanal existiert der nahezu den gesamten Transportweg überspannt. Die typischen Eigenschaften eines Carriers werden dadurch vermittelt, daß das Bindungszentrum des Translokators zu einem bestimmten Zeitpunkt immer nur von einer Membranseite her zugänglich ist. Zu diesem Zweck besitzt der Carrier sogenannte *gates* deren wechselseitiges Schließen bzw. Öffnen die Zugänglichkeit des Transportweges bestimmt. Ausgelöst wird dieser (*gating*-)Prozeß vermutlich durch die Interaktion zwischen Carrier und Substrat und einer sich hieran anschließenden Sequenz räumlicher Ladungsverschiebungen (s. Abbildung 1.4.1). Das gezeigte Modell impliziert weiterhin, daß sich beide *gates* im Übergangszustand in einer intermediären Position befinden. Aus energetischen Gründen ist diese Position bevorzugt, da diese labile Konformation des Carriers die anschließende Abdissoziation des Substrates erleichtert.

Es ist offensichtlich, daß ein postuliertes theoretisches Modell mit den entsprechenden funktionellen Daten übereinstimmen sollte. Für eine Reihe mitochondrialer Carrier konnte in den letzten 5 Jahren der genaue kinetische

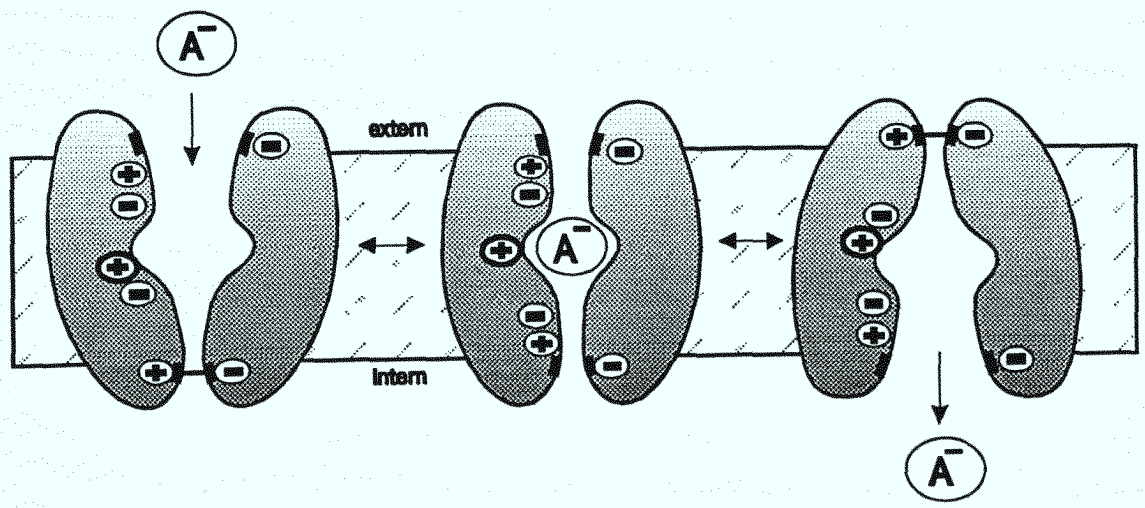


Abbildung 1.4.1: **Beschreibung des *single binding centre gated pore mechanism*.**
Die Grundlagen des gezeigten Modells (umgezeichnet nach: Klingenberg 1992) werden im Abschnitt 1.4 besprochen. Der Mechanismus, der die alternierende Zugänglichkeit des Kanals (*charge-oscillating model of gating*) bewirkt, ist skizziert. mit A^-: anionisches Substrat.

Reaktionsmechanismus bestimmt werden, wobei diese Studien teilweise erst durch den Einsatz rekonstituierter Systeme und der damit verbundenen Möglichkeit der Verwendung beliebiger interner/externer Substratkonzentrationen möglich wurden. Interessanterweise erfolgt bei nahezu allen bisher untersuchten mitochondrialen Carrierproteinen die Translokation der Substrate entsprechend des sogenannten *simultanen* (sequentiellen) Transportmechanismus. Charakteristisch für diesen Mechanismus ist die Existenz von zwei katalytischen Bindungsstellen im Carrierprotein. Erst durch die gleichzeitige Besetzung beider Bindungsstellen bildet sich ein katalytisch-aktiver (ternärer) Komplex aus (vgl. Abb.: 1.4.2/B). Gesichert ist dieser Mechanismus für die nachfolgenden Carrier: den Aspartat/Glutamat-Carrier (Dierks et al. 1988*b*, Sluse et al. 1991), den Oxoglutarat/Malat-Carrier (Indiveri et al. 1991, Sluse et al. 1972), den Dicarboxylatcarrier (Indiveri et al. 1993) und den Citratcarrier (Bisaccia et al. 1993). Weiterhin wurden Hinweise für die Gültigkeit dieses speziellen Mechanismus im Falle des ADP/ATP-Carriers erhalten (Duyckaerts et al. 1980, Sluse et al. 1989). Bislang ist nur eine einzige Ausnahme von diesen identischen kinetischen Transporteigenschaften bekannt. Wie Indiveri et al. (1994) zeigte, erfolgt der Substrattransport beim Carnitincarrier aus Rattenlebermitochondrien entsprechend dem Ping-Pong-Mechanismus (vgl. Abb.: 1.4.2/A). In diesem Zusammenhang fällt auf, daß der Carnitincarrier der einzige mitochondriale Carrier ist, der im physiologischen Zustand (je nach aktueller Substratkonzentration) zwischen Substrat/Substrat-Antiport und unidirektionalem Substrattransport umschalten kann (Indiveri et al. 1991*a*, 1991*b*). Demgegenüber katalysieren die Carrier für die der simultane Mechanismus nachgewiesen wurde (s.o.) ausschließlich einen Substrat/Substrat-Antiport. Festzuhalten bleibt jedoch, daß der, für die Mehrzahl der untersuchten Carrierproteine gezeigte, einheitliche Reaktionsmechanismus zur Aufstellung einer Funktionsfamilie der mitochondrialen Carrier führte (Indiveri et al. 1991, Krämer & Palmieri 1992, Bisaccia et al. 1993).

Der kinetische Befund, wonach für die Mehrzahl der mitochondrialen Carrier zwei Bindungsstellen gefordert werden, hat zudem direkte Auswirkungen auf das *single binding centre gated pore model* (s.o.). Das "klassische" Modell (Klingenberg 1981 & 1992), das nur von einem vorgeformten Kanal mit einer einzigen Bindungsstelle pro Carrierdimer ausgeht (*Ein-Kanal-Modell*), muß folglich in Hinsicht auf ein *Zwei-Kanal-Modell* modifiziert werden, wobei der beobachtete simultane (sequentielle) Mechanismus eine enge Kopplung der einwärts- und auswärtsgerichteten Translokation fordert.

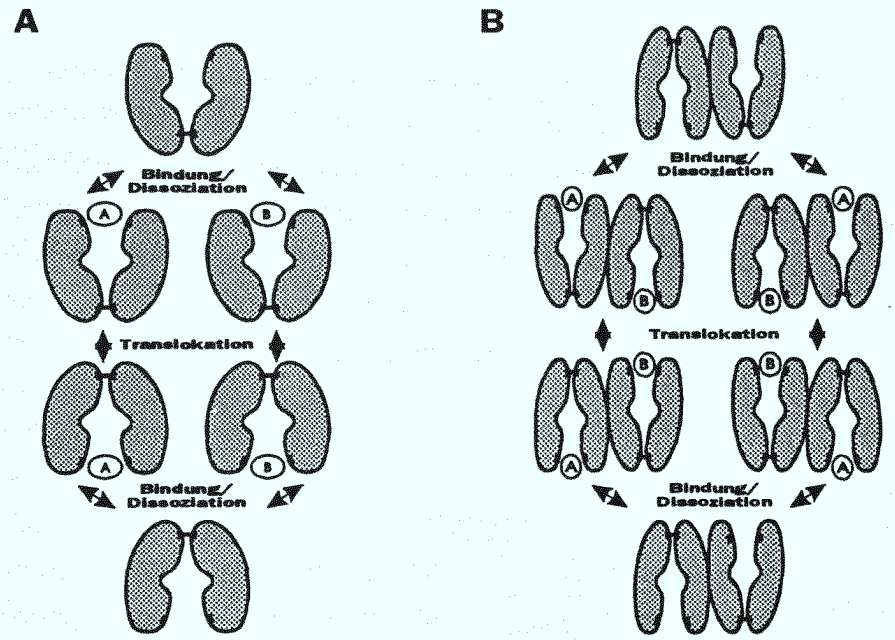


Abbildung 1.4.2: **Funktionsmodelle zur Beschreibung des kinetischen Reaktionsmechanismus.**
A: Darstellung des Ping-Pong-Mechanismus: Die gezeigte Abbildung ist mit dem Modell *des single binding centre gated pore mechanism* (vgl. Abbildung 1.4.1) identisch. Charakteristisch für den Ping-Pong-Mechanismus ist die Ausbildung eines sekundären [Carrier•Substrat$_{in/ex}$]-Komplexes als katalytisch-aktive Komponente.
B: Darstellung des *simultanen (sequentiellen) Mechanismus*: Kennzeichnend für diesen Mechanismus ist die Existenz von zwei Bindungsstellen im Carrierprotein. Erst die gleichzeitige Besetzung beider Bindungsstellen führt zur Ausbildung des ternären [Substrat$_{in}$•Carrier•Substrat$_{ex}$]-Komplexes als katalytisch-aktive Komponente.

1.5 Porenartige Eigenschaften mitochondrialer Carrierproteine

Charakteristisch für alle mitochondrialen Carrier sind sehr hohe Substratspezifitäten, definierte Substrataffinitäten ($\leq 10^{-3}$ M), Aktivierungsenergien $\geq$ 50 kJ/mol sowie Wechselzahlen, die von 8 $\bullet 10^{2}$ min^{-1} (AAC) über 5 $\bullet 10^{3}$ min^{-1} (PIC) bis 2.5 $\bullet 10^{4}$ min^{-1} (UNC) variieren (Klingenberg 1993, Palmieri et al. 1993). Kürzlich wurde jedoch publiziert, daß die Zugabe von quecksilberhaltigen Reagenzien sowohl beim Aspartat/Glutamat- und ADP/ATP-Carrier (Dierks & Krämer 1989, Dierks et al. 1990) als auch beim Carnitincarrier (Indiveri et al. 1992, Palmieri et al. 1992) zur Induktion einer unphysiologischen (unidirektionalen) Effluxfunktion führt. Diese Transportfunktion zeigt sowohl porenspezifische Eigenschaften, wie eine signifikant verringerte Substratspezifität und ein völliger Verlust der Substrataffinität, als auch carrierspezifische Parameter, wie hohe

Aktivierungsenergien (≥ 70 kJ/mol) und Wechselzahlen im Bereich von ca. 10^3 min^{-1} (Dierks et al. 1990*b*). Interessanterweise korrespondieren die beobachteten Poreneigenschaften mit dem vermuteten evolutionären Konzept der Bildung der Carrierproteine. Aufbauend auf Studien an prokaryotischen Transportproteinen wurde vorgeschlagen, daß die Evolution möglicherweise von einer einfachen Pore ausging und sich dann zu komplexeren Strukturen und Mechanismen fortentwickelte (Maloney 1989). Folglich ist davon auszugehen, daß ein proteinimmanenter Kanal ein gemeinsames Strukturmerkmal aller Carrierproteine bildet.

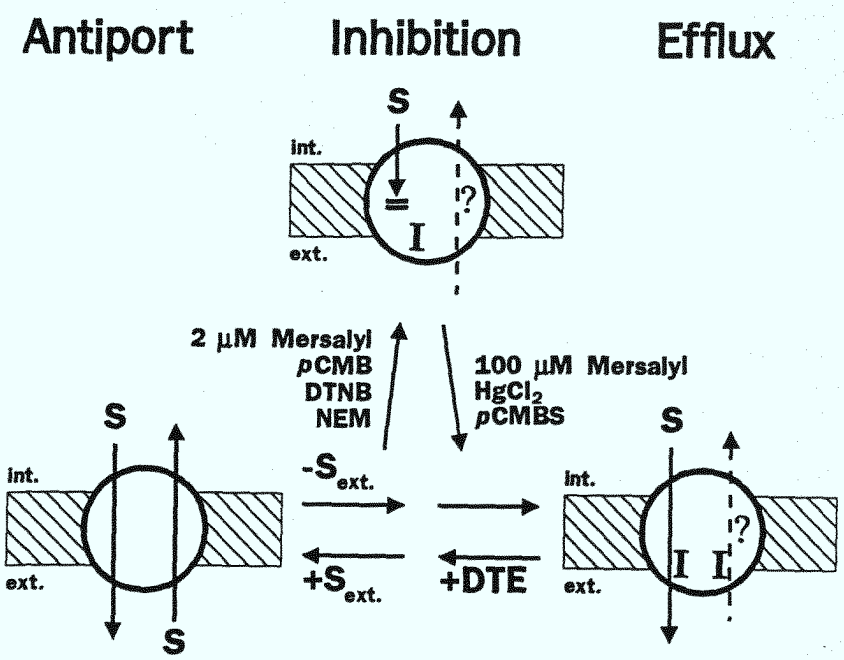


Abbildung 1.5.1: **Funktionelles Modell zur Erklärung der Effluxinduktion beim Aspartat/Glutamat-Carrier (umgezeichnet nach: Dierks et al. 1990*b*).**
Die Lokalisation des Aspartat-Glutamat-Carriers als integrales Membranprotein ist angedeutet. Nach Entfernung des externen Substrates (S) führt die Bindung eines Inhibitors (I) an ein bestimmtes Cystein des Carriers lediglich zur Inhibition der physiologischen Antiportfunktion. Erst die zusätzliche Bindung des zweiten Inhibitors (an ein weiteres Cystein) induziert die unphysiologische Effluxfunktion. Durch Zugabe von DTE und externem Substrat wird die ursprüngliche Transportfunktion des Carriers wieder regeneriert (s. Pfeile). Das Fragezeichen neben der gestrichelten Linie verdeutlicht, daß die Möglichkeit eines unspezifischen Substrat-Influx in die Proteoliposomen nach der Modifikation beider Cysteine bzw. die Frage nach der Beteilung der externen Bindungsstelle an den Konformationsübergängen bisher noch nicht geklärt wurde. Mit: (I), gebundener Inhibitor.

Ein unspezifischer Efflux von verschiedenen Metaboliten aus intakten Mitochondrien nach Zugabe von quecksilberhaltigen Reagenzien war bereits seit mehr als 20 Jahren bekannt (Scott et al. 1970), doch ermöglichten erst die Untersuchungen am rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carrier weitere Einsichten in den Mechanismus dieses Prozesses. Das publizierte Modell (Dierks et al. 1990*b*) zur Erklärung der quecksilberinduzierten Effluxfunktion geht von zwei modifizierbaren Cysteinresten (bzw. Klassen von Cysteinen) aus (vgl. Abbildung: 1.5.1). Die selektive Modifikation einer der beiden SH-Gruppen durch die Zugabe von DTNB, *p*CMB oder Mersalylsäure in geringen Konzentrationen (vgl. auch Tabelle 3.7.1) führt ausschließlich zur Inhibition der physiologischen Antiportfunktion des Carriers. Die Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion erfolgt erst nach der Modifikation eines zweiten Cysteins (vgl. Tabelle 3.7.1). Dies geschieht durch Zugabe (hydrophiler) quecksilberhaltiger Reagenzien wie *p*CMBS, $HgCl_2$ oder Mersalylsäure (in höherer Konzentration). Charakteristisch für die beschriebene Konvertierung der Transportfunktion des Aspartat/Glutamat-Carriers ist die völlige Reversibilität dieses Prozesses (s. Abb. 1.5.1). Die Eigenschaften der physiologischen Transportfunktion des Aspartat/Glutamat-Carriers werden durch diese reversible Modifikation nicht verändert, somit ist eine mögliche partielle Denaturierung des Carrierproteins als Ursache der beobachteten unspezifischen Uniportfunktion ausgeschlossen (Dierks et al. 1990*b*).

1.6 Zielsetzung der durchgeführten Studien

① Mit Hilfe der Anwendung spezifischer Inhibitoren sollte versucht werden, Möglichkeiten zur Differenzierung der beiden essentiellen Cysteine des Aspartat/Glutamat-Carriers zu ermitteln. Die gewonnenen Daten sollten, neben einem besseren Verständnis der Struktur/Funktions-Korrelation des Carriers, auch dazu beitragen, einen (möglicherweise) grundsätzlichen Mechanismus zur Induktion der Effluxfunktion aufzuzeigen.

② Das Amberlite-Verfahren zur Rekonstitution des mitochondrialen Phosphatcarriers sollte etabliert werden. Durch die weitere Verbesserung des Meßsystems sollten die Voraussetzungen zur detaillierten kinetischen Charakterisierung dieses Carriers geschaffen werden.

③ Zusätzlich zu der Aufklärung des Mechanismus des carriervermittelten Phosphattransports sollte weiterhin überprüft werden, ob die kinetische Untersuchung des Phosphatcarriers weitere Rückschlüsse auf die Existenz einer universellen mitochondrialen Carrierfamilie ermöglicht, die sowohl übereinstimmende strukturelle als auch identische funktionelle Eigenschaften zeigen sollte.

④ Der Mechanismus der Effluxinduktion der für den Aspartat/Glutamat-Carrier aufgezeigt wurde, sollte unter Verwendung des rekonstituierten Phosphatcarriers weiter untersucht werden. Diese Experimente könnten möglicherweise den Nachweis eines universellen Mechanismus der Induktion dieser unphysiologischen Uniportfunktion erbringen.

⑤ Vor dem Hintergrund der (bekannten) deutlich unterschiedlichen Primärstrukturen der (Phosphat-)Carrier aus Rinderherzmitochondrien, bzw. aus Hefemitochondrien (*Saccharomyces cerevisiae*) sollten Experimente mit beiden Carriern durchgeführt werden. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, strukturelle Unterschiede und funktionelle Befunde miteinander zu vergleichen. Ziel dieser Untersuchungen sollte insbesondere die Aufklärung der Funktion bestimmter Cysteine sein, wobei beispielsweise die mögliche Identifikation der Cysteine, deren Modifikation zur Induktion der (unphysiologischen) Effluxfunktion führt angestrebt werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien der Firma Amersham International:

AMPLIFY, L-[U-^{14}C]Aspartat, [8-^{14}C]ATP, D-[U-^{14}C]Glucose, L-[U^{14}C]Glutamat, L-[U-^{14}C]Lysin, ^{14}C-methylierte *Rainbow* Molekulargewicht-Standardproteine, Natrium[^{36}Cl]chlorid, Natrium[^{35}S]Sulfat, [5-^{14}C]Oxoglutarat, [^{32}P]Phosphat, [1,4-^{14}C] Succinat.

Chemikalien der Firma Bio-Rad:

Ammoniumperoxydisulfat, Acrylamid, DOWEX 50W-X8, Hydroxylapatit (Bio-Gel HTP), Mercaptoethanol, N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid, TEMED.

Chemikalien der Firma Fluka:

N-Acetylcystein, N-Acetylimidazol, Amberlite XAD-2, BPAB, $C_{12}E_8$, DOWEX 1-X8, DOWEX 2-X10, NBD-Cl, Phenylglyoxal, SITS, Sorbitol.

Chemikalien der Firma Merck:

Cystein, Folin Ciocalteus Phenolreagenz, Glucose, Histidin, Lysin, Natriumdithionit, N-Ethylmaleimid, Pyridoxal-5'-Phosphat, Tyrosin.

Chemikalien der Firma Pharmacia:

Sephadex G-25, Sephadex G-50, Sephadex G-75, Phast Gel 10-15, Phast Gel SDS Pufferstreifen, unmarkierte Molekulargewicht-Standardproteine.

Chemikalien der Firma Sigma:

$C_{13}E_{10}$, Cardiolipin, CAT, DEPC, Diamide, DTE, DTNB, EDC, Fluorescein-5-Isothiocyanat, Glycinmethylester, HEPES, Lactat, Lyticase, Mannitol, Mersalylsäure, MOPS, Nigericin, *p*CMB, *p*CMBS, Pepton, Phenanthrolin, Phospholipid aus Truthahn-Eigelb, PMSF, SDS, Triton X-114.

Abweichende Materialien:

Oxoglutarat, Rinderserumalbumin (Fraktion V), Valinomycin (Boehringer Mannheim); Ultima Gold Szintillationscocktail (Camberra Packard); [^{14}C]NBD-Cl {4-Chlor-7-nitro-[U-^{14}C]benzo-2-oxa-1,3-diazol} (CEA); Hefeextrakt (Difco); DIDS (Pierce); $HgCl_2$ (Henkel); [^{33}P]Phosphat (NEN - Du Pont); N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (Serva).

Bongkrekat wurde von Prof. Berends (Delft) aus Kokosnüssen isoliert. Cyclosporin A erhielten wir von Prof. M. Zoratti (Padua). Die Stammkultur des *Saccharomyces cerevisiae* Stammes ATCC 24657 wurde uns von Prof. M. Klingenberg (München) zur Verfügung gestellt. Die Antikörper gegen den ADP/ATP-Carrier stammen von Dr. B. Seitner (München). Nicht aufgeführte Chemikalien wurden immer in p.A. Qualität bei unterschiedlichen Firmen bezogen.

2.2. Präparative Methoden

2.2.1 Präparation der Rinderherzmitochondrien

Die Präparation der Mitochondrien aus frischen Rinderherzen erfolgte entsprechend der Vorschrift von Smith (1967). Nach der Präparation wurde die Fraktion in 250 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) und 50 μM EDTA suspendiert (50 mg Protein/ml), in flüssigen Stickstoff eingefroren und danach bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Anzucht und Präparation der Hefemitochondrien

Der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm ATCC 24657 wurde im Schüttelkolben bei 30°C unter aeroben Bedingungen in einem semisynthetischen Medium (0.5% Pepton, 0.3 % Hefeextrakt, 0.12% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4, 0.1% Glucose, 0.07% $Mg_2SO_4 \cdot 7\ H_2,O$, 0.05% $CaCl_2$, 0.05% NaCl, 0.0005% $FeCl_3$ und 2% Lactat) bei pH 4.5 angezogen (Gawaz et al. 1990). Die Zellen wurden in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (OD_{600} = 5-6). Die anschließende Protoplastierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von Lyticase (Zymolase) (Guérin et al. 1979, O'Malley et al. 1982, Daum et al. 1982). Bei der Verwendung von 50000 U Lyticase/g feuchter Hefe war die Protoplastierung nach ca. einer Stunde abgeschlossen. Alle weiteren Schritte der präparativen Zentrifugation zur Auftrennung der unterschiedlichen Bestandteile sowie die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer werden ausführlich in der Arbeit von Gawaz et al. (1990) und den dort zitierten Literaturstellen beschrieben. Nach dem abschließenden Zentrifugationsschritt (15 min, 10000 g) wurden die erhaltenen Mitochondrien vorsichtig in 0.6 M Mannitol, 20 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1 mM PMSF, 2 mM EGTA und 0.5 mM EDTA aufgenommen (Proteinkonzentration ≈ 10 mg/ml), bei 4°C kurz homogenisiert (Dounce-Homogenisator), in flüssigen Stickstoff eingefroren und danach bei -70°C aufbewahrt.

2.2.3 Präparation des Aspartat/Glutamat-Carriers aus Rinderherzmitochondrien

Die Aufreinigung des Aspartat/Glutamat-Carriers entspricht dem von Krämer et al. (1986 *b*) beschriebenen Verfahren. Hierbei ist anzumerken, daß die erhaltene Proteinfraktion (im weiteren Verlauf als G-25 Protein bezeichnet) ebenfalls den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier enthält. Infolge der sehr hohen Substratspezifität mitochondrialer Carrierproteine war diese "Verunreinigung" in den durchgeführten kinetischen Untersuchungen jedoch nicht von Bedeutung.

Bei der Präparation des Aspartat/Glutamat-Carriers wurden zuerst die Proteine der Mitochondrienmatrix mittels einer Vorextraktion (2% $C_{13}E_{10}$, 10 mM Pipes - pH 7) unter Niedrigsalzbedingungen entfernt. Die Membranfraktion wurde abzentrifugert (20 min./ 175000 g) und wie folgt aufgearbeitet. Zur Solubilisierung der Carrierproteine wurden 1% $C_{12}E_8$ und 10 mM Pipes (pH 7) in Gegenwart von 1.2 M NH_4AC (pH 6.5) zugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20 min./ 175000 g) wurden 2.5 ml des Überstandes auf 1 g trockenes Hydroxylapatit aufgetragen. Zur Gewährleistung einer hohen Carrieraktivität war es notwendig die Kontaktzeit zwischen der Säule und dem Solubilisat zu verringern. Zu diesem Zweck wurde eine Zentrifugationstechnik entwickelt. Die Passage über die Hydroxylapatitsäule fand in einer präparativen Beckmann-Zentrifuge bei ca. 5000 g (T = 4°C) statt. Unter den eingestellten Hochsalzbedingungen konnten ≤ 85% der kontaminierenden Proteine entfernt werden. Das Eluat enthielt insbesondere den AGC und den AAC. Für die weitere Verwendung wurde die Konzentration des Ammoniumacetats mit Hilfe einer Passage über Sephadex G-25 Säulen von 1.2 M auf 0.3 M reduziert. Die Proteinkonzentration der so erhaltenen (G-25-)Fraktion lag zwischen 0.75 mg/ml und 1.0 mg/ml. Sie wurde direkt zur Rekonstitution des Carriers verwendet.

2.2.4 Präparation des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien

Der Phosphatcarrier wurde aus gefrorenen Rinderherzmitochondrien entsprechend der Vorschrift von Genchi et al. (1998) aufgereinigt. Diese Vorschrift basiert auf dem von Bisaccia et al. (1984) publizierten Verfahren der Aufreinigung des Phosphatcarriers über Hydroxylapatidsäulen in Gegenwart von Cardiolipin.

Nach dem raschen Auftauen der Mitochondrien (je 20 mg Protein) wurden diese zweimal mit 20 mM KCl, 20 mM KPi (pH 6.5) und 2 mM EGTA gewaschen.

Anschließend erfolgte die Solubilisierung des Phosphatcarriers in Gegenwart von 2.5% Triton X-114, 4 mg/ml Cardiolipin, 20 mM KCl, 20 mM KPi (pH 6.5) und 2 mM EGTA (Endvolumen 0.7 ml). Der Zusatz von Cardiolipin war bei diesem Schritt dringend erforderlich, da andernfalls der PIC bei der sich anschließenden Passage über Hydroxylapatid (Einsatz von 0.4 g trockenem Hydroxylapatid bei Auftrag von 0.6 ml Solubilisat) nicht eluiert wurde. Zur Elution der Säule wurde ein Puffer bestehend aus 2.5% Triton X-114, 20 mM KCl, 20 mM KPi (pH 6.5) und 2 mM EGTA verwendet. Es wurden drei Fraktionen zu je 0.5 ml gesammelt. Die zweite Fraktion konnte ohne weitere Zwischenschritte direkt zur Rekonstitution des Phosphatcarriers eingesetzt werden. Die Proteinkonzentration dieser Fraktion lag durchschnittlich bei 0.2 mg/ml. Neben dem Phosphatcarrier wurde auch der ADP/ATP-Carrier in einer vergleichbaren Konzentration mit aufgereinigt.

2.2.5 Präparation des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Methode zur Isolierung des Phosphatcarriers aus Hefemitochondrien leitete sich von dem Verfahren zur Aufreinigung des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien ab. Durch einige Variationen wurde die Methode an die speziellen Umstände beim Arbeiten mit Hefen adaptiert. In erster Linie ist hierbei die hohe Proteaseaktivität in Hefeextrakten zu beachten. In Analogie zur Isolierung des ADP/ATP-Carriers aus *Saccharomyces cerevisiae* (Gawaz et al. 1990) wurde deshalb allen verwendeten Lösungen 1 mM PMSF (als effizienten Inhibitor von Serinproteasen) zugesetzt. Weiterhin wurden die Konzentration des Komplexbildners EGTA von 2 mM auf 5 mM heraufgesetzt. In Kombination mit der Verwendung von 2 mM EDTA sollte dies zur Inaktivierung $Zink^{2+}$-abhängiger Proteasen führen. Die Stabilität des Phosphatcarriers wurde durch ständiges Arbeiten bei 4°C unter gleichzeitigem Zusatz von 1 mM DTE (vgl. Wohlrab 1986*b*, Guérin et al. 1990) erhöht. In der Regel wurde nach den beiden ersten Waschschritten jeweils 10 mg Protein in 400 µl Puffer (2.5% Triton X-114, 4 mg/ml Cardiolipin, 20 mM KCl, 20 mM KPi (pH 6.5), 1 mM PMSF, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA und 1 mM DTE) aufgenommen und anschließend auf 0.25 g trockenen Hydroxylapatid aufgetragen. Es wurden drei Fraktionen zu je 350 µl gesammelt. Die zweite Fraktion wurde zur Verringerung von Aktivitätsverlusten sofort zur Rekonstitution weiter verwendet. In Analogie zur Präparation des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien wurden zwei dominante Banden bei ≥ 30 kDa im Eluat vorgefunden, welche dem PIC und AAC zugeordnet wurden (s. Abschnitt 4 ff.). Die Proteinkonzentration der zweiten Fraktion lag bei ≤ 0.1 mg/ml.

2.2.6 Funktionelle Rekonstitution des Aspartat/Glutamat-Carriers

Das beschriebene Verfahren beruht auf der Inkorporation der Carrierproteine in Liposomen durch kontinuierliche Abreicherung des Detergens mittels hydrophober Chromatographie auf kleinen Polystyrolkugeln (Krämer & Heberger 1986). Die publizierten Bedingungen wurden unverändert übernommen. Die Zugabe der Substrate richtete sich nach der Art der durchzuführenden Experimente. In der Regel wurden 16 mM Aspartat bzw. 8 mM Aspartat und 8 mM Glutamat gleichzeitig eingesetzt. Zur Messung der Aktivität des ADP/ATP-Carriers wurden 10 mM ATP zugegeben. Die gesamte Mischung (der sogenannte "Amberlite-Mix") wurde anschließend, in einem sich wiederholenden Zyklus, 15 mal über eine mit Amberlite XAD-2 Material gefüllte Pasteurpipette gegeben. Das Verhältnis $C_{12}E_8$ zu Amberlite betrug dabei 0.05 zu 1 (g/g). Zu beachten war bei dieser Methode, daß bei der Verwendung von Amberlite (anstatt der sogenannten Bio-Beads) das Material zuvor gründlich mit Methanol und H_2O (bidest.) gewaschen wurde. Vor jedem Experiment erfolgte zusätzlich eine Voräquilibrierung des Säulenmaterials, wobei die Puffer- und Substratkonzentrationen so gewählt wurden, daß sie mit den gewünschten Werten der Proteoliposomen korrelierten. Das Phospholipid wurde in Form von Schalliposomen zugegeben. Die Herstellung dieser Schalliposomen erfolgte analog der von Krämer und Klingenberg (1977) beschriebenen Methode. Bei diesem Verfahren werden 525 mg Phospholipid (enthält ≈ 60% Phosphatidylcholin; Ausgangspunkt bei der Herstellung ist Truthahn-Eigelb) mit 4.375 ml 1 M MOPS/KOH (pH 6.5) sowie 2.625 ml H_2O (bidest.) versetzt. Die Ausbildung der Liposomen erfolgt durch Beschallung (20 Minuten/0°C) unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre.

2.2.7 Funktionelle Rekonstitution des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien

Die Etablierung der Rekonstitution des Phosphatcarriers unter Anwendung der Amberlitemethode war eine der wesentlichen Grundvoraussetzungen zur exakten kinetischen Analyse dieses Carriers. Die exakten Bedingungen zur Bildung aktiver Proteoliposomen werden detailliert im Abschnitt 4.2 vorgestellt. In der Regel wurde eine interne Phosphatkonzentration von ca. 20 - 30 mM eingestellt. Abweichungen von diesen Standartkonzentrationen sind in den Legenden der entsprechenden Figuren ausdrücklich erwähnt. Die Zugabe des Phospholipids erfolgte ebenfalls in Form von Schalliposomen, die in Gegenwart von 50 mM KCl und 20 mM HEPES (pH 6.5) hergestellt wurden.

2.2.8 Funktionelle Rekonstitution des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Parameter zur Rekonstitution des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* leiteten sich unverändert von den Angaben zur Rekonstitution des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien ab. Zur Verringerung proteolytischer Aktivitäten wurden jedoch 1 mM PMSF, 1 mM EGTA und 1 mM EDTA dem "Amberlite-Mix" hinzugegeben.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Transportaktivitäten

Alle Transportaktivitäten im rekonstituierten System wurden durch Messungen der Änderung im Verteilungskoeffizienten (intern/extern) der markierten Substrate ermittelt. Zur exakten Bestimmung der Carrieraktivität wurden sowohl Messungen in der Vortausch-, als auch in der Rücktauschtechnik durchgeführt (vgl. Dierks et al. 1988).

2.3.1.1 Die Vortauschtechnik

Bei der Vortauschtechnik wird die Aufnahme von markiertem Substrat in die Liposomen gemessen (Krämer 1984). Dazu wurde die rekonstituierte Liposomenfraktion durch Größenausschlußchromatographie (Sephadex G-75 Säulen; Größe: 7 x 130 mm, Auftragsvolumen 400 - 600 µl, Elutionsvolumen 600 - 900 µl) von externem Substrat befreit, wodurch gleichzeitig ein Konzentrationsgradient aufgebaut wurde. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß die meisten Experimente in Gegenwart von Valinomycin (500 ng/mg Phospholipid) und Nigericin (200 ng/mg Phospholipid) durchgeführt wurden. Dieser Zusatz gewährleistete, daß die Transportmessungen nicht durch einen pH-Gradienten, bzw. durch ein Membranpotential verfälscht wurden. Der bei diesem Chromatographieschritt benutzte Puffer enthält neben der eigentlichen Puffersubstanz (MOPS, HEPES oder Phosphatpuffer) ebenfalls einen bestimmten Anteil an Sucrose zur Einstellung der osmotischen Verhältnisse. Nachfolgend wurde die Messung der Transportaktivitäten durch Zugabe von markiertem Substrat gestartet. Der Austausch wurde zu genau definierten Zeiten durch Zugabe eines Stoppinhibitors beendet. Zur Kontrolle der Effizienz dieser Inhibition wurde zu einigen Ansätzen das Substrat und der Stoppinhibitor zeitgleich zugesetzt. Abschließend wurde die nicht

von den Liposomen aufgenommene Radioaktivität durch Passage über Ionenaustauschersäulen entfernt, die zuvor mit 4 mg Phospholipid und 2 mg Rinderserumalbumin konditioniert wurden. Zur Elution der Proteoliposomen wurden die Säulen mit 1.2 ml einer isoosmotischen Sucroselösung gespült. Die Elution der Liposomen erfolgte direkt in Szintillations-Vials.

Die Wahl des Stoppinhibitors sowie die geeignetste Form der Ionenaustauschersäulen richtete sich jeweils nach dem untersuchten Carrierprotein, bzw. nach dem transportierten Substrat. Zur schnellen Inhibition des Aspartat/Glutamat-Carriers wurde ≥ 25 mM Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) eingesetzt. Der Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien kann auch durch Zugabe von *p*CMBS in Konzentrationen ≥ 50 µM effizient inhibiert werden. Für den Fall, daß zuvor DTE zur Reaktivierung des Phosphatcarriers verwendet wurde, erfolgte ausschließlich die Verwendung von ≥ 25 mM PLP als Stoppinhibitor. Zur Inaktivierung des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich insbesondere DEPC (Endkonzentration ≈ 0.25 mM), doch ist die Handhabung dieses Inhibitors infolge seiner großen Hydrolyseempfindlichkeit schwierig. Folglich wurde auch dieser Carrier generell durch die Gabe von PLP (≥ 25 mM) als Stoppinhibitor inhibiert. Infolge der relativ schlechten Inhibition nach Gabe von PLP wurden die Ansätze zur Verringerung von Meßwertschwankungen unverzüglich auf die DOWEX-Säule aufzutragen (vgl. auch Abschnitt 4.7). Zur Abtrennung der anionischen Substrate Phosphat und Aspartat konnten generell DOWEX 1-X8 Säulen (Acetatform, pH 6-7) verwendet werden.

Die Austauschraten (v) wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Enzfitter-Biosoft) berechnet, welches den zeitlichen Verlauf der Isotopenäquilibrierung gemäß einer Exponentialfunktion erster Ordnung an die Meßwerte anpaßte. Die apparente Transportaktivitäten [dpm•min^{-1}] wurde durch Multiplikation der Geschwindigkeitskonstante *k* [min^{-1}] mit dem Endwert der Kinetik [dpm] erhalten. Aus dieser Größe ließ sich durch Einbeziehung der spezifischen Radioaktivität [dpm/nmol] und des eingesetzten Probenvolumens [ml] die Volumenaktivität [dpm •min^{-1}/(dpm•nmol^{-1})•ml =nmol/min•ml] des untersuchten Ansatzes bestimmen. Bei bekannter Proteinkonzentration, sowie unter Berücksichtigung der Verdünnung der Proteoliposomen durch die verschiedenen Chromatographieschritte, war es weiterhin möglich die Volumenaktivität in die spezifische Carrieraktivität [µmol/min•mg$_{Protein}$] umzuformen.

2.3.1.2 Die Rücktauschtechnik

Bei der Anwendung der Rücktauschtechnik wurde der Export von radioaktivmarkierten Substraten aus zuvor beladenen Proteoliposomen untersucht. Das Vorbeladen der Proteoliposomen erfolgte durch Zugabe des radioaktiven Isotops für eine Zeitdauer von mindestens 10 Minuten. Nachfolgend wurde mit Hilfe einer G-75 Passage die nicht aufgenommene Markierung entfernt. Gleichzeitig erzeugt dieser Schritt einen Konzentrationsgradienten. Die benutzten Puffer entsprachen den Puffern, die im vorhergehenden Abschnitt bereits vorgestellt wurden. Der Export der internen Markierung wurde durch Zugabe von unmarkiertem Substrat gestartet und zu definierten Zeitpunkten durch Zugabe der bereits erwähnten Stoppinhibitoren beendet.

Abweichend von dieser allgemeinen Beschreibung ergaben sich für die einzelnen Carrierproteine folgende Abweichungen. Wurden Untersuchungen mit dem rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carrier durchgeführt, so konnte zuerst das (gesamte) unmarkierte externe Substrat mit Hilfe einer ersten G-75 Passage abgetrennt werden. In Anschluß hieran erfolgte die Zugabe des radioaktiven Aspartats in hoher spezifischer Radioaktivität (Endkonzentration $\leq 0.5\ \mu M$). Diese Vorgehensweise führte dazu, daß die Menge des einzusetzenden markierten Substrates deutlich verringert werden konnte (vgl. Gl. 4). Infolge des (ausschließlich) stattfindenden Asp/Asp-Austausches änderten sich die Substratkonzentrationen in den beiden Kompartimenten während der Aufnahme der Markierung nicht. Nachfolgend wurde mit Hilfe einer zweiten G-75 Passage das nicht aufgenommene externe Substrat entfernt.

Bei der Anwendung der Rücktauschtechnik auf den Phosphatcarrier erfolgte die Zugabe des radioaktiven Substrates direkt nach der Rekonstitution. Eine erste G-75 Passage war hier nicht möglich, da andernfalls der carriervermittele unidirektionale Phosphattransport zu undefinierten Substratkonzentrationen in den beiden Kompartimenten geführt hätte. Auf dieser Transportaktivität beruhte die absolute Notwendigkeit der Zugabe eines Inhibitors (vgl. Abschnitt 4.2) vor der G-75 Passage die bei 4°C durchgeführt wurde. Der Export der internen Markierung wurde beim PIC durch Zugabe von unmarkiertem Substrat in Kombination mit 5 mM DTE (bei Untersuchung der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion), bzw. nur durch Zugabe von 5 mM DTE (bei Untersuchung der P_i^-/OH^--Antiport- bzw. der P_i^-/H^+-Symportfunktion) gestartet. In diesem Zusammenhang soll darauf verweisen werden, daß die gemessene Zeitabhängigkeit der, durch den Phosphatcarrier katalysierten, Isotopenäquilibrierung in der Rücktauschtechnik den entsprechenden Werten nach Anwendung der Vortauschtechnik völlig

entspricht. Dieses Ergebnis demonstriert, daß die Reaktivierung des Carriers durch DTE in einem (vernachlässigbar) kurzen Zeitraum stattfindet.

Die Transportaktivitäten der einzelnen Ansätze können nach Anwendung der Rücktauschtechnik ebenfalls mit Hilfe des oben genannten Computerprogramms berechnet werden. Die Anpassung der Meßpunkte beruhte dabei auf den nachfolgenden Gleichungen (Dierks & Krämer 1988).

Grundvoraussetzung bei der Berechnung von Rücktauschkinetiken war in allen Fällen die Kenntnis des Start- (dpm_0) und des Endpunktes (dpm_∞) der Isotopenäquilibrierung. Der prozentuale Äquilibrierungsgrad (α) der Reaktionskinetik zu einem beliebigen Zeitpunktes (t) berechnet sich aus:

$$\alpha = 100 \cdot (dpm_0 - dpm_t) / (dpm_0 - dpm_\infty) \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Unter der Annahme, daß die Menge an externem Substrat im Vergleich zum internen "Pool" sehr groß war ($S_{ex}V_{ex} >> S_{in}V_{in}$), konnte die Zeitabhängigkeit der Isotopenäquilibrierung folgendermaßen beschrieben werden:

$$\alpha = 100 \cdot (1 - e^{-kt}) \qquad \text{(Gl. 2)}$$

Die erhaltenen Werte für die apparente Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k) [min^{-1}] gaben somit direkt den zeitlichen Verlauf der Isotopenäquilibrierung wieder. Bei genauer Kenntnis des aktiven Innenvolumens der Proteoliposomen (V_{in}) sowie der internen Substratkonzentration (S_{in}) konnte die Austauschaktivität (v´) wie folgt bestimmt werden.

$$v' = k \cdot V_{in} \cdot S_{in} \quad [\mu M \cdot min^{-1}] \qquad \text{(Gl. 3)}$$

Entsprechend der Gleichung 3 können folglich nur solche Austauschaktivitäten direkt miteinander verglichen werden, die unter Verwendung identischer Proteoliposomen bestimmt wurden, da nur hier die Forderung nach exakt gleichen aktiven Innenvolumen und internen Substratkonzentrationen erfüllt ist. Diese Forderung schließt somit eine generelle Vergleichbarkeit der in Rücktauschexperimenten gewonnenen Transportaktivitäten aus (Dierks & Krämer 1988).

2.3.2 Effluxexperimente

Wie schon in der Einleitung erwähnt, bzw. für den Phosphatcarrier in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt wurde, induziert die Zugabe quecksilberhaltiger Reagenzien sowohl beim Aspartat/Glutamat-Carrier als auch beim Phosphatcarrier einen unidirektionalen Transportmodus (Efflux). Für den Fall, daß der Transport der physiologischen Substrate in der Effluxfunktion untersucht wurde,

entsprach die Durchführung dieser Experimente den Versuchen, die mit Hilfe der Rücktauschtechnik durchgeführt wurden. Der Transport wurde im Falle der Efluxexperimente durch Zugabe der beschriebenen SH-Reagenzien (vgl. Abschnitte 1.5 & 4.5) gestartet und durch Zugabe von 5 mM DTE und 40 mM PLP gestoppt. Die Auswertung der Experimente entspricht dem im Abschnitt 2.3.1.2 beschriebenen Verfahren.

Wurde der Transport unphysiologischer Stoffe untersucht, so mußte die Inkorporation dieser Substanzen in die Proteoliposomen direkt bei der Rekonstitution stattfinden. Die sich hieran anschließenden Schritte entsprachen jedoch der generellen Durchführung der Experimente (s.o.).

Zur Abtrennung anionischer Substrate wie Phosphat, Sulfat, Oxoglutarat oder Succinat konnten DOWEX 1-X8 Säulen (Acetatform, pH 6-7) verwendet werden. Ungeladene Stoffe wie z.B. Glucose wurden mittels kalibrierter Sephadex G-50 Säulen abgetrennt. Kationische Moleküle wie z.B. Lysin wurden dagegen mittels DOWEX 50W-X8 Säulen (Lithiumform) entfernt. Zur Elution der Proteoliposomen wurden jeweils isoosmolare Sucroselösungen verwendet.

2.3.3 Bestimmung des aktiven Innenvolumens der Proteoliposomen

Zur Berechnung des aktiven Innenvolumens der Proteoliposomen wurde die Substrataufnahme bei gleichen internen und externen Substratkonzentrationen bestimmt (vgl. Krämer & Heberger 1986). Der Anteil an Radioaktivität der von einem Antiportcarrier in Abwesenheit einer treibenden Kraft in die Proteoliposomen transportiert wird, kann durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$dpm_{in}/dpm_{ex} = (S_{in} \cdot V_{in})/(S_{ex} \cdot V_{ex}) \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Durch Umstellung von Gl. 4, sowie unter der Bedingung $S_{in} = S_{ex}$ gilt:

$$V_{in}(\mu l/ml) = 1000 \cdot (dpm_{in}/dpm_{ex}) \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Gleichung 5 impliziert, daß das externe Volumen zu 100% gleich 1000 μl/ml gesetzt wird. Diese Auslegung gilt selbstverständlich nur bei $V_{in} << V_{ex}$.

2.3.4 Transformation der apparenten Transportraten

Bei Arbeiten mit dem mitochondrialen Phosphatcarrier war es oftmals notwendig die apparenten Transportraten auf die maximalen Transportraten umzurechnen. Die wesentliche Bedeutung dieser Vorgehensweise beruhte auf der

Unterscheidung zwischen dem Einfluß des eingestellten pH-Wertes auf die Konzentration der jeweiligen Substrate ($H_2PO_4^-$, bzw. H^+ oder OH^-) von anderen Effekten. Die durchgeführte Transformation der Daten beruhte auf der Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung: Diese Vorgehensweise beinhaltete die genaue Kenntnis der jeweiligen K_m-Werte sowie der aktuellen Substratkonzentrationen. Die aktuellen Substratkonzentrationen ergaben sich direkt aus dem eingestellten pH-Wert (H^+ oder OH^-) oder konnten mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ($H_2PO_4^-$) berechnet werden. Die entsprechenden pK_S-Werte der Phosphorsäure sind: pK_1: 2.16, pK_2: 7.21 und pK_3: 12.33. Die internen und externen K_m-Werte des Phosphatcarriers werden in den Abschnitten 4.3 & 4.4 aufgeführt.

2.4 Allgemeine Methoden

2.4.1 Spektrale Bestimmungen

Die colorimetrische Proteinbestimmung wurde entsprechend der Methode von Helenius und Simons (1972) durchgeführt. Zur Eliminierung des störenden Ammoniumacetats wurde zuvor der Proteinanteil mit 0.015% Desoxycholat und 7.2% Trichloressigsäure (Peterson 1977) ausgefällt. Absorptionspektren des modifizierten AGC wurden bei Raumtemperatur mit einem Zweistrahlphotometer der Firma Perkin Elmer, Modell Lambda 15, aufgenommen. Unmodifiziertes Protein wurde in allen Fällen in der Referenzküvette vorgelegt.

2.4.2 Einstellen des internen/externen pH-Wertes

In allen Experimenten wurde der interne pH-Wert direkt bei der Rekonstitution eingestellt. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit mitochondrialer Carrierproteine gegenüber großen pH-Wert-Schwankungen wurden zu diesem Zweck 0.05 M KOH oder 0.05 M HCl tropfenweise mit einer Pipette zugegeben. Die Pufferkonzentration im Medium lag bei ≥ 100 mM. Experimente die gleiche interne und externe pH-Werte erforderten wurden generell in Anwesenheit von Valinomycin (500 ng/mg Phospholipid) und Nigericin (200 ng/mg Phospholipid) durchgeführt. Somit wurde ein pH-Gradient bzw. ein elektrisches Potential über der Membran verhindert. In den Experimenten bei denen die Transportaktivität in Gegenwart eines pH-Gradienten gemessen werden sollte, wurde zuerst der interne pH Wert bei der Rekonstitution eingestellt. Vor dem Start der Kinetik erfolgte die Einstellung des externen pH-Wertes mittels einer Passage der Proteoliposomen über eine Sephadex G-75 Säule, wobei diese zuvor auf den gewünschten pH-Wert mit einer stark gepufferten Lösung eingestellt wurde.

2.4.3 Einstellen der Kaliumdiffusionspotentiale

Kaliumdiffusionspotentiale konnten im rekonstituierten System durch Verwendung von Valinomycin (500 ng/mg Phospholipid) in Gegenwart von Kalium-Gradienten (100 mM internes K^+/ 1 mM externes K^+ bzw. umgekehrt) erzeugt werden. Die Kalium-Gradienten wurden dadurch ausgebildet, daß alle Puffer und Salze zuerst in der Natrium-Form zugesetzt wurden. In einem sich anschließenden Chromatographieschritt (Sephadex G-75 Passage) wurden diese dann extern durch die Kalium-Form der Verbindungen ersetzt. Die Erzeugung von Kalium-Gradienten mit umgekehrtem Vorzeichen erfolgte durch eine Umkehrung der gerade erwähnten Schritte. Entsprechend der Nernst-Gleichung erzeugte ein Kalium-Gradient von 1/100 ein (theoretisches) Membranpotential von 120 mV.

2.4.4 Chemische Modifikation (Inaktivierung) der Carrierproteine

Die verschiedenen Modifizierungsreagenzien wurden für jedes Experiment frisch angesetzt. Die einzige Ausnahme bildeten die Cysteinreagenzien $HgCl_2$, Mersalylsäure, DTNB, *p*CMB und *p*CMBS, die jeweils ausgehend von eingefrorenen Stammlösungen angesetzt wurden. Als Lösungsmittel für die einzelnen Substanzen wurden verwendet: absoluter Alkohol (NBD-Cl, DEPC) 50% Ethanol: (DIDS, SITS, Phenylglyoxal, Diacetyl); Acetonitril (BPAB); DMSO (FITC) sowie 50 mM Phosphatpuffer - pH 7 (DTNB). PLP in hohen Konzentrationen wurde in 1 M Imidiazol (pH 6.5) gelöst. Alle weiteren Reagenzien, sowie auch PLP in niedrigen Konzentrationen ($\leq$ 150 mM), wurden in dem jeweils zu Äquilibrierung der Sephadex G-75 Säule verwendeten Puffer gelöst. Die Modifikation der Carrierproteine erfolgte in der Regel nach Entfernung des externen Substrates. Zum Kontrollansatz wurde in allen Experimenten ein vergleichbares Volumen des Lösungsmittels (in Abwesenheit des Inhibitors) zugesetzt. Einige der aufgeführten Modifizierungsreaktionen konnten durch Zusatz eines weiteren Stoffes zu einem exakt definierten Zeitpunkt gestoppt werden. In einzelnen handelt es sich dabei um: GME (EDC), DTE (DIDS, FITC, SITS) bzw. Histidin (DEPC). Die Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl konnte bei pH-Werten $\geq$ 7.8 ebenfalls durch den Zusatz von DTE gestoppt werden, ohne daß dabei der gebundene Inhibitor revertiert wurde. Weitere Erläuterungen sind in den Legenden der entsprechenden Figuren und Tabellen angegeben.

2.4.5 Überprüfung des Substrateinflusses auf die Inhibitorwirkung

Zur Überprüfung des Ausmaßes der gegenseitigen Beeinflussung von Inhibitor und Substrat auf die Inaktivierung des Carriers wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt die jeweils auf dem Prinzip der Vortauschtechnik (vgl. 2.3.1.1) beruhten. Nach der Rekonstitution wurden die Proteoliposomen vom externen Substrat mittels Passage über eine Sephadex G-75 Säule befreit. Daran anschließend erfolgte eine zweiminütige Vorinkubation mit dem Substrat (in unterschiedlichen externen Konzentrationen) bevor der Inhibitor zugegeben wurde. Nach der zweiten G-75 Passage wurden die verbleibende Carrieraktivität bestimmt. Die apparenten Aktivitäten wurde zur Auswertung der Experimente umgeformt. Der sogenannte "relative Schutz" beschreibt direkt den Einfluß der Vorinkubation mit Substrat auf die Modifizierungsreaktion. Für weitere Informationen: s. Legende der entsprechen Abbildung.

2.4.6 Überprüfung der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Reagenzien

Die Beeinflussung einer bestimmten Modifizierungsreaktion durch die Zugabe verschiedener Inhibitoren wurde folgendermaßen untersucht. Zuerst erfolgte eine Vorinkubation mit einem der ausgesuchten Reagenzien. Die Bedingungen wurden dabei so gewählt, daß eine Restaktivität des Carriers nach diesem Schritt von ≤ 10 % erzielt wurde. Hieran anschließend fand die Inkubation mit dem zweiten Inhibitor statt, wobei die Inhibitorkonzentration und die Inkubationszeit für diesen Schritt so gewählt wurden, daß auch dieses Reagenz den Carrier stark hemmt (Restaktivität ≤ 10%). Für den Fall, daß zumindest einer der beiden zugesetzten Inhibitoren revertiert werden konnte, wurde generell das Ausmaß der Revertierung in Kontrollansätzen mit überprüft.

2.4.7 Modifizierung der Carrierproteine durch Einsatz [^{14}C]-markierter Inhibitoren

Die Markierung essentieller Cysteine mittels [^{14}C]-NBD-Cl wurde analog der Inaktivierung durch unmarkierte Inhibitoren (vgl. Abschnitt 2.4.4) durchgeführt. Zur Steigerung des Anteils an inkorporierter Markierung wurde stets ein pH Wert von ≥ 7.5 in den betreffenden Ansätzen eingestellt. Nach der Abtrennung des nicht abreagierten [^{14}C]-NBD-Cl, mußte das gebildete [^{14}C]-NBD-AGC-Produkt vor der Gelelktrophorese stabilisiert werden, da anderenfalls der gebundene Inhibitor durch das im Probenpuffer vorhandene Mercaptoethanol revertiert wurde. Zu diesem Zweck wurde die Nitrogruppe des gebundenen NBD durch

chemische Reduktion mit überschüssigen Natriumdithionit in eine primäre Aminogruppe umgewandelt (Andrews et al. 1984). In der Regel wurden ≤ 5 µg des markierten Proteins auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Zur fluorographischen Detektion der Radioaktivität wurden die Gele zuerst mit Coommassie Brilliant Blue R 250 gefärbt und anschließend mit AMPLIFY für eine Zeitdauer von 30 Minuten behandelt. Nachdem die Gele auf einem Filterpapier im Vakuum getrocknet wurden (70°C, 90 min), wurden sie für eine Zeitdauer von (mindestens) 4 Wochen bei -70°C auf einem röntgenempfindlichen Film (Fuji RX) exponiert und abschließend entwickelt.

2.4.8 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese des [^{14}C]-markierten Proteins

2.4.8.1 Durchführung der Gelelektrophorese

Die beschriebene Elektrophorese basiert auf der Veröffentlichung von Schägger und von Jagow (1987).

Das Sammelgel bestand aus 4 % (w/v) Acrylamid, 0.125 % (w/v) N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid, 0.75 M Tris-HCl (pH 8.45), 0.075 % (w/v) SDS, 0.083 % (w/v) Peroxidisulfat und 0.083 % (w/v) TEMED. Das Trenngel setzte sich aus 10 % (w/v) Acrylamid, 0.4 % (w/v) N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid, 1.0 M Tris-HCl (pH 8.45), 0.1 % (w/v) SDS, 13.3 (v/v) % Glycerin, 0.033 % (w/v) Peroxidisulfat und 0.033 % (w/v) TEMED zusammen.

Der Probenpuffer enthielt 4 % (w/v) SDS, 12.5 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) Mercaptoethanol, 0.05 M Tris-HCl (pH 8) und 0.01 (w/v) % Bromphenolblau.

Der Anodenpuffer bestand aus 0.2 M Tris-HCl (pH 8.9) wohingegen sich der Kathodenpuffer aus 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine und 0.1 % (w/v) SDS zusammensetzte.

In der Regel wurden Mini-Gele der Größe 101•82•0.75 mm hergestellt. Optimale Trennergebnisse bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden bei Anlegung einer Spannung von 60 V (Stromstärke: 30 mA) erzielt. Beim gleichzeitigen Lauf von zwei Gelen lagen die Werte dementsprechend höher.

Als Molekulargewichtsmarker wurden folgende Proteine verwendet: Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (68 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa) und α-Lactalbumin (14.4 kDa).

2.4.8.2 Färbemethoden

Die Anfärbung der Proteine durch Coommassie Brilliant Blue R 250 erfolgte in Abwandlung der Vorschrift von Weber und Osborn (1969). Hierbei wurden die

Gele nach der Elektrophorese für eine Stunde in 30 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Nach Austausch dieser Lösung gegen eine 0.25 % (w/v) Lösung von Coommassie Blue wurden die Gele bis zur intensiven Färbung für eine Zeitdauer von 2 Stunden gründlich geschüttelt. Die abschließende Entfärbung erfolgte im Verlauf von ca. 2 Tagen in 10 % (v/v) Essigsäure, wobei der Entfärber mehrmals gewechselt wurde.

Für Western-Analysen der getrennten Proteinbanden wurden die ungefärbten Gele mit einem in Wasser angefeuchteten Stück Nitrocellulose (Schleicher & Schüll BA 85) bedeckt und 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 Immunodetektion durchgeführt. Dazu bedurfte es einer einstündiger Inkubation zunächst mit polyclonalen Antikörpern gegen Porin (1:300 in Blockierungspuffer), gegen den Phosphatcarrier (1:500) 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).

3 Struktur/Funktions-Korrelation essentieller Aminosäurereste des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers

(Dierks et al. 1992, Stappen et al. 1992)

3.1 Einleitung

Zur Ermittlung von Struktur/Funktions-Beziehungen membranständiger Proteine bieten sich insbesondere zwei experimentelle Ansätze an. Der molekularbiologische Ansatz beruht auf einer spezifischen (*site-directed*) Mutagenese in der für das Protein kodierenden DNA und anschließender Expression des mutierten Proteins. Ein Beispiel für die intensive Anwendung dieser Methode bilden die umfangreichen Untersuchungen der *Lac* Permease aus *E. coli* (Kaback 1990, 1992). In Hinsicht auf mitochondriale Carrier ist dieses Verfahren jedoch zur Zeit (noch) nicht von großer Bedeutung. Dieser Umstand beruht neben den oftmals noch gänzlich unbekannten Primärstrukturen insbesondere auf den großen Schwierigkeiten bei der Expression dieser eukaryotischen Carrierproteine in Bakterien (Ferreira et al. 1992, Miroux et al. 1992, Fiermonte et al. 1993). Struktur/Funktions-Korrelationen auf Basis der spezifischen Mutagenese wurden bislang lediglich für den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier aus *Saccharomyces cerevisiae* publiziert (Klingenberg et al. 1992, Nelson et al. 1993).

Die weitaus meisten Studien zur Struktur/Funktions-Korrelation bei mitochondrialen Carrierproteinen beruhen auf der Anwendung spezifischer Modifizierungsreagenzien (allgemeine Übersichtsartikel sind z.B.: Vallee 1969, Feeney 1987). Die Bedeutung dieser proteinchemischen Methode liegt insbesondere in der Identifikation und Markierung essentieller Aminosäurereste, die am Aufbau der Bindungsstellen sowie anderer wichtiger funktioneller Domänen des Carriers beteiligt sind. Diese Methode wurde beispielsweise detailliert auf den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier angewendet. Die durchgeführten Studien belegten (u.a.) die große Flexibilität der matrixseitigen *Loops* dieses Carriers (eine Übersicht gibt: Klingenberg 1989; vgl. auch Abbildung 1.3.1).

Die Anwendung bestimmter Modifizierungsreagenzien auf den Aspartat/Glutamat-Carrier aus Rinderherzmitochondrien führte zur Induktion einer unphysiologischen Uniportfunktion (vgl. Abschnitt 1.5). Von Dierks et al. (1990*b*) wurde gezeigt, daß diese Effluxfunktion auf der Modifikation zweier unterschiedlicher Cysteine (bzw. Klassen von Cysteinen) beruht. Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus der Effluxinduktion sollte mit Hilfe der chemischen Modifikation wichtige strukturelle Aspekte dieses Prozesses analysiert werden. In Ergänzung zu bereits durchgeführten Untersuchungen zur Inhibition des Aspartat/Glu-

tamat-Carriers mittels divergenter Reagenzien (vgl. Tabelle 3.1.1), erwies sich insbesondere das fluoreszierende, heteroaromatische Reagenz NBD-Cl (4-Chlor-7-nitrobenzofurazan bzw. 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, vgl. Strukturformel in Abb. 3.2.1) das bislang vorwiegend zur Charakterisierung der Bindungsstellen in F_1F_O-ATPasen (Ferguson et al. 1975*a*+*b*, Ceccarelli et al. 1989, Bickel-Sand-

Tabelle 3.1.1: **Inaktivierung des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers durch verschiedene Inhibitoren.**

Die Konzentration der verschiedenen Reagenzien die zu einer Halbierung der Transportraten führen (I_{50}-Werte) werden miteinander verglichen. Zusätzlich sind der modifizierte Aminosäurerest sowie (falls bekannt) dessen Lokalisation angegeben. Die Proteoliposomen wurden jeweils bei pH 6.5 (EDC: pH 6.2/50 mM Acetat) in Abwesenheit von externem Substrat (vgl. Abschnitt 2.4.4) mit den Reagenzien inkubiert. Die Einstufung als Bindungsstelleninhibitor erfolgte in den Fällen, bei denen die Inaktivierung durch Zugabe der spezifischen Substrate (im Konzentrationsbereich der entsprechenden K_m-Werte) signifikant (≥ 50%) verringert wurde (Dierks et al. 1992).

Reagenz	I_{50}-Wert [mM]		Effluxinduktion nach Zugabe von [mM]:	modifizierte Aminosäure	Bindungsstellen-inhibitor
	Antiport	Efflux			
DTNB	0.2	n.b.	----	Cys	n.b.
*p*CMB	0.002	n.b.	----	Cys	n.b
NEM	1.0	n.b.	----	Cys	n.b.
BPAB	0.003	n.b.	----	His (?)	n.b.
SITS	0.3	n.b.	----	Lys	ja
FITC	0.08	n.b.	----	Lys	n.b
PLP	0.9	> 1.0	----	Lys	ja
EDC	0.3	0.45	----	Lys	ja
DEPC	0.02	0.08	----	Lys/His[a] (?)	ja
$HgCl_2$	0.002	----	0.002	Cys	n.b
Mersalylsäure	0.002	----	0.100	Cys	n.b.
*p*CMBS	0.002	----	0.040	Cys	n.b.
DIDS	0.008	----	0.080[b]	Cys/Lys[c] (?)	n.b.

a: Widersprüchliche Ergebnisse erlaubten keine exakte Einordnung
b: Führte nur zu einer schwachen Effluxinduktion
c: Hinweise auf die Modifikation mehrerer Aminosäurereste wurden erhalten
n.b.: nicht bestimmt

kötter & Strümper 1989) verwendet wurde, als äußerst interessantes Reagenz. Wir konnten zeigen, daß NBD-Cl spezifisch ein Cystein des Aspartat/Glutamat-Carriers modifiziert das mit hoher Wahrscheinlichkeit in der externen Bindungsstelle des Carriers lokalisiert ist. Die hohe Spezifität der Reaktion, in Kombination mit der Verfügbarkeit von [^{14}C]-NBD-Cl ermöglichte umfassende Studien zur Struktur/Funktions-Korrelation des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers.

3.2 Die Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl und BPAB - Funktionelle Klassifizierung von Cys_a

Wir beobachteten, daß eine 15-minütige Inkubation des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers mit NBD-Cl in Konzentrationen ≥ 200 μM (pH 7) zu einer vollständigen Inaktivierung des Aspartattransports in Proteoliposomen führte. Aufgrund der beschriebenen Reaktionen von NBD-Cl mit Cystein- (Miyamoto et al. 1986, Bailin et al. 1990), Lysin- (Allegrini et al. 1983, Randall et al. 1987) und Tyrosinresten (Ferguson et al. 1975*b*, Ceccarelli et al. 1989) wurde die Spezifität der NBD-Cl-vermittelten Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers eingehend untersucht. Kennzeichnend für ein Reaktionsprodukt aus NBD-Cl mit Lysinresten ist die Insensitivität der Modifikation gegen eine Zugabe von Verbindungen mit freien SH-Gruppen (Aboderin et al. 1973, Ferguson et al. 1975*a*). Im Gegensatz dazu wird die Modifikation von Cystein- und Tyrosinresten durch die Gabe von DTE revertiert (Deters et al. 1975, Grubmeyer et al. 1986). Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente (vgl. Tabelle 3.2.1) sprechen deutlich gegen die Modifikation von Lysinresten des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl. Die Tabelle belegt, daß insbesondere die Zugabe von Mercaptoethanol zu einer vollständigen Revertierung des gebundenen Inhibitors (NBD-Cl) führte.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des modifizierten Aminosäurerestes beruht auf unterschiedlichen spektralen Eigenschaften der NBD-Protein-Produkte. NBD-Cl zeigt im Photometer eine Absorptionsbande im Wellenlängenbereich um 340 nm. Das mögliche Reaktionsprodukt von NBD-Cl mit primären Aminogruppen (NBD-Lys-Protein) absorbiert bei 475 nm, hingegen wird nach Bindung von NBD-Cl an Thiolgruppen (NBD-Cys-Protein) eine Bande bei 425 nm und nach der Modifikation phenolischer Hydroxylgruppen durch NBD-Cl (NBD-Tyr-Protein) eine

Tabelle 3.2.1: **Die Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl ist reversibel.**
Der rekonstituierte AGC wurde bei pH 7 für 15 Minuten mit 70 μM NBD-Cl inkubiert. Verschiedene Teilansätze wurden danach mit 5 mM DTE, 5 mM Cystein oder 5 mM Mercaptoethanol behandelt. Nach der Gelfiltration wurden die resultierenden Transportaktivitäten durch Anwendung der Vortauschtechnik nach Zugabe von 50 μM externem [^{14}C]-Aspartat bestimmt (vgl. Abschnitte 2.3.1.1 & 2.4.4). Anzumerken ist, daß nach Alkalisierung des Mediums (pH ≥ 8) nur noch Mercaptoethanol, nicht aber DTE oder Cystein die Inaktivierung signifikant (≥ 40%) revertiert (Ergebnis nicht gezeigt).

Zugabe von (1., 2.)	Restaktivität (%)
unmodifizierter Carrier (2 % EtOH)	100
NBD-Cl, ----	23
NBD-Cl, DTE	51
NBD-Cl, Cystein	54
NBD-Cl, Mercaptoethanol	103

Bande bei 390 nm beobachtet (Ghosh et al. 1968, Birkett et al. 1970, Fayer et al. 1973). Die zeitversetzte Aufnahme mehrerer Absorptionspektren nach Inkubation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl (vgl. Abbildung 3.2.1) belegt eindeutig, daß die Inaktivierung des Carriers ausschließlich auf der Reaktionen zwischen NBD-Cl und SH-Gruppen beruht. Unterstützt wird dieses Ergebnis zudem durch den Befund, daß die Zugabe des tyrosinspezifischen Reagenz *N*-Acetylimidazol (Riordan et al. 1965, Auld et al. 1970, Bünning et al. 1978) ohne Effekt auf die Aktivität des Aspartat/Glutamat-Carriers ist (Ergebnis nicht gezeigt). Das aufgezeichnete Spektrum (s. Abb. 3.2.1) zeigt einen isosbestischen Punkt bei 371 nm. Dieser Befund steht im Einklang mit dem erwarteten Reaktionsmechanismus der Modifikation des Carriers durch NBD-Cl, da bei der nucleophilen aromatischen Substitution keine (zumindest keine spektroskopisch aktiven) stabilen Intermediate gebildet werden (vgl. Lehrbücher der organischen Chemie, z.B. March 1985). Weiterhin ist anzumerken, daß für den pH-Bereich zwischen pH 5.5 und pH 8.25 identische Spektren erhalten wurden. Offensichtlich ist die Reaktion zwischen NBD-Cl und dem Aspartat/Glutamat-Carrier durch eine außerordentlich hohe Spezifität gegenüber Cysteinresten gekennzeichnet.

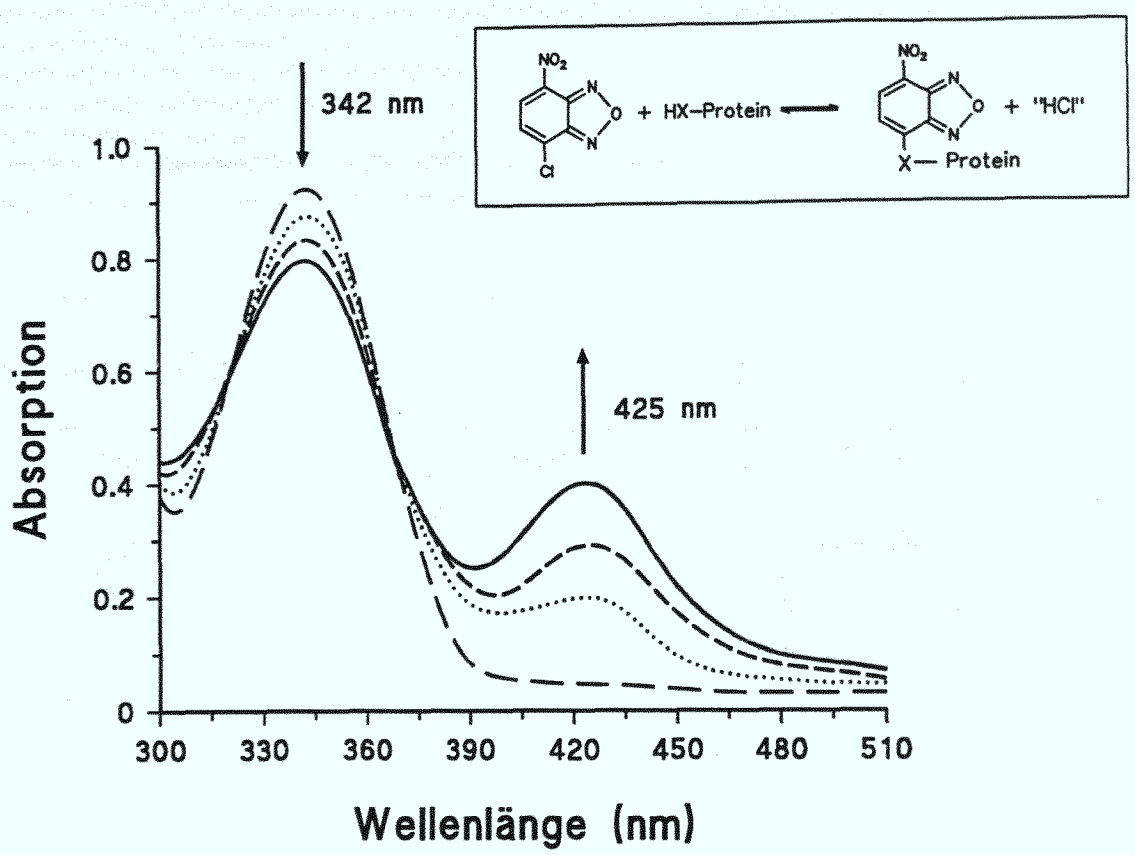


Abb.3.2.1: **Absorptionsspektrum nach Modifikation des AGC durch NBD-Cl.**
Der solubilisierte Aspartat/Glutamat-Carrier (0.65% $C_{12}E_8$/0.3 M Ammoniumacetat - pH 7.0) wurde mit 0.1 mM NBD-Cl inkubiert. Die Aufzeichnung der einzelnen Spektren erfolgte unmittelbar nach der Zugabe des Inhibitors (—), bzw. nach einer Reaktionsdauer von 5 (••), 10 (---) und 15 (—) Minuten. Die Spektren wurden als Differenzspektren gegen den unmodifizierten AGC in der Referenzküvette aufgezeichnet. Nebenbild: Reaktionsgleichung der Modifikation von nucleophilen Aminosäureresten durch NBD-Cl.

In verschiedenen Publikationen wurde nachgewiesen, daß die Geschwindigkeit der Inaktivierung des betreffenden Proteins durch NBD-Cl im wesentlichen auf dem Dissoziationsgrad des modifizierten Aminosäurerestes beruht (Ghosh et al. 1966, Fayer et al. 1973). Unter der Annahme von Cys-S^- als angreifendes Nucleophil wurde auf der Basis der gemessenen pH-Abhängigkeit der Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl (s. Tabelle 3.2.2) ein pK_S-Wert von $\leq$ 6.7 für das (die) modifizierte(n) Cystein(e) abgeleitet. Dieser Wert ist erheblich niedriger als der pK_S-Wert der SH-Gruppe von freiem Cystein (pK_S-Wert = 8.3, vgl. Edsall & Wyman 1958).

Tabelle 3.2.2: **pH-Abhängigkeit der Modifikation des AGC durch NBD-Cl.**
Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Modifikation des AGC durch NBD-Cl wurden die Proteoliposomen bei den jeweiligen pH-Werten mit NBD-Cl in 6 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0.005 mM und 1 mM für 15 Minuten inkubiert (vgl. Abschnitt 2.4.2 & 2.4.4). Die gezeigten Werte, die eine halbmaximale Inaktivierung des Carriers verursachen (I_{50}-Werte) wurden anschließend berechnet.

externer pH	I_{50}-Wert [μM]
5.5	400
6.0	250
6.5	50
7.0	35
7.5	20
8.0	20

Die Abbildung 3.2.2 beschreibt die kinetische Analyse der Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl in unterschiedlichen Konzentrationen (vgl. Levy 1963, Scrutton et al. 1965). Der Inhibitor wurde jeweils im mindestens 15-fachen Überschuß hinzugegeben, so daß die Gesamtreaktion einem Zeitgesetz pseudo-erster Ordnung folgt. Mit Hilfe der Teilfigur 3.2.2/A wurden die entsprechenden apparenten Inaktivierungskonstanten [k_{app}] bestimmt. Die doppelt-logarithmische Auftragung (Fig. 3.2.2/B) zeigt deutlich eine lineare Abhängigkeit der ermittelten Inaktivierungskonstanten. Auf Basis der zugrunde liegenden Gleichung, wonach:

$$\log k_{app} = \log c + n \bullet \log [\text{Inhibitor}]$$

ist, geht aus der Steigung der resultierenden Geraden (Fig. 3.2.2/B) unmittelbar die Stöchiometrie (n) der Modifizierungsreaktion hervor (c: Proportionalitätsfaktor für die Umrechnung der apparenten in die tatsächliche Inaktivierungskonstante). Der erhaltene Wert (n = 0.85) impliziert, daß die Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers ausschließlich auf der Modifikation einer SH-Gruppe beruht. Die Geschwindigkeitskonstante (zweiter Ordnung) der Gesamtreaktion liegt bei 2000 $min^{-1} \bullet M^{-1}$ (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Verringerung der Inhibitorwirkung in Gegenwart des spezifischen Substrates des untersuchten Proteins wird als Hinweis darauf gewertet, daß die modifizierte Aminosäure sich in der Bindungsstelle (bzw. zumindest in unmittelbarer Nähe hierzu) befindet (Grubmeyer et al. 1986, Pratt & Pedersen 1989). Die Abb. 3.2.3 belegt, daß die Zugabe der beiden Substrate des Aspartat/Glutamat-Carriers die

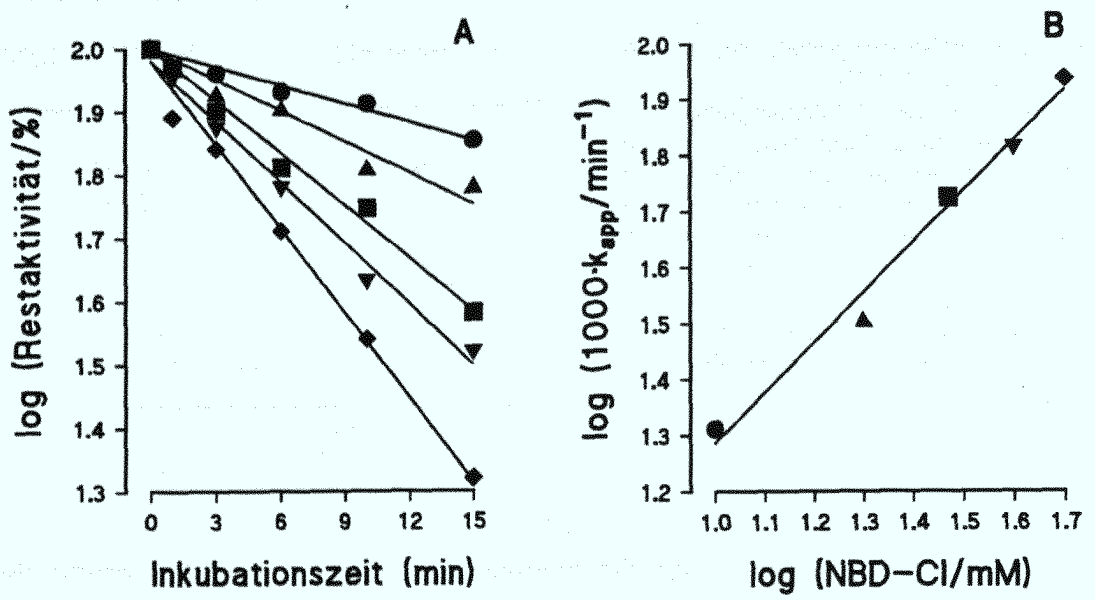


Abbildung 3.2.2: **Kinetische Analyse der Inaktivierung des AGC durch NBD-Cl.**
A: Die Proteoliposomen wurden bei pH 8 mit 10 μM (●), 20 μM (▲), 30 μM (■), 40 μM (▼) bzw. mit 50 μM (◆) NBD-Cl inkubiert. Die einzelnen Symbole kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe von 2.5 mM DTE zur Beendigung der Modifikation. Nach der abschließenden Sephadex G-75 Passage wurden die resultierenden Transportaktivitäten mit Hilfe der Vortauschtechnik bestimmt und auf die Transportaktivität des Kontrollansatzes (=100%) normiert (vgl. Abschnitt 2.3.1.1).
B: Doppelt logarithmische Auftragung der bestimmten apparenten Inaktivierungskonstanten {2.3 • (Steigung der resultierenden Geraden aus 3.2.2/A)} gegen die jeweilig eingesetzten Konzentrationen an NBD-Cl. Die Steigung der resultierenden Geraden (n = 0.85) entspricht unmittelbar der Reaktionsordnung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Modifizierung.

Inhibition des Translokators durch NBD-Cl vollständig verhinderte. Die Annahme, wonach dieser Effekt mit hoher Sicherheit auf einer spezifischen Kompetition zwischen Substrat und Inhibitor um die Bindungsstelle beruht stützt sich insbesondere auf zwei Beobachtungen (vgl. Abb. 3.2.3): (i) Die berechneten Substratkonzentrationen, die eine Halbierung der Inhibitorwirkung bewirken ($S_{0.5}$-Werte), stimmen mit den K_m-Werten des Aspartat/Glutamat-Carriers nahezu exakt überein. (ii) Die Inkubation des Carriers mit substratverwandten Stoffen wie α-Aminoadipinat oder Oxoglutarat hatte keinen Einfluß auf die Modifikation.

Wie Dierks et al. (1990*a*, 1990*b*) zeigten, führte die Modifikation von (mindestens) zwei verschiedenen Cysteinresten des Aspartat/Glutamat-Carriers zur Konvertierung der physiologischen Antiportfunktion in eine unphysiologische

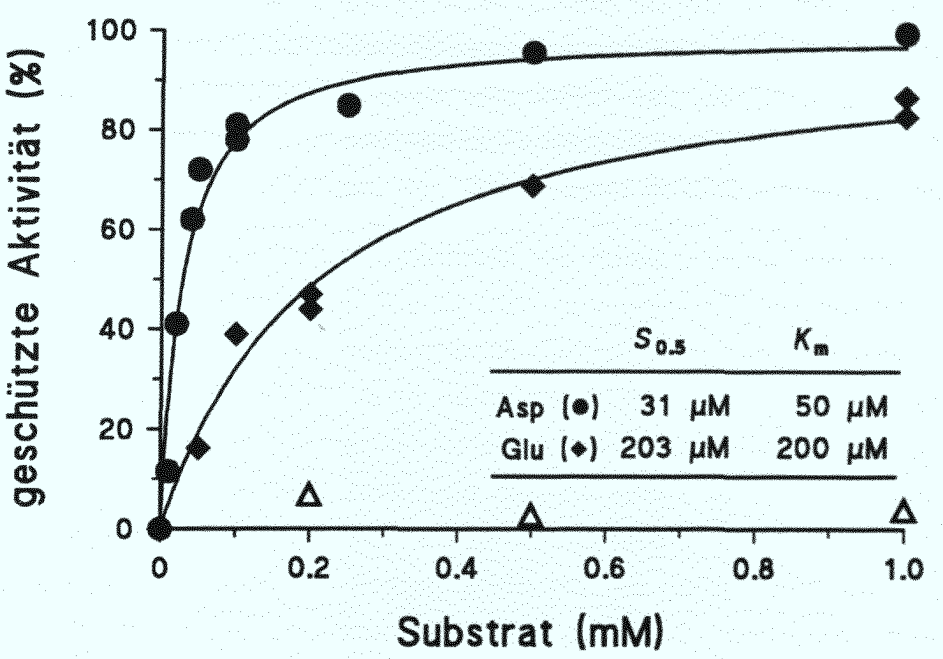


Fig. 3.2.3: **Substratschutz gegen eine Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl.** Die Proteoliposomen wurden für eine Dauer von 15 Minuten bei pH 6.6 mit 50 µM NBD-Cl in Gegenwart der eingezeichneten Konzentrationen an Aspartat (●), Glutamat (◆) und Oxoglutarat (Δ) inkubiert. Nach der Gelfiltration wurden die resultierenden Transportaktivitäten mit Hilfe der Vortauschtechnik bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.1.1) und auf die Transportrate der Probe mit maximaler NBD-Cl Hemmung (Restaktivität: 48% = 0% relativer Schutz) bzw. auf die Transportrate der unmodifizierten Kontrolle (Restaktivität: 100% = 100% relativer Schutz) normiert. Die Abhängigkeit der Meßwerte (Angabe als relativer Schutz [%]) als Funktion der eingesetzten Substratkonzentrationen konnte mit Hilfe der nachfolgenden Gleichung berechnet werden: Relativer Schutz (%) = 100 • [Substrat]/($S_{0.5}$ + [Substrat]). Die Tabelle stellt die ermittelten $S_{0.5}$-Werte den entsprechenden K_m-Werten (Dierks et al. 1988) gegenüber. Weitere experimentelle Einzelheiten werden im Abschnitt 2.4.5 erläutert. $S_{0.5}$-Wert: Substratkonzentration die eine Halbierung der Inhibitorwirkung bewirkt.

Effluxfunktion. Die Inkubation des Aspartat/Glutamat-Carriers mit dem cysteinspezifischen NBD-Cl in millimolaren Konzentrationen (≤ 5 mM) bewirkte ausschließlich die Inaktivierung des Carriers (Ergebnis nicht gezeigt). Interessanterweise konnten wir jedoch feststellen, daß nach einer Vorinkubation mit NBD-Cl die Induktion der Effluxfunktion durch die Zugabe von quecksilberhaltigen Reagenzien (vgl. Abschnitt 1.5) signifikant stimuliert wurde. Dieser festgestellte "Stimulationseffekt" war halbmaximal nach Zugabe von 40 µM NBD-Cl (pH 6.5 - Ergebnis nicht gezeigt). Auffallend ist, daß diese Konzentration dem I_{50}-Wert des Inhibitors bei gleichem pH-Wert entspricht (vgl. Tabelle 3.2.2). Aus den bisher gezeigten Experimenten resultiert somit, daß die Inaktivierung des

Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl auf der Modifikation einer SH-Gruppe beruht, die in der Bindungsstelle des Aspartat/Glutamat-Carriers lokalisiert ist. Die Modifikation dieses Cystein, das fortan als Cys_a bezeichnet wird, führt nicht direkt zur Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion, wenngleich das identifizierte Cystein an diesem Prozeß beteiligt ist.

Aufschlußreich war ein Vergleich der Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch BPAB mit der Wirkung von NBD-Cl auf den Carrier. In verschiedenen Publikationen wird von der spezifischen Modifikation essentieller Histidine durch BPAB berichtet (Volwerk et al. 1974, Fohlman et al. 1979). Folglich wurde auch für die beobachtete Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers nach Gabe von BPAB die Modifikation eines Histidinrestes postuliert (Dierks 1992). Neuere Studien zur Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch BPAB zeigten jedoch, daß dieser Inhibitor hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Modifikation, der Beeinflussung durch externes Substrat, der Stimulation einer anschließenden Effluxinduktion durch (z.B.) $HgCl_2$ und letztlich auch hinsichtlich seiner Wechselwirkung mit *p*CMB (vgl. Abschnitt 3.5) exakt den charakteristischen Eigenschaften der Modifikation des Carriers durch NBD-Cl gleicht (Ergebnisse nicht gezeigt). Der I_{50}-Wert für BPAB wurde mit 3 μM bestimmt (15 Minuten Inkubationszeit, pH 6.5). Dieser im Vergleich zum NBD-Cl etwas niedrigere Wert ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Existenz der leichter substituierbaren Abgangsgruppe Br^- im Molekülgerüst des BPAB zurückzuführen. Als Fazit dieser Untersuchungen ergibt sich somit, daß der Aspartat/Glutamat-Carrier unserer Wissens nach das erste Protein ist, bei dem die Wirkung von BPAB als cysteinspezifisches Reagenz nachgewiesen wurde. Die hohe Reaktivität von Cys_a gegenüber BPAB korreliert mit dem angegebenen niedrigen pK_S-Wert dieses Cysteins. Der für diesen Aminosäurerest abgeschätzte pK_S-Wert von $\leq$ 6.7 (s. oben) liegt bezeichnenderweise in der Nähe des pK_S-Wertes der sekundären Aminogruppe des Histidins (pK_S = 6.0, vgl. Edsall & Wyman 1958).

Weitere Experimente zur besseren Charakterisierung bekannter Inhibitoren des Aspartat/Glutamat-Carriers (vgl. Tabelle 3.1.1) wurden durchgeführt. Vergleichbar mit der Verwendung von Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) als Referenzreagenz für das bereits identifizierte Lysin (Dierks et al. 1992) basieren diese Untersuchungen insbesondere auf dem Einsatz von NBD-Cl zur spezifischen Modifikation von Cys_a. Wir fanden heraus, daß alle eingesetzten cysteinspezifischen Reagenzien eine nachfolgende Bindung von [^{14}C]-NBD-Cl an den Aspartat/Glutamat-Carrier vollständig verhinderten (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Vorinkubation mit dem

histidinspezifischen Reagenz DEPC hatte keinen Effekt auf eine spätere Modifikation des Carriers durch NBD-Cl, hingegen beeinflußte eine Vorinkubation des Carriers mit lysinspezifischen Reagenzien die nachträgliche Bindung von [^{14}C]-NBD-Cl an Cys_a. Interessanterweise belegten die durchgeführten Experimente eine deutliche Korrelation zwischen der Größe des eingesetzten (lysinspezifischen) Inhibitors und der verringerten Bindung von [^{14}C]-NBD-Cl an Cys_a. So zeigte sich beispielsweise nach der Bindung von Succinat an das essentielle Lysin (katalysiert durch die gleichzeitige Zugabe von EDC - vgl. Dierks et al. 1992) nur ein geringer Effekt, andererseits führte die Vorinkubation des Aspartat/Glutamat-Carriers mit dem räumlich anspruchsvollen Stilbenderivat SITS zu einer beträchtlichen Reduktion der Markierung. Die Beobachtung einer vollständigen Unterdrückung der Markierung des Carriers durch [^{14}C]-NBD-Cl in Gegenwart des bifunktionellen Stilbenderivates DIDS überraschte dagegen (Ergebnisse nicht gezeigt). Weitere Experimente zur Analyse der Modifikation des Carriers durch DIDS wurden durchgeführt (s.u.).

3.3 Die Modifikation des Aspartat/Glutamat Carriers durch DIDS - Intramolekulare Verbrückung von Cys_a und *Lys*

Die Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch mono- (SITS) bzw. durch bifunktionelle (DIDS) Stilbenderivate wurde, abgesehen von den differierenden Wirkungen auf die Modifikation des Carriers durch [^{14}C]-NBD-Cl (s.o.), durch weitere Unterschiede charakterisiert. Zusätzlich zu den deutlichen Diskrepanzen in der Zeit- und pH-Abhängigkeit beider Reaktionen (Dierks et al. 1992) zeichnete beide Inhibitoren insbesondere eine unterschiedliche Wirkung auf die unphysiologische Effluxfunktion aus. Während die Inkubation des Carriers mit SITS zur Inhibition der Effluxfunktion führte (vgl. auch Tabelle 3.7.1), bewirkte die Inkubation des Aspartat/Glutamat-Carriers mit 90 μM DIDS eine (wenn auch vergleichsweise langsame) Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion (s. Abb. 3.3.1 & Tabelle 3.7.1). Die Abbildung 3.3.1 belegt, daß die Effluxinduktion durch das bifunktionelle DIDS sich von der (vollständig reversiblen) Effluxinduktion durch $HgCl_2$ oder Mersalylsäure unterscheidet. Zwar stoppte der "DIDS-induzierte" unidirektionale Transport umgehend nach Zugabe von DTE, jedoch wurde durch diese Behandlung des Carriers die physiologische Antiportfunktion nicht wieder reaktiviert, wie dies im Falle der übrigen effluxinduzierenden Reagenzien geschieht (vgl. Abschnitt 1.5). Vor dem Hintergrund, daß nur die Bildung von Thiourethanen, im Gegensatz zur Bildung von Thioharnstoffderivaten rever-

sibel ist (Maddy 1964), beweist die Abbildung 3.3.1 somit, daß DIDS neben der erwarteten Reaktion mit dem Lysinrest (*Lys*) der exofazialen Bindungsstelle des Carriers (Dierks et al. 1992) weiterhin mit zumindest einer SH-Gruppe reagiert.

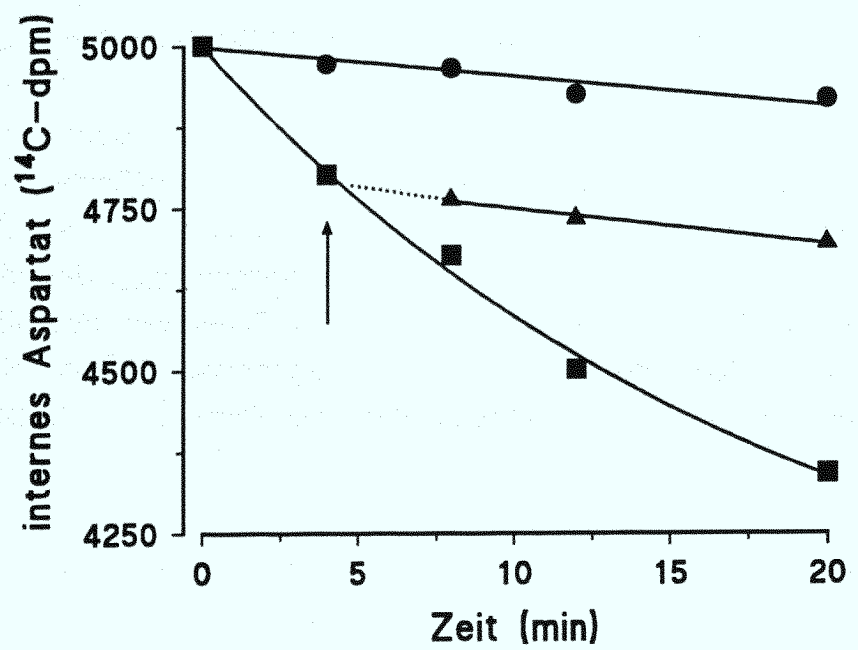


Abbildung 3.3.1: **Induktion der Effluxfunktion nach Inkubation des Carriers mit DIDS.**
Die Abnahme des internen Substrates nach folgenden Zugaben wurde gemessen: (●) Puffer, (■) 90 μM DIDS und (▲) 90 μM DIDS, nach 4 Minuten (s. Pfeil) erfolgte eine weitere Zugabe von 5 mM DTE. Die Experimente wurden jeweils bei pH 6.5 durchgeführt. Folgende Geschwindigkeitskonstanten wurden berechnet: 0.001 min^{-1} (●), 0,018 min^{-1} (■) und 0.003 min^{-1} (▲). In gleichzeitig durchgeführten Rücktauschexperimenten wurde die Wirkung der jeweiligen Ansätze auf den Asp/Asp-Austausch überprüft. Folgende Geschwindigkeitskonstanten wurden für den Asp/Asp-Austausch gemessen: 0.12 min^{-1} (●), 0,007 min^{-1} (■) und 0.009 min^{-1} (▲).

Zur Überprüfung dieses interessanten Ergebnisses wurde die Möglichkeit der Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch DIDS nach Vorinkubation des Carrierproteins mit lysinspezifischen (PLP) und cysteinspezifischen (*p*CMB) Reagenzien überprüft (s. Tabelle 3.3.1). Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß eine Zugabe von 10 mM PLP den AGC zwar vollständig inhibiert (Krämer 1984, Dierks et al. 1992), jedoch ist die Reaktion aufgrund der gebildeten Schiffschen Base reversibel (Hartmann & Norton 1977). Dieser Umstand erklärt die hohe Restaktivität von etwa 40 % die nach abschließender Passage der Proteoliposomen über eine Sephadex G-75 Säule (zur Abtrennung nicht gebundener Inhibitormoleküle) gemessen wurde (Ansatz b). Die Inhibition des Carriers durch *p*CMB ist vollkommen reversibel (a,d). Dies gilt jedoch nicht für die

Inhibition des Carriers durch DIDS (c,f). Die Ansicht, wonach DIDS und PLP mit dem in der Bindungsstelle des Carriers identifizierten Lysin (*Lys*) reagieren (Dierks et al. 1992), wird durch den Befund, daß beide Reaktion insensitiv gegen eine Vorinkubation mit *p*CMB sind weiter erhärtet (i,j). Gleichwohl kann auch eine Vorinkubation mit PLP die Bindung von DIDS an den Aspartat/Glutamat-Carrier nicht verhindern (h). Somit belegen die beiden letzten Ansätze (k,l), daß die Inhibition des Carriers durch DIDS in Gegenwart von PLP auf der Modifikation von Cysteinresten beruht. Aufgrund der hohen Reaktivität von Cys_a und der räumlichen Nähe der Aminosäurereste Cys_a und *Lys* (vgl. Abschnitt 3.2) ist eine (zusätzliche) Bindung von DIDS an Cys_a sehr wahrscheinlich. Unter Berücksichtigung der beobachteten Effluxinduktion nach Inkubation des Aspartat/Glutamat-Carriers mit DIDS in hohen Konzentrationen (≥ 60 µM) ist in diesem Konzentrationsbereich die Modifikation eines weiteren Cysteins (weiterer Cysteine) jedoch nicht auszuschließen.

Tabelle 3.3.1: **DIDS modifiziert Lysin- und Cysteingruppen des Aspartat/Glutamat-Carriers.**
Die Proteoliposomen wurden bei pH 6.5 mit den verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen (Inkubationszeit je 5 min.) sind: DIDS 0.03 mM, *p*CMB 0.05 mM, DTE 5 mM und PLP 10 mM. Überschüssige Substanzen wurden vor der Bestimmung der Transportaktivität des jeweiligen Teilexperimentes durch Gelfiltration (Sephadex G-75 Passage) abgetrennt. Alle bestimmten Transportraten sind auf die Aktivität des unmodifizierten Carriers (=100%) normiert.

Teil-experiment	Zugabe von				Restaktivität (%)
	1.	2.	3.	4.	
a	*p*CMB				8
b	PLP				38
c	DIDS				5
d	*p*CMB	DTE			102
e	PLP	DTE			41
f	DIDS	DTE			4
g	*p*CMB	DIDS			2
h	PLP	DIDS			5
i	*p*CMB	PLP	DTE		41
j	*p*CMB	DIDS	DTE		2
k	PLP	DIDS	DTE		40
l	*p*CMB	PLP	DIDS	DTE	26

3.4 Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers mit 2.3-Butandion (Diacetyl) und Phenylglyoxal (PG) - Identifikation eines Argininrestes

Die negative Gesamtladung der Substrate des Aspartat/Glutamat-Carriers läßt eine direkte Interaktion mit basischen Seitenketten des Carriers vermuten. Um weitere Informationen über den Transportmechanismus zu erhalten, wurde deshalb die Wirkung argininspezifischer Reagenzien auf den Aspartat/Glutamat-Carrier überprüft. Der ermittelte I_{50}-Wert für die Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch Phenylglyoxal liegt bei 4.8 mM (s. Abb. 3.4.1). Hingegen zeichnete sich das hydrophilere 2.3-Butandion durch eine leicht erhöhte Reaktivität aus. Der gemessene I_{50}-Wert liegt in diesem Fall bei 2.8 mM (s. Abb. 3.4.1). Eine deutliche pH-Abhängigkeit beider Modifizierungsreaktionen zwischen pH 5.5 und pH 8.0 wurde nicht festgestellt. Somit dürfte sich der pK_S-Wert des modifizierten Argininrestes nicht wesentlich von dem pK_S-Wert der Guanidingruppe im freien Arginin (pK_S = 12.5, vgl. Edsall & Wyman 1958) unterscheiden. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang anzumerken, daß weder eine Vorinkubation mit den carrierspezifischen Substraten noch eine vorhergehende Modifikation des Carriers durch lysin- und cysteinspezifische Reagenzien die Wirkung der eingesetzten 1,2-Diketone beeinflußte (Ergebnisse nicht gezeigt).

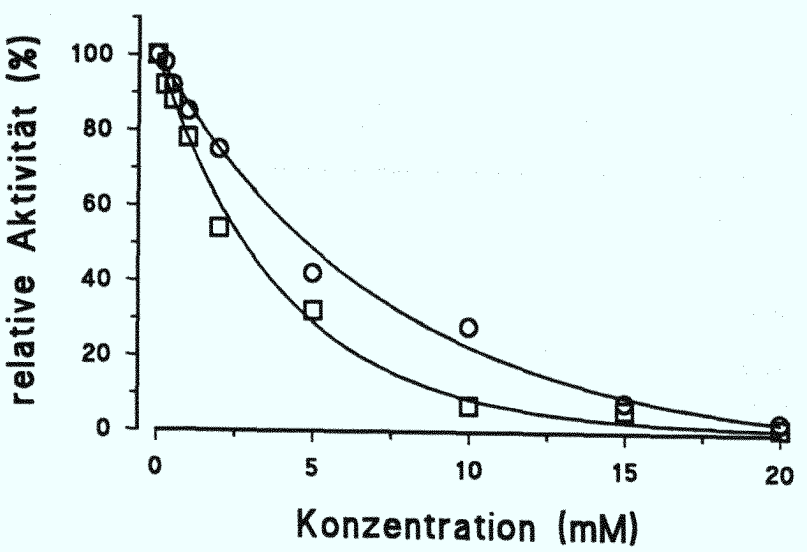


Abb. 3.4.1: **Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers durch argininspezifische Reagenzien.** Die Proteoliposomen wurden bei pH 7 mit Phenylglyoxal (○) bzw. 2.3-Butandion (□) für jeweils 30 Minuten bei pH 7 inkubiert. Die einzelnen Symbole kennzeichnen die jeweilig eingesetzten Konzentrationen. Nach der abschließenden Sephadex G-75 Passage wurden die resultierenden Transportaktivitäten mit Hilfe der Vortauschtechnik bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.1.1). Alle Aktivitäten wurden auf die Transportaktivität des unmodifizierten Carrierproteins (= 100%) normiert.

3.5 Räumliche und funktionelle Interaktion essentieller Aminosäurereste

Zur Lokalisation der identifizierten Aminosäurereste innerhalb eines (zu erstellenden) topographischen Strukturmodells wurden die wechselseitigen Wirkungen aller untersuchten Modifizierungsreagenzien überprüft. Das angewendete Verfahren beruhte im wesentlichen auf der Verwendung von PLP (Dierks et al. 1992) und NBD-Cl (s. Abschnitt 3.2) als reversible Referenzreagenzien für die Modifikation der in der Bindungsstelle des Carriers lokalisierten Aminosäuren *Lys* und Cys_a.

Deutlich zu differenzieren ist zwischen der Beeinflussung einer Vorinkubation des Carriers mit PLP auf die nachfolgende Effluxinduktion (s. Tab. 3.5.1/A), bzw. auf eine anschließende Inhibition des physiologischen Antiports (s. Tab. 3.5.1/B). Die Tabelle zeigt, daß $HgCl_2$ und *p*CMBS unabhängig von einer Modifikation des Lysins die unphysiologische Effluxfunktion induzieren. Die Reaktion dieser (cysteinspezifischen) Inhibitoren ist in diesem Zustand somit nicht auf das bereits identifizierte Cystein (Cys_a) beschränkt, vielmehr kommt es aufgrund der Modifikation eines zweiten Cysteins (Cys_b) zur Effluxinduktion (Dierks et al. 1990*b*). Demgegenüber bewirkt die Bindung von PLP an das essentielle Lysin den Verlust der effluxinduzierenden Eigenschaften der relativ sperrigen Mersalylsäure sowie des voluminösen [$HgCl_2$·EDTA]-Komplexes. Die vorherige Inkubation mit PLP schützt den Carrier auch gegen eine Inaktivierung der Antiportfunktion durch [$HgCl_2$·EDTA] und DTNB, wohingegen Mersalylsäure diese Transportfunktion weiterhin inaktiviert (s. Tab. 3.5.1/B). In Analogie zur Beeinflussung der Bindung von NBD-Cl an Cys_a durch lysinspezifische Reagenzien (s.o.) zeigt sich auch in diesen Ansätzen erneut eine enge Korrelation zwischen dem Ausmaß des beobachteten Effektes und der Größe der eingesetzten Inhibitoren. Offensichtlich unterschieden sich die Wirkungen der Reagenzien $HgCl_2$, *p*CMBS, Mersalylsäure und [$HgCl_2$·EDTA] in Gegenwart von PLP voneinander. Die unbeeinflußte Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch $HgCl_2$ und *p*CMBS nach einer Vorinkubation mit PLP belegt, daß die beiden wichtigen Cysteine für diese Inhibitoren weiterhin zugänglich sind. Hingegen ist die Zugabe von [$HgCl_2$·EDTA] in Gegenwart von PLP ohne Wirkung. Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang der abgestufte Effekt den die Modifikation des Lysins auf die Wirkung der Mersalylsäure zeigt. Die Kombination aller Experimente läßt als einzig sinnvolle Schlußfolgerung nur eine spezifische Modifikation von Cys_b durch Mersalylsäure nach Vorinkubation des Carriers mit PLP zu. Dieser Befund beweist somit, daß die Derivatisierung eines der beiden Cysteine immer zur Inhibition der physiologischen Antiportfunktion führt.

In einem ergänzenden Experiment wurde die wechselseitige Interaktion der verschiedenen lysin- und cysteinspezifischen Inhibitoren bei umgekehrter Reihenfolge der Inkubation überprüft (s. Tab. 3.5.1/C). Hierbei zeigte sich, daß eine Modifikation von Cys_a (durch NBD-Cl) die anschließende Inaktivierung des Carriers durch lysinspezifische Reagenzien (SITS) nicht beeinflußte.

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Identifikation eines essentiellen Histidins (*His*) in der Bindungsstelle des Aspartat/Glutamat-Carriers durchgeführt (s. Tab 3.5.1/D). Die Inaktivierung des Carriers durch DEPC wurde bereits ausführlich beschrieben (Dierks et al. 1992). Obwohl die hohe Spezifität dieses Inhibitors in Kombination mit den charakteristischen Eigenschaften der Modifizierungsreaktion auf die Modifikation eines Histidins hindeutete (vgl. Miles 1977), konnte bislang eine Modifikation des essentiellen Lysins (*Lys*) durch DEPC nicht vollständig ausgeschlossen werden (vgl. auch Tabelle 3.1.1). Dieser Umstand beruhte insbesondere auf der Beobachtung, daß eine Vorinkubation des Carriers mit PLP das Protein vollständig vor einer Inhibition durch DEPC schützt (s. Tab 3.5.1/D). Vor dem Hintergrund der beschriebenen Reaktion zwischen DEPC und Tyrosinresten (Burstein et al. 1974, Bagert & Röhm 1989) belegen die gezeigten Kontrollexperimente (Tabelle 3.5.1/D), daß der beobachtete Schutzeffekt gegen die Modifikation des Carriers durch DEPC ausschließlich auf einer Reaktion zwischen DEPC mit den phenolischen Hydroxylgruppen des vorab im (200-fachen) Überschuß zugesetzten PLP beruht. Diese Aussage leitet sich von den identischen Ergebnissen einer Vorinkubation der Proteoliposomen mit 20 mM Tyrosin bzw. mit 20 mM Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) auf die nachfolgende Wirkung von DEPC ab. Dieses Resultat verdeutlicht, daß selbst die Beobachtung einer anscheinend eindeutigen Kompetition zweier Hemmstoffe um einen Aminosäurerest ohne ausreichende Kontrollen zu mißverständlichen Interpretationen führen kann.

Der Befund, daß in Gegenwart von PLP die Inkubation des Carriers mit dem sterisch anspruchsvollen [$HgCl_2$·EDTA]-Komplex weder zur Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion noch zur Inhibition des Asp/Asp-Austausches führte, deutete auf eine räumliche Nachbarschaft dieser drei essentiellen Aminosäurereste und somit auch der beiden Cysteine hin. In Anlehnung an die Hypothese, wonach ein reversibler Dithiol/Disulfid-Austausch möglicherweise ein wichtiges Element bei Transportprozessen darstellt (vgl. Kaback & Barnes 1971, Robillard & Konings 1982) wurde daher überprüft, ob die räumliche Anordnung der beiden Cysteine die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke erlaubt. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen eindeutig gegen diese Möglichkeit. Weder die Inkubation der Proteoliposomen mit Diamid (Kosower et al. 1969) respektive die Verwendung eines katalytisch-wirkenden Kupfer·Di(1,10-Phenanthrolin)-Kom-

Tabelle 3.5.1: **Gegenseitige Beeinflussung der Wirkung verschiedener Reagenzien auf den AGC.** **A:** Transportmessungen der unphysiologischen Effluxfunktion. Mit [^{14}C]-Aspartat vorbeladene Proteoliposomen wurden zuerst mit Puffer bzw. mit 20 mM PLP (Inkubationszeit: 2 min) versetzt. Im Anschluß hieran erfolgte die Zugabe der cysteinspezifischen Inhibitoren (5 μM $HgCl_2$, 5 μM $HgCl_2$/50μM EDTA, 100 μM Mersalylsäure oder 50 μM *p*CMBS). Nach der Gelfiltration und abschließender Zugabe von 5 mM DTE wurde der Efflux von [^{14}C]-Asp bestimmt. Die jeweiligen Effluxraten der verschiedenen Ansätze wurden abschließend auf die in Abwesenheit von PLP durchgeführte Kontrollmessungen normiert. **B:** Messung des Asp/Asp-Austausches. Zu vorbeladenen und durch Gabe von 20 mM PLP inaktivierten Proteoliposomen wurden verschiedene cysteinspezifische Reagenzien zugesetzt (10 μM $HgCl_2$, 5 μM $HgCl_2$/50μM EDTA, 100 μM Mersalylsäure, 20 μM *p*CMBS bzw. 200 μM DTNB). Nach der abschließenden Gelfiltration wurde die resultierenden Transportaktivitäten in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von 5 mM DTE gemessen, so daß hieraus direkt die Wirkung der verschiedenen Reagenzien auf die Antiportfunktion des Carriers ersichtlich wird. Die gemessenen Transportaktivitäten sind alle auf den Kontrollwert (alleinige Zugabe von PLP) normiert. **C:** Messung des Asp/Asp-Austausches. Vorbeladene Proteoliposomen wurden durch Gabe von 100 μM NBD-Cl oder 500 μM SITS bzw. durch die Kombination beider Reagenzien inaktiviert. Aufgrund der besseren Reaktivierung des durch NBD-Cl inaktivierten Aspartat/Glutamat-Carriers mittels Zugabe von 5 mM Mercaptoethanol (ME) wurde dieses Thiol zur Revertierung verwendet (vgl. Tab. 3.2.1). **D:** Messung des Asp/Asp-Austausches. Die Inhibition des Aspartat/Glutamat-Carriers nach Vorinkubation der Liposomen mit Puffer, 20 mM PLP, 20 mM PMP oder 20 mM Tyrosin und abschließender Inkubation mit 100 μM DEPC wurde untersucht. Die gemessenen Transportaktivitäten wurden alle auf die Transportaktivität des unmodifizierten Aspartat/Glutamat-Carriers normiert.

Experiment	Zugabe vor der Gelfiltration		Zugabe nach der Gelfiltration	relative Transportaktivitäten	
	1.	2.		Efflux	Antiport
A	Puffer/PLP	$HgCl_2$	DTE	76/59	
	Puffer/PLP	$HgCl_2$·EDTA	DTE	46/ 4	
	Puffer/PLP	Mersalylsäure	DTE	52/ 1	
	Puffer/PLP	*p*CMBS	DTE	22/25	
B	PLP	$HgCl_2$	Puffer/DTE		3/ 47[a]
	PLP	$HgCl_2$·EDTA	Puffer/DTE		82/106
	PLP	Puffer	$HgCl_2$·EDTA		19
	PLP	Mersalylsäure	Puffer/DTE		23/126
	PLP	*p*CMBS[b]	Puffer/DTE		24/109
	PLP	DTNB[c]	Puffer/DTE		75/107
	PLP	Puffer	DTNB		11
C	NBD-Cl		Puffer/ME		18 /67
	SITS		Puffer/ME		22/ 20
	NBD-Cl	SITS	Puffer/ME		8/12
D	Puffer	PLP	------		42
	Puffer	PMP	------		106
	Puffer	Tyrosin	------		93
	Puffer	DEPC	------		9
	PLP	DEPC	------		39
	PMP	DEPC	------		97
	Tyrosin	DEPC	------		84

a: Scheinbar unvollständige Inaktivierung aufgrund hoher Effluxraten vor der Bestimmung der Aktivität des Asp/Asp-Austausches

b: Werte für *p*CMB und *p*CMBS sind identisch

c: Eine ähnliche Wirkung zeigten auch die SH-Reagenzien NBD-Cl und BPAB

plexes (Kobashi et al. 1968) bewirkten die Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers bzw. die Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion (Ergebnisse nicht gezeigt). Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß beispielsweise der mitochondriale Carnitincarrier unter identischen Versuchsbedingungen völlig inhibiert wird (Indiveri et al. 1992).

3.6 Beteiligung der identifizierten Aminosäurereste am unphysiologischen Substrattransport

Eine Modifikation der bislang identifizierten Aminosäurereste (*Cys_a*, *Cys_b*, *Lys*, *His*, *Arg*) führt (einheitlich) zur Inhibition der physiologischen Antiportfunktion des Aspartat/Glutamat-Carriers. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch hinsichtlich einer möglichen Beteiligung der einzelnen Aminosäurereste am Substrattransport nach Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion.

Bereits erwähnt wurde die Stimulation der Effluxinduktion nach vorheriger spezifischer Modifikation von *Cys_a* (vgl. Abschnitt 3.2). Diese Beobachtung belegt, daß die Modifikation dieses Cysteins für die Effluxinduktion notwendig ist. Die Abbildung 3.6.1/A veranschaulicht diesen Fall am Beispiel einer Vorinkubation mit BPAB und anschließender Effluxinduktion durch Mersalylsäure. Im Gegensatz dazu ist in Gegenwart von DEPC der unphysiologische Substrattransport gehemmt (3.6.1/B). Eine mögliche Erklärung, wonach die Anwesenheit von DEPC die Effluxinduktion aufgrund sterischer Wechselwirkungen zwischen der am Histidin gebundenen Ethoxygruppe (His-C(O)-O-C_2H_5) und *Cys_a* behindert, kann infolge der bereits beschriebenen Ergebnisse ausgeschlossen werden (s.o.). Desgleichen führt die Modifikation des Lysins (*Lys*) durch PLP, EDC/Succinat oder SITS ebenfalls zur einer Inhibition der unphysiologischen Uniportaktivität (s. Tabelle 3.5.1), obwohl die von diesen drei Inhibitoren verursachten sterischen Effekte deutlich voneinander abweichen (s. Tabelle 3.2.3). Mutmaßlich sind somit die beiden essentiellen Aminosäurereste *Lys* und *His* auch beim unphysiologischen Substrattransport von funktioneller Bedeutung. Ein weiterer abweichender Effekt basiert auf der Modifikation des essentiellen Argininrestes. Die Abbildung 3.6.1/C zeigt, daß die unphysiologische Uniportfunktion durch eine Vorinkubation mit argininspezifischen Reagenzien nicht beeinflußt wurde, obwohl die Zugabe von 15 mM 2.3-Butandion zur vollständigen Inhibition der Antiportfunktion des Carriers führte (vgl. Abschnitt 3.4).

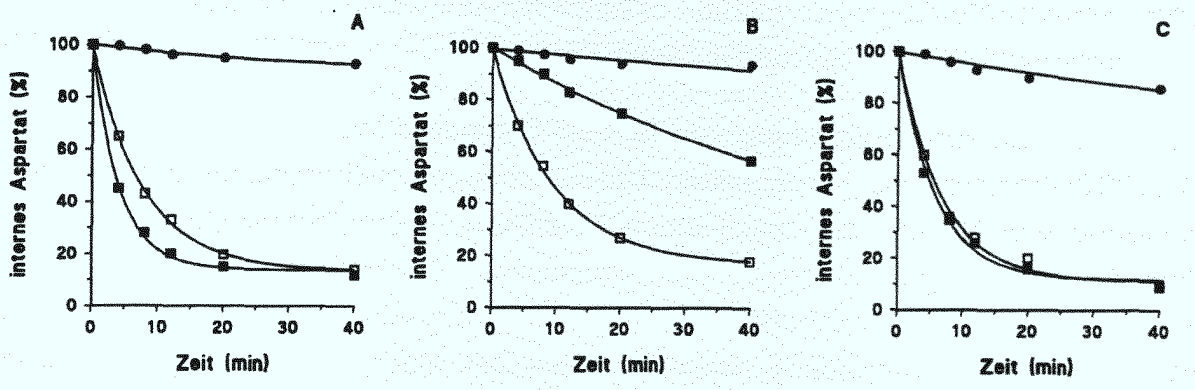


Abb. 3.6.1: **Differentielle Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die unphysiologische Effluxinduktion des Aspartat/Glutamat-Carriers.**
Der Efflux von [^{14}C]-Asp aus vormarkierten Proteoliposomen nach Inkubation des Carriers mit unterschiedlichen Reagenzien wurde überprüft. In gleichzeitig durchgeführten Rücktauschexperimenten wurde ebenfalls die Aktivität des Asp/Asp-Austausches nach identischer Behandlung der Proteoliposomen kontrolliert. Der Asp/Asp-Austausch wurde durch die verschiedenen Reagenzien immer zu $\geq$ 91 % gehemmt. In allen Versuchen wurde jeweils 100 μM Mersalylsäure zur Effluxinduktion eingesetzt.
A: Einfluß einer Vorinkubation des Carriers mit 15 μM BPAB (pH 6.5, Inkubationszeit 15 min.). Folgende Effluxkinetiken sind dargestellt: Efflux nach alleiniger Zugabe von BPAB (●), der induzierte Efflux nach Zugabe von Mersalylsäure (□) sowie der induzierte Efflux nach einer Vorinkubation mit BPAB (■). Folgende Geschwindigkeitskonstanten wurden berechnet: 0.004 min^{-1} (●), 0.138 min^{-1} (□), und 0.221 min^{-1} (■).
B: Einfluß einer Vorinkubation des Carriers mit 175 μM DEPC (pH 6.5, Inkubationszeit 15 min.). Folgende Effluxkinetiken sind dargestellt: Efflux nach alleiniger Zugabe von DEPC (●), der induzierte Efflux nach Zugabe von Mersalylsäure (□) sowie der induzierte Efflux nach Vorinkubation des Carriers mit DEPC (■). Folgende Geschwindigkeitskonstanten wurden berechnet: 0.005 min^{-1}(●), 0.106 min^{-1} (□) und 0.018 min^{-1} (■).
C: Einfluß einer Vorinkubation des Carriers mit 15 mM 2.3-Butandion (pH 7.0, Inkubationszeit 30 min.). Folgende Effluxkinetiken sind dargestellt: Efflux nach alleiniger Zugabe von 2.3-Butandion (●), der induzierte Efflux nach Zugabe von Mersalylsäure (□) sowie der induzierte Efflux nach einer Vorinkubation mit 2.3-Butandion (■). Folgende Geschwindigkeitskonstanten wurden berechnet: 0.009 min^{-1} (●), 0.162 min^{-1} (□) und 0.178 min^{-1} (■).

3.7 Diskussion

Aufbauend auf bereits durchgeführten Studien zur Struktur/Funktions-Korrelation des mitochondrialen Aspartat/Glutamat-Carriers führte die vorliegende Arbeit zu einer eindeutigen Einteilung aller getesteten Reagenzien in vier verschiedene Klassen (s. Tabelle 3.7.1). Die charakteristischen Besonderheiten der einzelnen Klassen werden nachfolgend besprochen.

3.7.1 Struktur/Funktions-Korrelation essentieller Aminosäurereste des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers

In Analogie zur Verwendung von PLP als "Standard-Lysin-Reagenz" (Dierks et al. 1992) basieren die vorgestellten Untersuchungen insbesondere auf der Anwendung von NBD-Cl zur spezifischen Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers. Die folgenden Resultate belegen die selektive Bindung von NBD-Cl an Cys_a: (i) Die spektralen Eigenschaften des Reaktionsproduktes aus Carrierprotein und NBD-Cl sowie die gefundene Revertierbarkeit der Markierung belegen eindeutig die Modifikation von Cysteinen. (ii) Die durchgeführten Inaktivierungskinetiken zeigen, daß die Modifikation eines einzigen Aminosäurerestes zur vollständigen Hemmung des Carriers führt. (iii) Der effiziente Substratschutz gegen die Inhibition durch NBD-Cl (unter Berücksichtigung der identischen $S_{0.5}$- und K_m-Werte) weist auf eine Lokalisation der modifizierten Gruppe in der (bzw. in unmittelbarer Nähe zur) Bindungsstelle des Aspartat/Glutamat-Carriers hin.

Wir konnten zeigen, daß die spezifische Modifikation von Cys_a nicht zur Induktion der unphysiologischen Transportfunktion führt, allerdings bewirkte die Vorinkubation des Carriers mit Reagenzien die an Cys_a binden immer eine deutliche Stimulierung der nachfolgend induzierten Effluxfunktion. Inhibitoren mit diesen charakteristischen Eigenschaften wurden der Klasse A zugeordnet. Diese Klasse enthält die Reagenzien: BPAB, DTNB, NBD-Cl, NEM und *p*CMB (s. Tabelle 3.7.1). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß die aufgelisteten Inhibitoren in ihrer chemischen Grundstruktur völlig voneinander abweichen. Die Einstufung von NEM in diese Reagenzienklasse beruht im wesentlichen auf der eindeutig nachgewiesenen Kompetition mit *p*CMB, jedoch reagiert NEM neben Cys_a mit weiteren Cysteinen (Ergebnisse nicht gezeigt). Aufgrund der Membranpermeabilität dieses Inhibitors könnte NEM zusätzlich mit dem Cystein reagieren, das die entsprechende Position von Cys_a in der (geforderten) internen Bindungsstelle des Carriers einnimmt. Diese Möglichkeit zeigt die Abbildung 3.7.2 (s.u.).

Die durchgeführten Untersuchungen ermöglichten zudem eine differenzierte Betrachtung der beiden funktionellen Cysteine. Die ausschließliche Modifikation von Cys_a führt einzig zur Inaktivierung der physiologischen Antiportfunktion. In den Prozeß der Effluxinduktion ist ein zweites Cystein (Cys_b) des Aspartat/Glutamat-Carriers involviert. Nur die simultane Modifikation von Cys_a und Cys_b durch die Inhibitoren der Reagenzienklasse B ($HgCl_2$, Mersalylsäure, *p*CMBS und DIDS)

induziert die Effluxfunktion. Cys_b reagiert nicht mit den Inhibitoren der Reagenzienklasse A, hingegen binden alle Reagenzien der Klasse B auch an Cys_a was sich in der Fähigkeit dieser Reagenzien zur Repression der Modifikation des Carriers durch [^{14}C]-NBD-Cl zeigt. In Folge der "Substratschützbarkeit" von Cys_a (vgl. Abb. 3.2.3) ist in Gegenwart von externem Substrat die Bindung der Inhibitoren der Klasse B auf Cys_b beschränkt. Die Inkubation des Carriers unter diesen Bedingungen führt somit nicht zur Effluxinduktion sondern bewirkt lediglich die Inhibition der Antiportfunktion.

Neben den charakterisierten Cysteinen wurden im Carrierprotein weitere basische Aminosäuren von essentieller Bedeutung identifiziert. Die Lokalisierung des Histidin- (*His*) und des Lysinrestes (*Lys*) in der Bindungsstelle des Aspartat/Glutamat-Carriers wurde bereits publiziert (Dierks et al. 1992). Die Modifikation beider Aminosäurereste führte zur Inaktivierung der Antiport- und der Effluxfunktion des Carriers (vgl. Tabelle 3.5.1 & 3.7.1). Aufgrund dieser einheitlichen Wirkung werden alle histidin- und lysinspezifischen Reagenzien in die Reagenzienklasse C eingeordnet. Weiterhin wurden Hinweise auf ein essentielles Arginin außerhalb der Bindungsstelle des Carriers erhalten. Die Modifikation dieses Arginins führt ausschließlich zur Inhibition des Substratantiports, hingegen wird die Effluxfunktion nicht beeinflußt. Argininspezifische Inhibitoren werden in die Reagenzienklasse D eingeordnet.

Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß das gewählte Verfahren zur Lokalisation der Aminosäuren nicht unumstritten ist. Beispielsweise ergab sich bei der detaillierten Untersuchung der Funktion bestimmter Cysteine der *Lac* Permease aus *Escherichia coli*, daß ein bestimmtes Cystein dieses Carrierproteins in Gegenwart von externem Substrat gegen eine Modifikation durch NEM geschützt wird. Mittels spezifischer (*site-directed*) Mutagenese konnte jedoch einwandfrei nachgewiesen werden, daß dieses "schützbare" Cystein in Hinblick auf die Transportaktivität der *Lac* Permease nicht essentiell ist (Kennedy et al. 1971, van Iwarden et al. 1991). Die Situation bei der *Lac* Permease unterscheidet sich jedoch insofern von dem hier untersuchten Carrier, da die Modifikation der Cysteine beim Aspartat/Glutamat-Carrier nicht nur eine Inaktivierung des Carriers bewirkt, sondern auch (bei Verwendung von Reagenzien der Klasse B) zur Induktion einer unphysiologischen Transportfunktion führt.

Tabelle 3.7.1: **Klassifizierung der verschiedenen Reagenzien aufgrund unterschiedlicher Wirkungen auf die Transportfunktionen des Aspartat/Glutamat-Carriers.**

Reagenz	modifizierte Aminosäure	I_{50}[a] [µM] Anti-port	I_{50}[a] [µM] Uniport	A_{50}[a] [µM] Uniport-induktion	Substratschutz gegen Antiport-inhibition	Substratschutz gegen Uniport-inhibition	Substratschutz gegen Uniport-induktion
Klasse A: Inhibition des Antiports; die Uniportinduktion wird stimuliert.							
*p*CMB	*Cys*$_a$	2	-----	-----	(+)[b]		
BPAB	*Cys*$_a$	3	-----	-----	+		
DTNB	*Cys*$_a$	10	-----	-----	+		
NBD-Cl	*Cys*$_a$	50	-----	-----	+		
NEM	*Cys*$_a$	1000	-----	-----	(+)[c]		
Klasse B: Inhibition des Antiports nach Zugabe geringer Konzentrationen; Uniportinduktion und Inhibition des Antiports nach Zugabe hoher Konzentrationen.							
$HgCl_2$	*Cys*$_a$/*Cys*$_b$	2	-----	10	-----		+
*p*CMBS	*Cys*$_a$/*Cys*$_b$	2	-----	40	-----		+
Mersalyl.	*Cys*$_a$/*Cys*$_b$	2	-----	100	-----		+
DIDS	*Cys*$_a$/*Cys*$_b$	8	-----	70	-----		(+)[d]
Klasse C: Inhibition von Antiport und Uniport.							
DEPC	*His*	20	80	-----	+	+	
EDC/Succinat	*Lys*	500	4000	-----	+	+	
PLP	*Lys*	900	>1000	-----	+	+	
SITS	*Lys*	300	1000	-----	+	+	
FITC	*Lys*	450	>1500	-----	+	+	
Klasse D: Inhibition des Antiports; die Uniportinduktion bleibt unbeeinflußt.							
Phenylglyoxal	*Arg*	4800	-----	----	----		
Diacetyl	*Arg*	2800	-----	----	----		

[a]: I_{50} (A_{50}) bezeichnet die Inhibitor- (Aktivator-) Konzentraton die eine 50% Inhibition (Effluxinduktion) bewirkt

[b]: schwacher Substratschutz aufgrund der schnellen Modifikation durch *p*CMB (kinetisch kontrollierte Reaktion)

[c]: sehr schwacher Substratschutz; Einstufung in die Klasse A aufgrund der Kompetition mit *p*CMB (s. Text)

[d]: geringe Uniportaktivitäten; beruht wahrscheinlich auf der zusätzlichen Modifikation von *Lys* neben *Cys*$_a$ und *Cys*$_b$

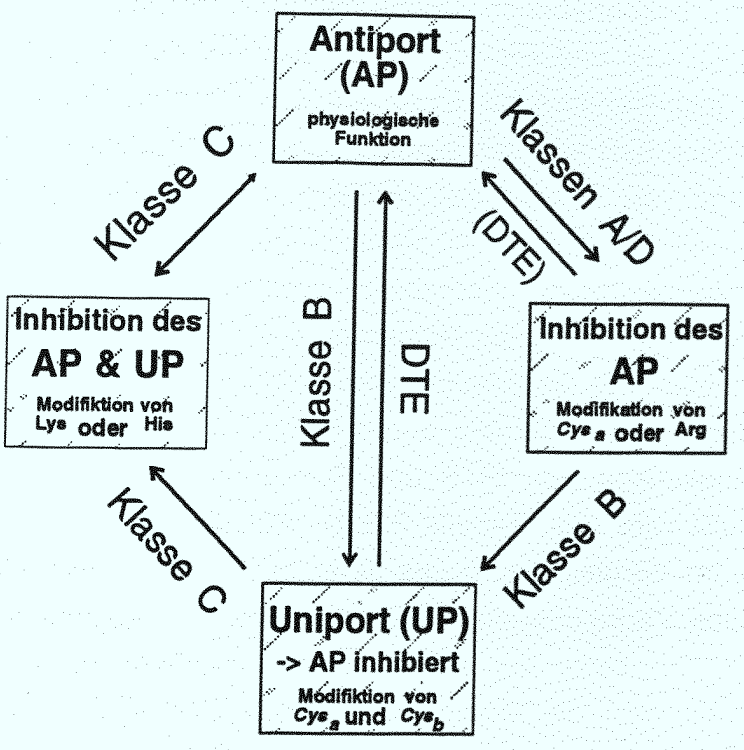


Abbildung 3.7.1: **Korrelation aller Effekte der verschiedenen Inhibitoren hinsichtlich der Transportaktivitäten des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers.**
Im physiologischen Zustand (alle essentiellen Aminosäurereste sind unmodifiziert) katalysiert der Aspartat/Glutamat-Carrier einen Substrat/Substrat-Antiport (AP). Die reversible Modifikation von Cys_a (vermittelt durch Reagenzien der Klasse A) sowie die irreversible Modifikation des Arginins (vermittelt durch Reagenzien der Klasse D) führten zur Antiportinhibition. Die Inkubation des Carriers mit Reagenzien der Klasse B induziert die unphysiologische Transportfunktion infolge der simultanen Modifikation von Cys_a und Cys_b. Für den Fall, daß die Effluxinduktion in Abwesenheit der argininspezifischen Inhibitoren durchgeführt wurde, ist die Effluxinduktion vollkommen reversibel. Wie gezeigt, führt die Inkubation des Carriers mit Reagenzien der Klasse C immer zur Inhibition beider Transportfunktionen. Diese Reagenzien sind mit Ausnahme von PLP durchweg irreversibel.

3.7.2 Schlußfolgerungen zur Topologie der identifizierten Aminosäuren

Basierend auf der Membranimpermeabiltät der eingesetzten Verbindungen (mit Ausnahme von NEM) sowie unter Berücksichtigung der *right-side-out* Orientierung des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers (Dierks et al. 1988) lassen die durchgeführten Experimente interessante Schlußfolgerungen über den topologischen Aufbau der exofazialen (cytosolischen) Bindungsstelle des Carriers zu.

Beruhend auf den beschriebenen Substratschutzexperimenten wurden drei Aminosäurereste (*Cys$_a$*, *Lys* und *His*) der Bindungsstelle des Aspartat/Glutamat-Carriers zugeordnet. Insbesondere für *Cys$_a$* und *Lys* konnten Hinweise auf eine enge räumliche Nachbarschaft erhalten werden. Das überzeugendste Argument in diesem Zusammenhang war der Befund, wonach die Behinderung der Bindung von NBD-Cl an *Cys$_a$* mit der Größe des vorab eingesetzten lysinspezifischen Inhibitors korrelierte. Vergleichbare (wenngleich weniger signifikante) Ergebnisse wurden auch bei einer Umkehrung der Reihenfolge der Inhibitoren gefunden (vgl. Tabelle 3.5.1). Im Hinblick auf die deutlich verringerte Bindung von [^{14}C]-NBD-Cl an *Cys$_a$* nach Modifikation des Carriers durch PLP, überraschte der Befund, daß umgekehrt die Zugänglichkeit von SITS und PLP durch eine Vorinkubation mit NBD-Cl nicht beeinflußt wird (vgl. Tabelle 3.5.1). Auf diesem Resultat beruht die Annahme, daß *Cys$_a$* im Vergleich zum *Lys* tiefer in der Bindungsstelle lokalisiert ist (s. Abb. 3.7.2). Eine Vorinkubation mit lysinspezifischen Reagenzien wirkt sich auf die Modifikation von *Cys$_b$* nur schwach aus. In Gegenwart des carrierspezifischen Substrates wird die Modifikation dieses Cysteins nicht beeinflußt, demzufolge ist dieser Aminosäurerest vermutlich außerhalb der Bindungsstelle des Carriers lokalisiert. Diese (angenommene) Lokalisation korreliert mit der Beobachtung, wonach keine Disulfidbrücke zwischen *Cys$_a$* und *Cys$_b$* ausgebildet werden konnte.

Die Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch DIDS unterschiedet sich erheblich von der Inaktivierung des Carriers durch das monofunktionelle SITS. Während der monofunktionelle Inhibitor eindeutig als lysinspezifisches Reagenz wirkt (Dierks et al. 1992), reagiert DIDS sowohl mit *Lys* als auch mit *Cys$_a$* (vgl. Tabelle 3.5.1). Demzufolge ist eine direkte Verbrückung beider Aminosäurereste durch diesen bifunktionellen Inhibitor denkbar. Ein endgültiger Beweis ist jedoch mit Hilfe der funktionellen Untersuchungen nicht möglich. Zu diesem Zweck müßten proteolytische Studien mit hochaufgereinigtem und markiertem Carrier durchgeführt werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich waren. Interessanterweise induziert DIDS im Konzentrationsbereich $\geq$ 60 μM ebenfalls die unphysiologische Effluxfunktion, was auf eine zusätzliche Modifikation von *Cys$_b$* hindeutet. Die verhältnismäßig geringeren Effluxraten, die nur nach Induktion der Effluxfunktion durch DIDS beobachtet wurden, dürften mit hoher Wahrscheinlich auf der parallel stattfindenden Modifikation des Lysins (*Lys*) beruhen.

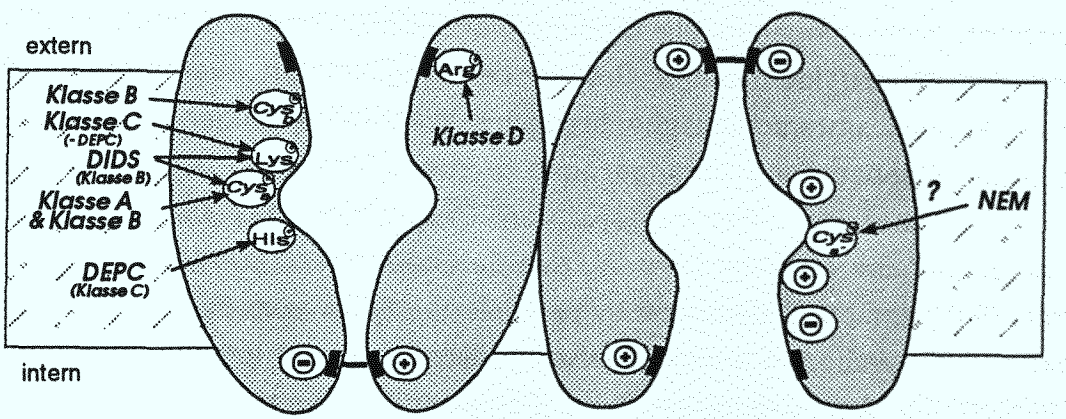


Abbildung 3.7.2: **Hypothetisches Modell der Topologie der externen Bindungsstelle des Aspartat/Glutamat-Carriers.**
Das gezeigte Modell wurde vom *single binding centre gated pore model* (vgl. Abschnitt 1.4) abgeleitet. Der Entwurf berücksichtigt die Existenz von zwei Bindungsstellen pro Carrierdimer (s. Abschnitt 1.4). Es soll an dieser Stelle ausdrücklich betont werden, daß die eingezeichnete Lokalisation der identifizierten Aminosäure (trotz der beschriebenen experimentellen Befunde) im wesentlichen spekulativ ist.

3.7.3 Schlußfolgerungen zum molekularen Mechanismus des Substrattransports

In der vorliegenden Arbeit wurde die Existenz von fünf essentiellen Aminosäureresten des Aspartat/Glutamat-Carriers nachgewiesen. Zur Bindung der sauren Substrate des Carriers (Glutamat & Aspartat) tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit die identifizierten Aminosäurereste Cys_a, *Lys* und *His* bei. Der pK_S-Wert von Cys_a wurde zu ≤ 6.7 bestimmt. Dies hat zur Folge, daß unter physiologischen Bedingungen zwei positive Ladungen und eine negative Ladung in der Bindungsstelle des Carriers vorliegen, die eine Bindung der Substrate über elektrostatische Wechselwirkungen ermöglichen könnten. Eine enge räumliche Nachbarschaft wurde insbesondere für die beiden Aminosäurereste Cys_a und *Lys* nachgewiesen. Möglicherweise sind diese beiden Gruppen für die Bindung der α-ständigen Amino- und der α-ständigen Carboxylgruppe der transportierten Aminosäuren notwendig. Der aufgezeigte niedrige pK_S-Wert für den Aminosäurerest Cys_a deutet möglicherweise auf eine Interaktion dieses Aminosäurerestes mit den basischen Gruppen *Lys* und *His* hin. Diese Annahme erklärt sowohl die

auffallend hohe Reaktivität von Cys_a als auch die Beob-achtung, wonach eine Vorinkubation mit PLP zwar die Modifikation von Cys_a durch NBD-Cl oder BPAB beeinträchtigt, nicht hingegen die Bindung von pCMB (bzw. *p*CMBS) an Cys_a. Aufgrund der nahezu identischen Größen der eingesetzten cysteinspezifischen Inhibitoren können unterschiedliche sterische Wechselwirkungen nicht zur Erklärung dieser Beobachtung herangezogen werden. Eine elektrostatische Beeinflussung der Dissoziation des Protons von Cys_a durch das benachbarte *Lys* erlaubt hingegen eine einfache Deutung des Befundes. Nach der Modifikation von *Lys* durch PLP liegt Cys_a demnach in protonierter Form vor. In diesem Zustand komplexiert Cys_a weiterhin quecksilberhaltige Komponenten (*p*CMB, *p*CMBS) hingegen verliert der Aminosäurerest seine Fähigkeit zur nucleophilen Substitution (verringerte Bindung der Inhibitoren BPAB, DTNB und NBD-Cl). Vergleichbare elektrostatische Wechselwirkungen zwischen räumlich benachbarten Aminosäureresten werden beispielsweise im Falle der *Lac* Permease (Menick et al. 1987, Kaback 1992) oder auch für den mitochondrialen Phosphatcarrier (Kolbe & Wohlrab 1985) diskutiert. In Analogie zum bereits vorgestellten *single binding centre gated pore* Modell (vgl. Abschnitt 1.4) ist die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen den im peripheren Bereich des Carrierproteins lokalisierten Aminosäureresten Cys_b und *Arg* denkbar. Anzumerken ist weiterhin, daß die geladenen Aminosäurereste in der Bindungsstelle des Carriers auch in der (unphysiologischen) Effluxfunktion von großer Bedeutung sind. Diese Ansicht beruht neben der direkten Einbeziehung der Modifikation von Cys_a in den Prozeß der Effluxinduktion insbesondere auf der beobachteten Inaktivierung dieser Transportfunktion nach Zugabe der sterisch wenig anspruchsvollen Inhibitoren EDC/ Succinat oder DEPC.

Abschließend kann somit festgehalten werden, daß die durchgeführten Studien das theoretische (*single binding centre gated pore)* Modell der Transportkatalyse eindeutig stützen. Auf Basis der bereits durchgeführten Bisubstrat-Analyse wird die Existenz von zwei katalytischen Bindungsstellen für den Aspartat/Glutamat-Carrier gefordert (Dierks et al. 1988). Das vorgestellte Modell der Transportkatalyse (vgl. Abbildung 1.4.1) muß somit in Hinblick auf ein Zwei-Kanal-Modell erweitert werden (vgl. Abbildung 3.7.2). Dieses Zwei-Kanal-Modell impliziert eine hohe Kooperativität zwischen den beiden katalytisch-aktiven Untereinheiten des Carriers. Diese Forderung steht im Einklang mit den erhaltenen experimentellen Daten. Sowohl im Falle der Modifikation des Aspartat/Glutamat-Carriers durch NBD-Cl (s. Abschnitt 3.2) als auch bei Inaktivierung des Translokators durch DEPC, EDC/Succinat bzw. SITS (Dierks et al. 1992) konnte eindeutig belegt werden, daß die Inhibition des Carrier-Homodimers auf der Modifikation eines einzigen Aminosäurerestes beruht.

4 Funktionelle Charakterisierung des rekonstituierten Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien

(Stappen & Krämer 1993; Stappen & Krämer 1994)

4.1 Einleitung

Die Aufnahme von anorganischem Phosphat in die mitochondriale Matrix ist von primärer Bedeutung für den Energiestoffwechsel. Grundsätzlich katalysieren sowohl der Phosphatcarrier als auch der Dicarboxylatcarrier diese Transportfunktion, doch ist für die Nettoaufnahme von Phosphat ausschließlich der mitochondriale Phosphatcarrier von Bedeutung (eine Übersicht geben: LaNoue & Schoolwerth 1984, Wohlrab 1986, Wehrle & Pedersen 1989, Ferreira & Pedersen 1993). Die Primär- und Sekundärstruktur des Phosphatcarriers aus Rinderherz- (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987) Rattenleber- (Ferreira et al. 1989) und Hefemitochondrien (Phelps et al. 1991) ist bekannt. Aufgrund der übereinstimmenden Sekundärstruktur gehört der Phosphatcarrier eindeutig zur Strukturfamilie der mitochondrialen Carrier (vgl. Abschnitt 1.3). Den bisher durchgeführten kinetischen Untersuchungen zufolge, ist die carriervermittelte (unidirektionale) Phosphataufnahme in die Mitochondrienmatrix ein elektroneutraler Prozeß (Coty & Pedersen 1974, Ligeti et al. 1985), wobei der Ausgleich der Ladung(en) des transportierten Phosphats durch cotransportierte Protonen (bzw. Hydroxylionen) erfolgt. Der Phosphatimport wird somit direkt durch die protonenmotorische Kraft getrieben, die von diesen Transportprozeß zu einem hohen Maß (≤ 25%) verbraucht wird (Lehninger & Reynafarje 1982). Neben einer hohen Substratspezifität zeichnend den mitochondrialen Phosphatcarrier insbesondere die hohe Sensitivität gegenüber NEM aus (Fonyo & Bessman 1968, Meijer et al. 1970). Dieser Inhibitor modifiziert spezifisch das Cystein an Position 42 (Cys_{42}) des Carriers aus Rinderherzmitochondrien. Interessanterweise wird dieses Cystein von zwei basischen Gruppen (Lys_{41} und Arg_{43}) flankiert (Kolbe & Wohlrab 1985) die voraussichtlich zur Stabilisierung des reaktiven Thiolatanions ($Cys\text{-}S^-$) beitragen und somit die gesteigerte Reaktivität verursachen. In Analogie zu anderen sekundären Carrierproteinen katalysiert der mitochondriale Phosphatcarrier neben der unidirektionalen Phosphataufnahme auch einen Substrat/Substrat-(Homo-) Austausch.

Ungeachtet der bereits seit mehr als 10 Jahren publizierten Verfahren zur Aufreinigung und aktiven Rekonstitution des Phosphatcarriers in künstliche Liposomen (Wohlrab 1980, Wohlrab et al. 1986) wurde eine detaillierte kinetische

Untersuchung des mitochondrialen Phosphatcarrier bislang nicht durchgeführt. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß alle bisher publizierten Rekonstitutionsverfahren für den Phosphatcarrier ausschließlich auf der Anwendung der sogenannten *freeze/thaw/sonication*-Methode beruhen (s. auch: Kasahara & Hinkle 1977, Krämer & Klingenberg 1977, Bisaccia & Palmieri 1984, Wohlrab et al. 1984). Die nachfolgend vorgestellten Ergebnisse belegen, daß die unvollkommene Charakterisierung des Phosphatcarriers insbesondere auf den spezifischen Nachteilen (z.B. dem nicht abgereicherten Detergens) des bisher angewendeten Rekonstitutionsverfahrens beruht. Aufbauend auf der Etablierung der sogenannten Amberlite-Methode, die erstmalig zur Rekonstitution des Aspartat/Glutamat-Carriers (Krämer & Heberger 1986) verwendet wurde, in Kombination mit der Entwicklung einer Technik zur reversiblen Inaktivierung des Phosphatcarriers ermöglichte die vorliegende Arbeit erstmalig eine detaillierte kinetische Charakterisierung des mitochondrialen Phosphatcarriers.

Die grundlegenden Eigenschaften des Phosphattransports in Proteoliposomen (Substrataffinität, Einfluß eines Membranpotentials und eines pH-Gradienten) stimmen mit publizierten Daten aus intakten Mitochondrien überein. Die durchgeführten Bisubstratanalysen belegen, daß der Phosphattransport in beiden physiologischen Transportfunktionen des Carriers entsprechend dem simultanen Mechanismus erfolgt (vgl. Abschnitt 1.4). Durch Zugabe von $HgCl_2$ zum rekonstituierten Phosphatcarrier wird eine unphysiologische Transportfunktion induziert, die in Analogie zu anderen mitochondrialen Carriern ebenfalls Poreneigenschaften aufweist (vgl. Abschnitt 1.5). Die erhaltenen Resultate bestätigen somit die vermutete Existenz einer universellen Funktionsfamilie der mitochondrialen Carrier. Zudem sind die kinetischen Befunde in Hinsicht auf die Funktion des Phosphatcarriers von großem Interesse. Die erhaltenen Daten deuten daraufhin, daß der Phosphatcarrier neben dem P_i^-/P_i^--Antiport mutmaßlich auch einen P_i^-/OH^--Antiport katalysiert.

4.2 Optimierung des Meßsystems

Die kinetische Charakterisierung rekonstituierter Carrierproteine basiert im wesentlichen auf einem optimal angepaßten Rekonstitutionsverfahren. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen des mitochondrialen Phosphatcarriers, die allesamt auf der Verwendung der *freeze/thaw/sonication*-Methode beruhten (s.o.), adaptierten und modifizierten wir erstmalig die Amberlite-Methode zur Bildung funktioneller Proteoliposomen. Entsprechend der Vorgehensweise die (u.a.) zur erfolgreichen Rekonstitution des Aspartat/Glutamat-Carriers führte (Krämer & Heber-

ger 1986), wurde insbesondere der Einfluß variierender Protein/Phospholipid-Verhältnisse auf die Aktivität des Phosphatcarriers und den Zustand der Liposomen untersucht. Die Abbildung 4.2.1 belegt, daß die gemessenen spezifischen Transportraten lediglich in einem relativ kleinen Bereich zwischen 0.9-1.5 μg Protein/mg Phospholipid optimale Werte erreichen. Die Abbildung zeigt, daß die Abnahme der Transportraten bei Einsatz höherer Proteinmengen hauptsächlich auf einer starken Verringerung des Innenvolumens der Liposomen beruht. Beim Vergleich mit anderen mitochondrialen Carriern fällt auf, daß das festgestellte optimale Protein/Phospholipid-Verhältnis von ungefähr 1 μg Protein/mg Phospholipid dem Wert entspricht, der auch für den Carnitincarrier (Indiveri et al. 1991*a*) publiziert wurde. Die entsprechenden Werte beim ADP/ATP-Carrier bzw. beim Aspartat/Glutamat-Carrier liegen hingegen um den Faktor 10, respektive um den Faktor 100 (Krämer & Heberger 1986) über dem ermittelten Wert für den Phosphatcarrier.

Weitere wichtige Parameter, wie die totale Menge an Phospholipid im Ansatz, das Detergens/Phospholipid-Verhältnis, das Detergens/Amberlite-Verhältnis sowie die Anzahl der Säulenpassagen wurden ebenfalls überprüft. Die bestimmten Werte zur Erzielung optimaler Carrieraktivitäten weichen jedoch von den Werten anderer mitochondrialer Carrierproteine nicht signifikant ab. Maximale Transportraten wurden mit Hilfe der nachfolgenden Parameter erhalten: Wir setzten jeweils 12 mg Phospholipid/ml in Kombination mit einem Detergens/Phospholipid-Verhältnis von 1.6-1.8 mg/mg ein. Das Detergens/Amberlite-Verhältnis kann zwischen 15 mg/g bis 30 mg/g beliebig variiert werden. Die Abreicherung des Detergens war nach 15 aufeinanderfolgenden Säulenpassagen abgeschlossen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Vor dem Hintergrund, daß ein Zusatz von Cardiolipin während der Aufreinigung des Carriers absolut notwendig ist (Kadenbach et al. 1982, Bisaccia & Palmieri 1984), wurde die Wirkung dieses speziellen Phospholipids während der Rekonstitution des Phosphatcarriers ebenfalls überprüft. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch keine Stimulation der apparenten Transportaktivität solange der Anteil des zugesetzten Cardiolipins am Gesamtphospholipid unter 5 % blieb. Bei Konzentrationen über 10% wurde hingegen reproduzierbar ein deutlicher Rückgang der Transportraten verzeichnet (Ergebnisse nicht gezeigt).

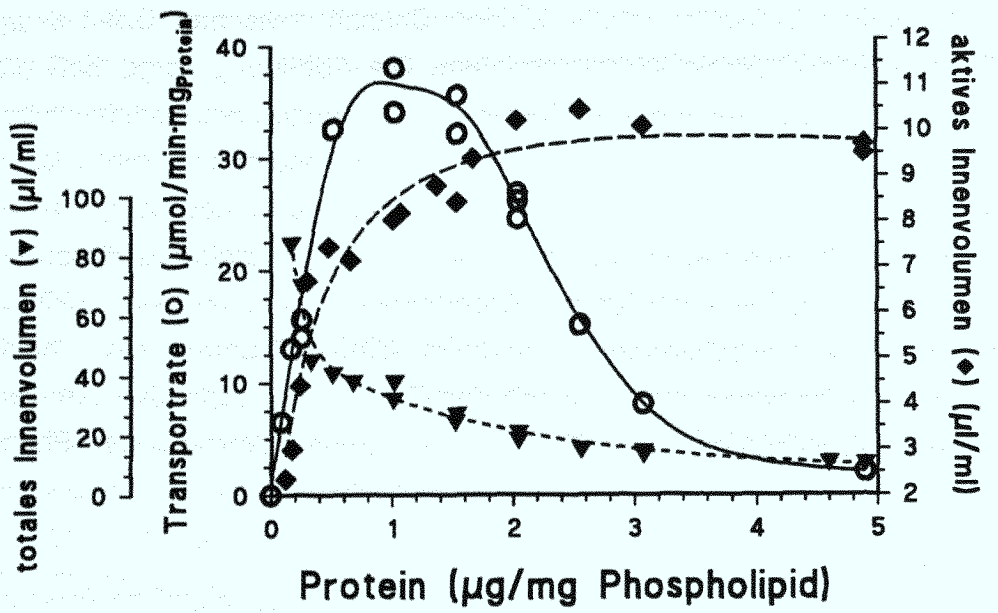


Abb. 4.2.1: **Rekonstitution des Phosphatcarriers - Einfluß des Protein/Phospholipidverhältnisses.** Die konstant gehaltenen Rekonstitutionsparameter lauten: 12 mg/ml Phospholipid; Triton X-114/ Phospholipid, 1.6 mg/mg; Triton X-114/Amberlite, 20 mg/g; Anzahl der Säulenpassagen, 15. Der P_i/P_i-Austausch wurde immer in Anwesenheit von 20 mM internem Phosphat (pH 6.5) sowie nach Zugabe von Valinomycin und Nigericin gemessen (vgl. Abschnitt 2.3.1.1). Die spezifischen Transportraten (o) ergaben sich aus den gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten der Austauschkinetiken in Gegenwart von 1.5 mM externem Phosphat. Zur Bestimmung des aktiven Innenvolumens (◆) wurden Parallelexperimente in Gegenwart von 20 mM externem Phosphat durchgeführt. Das aktive Innenvolumen ergibt sich in diesen Experimenten direkt aus dem Endwert der Aufnahmekinetik (vgl. Abschnitt 2.3.3). Das totale Innenvolumen (▼) wurde durch Phosphatbestimmung entsprechend der von Chen et al. (1956) publizierten Methode festgesetzt.

Die Abbildung 4.2.2 verdeutlicht die wichtigsten Vorteile der etablierten Amberlite-Methode zur Rekonstitution des mitochondrialen Phosphatcarriers. Unter identischen Bedingungen führt der Einsatz dieser Methode zur Bildung von Proteoliposomen mit einem mehr als zweifach höheren aktiven Innenvolumen und einer ähnlich signifikanten Steigerung der spezifischen Transportaktivität im direkten Vergleich zum bislang ausschließlich verwendeten *freeze/ thaw/sonication*-Verfahren. In Hinsicht auf die angestrebte exakte kinetische Charakterisierung des Phosphatcarrier von großer Bedeutung ist jedoch der Befund, daß der Anteil des unspezifischen Transports am Gesamttransport nach Anwendung der *Amberlite*-Methode deutlich herabgesetzt wurde.

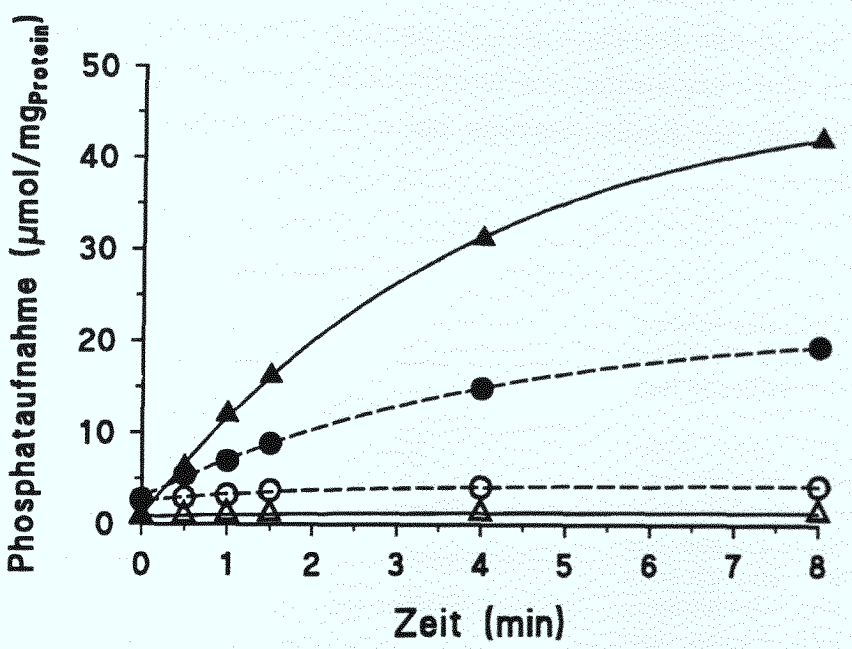


Abb. 4.2.2: **Zeitabhängigkeit des Phosphat/Phosphat-Austauschs in Proteoliposomen.**
Aktive Proteoliposomen wurden mit Hilfe der Amberlite-Methode (▲,△) bzw. mit Hilfe des freeze/thaw/sonication-Verfahrens (●,○) erzeugt. Zum Zeitpunkt t=0 wurden die Liposomen (internes Phosphat: 20 mM, pH 6.5) mit 0.5 mM [^{32}P]Phosphat (extern) versetzt. Die Phosphataufnahme durch den unmodifizierten Carrier (geschlossene Symbole), bzw. nach Inaktivierung des Carriers durch eine 15-minütige Vorinkubation mit 2 mM NEM (offene Symbole) sind gezeigt. Folgende Transportraten wurden (in Gegenwart einer suboptimalen externen Substratkonzentration) gemessen: 12.1 µmol/min•mg$_{Protein}$ (▲), 4.5 µmol/min•mg$_{Protein}$ (●), 0.21 µmol/min•mg$_{Protein}$ (△) bzw. 0.75 µmol/min•mg$_{Protein}$ (○).

Generell besitzen Untersuchungen im rekonstituierten System den großen Vorteil, daß die Substratkonzentration im internen und externen Kompartiment nahezu beliebig variiert werden kann. Die freie Variation des externen Substrates beruht jedoch auf der Anwendung chromatographischer Verfahren, wie beispielsweise der Größenausschluß- oder der Ionenaustauschchromatographie. Die Problematik dieser Methoden bei der Anwendung auf den rekonstituierten PIC hängt direkt mit der Fähigkeit des Carriers zur Katalyse eines unidirektionalen Phosphattransports zusammen. Die Realisierung von Experimenten die auf exakt definierten internen Substratkonzentration beruhen, bedingte somit den Einsatz eines sehr effektiven und zugleich völlig reversiblen Inhibitors zur Inaktivierung des Carriers während der Durchführung chromatographischer Verfahren. Diese gestellten Anforderungen schränkten die Auswahl möglicher Inhibitoren auf die Gruppe der SH-spezifischen Reagenzien ein, deren Wirkung (in der Regel) durch

Gabe von DTE wieder revertiert wird (Anfinsen & Haber 1961). Die überprüften Reagenzien werden in der Tabelle 4.2.1 vorgestellt. Die gezeigten Daten belegen, daß die chemisch eng verwandten Inhibitoren *p*CMB und *p*CMBS, in Kombination mit der Durchführung der Säulenpassage bei 4°C, die geforderten Bedingungen vollständig erfüllen.

Tabelle 4.2.1: **Inhibition des (physiologischen) unidirektionalen Phosphattransports durch SH-spezifische Reagenzien.**
Proteoliposomen (20 mM internes/externes Phosphat, pH 6.5) wurden durch Zugabe von [^{32}P]Phosphat vorbeladen. Nach Zugabe des Inhibitors in den angegebenen Konzentrationen und Gelfiltration über Sephadex G-75 Säulen (bei 4°C), wurde die in den Liposomen verbliebene Markierung durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. In Parallelexperimenten erfolgte analog dazu die Bestimmung der Verdünnung der Liposomen während der Säulenpassage. Die Zusammenfassung beider Werte erlaubte eine exakte Berechnung des Phosphatefflux während der Säulenpassage. Die Reversibilität der einzelnen Reagenzien nach Zugabe von 5 mM DTE wurde in Vortauschexperimenten bestimmt. Hier diente jeweils die Aktivität des unmodifizierten Carriers als Vergleichsansatz.
*: Eine exakte Bestimmung der Reversibilität war aufgrund der Induktion einer unphysiologischen Effluxfunktion (vgl. Abschnitt 4.5) nicht möglich.

Modifikation des PIC durch	Efflux des internen Phosphats (%)	Reversibilität des Reagenz (%)
Puffer (H_2O)	≥ 60	-----
5 µM *p*CMB	25	103
50 µM *p*CMB	2	112
1 µM *p*CMBS	30	104
5 µM *p*CMBS	≤ 3	98
50 µM *p*CMBS	1	101
50 µM DTNB	1	42
1 mM NEM	1	0
10 µM $HgCl_2$	8	98
100 µM $HgCl_2$	32	≈ 100*
1 mM $HgCl_2$	≥ 78	≥ 92*
100 µM Mersalyl.	9	105
1 mM Mersalyl.	14	95

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Verringerung der Phosphatkonzentration während der Aufreinigung des Phosphatcarriers durchgeführt. Bei der publizierten Methode (Bisaccia & Palmieri 1984, Genchi et al. 1988) wird der Carrier (u.a.) in Gegenwart von 20 mM K-P_i aufgereinigt. Dieser feste Wert, in Kombination mit den ermittelten "optimalen" Rekonstitutionsparametern (s.o.), ermögliche nur eine freie Variation der internen Phosphatkonzentration im

Bereich ≥ 1.5 mM. Zur Bestimmung der exakten (internen) Substrataffinität des Carriers sind jedoch Versuche mit niedrigeren, internen Phosphatkonzentrationen erforderlich. Wir konnten zeigen, daß eine Reduktion der Phosphatkonzentration während der Aufreinigung des Carriers von 20 mM auf 2 mM bei gleichzeitiger Steigerung der Kaliumchloridkonzentration von 20 mM auf 50 mM und einem Zusatz von 20 mM HEPES (pH 6.5) möglich ist. Die Aktivität des Carriers nimmt im Vergleich zur Standartpräparation unter diesen Bedingungen nur um ca. 30% ab (Ergebnis nicht gezeigt).

4.3 Charakterisierung des Phosphattransports

Aufgrund der spezifischen Verteilung des Dicarboxylatcarriers in Organismus (vgl. Tabelle 1.2.1) sollte die aus Rinderherzmitochondrien aufgereinigte Fraktion des Phosphatcarriers diesen (zweiten phosphattransportierenden) Carrier nicht enthalten. Dennoch wurde eine eventuelle Beteiligung des Dicarboxylatcarriers am gemessenen Phosphattransport in Proteoliposomen überprüft. Die Differenzierung zwischen dem Dicarboxylat- und dem Phosphatcarrier ist infolge der unterschiedlichen Inhibitorsensitivität beider Carrier leicht möglich. Zeichnet sich der Phosphatcarrier durch seine hohe Empfindlichkeit gegen NEM aus (Meijer et al. 1970), so wird der Dicarboxylatcarrier durch Substratanaloga wie n-Butylmalonat effektiv inhibiert (Robinson & Chapell 1967). Auf diesen Befunden beruht das in Abbildung 4.3.1 gezeigte Experiment. Man erkennt, daß der Phosphattransport in Proteoliposomen nach Inkubation mit 5 mM NEM vollkommen inaktiviert wird hingegen hat die Zugabe von 15 mM n-Butylmalonat keinen Einfluß auf die Transportaktivität. Dieses Experiment belegt, daß der gesamte meßbare Phosphattransport in Proteoliposomen durch den inkorporierten mitochondrialen Phosphatcarrier katalysiert wird. Zusätzlich zeigt die Abbildung die starke Inhibition des Phosphatcarriers durch das lysinspezifische Reagenz PLP. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang jedoch, daß infolge der verwendeten Aufreinigungsmethode die erhaltene Proteinfraktion neben dem Phosphatcarrier auch den ADP/ATP-Carrier enthält. Dieser zweite Carrier wurde sowohl durch Transportmessungen als auch durch immunologische Verfahren zweifelsfrei identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Das neu etablierte Meßsystem erlaubte die Bestimmung der Transportraten des Phosphatcarriers unter exakt definierten (internen/externen) Substratkonzen-

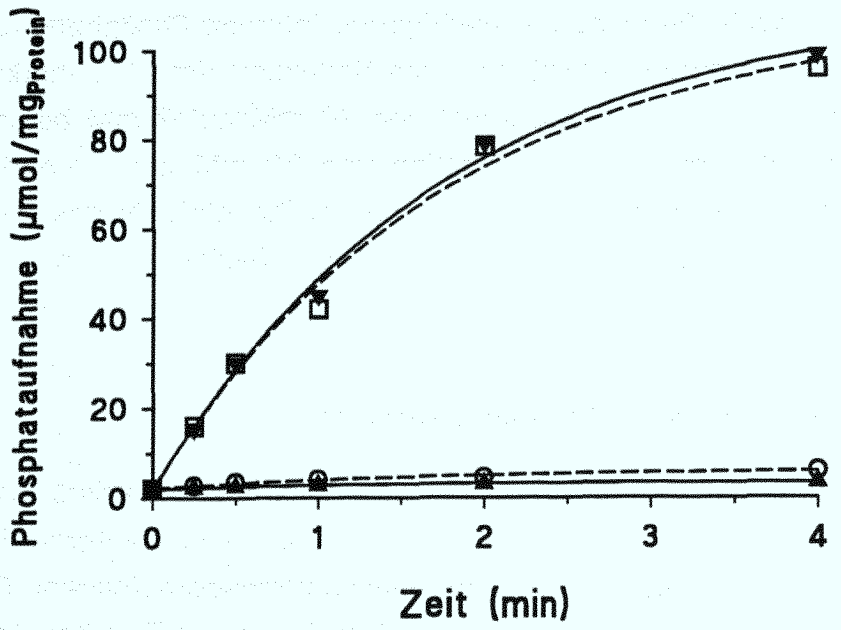


Abb. 4.3.1.: Sensitivität des Phosphattransportes gegen n-Butylmalonat, NEM und PLP.
Proteoliposomen (20 mM Phosphat intern/extern) wurden mit Puffer (•), mit 5 mM NEM (■), mit 5 mM PLP (o) oder mit 15 mM n-Butylmalonat (□) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte der Start der Aufnahmekinetik durch Zugabe von [^{32}P]Phosphat. Folgende Transportraten wurden gemessen: 62.8 µmol/min•mg$_{Protein}$ (•), 59.8 µmol/min•mg$_{Protein}$ (□), 2.43 µmol/min•mg$_{Protein}$ (o) und 1.05 µmol/min•mg$_{Protein}$ (■).

trationen. Wir untersuchten den Efflux von [^{32}P]Phosphat in Abwesenheit von externem Phosphat (P_i/H^+-Symport- bzw. P_i/OH^--Antiportfunktion) bzw. in Anwesenheit variierender externer Phosphatkonzentrationen (P_i/P_i-Antiportfunktion).

Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (*k*) werden in der Tabelle 4.3.1 miteinander verglichen. Die gemessenen Werte lagen zwischen 0.55 [min^{-1}] (P_i/H^+-Symport bzw. P_i/OH^--Antiport) und 1.61 [min^{-1}] (P_i/P_i-Antiport in Gegenwart sättigender Substratkonzentrationen). Durch Kontrollexperimente wurde gleichzeitig abgesichert, daß der unidirektionale Phosphattransport durch Zugabe von 1.5 mM externem Phosphat nahezu vollständig inhibiert wird. Gestützt auf die berechnete Maximalgeschwindigkeit für den P_i/P_i-Antiport von 90 µmol•min^{-1}•(mg$_{Protein}$)$^{-1}$ konnte auf Basis dieser Werte eine spezifische Transportrate von ca. 30 µmol•min^{-1}•(mg$_{Protein}$)$^{-1}$ für den physiologischen Phosphatefflux abgeschätzt werden.

Tabelle 4.3.1: **Unterscheidung zwischen carriervermitteltem P_i/P_i-Antiport und P_i/H^+-Symport (P_i/OH^--Antiport).**
Der interne Substratpool der Proteoliposomen (20 mM Phosphat/ pH 6.5) wurde durch Äquilibrierung nach Gabe von [^{32}P]Phosphat markiert. Vor der Sephadex G-75 Passage wurde der Carrier durch Gabe von 5 μM *p*CMBS inaktiviert. Nach der Gelfiltration zur Abtrennung des externen Phosphats wurden die Transportaktivitäten beider physiologischer Transportfunktionen des Phosphatcarriers bestimmt. Zum besseren Vergleich zwischen unidirektionalen Phosphattransport und P_i/P_i-Austausch sind jeweils die apparenten Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung angegeben.

Zugabe von:	k [min^{-1}]
5 mM DTE / kein Phosphat	0.55
5 mM DTE / 1.5 mM Phosphat (extern)	0.62
5 mM DTE / 5 mM Phosphat (extern)	0.89
5 mM DTE / 30 mM Phosphat (extern)	1.61

4.3.1 Ermittlung der Substrataffinitäten des rekonstituierten Phosphatcarriers

Die Bestimmung der Substrataffinitäten des Carriers auf beiden Seiten der Liposomenmembran ist in verschiedener Hinsicht von Bedeutung: (i) Der K_m-Wert für internes Phosphat in intakten Mitochondrien sowie die Substrataffinitäten für den unidirektionalen Phosphattransport sind noch unbekannt. (ii) Der Vergleich der ermittelten Substrataffinitäten im rekonstituierten System mit den bekannten K_m-Werten in intakten Mitochondrien ermöglicht Aussagen hinsichtlich der Orientierung des inkorporierten Carriers (vgl. Abschnitt 4.8.1). (iii) Die Kenntnis der einzelnen K_m-Werte ist von essentieller Bedeutung für die angestrebte Aufklärung des kinetischen Transportmechanismus des mitochondrialen Phosphatcarriers (vgl. Abschnitt 4.4).

Zur Ermittlung der K_m-Werte für den P_i/P_i-Antiport wurden sowohl (sich teilweise ergänzende) Vortausch- als auch Rücktauschexperimente durchgeführt. Die Abbildung 4.3.2/A zeigt ein Eadie-Hofstee-Diagramm das sich aus Vortauschmessungen unter Variation des externen Substrates zwischen 0.1 - 37.5 mM, bei einer konstanten internen Phosphatkonzentration von 30 mM, ableitet. Die Werte in Abbildung 4.3.2/B beziehen sich auf ein Rücktauschexperiment mit variierenden internen Phosphatkonzentrationen (0.1 - 37.5 mM) und einer konstanten externen Phosphatkonzentration (30 mM). Beide Eadie-Hofstee-Diagramme

dokumentieren die Existenz eines einzigen K_m-Wertes auf den unterschiedlichen Seiten der liposomalen Membran. Bemerkenswert ist die signifikant höhere Affinität des Carriers gegenüber externem Phosphat (K_m = 1.8 ± 0.1 mM) im Vergleich zum entsprechenden internen K_m-Wert (9.4 ± 0.5 mM). Weiterhin wurde der K_m-Wert für internes Phosphat in der unidirektionalen Transportfunktion bestimmt (s. Abb. 4.3.2/C). Das entsprechende Eadie-Hofstee-Diagramm basiert auf einem Experiment bei dem Proteoliposomen mit internen Phosphatkonzentrationen zwischen 0.3 und 37.5 mM verwendet wurden. Nach der Gelfiltration zur Abtrennung des externen Phosphats wurde in diesem Versuch der Phosphattransport ausschließlich durch Revertierung des Inhibitors (*p*CMBS) unter Verwendung von DTE gestartet. Der ermittelte K_m-Wert für internes Phosphat liegt bei 11.2 ± 0.9 mM.

Als Resümee dieser Experimente kann somit festgehalten werden, daß zwar einerseits die K_m-Werte auf den beiden verschiedenen Membranseiten deutlich voneinander abweichen, daß andererseits hingegen identische interne K_m-Werte (für Phosphat) in beiden Transportfunktionen bestimmt wurden.

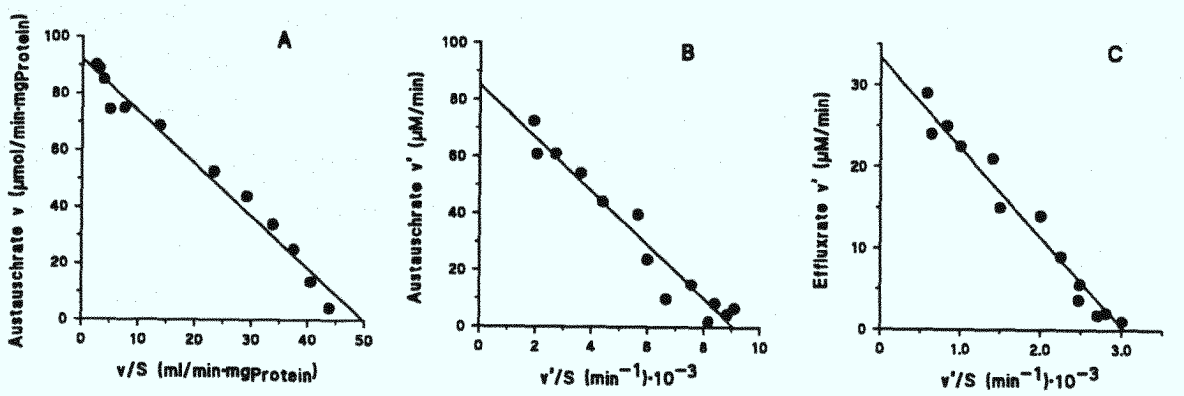


Abb. 4.3.2: **Affinitäten des rekonstituierten Phosphatcarriers für internes/externes Phosphat.** P_i/P_i-Antiportmessungen unter Variation der Phosphatkonzentration an der externen Membranseite (A) und an der internen Membranseite (B) sowie Messungen des unidirektionalen Phosphattransports zur Bestimmung des K_m-Wertes für internes Phosphat (C) wurden durchgeführt. Die jeweiligen Eadie-Hofstee-Diagramme leiten sich von Vortausch- (A), Rücktausch- (B) sowie von Efflux-experimenten (C) ab. Folgende Phosphatkonzentrationen wurden eingestellt: 30 mM internes P_i und 0.1 - 37.5 mM externes P_i (A); 30 mM externes P_i und 0.3 - 37.5 mM internes P_i (B); 0.3 - 37.5 mM internes P_i in Abwesenheit von externem P_i (C). Zur Berechnung von v', vgl. Abschnitt 2.3.1.2. Die ermittelten K_m-Werte sind: externes Phosphat (P_i/P_i-Antiport), 1.8 ± 0.1 mM; internes Phosphat (P_i/P_i-Antiport), 9.4 ± 0.5 mM; internes Phosphat (P_i/H^+-Symport bzw. P_i/OH^--Antiport), 11.2 ± 0.9 mM.

4.3.2 Einfluß eines Membranpotentials auf den Phosphattransport

Zur weiteren detaillierten Charakterisierung des rekonstituierten Phosphatcarriers wurde der Einfluß eines künstlich erzeugten Membranpotentials ($\Delta\Psi$) auf beide physiologische Transportfunktionen des Carriers untersucht (zur Erzeugung des Membranpotentials: vgl. Abschnitt 2.4.3). Die gemessenen Transportraten (s. Tabelle 4.3.2) belegen eindeutig, daß weder der P_i/P_i-Antiport, noch der unidirektionale Phosphattransport durch die Energetisierung der Membran beeinflußt werden. Insofern bestätigen unsere Messungen die gängige Ansicht eines elektroneutralen Phosphatimports in die mitochondriale Matrix (Coty & Pedersen 1974, Ligeti et al. 1985). Die Beobachtung, wonach ein Membranpotential die P_i/P_i-Antiportfunktion nicht beeinflußt ist keineswegs trivial. Dies zeigt sich beispielsweise an der Beobachtung, daß im Falle des ADP/ATP-Carriers das Membranpotential gleichwohl ein signifikanten Einfluß auf die Aktivität des elektroneutralen ATP/ATP-Austauschs ausübt (Krämer & Klingenberg 1982). Dieser Befund implizierte die Existenz eines geladenen Carrier-Substrat-Intermediats als Bestandteil des Transportzyklus des ADP/ATP-Carriers. Diese Möglichkeit kann für den untersuchten Phosphatcarrier ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.3.2: **Einfluß eines Membranpotentials auf den P_i^-/P_i^--Austausch und auf den unidirektionalen Phosphattransport.**
Die Transportaktivität der einzelnen Ansätze wurde jeweils durch Messung der Anfangsgeschwindigkeiten des Efflux der internen Markierung in beiden physiologischen Transportfunktionen bestimmt. Alle Experimente fanden bei pH 6.5 und einer konstanten internen Phosphatkonzentration von 50 mM statt. Nach dem Vorbeladen der Proteoliposomen wurde der Carrier vor der G-75 Passage durch 5 μM *p*CMBS inaktiviert. Nach der Gelfiltration wurde der Transport durch Zugabe von 5 mM DTE in Kombination mit 50 mM externem Phosphat (P_i/P_i-Antiport) bzw. ausschließlich durch die Zugabe von 5 mM DTE (unidirektionaler Phosphattransport) gestartet. Das Membranpotential wurde durch Gabe von Valinomycin (500 ng/mg Phospholipid) bei unterschiedlichen externen/internen Kaliumkonzentrationen eingestellt und betrug (theoretisch) zwischen -120 bis +120 mV (vgl. Abschnitt 2.4.3). Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Werte sind die jeweils gemessenen Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung aufgelistet.

Substrat	k [min^{-1}] bei [K^+_{in}(mM)/K^+_{ex}(mM)]			
intern / extern	[1/1]	[1/100]	[100/100]	[100/1]
P_i^- / P_i^-	0.72	0.78	0.71	0.80
P_i^- / ----	0.29	0.23	0.29	0.25

4.3.3 Einfluß des pH-Wertes auf den Phosphattransport

Die aktuell verfügbaren Konzentrationen beider Substrate des Phosphatcarriers werden direkt durch den eingestellten pH-Wert bestimmt. Ist dieser Einfluß insbesondere für das cotransportierte Ion (H^+ bzw. OH^-) offensichtlich, so muß man in Hinsicht auf das eigentliche Substrat (P_i) des Carriers bedenken, daß anorganisches Phosphat (je nach eingestelltem pH-Wert) in vier verschiedenen Formen (H_3PO_4, $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} und PO_4^{3-}) vorliegen kann. In Analogie zur bekannten Spezifität anderer Carrierproteine, wie beispielsweise dem mitochondrialen Citratcarrier (Bisaccia et al. 1993), ist jedoch davon auszugehen, daß von diesen vier Formen nur eine bestimmte Spezies vom Phosphatcarrier als Substrat akzeptiert wird. Weiterhin müssen selbstverständlich bei Änderung des pH-Wertes des Mediums zusätzlich alle direkten Wirkungen des eingestellten pH-Wertes auf das Carrierprotein berücksichtigt werden.

Einen Überblick über die pH-Abhängigkeit des Phosphatcarriers in beiden physiologischen Transportfunktionen zeigt die Abbildung 4.3.3. Die Transportaktivität der P_i/P_i-Antiportfunktion erreicht maximale Werte in einem relativ breiten Optimum zwischen pH 5.8 und pH 6.6. Zu tieferen und höheren pH-Werten zeigt sich ein nahezu symmetrischer Abfall der (apparenten) Transportraten. Die Aktivität des unidirektionalen Phosphattransports steigt hingegen zwischen pH 5.5 und pH 6.65 stetig an und zeigt zwischen pH 6.65 bis pH 6.75 ein scharfes pH-Optimum. Bei weiterer Alkalisierung des Mediums verringern sich jedoch auch die Raten des unidirektionalen Transports wieder, wobei der Abfall der Aktivität des unidirektionalen Phosphattransports interessanterweise mit dem Abfall der P_i/P_i-Antiportaktivität nahezu übereinstimmt. Diese Beobachtungen entsprechen grundsätzlich den bisher publizierten Untersuchungen des Phosphatcarriers in intakten Mitochondrien (Kadenbach et al. 1978). Weiterhin sind vergleichbare Studien der pH-Abhängigkeit des Phosphatcarriers aus Rinderherzen sowie aus *Saccharomyces cerevisiae* in Liposomen bekannt (Wohlrab & Flowers 1982, Wohlrab et al. 1984, Guérin et al. 1990). Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit unseren Befunden. In Übereinstimmung mit Studien in intakten Mitochondrien (Freitag et al. 1978) verschob sich das pH-Optimum der P_i/P_i-Antiportfunktion zu alkalischeren pH-Werten in Gegenwart sättigender [100 mM internes/20 mM externes Phosphat] Phosphatkonzentrationen (Ergebnis nicht gezeigt). Festzuhalten bleibt jedoch, daß das aufgezeigte breite pH-Optimum der P_i/P_i-Antiportfunktion auf eine Insensitivität der katalytischen Aktivität des Carriers in diesem pH-Bereich hindeutet. Aus diesem Grund wurde dieser Bereich für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt.

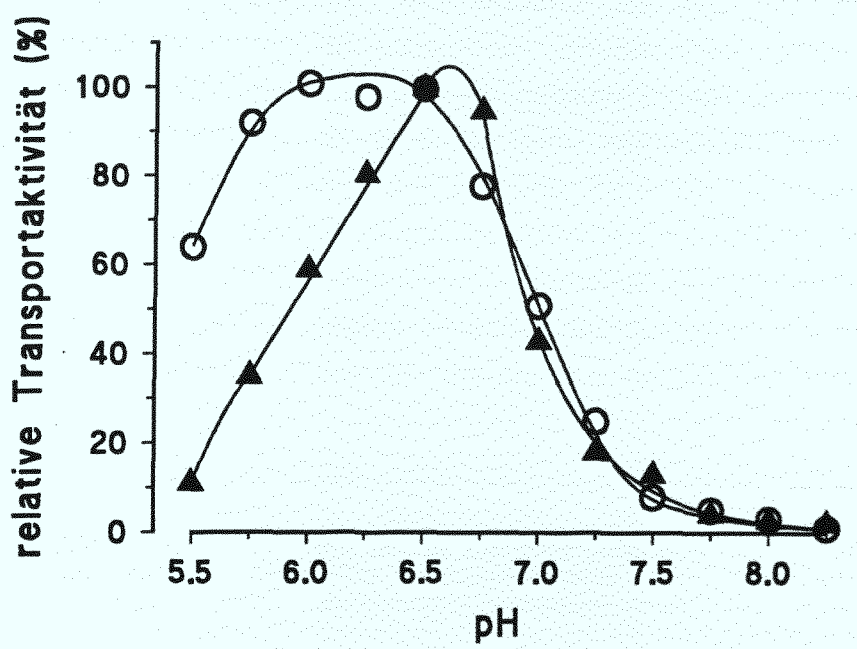


Abb. 4.3.3: **pH-Abhängigkeit des P_i/P_i-Austauschs und des unidirektionalen Phosphattransports.** Die Transportraten wurden jeweils bei den eingezeichneten pH-Werten gemessen. Zur Gewährleistung der Abwesenheit eines Membranpotentials bzw. eines Protonengradienten wurden den Proteoliposomen Valinomycin (500 ng/mg Phospholipid) und Nigericin (200 ng/mg Phospholipid) zugesetzt. Alle Raten sind als relative Transportaktivitäten angegeben, wobei der jeweils bei pH 6.5 gemessene Wert (willkürlich) zu 100% gesetzt wurde. Die pH-Abhängigkeit der P_i/P_i-Antiportfunktion wird durch die offenen Kreise symbolisiert, gefüllte Dreiecke symbolisieren die pH-Abhängigkeit des unidirektionalen Phosphattransports. Die interne Phosphatkonzentration lag in allen Experimenten bei 30 mM. Messungen des P_i/P_i-Austauschs wurden durch Zugabe von 5 mM DTE und 5 mM Phosphat (extern) gestartet. Der unidirektionale Phosphattransport wurde durch die Zugabe von 5 mM DTE gestartet.

4.3.4 Einfluß eines Protonengradienten auf den Phosphattransport

Die allgemein akzeptierte Vorstellung beschreibt den elektroneutralen, unidirektionalen Phosphattransport als $H_2PO_4^-/H^+$-Symport bzw. als $H_2PO_4^-/OH^-$-Antiport (Coty & Pedersen 1974, Ligeti et al. 1985). Gleichwohl wurden bisher experimentelle Befunde erhalten die mit dieser Ansicht nicht übereinstimmen. Mit Hilfe von Mono-und Difluorophosphaten konnten beispielsweise Freitag und Kadenbach (1978) Hinweise auf einen möglichen Transport von HPO_4^{2-} aufzeigen. Schon vorher hatten McGivan und Klingenberg (1971) ein H^+/P_i-Verhältnis von 1.5:1 (bei pH 7) publiziert. Sehr niedrige Verhältnisse von unter 0.5:1 ergaben hingegen neuere Untersuchungen von Greenbaum und Wilson (1985). Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß alle bisherigen Studien

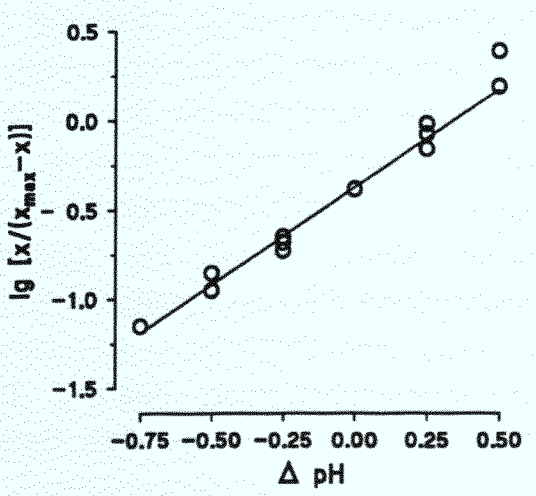
ausnahmslos in intakten Mitochondrien durchgeführt wurden. Die Optimierung des rekonstituierten Systems erlaubte die Bestimmung des $H^+:P_i^-$-($OH^-:P_i^-$)-Verhältnisses unter Verwendung definierter pH-Werte auf beiden Seiten der Liposomenmembran. Hierzu wurden die Transportraten des Phosphatefflux aus vorbeladenen Proteoliposomen unter Variation des internen/externen pH-Wertes im Bereich zwischen pH 5.85 und pH 6.6 untersucht. In der nachfolgenden Tabelle (s. Tab. 4.3.3) sind sowohl die apparenten Aktivitäten (v') als auch die berechneten (korrigierten) Maximalgeschwindigkeiten (V'_{max}) für alle möglichen Kombinationen der untersuchten Ansätze aufgelistet (vgl. Abschnitt 2.3.4 zur Umrechnung der apparenten Aktivitäten). Es soll an dieser Stelle darauf hinge-

Tabelle 4.3.3. **Einfluß eines Protonengradientens auf den unidirektionalen Phosphattransport.** Proteoliposomenfraktionen mit unterschiedlichen pH-Werten wurden durch Gabe von [^{32}P]Phosphat vormarkiert. Nach reversibler Inhibition des Carriers durch Zugabe von 5 μM *p*CMBS wurde anschließend mittels Sephadex G-75 Passage (in Gegenwart von 100 mM HEPES) das externe Phosphat abgetrennt und gleichzeitig der externe pH-Wert neu eingestellt (vgl. Abschnitt 2.4.2). Alle Proteoliposomen enthielten 30 mM internes Phosphat sowie 100 mM HEPES. Der Phosphatefflux wurde danach durch Zugabe von 5 mM DTE gestartet. Die gemessenen, apparenten Anfangsgeschwindigkeiten (v') [μM/min] sowie die berechneten Maximalgeschwindigkeiten (V'_{max}) [μM/min] (vgl. Abschnitt 2.3.4) sind aufgelistet. Mit Hilfe der Transportraten die bei gleichen internen und externen pH-Werten gemessen wurden (unterstrichene Werte) konnte ein vorläufiger Wert zur Berechnung der Affinität des Carriers gegenüber Protonen (bzw. Hydroxylionen) berechnet werden (s. Text). Der entsprechende pK_s-Wert ist: 6.45.

		interner pH			
externer pH		5.85	6.10	6.35	6.60
5.85					
	v'	<u>13.1</u>	10.9	10.2	8.4
	V'_{max}	96.3	51.0	34.0	21.2
6.10					
	v	21.8	<u>20.2</u>	17.6	15.2
	V'_{max}	162.0	94.5	59.6	21.8
6.35					
	v	32.8	32.1	<u>29.6</u>	21.8
	V'_{max}	240.8	147.9	98.8	55.4
6.60					
	v	45.1	44.0	41.5	<u>36.3</u>
	V'_{max}	330.0	206.1	138.0	92.3

wiesen werden, daß für die Umrechnung der Werte dieses Experimentes die Affinität des Carriers gegenüber Protonen (bzw. Hydroxylionen) verwendet wurde, die sich aus den Transportmessungen in Abwesenheit eines Protonengradienten ergab (unterstrichene Werte in Tabelle 4.3.3; der berechnete pK_S-Wert liegt bei 6.45). Als Folge der Umrechnung der apparenten Raten auf Maximalgeschwindigkeiten wurde gewährleistet, daß das Hill-Diagramm (s. Abb. 4.3.4) einzig den Einfluß des cotransportierten Protons (bzw. Hydroxylions) zeigt. Die Steigung der resultierenden Geraden (m = 1.09) zeigt an, daß während der Translokation eines Phosphatmoleküls nur ein Proton (bzw. Hydroxylion) cotransportiert wird. Dieser Befund bestätigt somit die Mehrzahl der Messungen in intakten Mitochondrien (s.o.). Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß diese Art der Auswertung eines kinetischen Experimentes grundsätzlich auf Messungen unter *steady-state* Bedingungen beschränkt ist (LaNoue & Schoolwerth 1979). Im Unterschied zum unidirektionalen Phosphattransport wird der P_i/P_i-Austausch unter identischen Bedingungen jedoch nicht beeinflußt (Ergebnis nicht gezeigt). Dieser Befund spricht für die grundsätzliche Eignung der durchgeführten Messungen. Unter Berücksichtigung der Elektroneutralität des unidirektionalen Phosphattransports (s.o.), ermöglichte das beobachtete $H^+(OH^-):P_i$-Verhältnis von 1:1 weiterhin die Festlegung auf $H_2PO_4^-$ als transportiertes Substrat des mitochondrialen Phosphatcarriers.

Abb. 4.3.4: **Bestimmung des Phosphat:Proton-(Phosphat:Hydroxylion)-Verhältnisses.**



Basierend auf den berechneten Maximalgeschwindigkeiten (V^*_{max}; s. Tabelle 4.3.3) konnte eine Bestimmung des $P_i:H^+$-($P_i:OH^-$)-Verhältnisses mittels eines Hill-Diagramms durchgeführt werden. Der verwendete Faktor x wird durch folgende Gleichung definiert: $x = V^\circ_{max}/V^*_{max}$. In dieser Gleichung bedeuten: V°_{max}: entsprechende Maximalgeschwindigkeit die bei einem identischen internen/externen pH-Wert gemessen wurde (s. Tabelle 4.3.3). V^*_{max}: Maximalgeschwindigkeiten die bei gleichen internen pH (bezüglich der Bestimmung von V°_{max}) aber unterschiedlichen externen pH-Wert gemessen wurde. Hinsichtlich der Festlegung des Wertes für x_{max} wurde der Quotient ausgewählt der in Gegenwart einer maximalen pH-Differenz von 0.75 ($pH\ 6.6_{(extern)}$ - $pH\ 5.85_{(intern)}$) gemessen wurde. Die Steigung der resultierenden Geraden beträgt: m = 1.09

4.4 Kinetische Bisubstratanalysen

4.4.1 Kinetische Bisubstratanalyse der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion

Die etablierte Methode zur freien Variation der Substratkonzentration in beiden Kompartimenten ermöglichte die kinetische Untersuchung des Phosphatcarriers mit Hilfe sogenannter Bisubstratanalysen. Das primäre Ziel dieser Studien war die Bestimmung des zugrunde liegenden kinetischen Transportsportmechanismus (Ping-Pong- bzw. simultaner Mechanismus). Diese Untersuchungen sind insbesondere im Zusammenhang mit der bereits diskutierten Funktionsfamilie der mitochondrialen Carrier (vgl. Abschnitt 1.4) von großer Bedeutung.

Die Abhängigkeit der apparenten Transportgeschwindigkeiten bei variierenden externen und internen Substratkonzentrationen wird durch die folgende Gleichung beschrieben (Cleland 1970, Segel 1975):

$$v = (V_{max} \cdot I \cdot E) / (K_{iI} \cdot K_{mE} + K_{mI} \cdot E + K_{mE} \cdot I + I \cdot E)$$

(mit: V_{max}, maximale Transportgeschwindigkeit; I/E, Konzentrationen des externen/internen Substrates; K_{mE}/K_{mI}, Michaelis-Menten-Konstante des externen/internen Substrates; K_{iE}/K_{iI}, Dissoziationskonstante des binären [Carrier•Substrat]-Komplexes nach Bindung des externen/internen Substrates.)

In reziproker Form schreibt sich die obere Gleichung als:

$$1/v = 1/V_{max} + K_{mI}/(V_{max} \cdot I) + K_{mE}/(V_{max} \cdot E) + (K_{iI} \cdot K_{mE})/(V_{max} \cdot I \cdot E)$$

Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß der Wert für die Dissoziationskonstante des binären [Carrier•Substrat]-Komplex (K_{iE} bzw. K_{iI}) im Ping-Pong-Mechanismus gleich null ist, da hier der binäre Komplex bereits die katalytisch-aktive Komponente bildet.

Bei der Durchführung der Bisubstratkinetiken wurden die einzelnen Transportaktivitäten generell für einen ganzen Satz unterschiedlicher interner und externer Substratkonzentrationen bestimmt (vgl. Abb. 4.4.1). Trägt man die einzelnen Meßwerte in ein Lineweaver-Burk-Diagramm ein und verbindet anschließend die zusammengehörenden Punkte, so ermöglicht diese Auswertung (zumeist) eine deutliche Unterscheidung zwischen den beiden angesprochenen Bisubstratmechanismen (Cleland 1970, Segel 1975). Für den Ping-Pong-Mechanismus ist eine parallele Geradenschar, basierend auf einem konstanten K_m/V_{max}-Verhältnis, charakteristisch, hingegen kennzeichnet ein intersektierendes Geradenmuster, beruhend auf einem variablen K_m/V_{max}-Verhältnis, den simultanen (sequentiellen) Mechanismus.

Die nachfolgende Abbildung 4.4.1 zeigt die Bisubstratanalyse der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion für den Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien. In dem gezeigten Experiment wurde die Abhängigkeit der Transportaktivität bei fünf verschiedenen internen Phosphatkonzentrationen (3.5, 7, 12, 20 und 35 mM) und sechs unterschiedlichen externen Phosphatkonzentrationen (0.33, 0.66, 1.0, 2.0, 4.0 und 12.0 mM) untersucht. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß die einzelnen Transportaktivitäten durch eine genaue Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Phosphataufnahme (die Meßpunkte lagen für jeden Ansatz bei 0, 10, 20 und 45 Sekunden) ermittelt wurden. Die resultierenden Geraden zeigen in beiden (Teil-)Figuren (4.4.1/A & 4.4.1/B) eindeutig einen gemeinsamen Schnittpunkt in der Nähe der Abszisse. Dieses Resultat impliziert die Gültigkeit des simultanen (sequentiellen) Mechanismus für den carriervermittelten P_i^-/P_i^--Antiport. Charakteristisch für diesen Mechanismus ist die Bildung eines (katalytisch-aktiven) ternären Komplexes, bestehend aus dem Carrierprotein und zwei Substratmolekülen. Die gezeigten Diagramme lassen zudem erkennen, daß die K_m-Werte der beiden Substrate durch steigende Konzentrationen des Substrates auf der anderen Membranseite (dem sogenannten *counter*-Substrat) nicht, bzw. nur unwesentlich, beeinflußt werden. Dieser Befund weist auf eine unabhängig voneinander stattfindende Bindung der beiden Substrate hin. Diese Beobachtung wurde nachfolgend mit Hilfe der Sekundäranalysen (s. Abb. 4.4.1/C & 4.4.1/D) weiter untersucht wurde. Nach Einzeichnung der Steigungen und Ordinatenschnittpunkte der jeweiligen Geraden aus den (primären) Lineweaver-Burk-Diagrammen zeigen die entsprechenden Werte in beiden Sekundärauftragungen eine lineare Korrelation auf. Dieser Umstand ermöglichte die genaue Bestimmung der Substrataffinitäten sowie der maximalen Transportraten bei Anwesenheit einer unendlichen Konzentration des Gegensubstrates (Cleland 1970). Die entsprechenden K_m-Werte liegen zwischen 1.75 - 1.77 mM für externes Phosphat bzw. zwischen 8.37 - 8.46 mM für internes Phosphat. Die Werte korrelieren somit sehr gut mit den bei endlicher Konzentration des Gegenions bestimmten Werten (1.8 mM (intern), bzw. 9.4 mM (extern); vgl. Abb. 4.3.2). Mit Hilfe der Sekundärauftragung kann außerdem die Dissoziationskonstante für das binäre [Phosphat•Carrier]-Edukt bestimmt werden. Die einzelnen Werte sind: internes Phosphat, 1.89 mM (Abb. 4.4.1/C); externes Phosphat, 8.65 mM (4.4.1/D). Der sowohl auf der Membraninnenseite als auch auf der Membranaußenseite beobachtete konstante K_i/K_m-Quotient von 0.94 deutet auf einen Sonderfall des simultanen (sequentiellen) Mechanismus, den sogenannten *rapid-equilibration random* Mechanismus hin. Diese Aussage wird durch die Gültigkeit der Gleichung $K_i(P_i^-int)\cdot K_m(P_i^-ext) = K_i(P_i^-ext)\cdot K_m(P_i^-int)$ zusätzlich bestätigt.

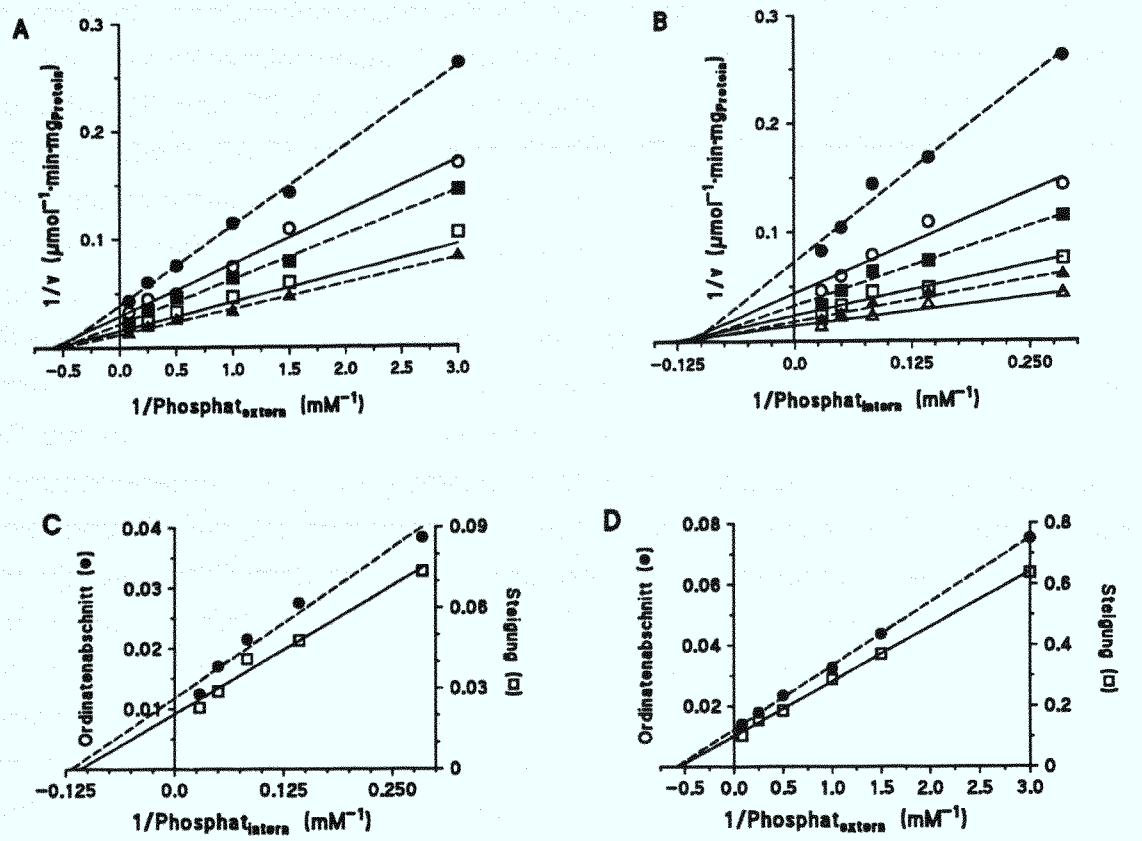


Abb. 4.4.1: **Bestimmung des Bisubstratmechanismus für den P_i^-/P_i^--Antiport.**
Bisubstratanalysen (unter Anwendung der Vortauschtechnik) wurden bei fünf verschiedenen internen Phosphatkonzentrationen {Abb. 4.4.1/A: 3.5 mM (●), 7 mM (o), 12 mM (■), 20 mM (□) und 35 mM (▲)} und sechs verschiedenen externen Phosphatkonzentrationen {Abb. 4.4.1/B: 0.33 mM (●), 0.66 mM (o) 1.0 mM (■), 2.0 mM (□) 4.0 mM (▲) und 12 mM (△)} unter isoosmotischen und deenergetisierten Bedingungen durchgeführt. Beide Lineweaver-Burk-Diagramme (4.4.1/A & 4.4.1/B) dokumentieren, daß sowohl beim Auftrag gegen die externe Phosphatkonzentration (A) als auch beim Auftrag gegen die interne Phosphatkonzentration (B) ein intersektierendes Geradenmuster erhalten wird. Dieses Ergebnis deutet somit auf einen simultanen (sequentiellen) Mechanismus, als Grundmechanismus der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion hin (s. Text). Basierend auf den berechneten Ordinatenabschnitten (●) und Steigungen (□) der jeweiligen Geraden aus den Teilfiguren 4.4.1/A & 4.4.1/B konnten die, auf unendliche Konzentration des *counter*-Substrates extrapolierten, K_m- und K_i-Werte mittels Sekundärauftragung (Teilfiguren 4.4.1/C & 4.4.1/D) bestimmt werden. Die bestimmten Werte sind: K_m (externes Phosphat): 1.75 mM (4.4.1/C) bzw. 1.77 mM (4.4.1/D); K_m (internes Phosphat): 8.37 mM (4.4.1/C) bzw. 8.48 mM (4.4.1/D); K_i (externes Phosphat) 1.89 mM (4.4.1/C) und K_i (internes Phosphat) 8.65 mM (4.4.1/D). Folgende maximale Transportaktivitäten (V_{max}) wurden berechnet: 85.4 µmol/min• $mg_{Protein}$ (4.4.1/C) bzw. 83.6 µmol/min• $mg_{Protein}$.

Als Resümee des gezeigten Experimentes ergibt sich somit, daß der P_i^-/P_i^--Austausch nur nach simultaner Bindung beider Substrate an den Carrier stattfindet, wobei die einzelnen Bindungsprozesse für beide Substrate sehr schnell und zudem vollkommen unabhängig voneinander ablaufen.

4.4.2 Kinetische Bisubstratanalyse des elektroneutralen, unidirektionalen Phosphattransports

In Analogie zur beschriebenen Bisubstratanalyse der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion wurden Untersuchungen zur Bestimmung des Reaktionsmechanismus der P_i^-/OH^--Antiportfunktion (P_i/H^+-Symportfunktion) durchgeführt. Bei diesen Studien wurde das Hydroxylion (bzw. das Proton) als "echtes" Substrat des Carriers betrachtet. Die vorgestellten Lineweaver-Burk-Diagramme (Abb. 4.4.2/A & 4.4.2/B) leiten sich von einem Experiment ab, bei dem die Aktivität des unidirektionalen Phosphattransports bei vier unterschiedlichen pH-Werten (pH 5.85, pH 6.1, pH 6.35 und pH 6.6) und drei verschiedenen internen Phosphatkonzentrationen (4, 10 und 25 mM) untersucht wurde. Den eingestellten pH-Werten entsprechend, lauten die eingesetzten Konzentrationen an Hydroxylionen: 7.2 nM, 12.6 nM, 25.1 nM und 39.8 nM. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß identische Diagramme selbstverständlich auch bei der Verwendung der aktuellen Protonenkonzentration erhalten werden. Die Analyse der kinetischen Daten mittels der beiden Lineweaver-Burk-Diagramme zeigt erneut ein intersektierendes Geradenmuster mit einem gemeinsamen Schnittpunkt aller Geraden in der Nähe der Abszisse. Folgerichtig bildet der Phosphatcarrier auch beim unidirektionalen Phosphattransport, in Analogie zum Mechanismus der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion (vgl. Abb. 4.4.1/A-D), einen ternären Komplex als katalytisch-aktive Komponente aus. Die K_m- und K_i-Werte wurden mit Hilfe der Sekundärauftragungen der einzelnen Steigungen und Ordinatenabschnitte (s. Abb. 4.4.2/C & 4.4.2/D) berechnet. Die gemittelten K_m-Werte sind: 11.14 mM für internes Phosphat und 32.25 nM für externe Hydroxylionen (letztgenannter Wert entspricht einem pK_S-Wert von 6.51 bzw. 310 nM H^+). Der ermittelte K_m-Wert für internes Phosphat in Gegenwart einer unendlich großen (sättigenden) Konzentration des Gegensubstrates (OH^- bzw. H^+) entspricht somit exakt der Substrataffinität, die bei einer nichtsättigenden Konzentration an Hydroxylionen bestimmt wurde (vgl. Abb. 4.3.2/C). Die Dissoziationskonstanten der binären [Carrier•Substrat]-Komplexe wurden ebenfalls berechnet. Der K_i-Wert für internes Phosphat liegt bei 11.12 mM (Abb. 4.4.2/C), der K_i-Wert für externe OH^--Ionen wurde zu 32.84 nM (entsprechend einem pK_S-Wert von 6.52 bzw. 300 nM H^+) bestimmt (Abb. 4.4.2/D). In Übereinstimmung mit den Untersuchungen zum Mechanismus des P_i^-/P_i^--Austauschs (vgl. Abschnitt 4.4.1), sind die K_i- und K_m-Werte wiederum nahezu identisch. Zudem gilt ebenfalls, daß das Produkt aus $K_i(P_i^-{}_{int})•K_m(OH^-{}_{ext})$ dem Produkt aus $K_i(OH^-{}_{ext})•K_m(P_i^-{}_{int})$ entspricht.

Den beschriebenen Experimenten zur Folge gilt somit der rapid-equilibration random Mechanismus für beide physiologischen Transportfunktionen {P_i^-/P_i^--Antiport & P_i^-/OH^--Antiport (P_i^-/H^+-Symport)} des mitochondrialen Phosphatcarriers.

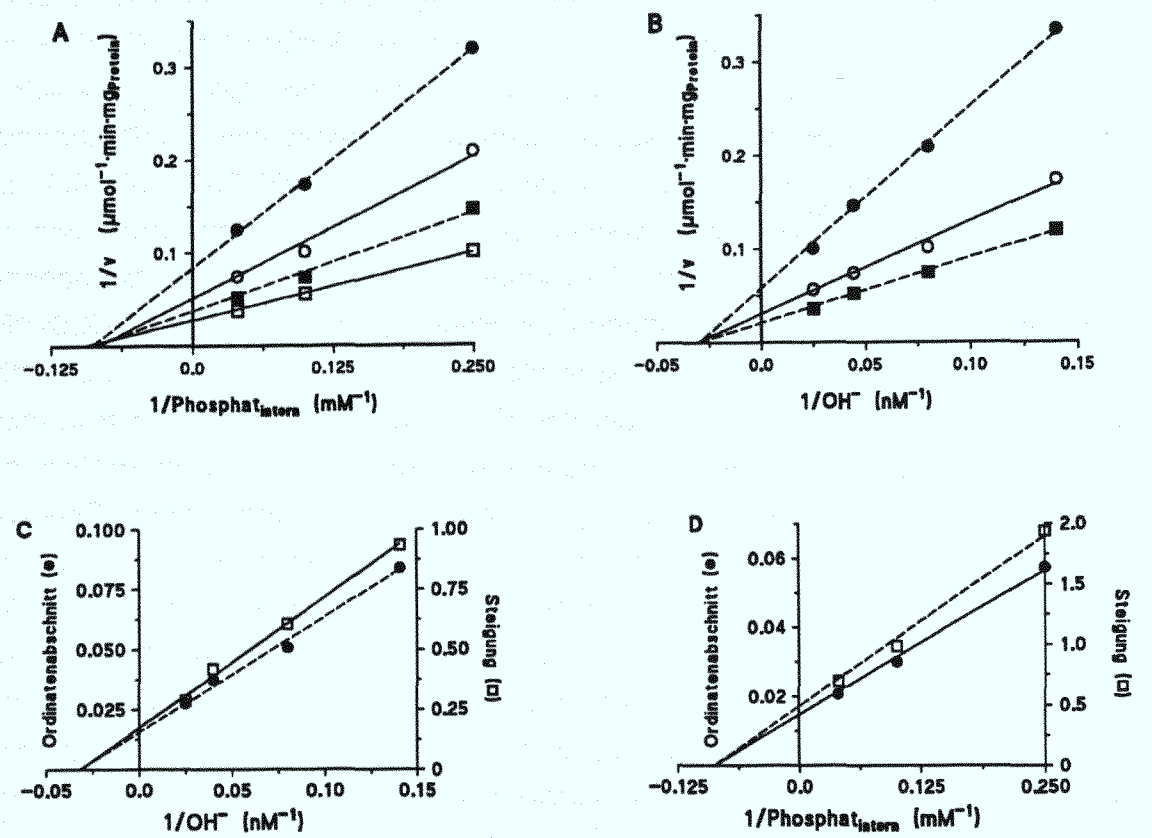


Abb. 4.4.2: **Bestimmung des Bisubstratmechanismus für den unidirektionalen Phosphattransport.** Die Teilfiguren 4.4.2/A und 4.4.2/B zeigen Lineweaver-Burk-Diagramme welche die Abhängigkeit der Transportaktivität (gemessen als Efflux von internem ^{32}P-Phosphat unter isoosmotischen und deenergetisierten Bedingungen) bei vier verschiedenen pH-Werten {Abb. 4.4.2/A: pH 5.85 (●), pH 6.1 (o), pH 6.35 (■) und pH 6.6 (□)} und drei verschiedenen internen Phosphatkonzentrationen (Abb. 4.4.2/B: 4.0 mM (●), 10.0 mM (o) und 25.0 mM (■)} beschreiben. Die eingestellten pH-Werte entsprechen den folgenden Konzentrationen an OH^--Ionen: 7.1 12.6, 25.1 und 39.8 nM (s. Abb. 4.4.2/B & 4.4.2/C). Beide (primären) Lineweaver-Burk-Diagramme (4.4.2/A & 4.4.2/B) zeigen eindeutig, daß sowohl beim Auftrag gegen die gegen die interne Phosphatkonzentration (4.4.2/A) als auch beim Auftrag gegen die externe Konzentration an OH^--Ionen (4.4.2/B) ein Geradenmuster erhalten wird, das charakteristisch für den simultanen (sequentiellen) Mechanismus ist. Basierend auf den berechneten Ordinatenabschnitten (●) und Steigungen (□) der jeweiligen Geraden aus den Teilfiguren 4.4.2/A & 4.4.2/B konnten mit Hilfe der Sekundärauftragungen (Teilfiguren 4.4.2/C und 4.4.2/D) die K_m- und K_i-Werte bestimmt werden die auf eine unendliche Konzentration des *counter*-Substrates extrapoliert sind (s. Text). Die bestimmten Werte sind: K_m (externe OH^--Ionen): 31.75 nM (4.4.2/C) bzw. 32.73 nM (4.4.2/D); K_m (internes Phosphat): 11.06 mM (4.4.2/C) bzw. 11.22 mM (4.4.2/D); K_i (externe OH^--Ionen) 32.84 nM (4.4.2/D) und K_i (internes Phosphat) 11.12 mM (4.4.2/C). Der K_m-Wert für die externen OH^--Ionen entspricht einem pK_s-Wert von 6.51 (oder 310 nM H^+), der dazugehörige K_i-Wert entspricht einem pK_s-Wert von 6.52 (oder 300 nM H^+). Die auf unendliche Konzentration des internen/externen Substrates extrapolierten Maximalgeschwindigkeiten betragen: 65.3 µmol/min·mg$_{Protein}$ (4.4.2/C) bzw. 66.8 µmol/min·mg$_{Protein}$ (4.4.2/D).

4.5 Die $HgCl_2$-induzierte, unphysiologische Effluxfunktion des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien

Im Abschnitt 1.5 wurde bereits die (publizierte) grundlegende Veränderung des Transportmechanismus dreier mitochondrialer Carrier nach Modifikation durch quecksilberhaltige Reagenzien beschrieben. Im Rahmen der Experimente zur Ermittlung eines reversiblen Stoppinhibitors des Phosphatcarriers (vgl. Tabelle 4.2.1.) zeigte sich, daß die Inkubation der Proteoliposomen mit $HgCl_2$ in Konzentrationen $\geq$ 100 μM einen schnellen Ausfluß des internen Substrates bewirkte. Dieser Effekt wurde in weiteren Studien ausführlich untersucht (s. Tabelle 4.5.1). In Hinsicht auf eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse wurde die Wirkung der zugesetzten Reagenzien auf Proteoliposomen sowie auf proteinfreie Liposomen überprüft. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß das zuerst zugesetzte Reagenz (s. Tabelle 4.5.1) ausschließlich zur Inhibition des Phosphatcarriers während der Gelfiltration diente (vgl. Abschnitt 4.2). Wie die Tabelle 4.5.1 eindeutig belegt, besitzt im Falle des Phosphatcarriers lediglich $HgCl_2$ die Fähigkeit zur Induktion eines schnellen Substratefflux aus Proteoliposomen. Die hohen Geschwindigkeitskonstanten die Gegenwart von 4 mM $HgCl_2$ oder 3 mM Mersalylsäure gemessen wurden, sind offensichtlich auf eine Schädigung der liposomalen Membran zurückzuführen (s. Tabelle 4.5.1). Sie wurden aus diesem Grund nicht weiter berücksichtigt. Bemerkenswert ist der Befund, daß der beobachtete Phosphatefflux nach Zugabe von $HgCl_2$ unabhängig von dem zuerst zugegebenen Inhibitor ist. Dieses Ergebnis wurde für den Fall der Zugabe von 1 mM $HgCl_2$ als zweites Reagenz (nach Vorinkubation des Carriers mit 5 μM *p*CMBS, 50 μM DTNB oder 1 mM NEM) explizit untersucht. Nur bei diesem Experiment wurden in allen Ansätzen identische Proteoliposomen verwendet, was für die Vergleichbarkeit der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten von essentieller Bedeutung ist (vgl. Abschnitt 2.3.1.2, bzw. s. Dierks & Krämer 1988).

Interessanterweise wurde der Phosphatefflux durch Zugabe von histidin- und lysinspezifischen Reagenzien, deren inhibitorische Wirkungen auf die physiologischen Transportfunktionen des Carriers dokumentiert sind [z.B. Diethylpyrocarbonat (Kaplan et al. 1986), Phenylisothiocyanat (Genchi et al. 1988) oder PLP (s. Abb. 4.3.1)], nicht inaktiviert. Ohne somit direkte Aussagen über den PIC zu ermöglichen, beweist dieser Befund jedoch eindeutig, daß der untersuche Transport nicht durch den gemeinsam aufgereinigten ADP/ATP-Carrier (vgl. Anmerkungen im Abschnitt 4.3) vermittelt wird. Zwei Argumente sprechen für diese Ansicht: (i) Im Vergleich zu den publizierten Aktivitäten der Effluxfunktion

des ADP/ATP-Carriers (Dierks et al. 1990*a*) liegen die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten weitaus höher (s. Tabelle 4.5.1). (ii) Die Effluxfunktion des ADP/ATP-Carriers wird nach Inkubation mit 20 PLP vollständig inhibiert (Dierks et al. 1990*a*). Die gefundene Insensitivität des Phosphatefflux gegen PLP spricht deutlich gegen eine mögliche Beteiligung des ADP/ATP-Carriers.

Tabelle 4.5.1. **Induktion einer unphysiologischen Effluxfunktion nach Inkubation des Carriers mit $HgCl_2$.**
Proteoliposomen mit inkorporiertem Phosphatcarrier wurden mit [^{32}P]Phosphat vorbeladenen, bzw. im Falle der carrierfreien Liposomen wurde [^{32}P]Phosphat direkt bei der Rekonstitution mit inkorporiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der (Proteo-)Liposomen mit den angegebenen cysteinspezifischen Reagenzien der 1. Spalte sowie eine anschließende Passage über Sephadex G-75 Säulen zur Abtrennung der nicht inkorporierten Radioaktivität (vgl. Abschnitte 2.3.1.2 & 4.2). Nach Zugabe der in der 2. Spalte aufgeführten Reagenzien wurde anschließend der Ausfluß der internen Markierung unter Anwendung der Rücktauschrechnik bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.2). Apparente Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (*k*) wurden für alle Ansätzen ermittelt.

erstes Reagenz	zweites Ragenz	k [min^{-1}] Proteoliposomen/Liposomen
5 µM *p*CMBS	5 .0 mM DTE	0.55 / 0.01
5 µM *p*CMBS	0.1 mM *p*CMBS	0.01 / n.b.
5 µM *p*CMBS	1.0 mM *p*CMBS	0.01 / 0.01
5 µM *p*CMBS	2.5 mM *p*CMBS	0.01 / 0.01
5 µM *p*CMBS	0.1 mM Mersalylsäure	0.01 / n.b.
5 µM *p*CMBS	0.5 mM Mersalylsäure	0.08 / 0.06
5 µM *p*CMBS	3.0 mM Mersalylsäure	1.20 / 0.89
5 µM *p*CMBS	0.1 mM $HgCl_2$	0.28 / 0.01
5 µM *p*CMBS	0.25 mM $HgCl_2$	0.46 / 0.01
5 µM *p*CMBS	0.5 mM $HgCl_2$	0.65 / 0.02
5 µM *p*CMBS	1.0 mM $HgCl_2$	2.25 / 0.07
5 µM *p*CMBS	1.0 mM $HgCl_2$/ 10.0 mM EDTA	0.16 / n.b.
5 µM *p*CMBS	1.25 mM $HgCl_2$	2.42 / 0.06
5 µM *p*CMBS	4.0 mM $HgCl_2$	6.90 / 2.95
5 µM *p*CMBS	1.0 mM DTNB	0.01 / n.b.
50 µM DTNB	1.0 mM $HgCl_2$	2.10 / 0.07
1 mM NEM	10.0 mM NEM	0.01 / 0.01
1 mM NEM	0.5 mM Mersalylsäure	0.06 / 0.04
1 mM NEM	0.1 mM $HgCl_2$	0.45 / 0.02
1 mM NEM	1.0 mM $HgCl_2$	1.95 / 0.05

Weiterhin wurde der $HgCl_2$-induzierte Phosphatefflux durch eine Inkubation der Proteoliposomen mit hohen Konzentrationen (≥ 150 µM) des zyklischen Polypeptids Cyclosporin A ebenfalls nicht inaktiviert. Da bekannt ist, daß dieses polyanionische Reagenz bereits in einer Konzentration von ≤ 10 nM das mitochondriale Porin vollständig inhibiert (Fournier 1987, Crompton 1988) ist folglich auch die Beteiligung dieses mitochondrialen Transportproteins an der beobachteten Effluxfunktion ausgeschlossen. Der Befund, wonach die Effluxinduktion zudem völlig reversibel ist, spricht ferner gegen die Möglichkeit einer unspezifischen Denaturierung des Phosphatcarriers durch das eingesetzte $HgCl_2$ (vgl. Abb. 4.5.1). Die Abbildung 4.5.1 zeigt, daß ein Zusatz von DTE zur sofortigen Beendigung der $HgCl_2$-induzierten Effluxfunktion führt. Erwartungsgemäß wird der Carrier in einen inaktiven Zustand überführt. Dieser Umstand beruht auf der Irreversibilität der vorausgegangen Modifikation des Phosphatcarriers durch NEM.

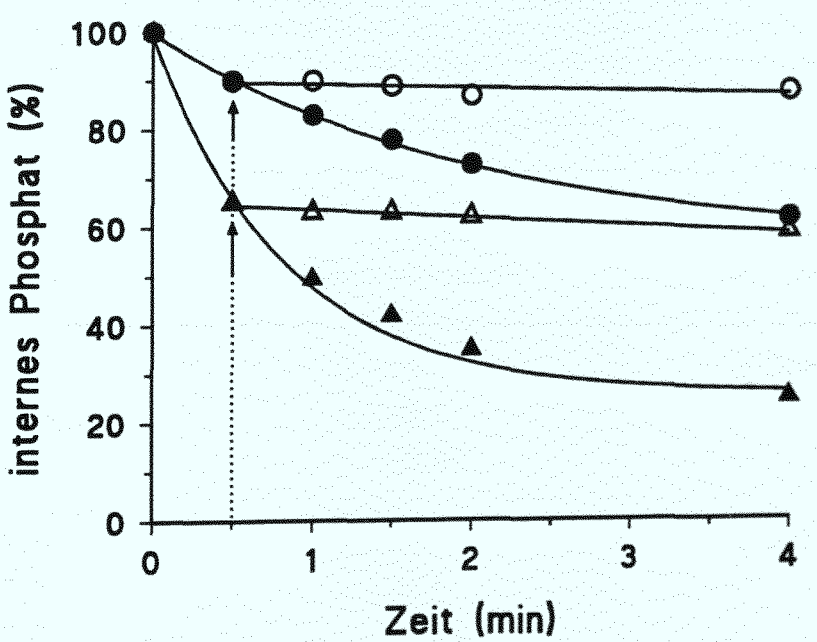


Abb. 4.5.1: **Sofortiger Stopp des $HgCl_2$-induzierten Phosphatefflux nach Zugabe von 5 mM DTE.** Der interne Substratpool der Proteoliposomen (30 mM Phosphat/ pH 6.5) wurde durch Äquilibrierung nach Gabe von [^{32}P]Phosphat markiert. Vor der Sephadex G-75 Passage wurde der Carrier durch Gabe von 1 mM NEM inaktiviert. Nach der Gelfiltration zur Abtrennung des externen Phosphats wurde der Phosphatefflux nach Zugabe von 0.5 mM $HgCl_2$ (•) bzw. nach Zugabe von 1.25 mM $HgCl_2$ (▲) bestimmt. Zugleich wurden die Proteoliposomen in Vergleichsansätzen 0.5 Minuten nach der Effluxinduktion zusätzlich mit 5 mM DTE (o,△) inkubiert (s. Pfeile). Folgende Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (k) wurden berechnet: 0.02 (o) [min^{-1}], 0.46 (•) [min^{-1}], 0.04 (△) [min^{-1}] und 1.3 (▲) [min^{-1}].

Ein weiteres Ergebnis, daß gegen die Annahme eines unspezifischen *leaks* (als Grundlage des beobachteten Transportphänonens) in der liposomalen Membran spricht, zeigt sich in der deutlichen Verringerung der Transportaktivität der Effluxfunktion in Gegenwart von externem Phosphat (vgl. Tabelle 4.5.2). Nach Zugabe von 1 mM Phosphat wurde eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten um mehr als 30 %, nach Zugabe von 25 mM Phosphat sogar um 50 %, detektiert. Interessanterweise tritt dieser Effekt nach Verwendung von $HgCl_2$ im Konzentrationsbereich ≥ 2.5 mM nicht mehr auf. Dieser Befund korreliert mit der Beobachtung unspezifischer Transporteffekte nach Einsatz von $HgCl_2$ (oder Mersalylsäure) in hohen Konzentrationen (vgl. Tabelle 4.5.1). Weiterhin spricht auch die Beobachtung, daß die Transportraten der unphysiologischen Effluxfunktion bei Alkalisierung des Mediums deutlich abnehmen gegen die Annahme eines unspezifischen *leaks* in der Membran (Ergebnis nicht gezeigt).

Tabelle 4.5.2: **Einfluß von externem Phosphat auf die Aktivität der Effluxfunktion.**
Der interne Substratpool der Proteoliposomen (30 mM Phosphat/ pH 6.5) wurde durch Äquilibrierung nach Gabe von [^{32}P]Phosphat markiert. Vor der Sephadex G-75 Passage wurde der Carrier durch Gabe von 1 mM NEM inaktiviert. Nach der Gelfiltration (zur Abtrennung des externen Phosphats) wurde der Phosphatefflux durch Zugabe von 0.25 mM $HgCl_2$ bzw. 2.5 mM $HgCl_2$ in Gegenwart der angegebenen Phosphatkonzentrationen induziert. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (k [min^{-1}]) sind aufgelistet.

Effluxinduktion durch:	externes Phosphat [mM]	k [min^{-1}]
0.25 mM $HgCl_2$	----	0.61
	1.0	0.41
	25.0	0.33
2.50 mM $HgCl_2$	----	4.20
	1.0	4.05
	25.0	3.96

Im Abschnitt 1.5 wurde auf die carrier- und porenspezifischen Eigenschaften als charakteristische Merkmale der unphysiologischen Effluxfunktion des mitochondrialen Aspartat/Glutamat-Carriers verwiesen (Dierks et al. 1990*b*). Die Tabelle 4.5.3 zeigt, daß der Phosphatcarrier in der (induzierten) Effluxfunktion außer Phosphat auch anionische Substrate wie Chlorid, Sulfat oder Oxoglutarat transportiert. Ebenfalls wurde festgestellt, daß der Efflux von Glukose nach

Zugabe von $HgCl_2$, im Vergleich zur meßbaren Geschwindigkeitskonstante der reinen Diffusion (in Abwesenheit von $HgCl_2$), mit einer dreifach höheren Aktivität katalysiert wird. Im Gegensatz zu diesen gesteigerten Werten wurde jedoch kein signifikanter Efflux von Aminosäuren (Aspartat bzw. Lysin) oder von ATP beobachtet. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß der induzierte (schnelle) Transport von kleinen Ladungsträgern die beabsichtigte Untersuchung der Effluxfunktion in Gegenwart eines artifiziellen Membranpotentials verhinderte.

Tabelle 4.5.3. **Efflux verschiedener Substrate nach Inkubation des Phosphatcarriers mit $HgCl_2$.** Unterschiedliche, radioaktivmarkierte Substanzen (jeweils 20 mM/pH 6.5) wurden direkt bei der Rekonstitution des Carriers in die Proteoliposomen inkorporiert (vgl. Abschnitt 2.3.2). In Analogie zur "konventionellen" Effluxinduktion wurde der Carrier vor der Gelfiltration durch Gabe von 1 mM NEM inaktiviert obwohl dieser Schritt bei der Verwendung unphysiologischer Substrate nicht erforderlich ist. Nach der Sephadex G-75 Passage wurde zum einem die passive Permeabilität der verschiedenen Substanzen (Zugabe des Säulenpuffers) als auch die (möglicherweise) carriervermittelte Permeabilität (Zugabe von 1 mM $HgCl_2$) überprüft. Apparente Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (*k*) wurden für alle Ansätzen ermittelt.

Inkorporiertes Substrat	Apparente Geschwindigkeitskonstanten (*k*) [min^{-1}] nach Zugabe von:	
	Puffer	1 mM HgCl
[^{32}P]Phosphat	0.010	2.250
[^{36}Cl]Chlorid	0.024	3.510
[^{35}S]Sulfat	0.015	0.720
[^{14}C]Oxoglutarat	0.020	0.250
[^{14}C]Glukose	0.160	0.490
[^{14}C]Aspartat	0.008	0.035
[^{14}C]Lysin	0.013	0.030
[^{14}C]ATP	0.018	0.023

In Übereinstimmung mit Untersuchungen am Aspartat/Glutamat-Carrier (Dierks et al. 1990*b*) ist weiterhin die Beobachtung, wonach der Phosphatcarrier in der unphysiologischen Effluxfunktion keine meßbare Substrataffinität mehr besitzt. Die Abbildung 4.5.2 zeigt ein Lineweaver-Burk-Diagramm welches die Abhängigkeit der Effluxraten bei Variation des internen Phosphats im Konzentrations-

bereich zwischen 5 mM bis 100 mM beschreibt. Der Schnittpunkt der resultierenden Geraden mit der Abszisse, der in dieser Auftragung dem Wert $-1/K_m$ entspricht, liegt nahezu im Nullpunkt. Er deutet somit auf eine unendlich geringe Substrataffinität (≥ 6 M) hin. Im Gegensatz dazu liegt der korrespondierende Wert für den physiologischen unidirektionalen Phosphattransport bei 11.2 mM (vgl. Abschnitt 4.3 & 4.4).

Als Fazit der vorgestellten Experimente bleibt festzuhalten, daß auch die unphysiologische Effluxfunktion des Phosphatcarriers durch typische Poreneigenschaften charakterisiert wird. Eine eindeutige Differenzierung zwischen dem physiologischen (unidirektionalen) Phosphattransport und der unphysiologischen Effluxfunktion ist auf der Grundlage der jeweils kennzeichnenden Eigenschaften beider Transportfunktionen möglich.

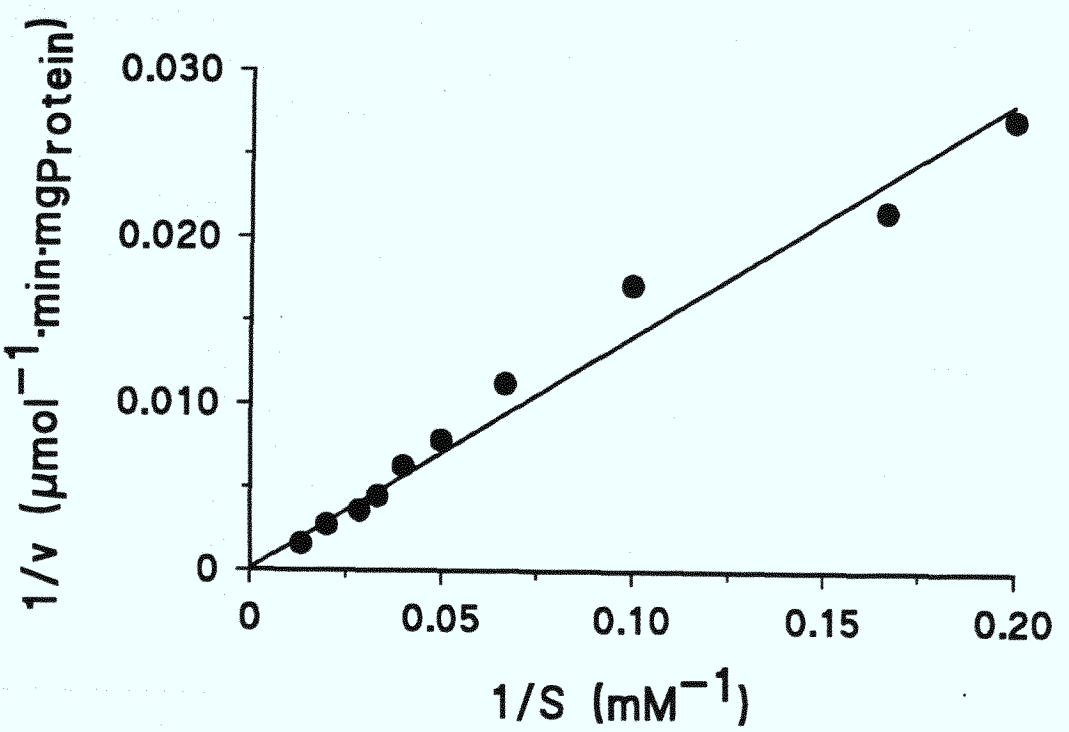


Abb. 4.5.2: **Substrat-(Transport-)Affinität des Phosphatcarriers nach Modifikation durch $HgCl_2$.** Proteoliposomen mit unterschiedlichen internen Phosphatkonzentrationen (5 mM bis 100 mM) wurden bei einem konstanten pH von 6.5 durch Äquilibrierung nach Gabe von [^{32}P]Phosphat vorbeladen. Vor der Sephadex G-75 Passage wurde der Carrier durch Gabe von 1 mM NEM inaktiviert. Nach der Gelfiltration der Liposomen unter isoosmotischen Bedingungen (zur Abtrennung des externen Phosphats) wurde der Phosphatefflux durch Zugabe von 1.0 mM $HgCl_2$ induziert. Apparente Transportraten wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 2.3.1.2 bestimmt und mit Hilfe der gemessenen Proteinkonzentration auf spezifische Transportaktivitäten umgerechnet.

4.6 Sensitivität des rekonstituierten Phosphatcarriers gegenüber Anionen

Interessanterweise stellte es sich im Verlauf der durchgeführten kinetischen Untersuchungen heraus, daß die Verwendung hoher Konzentrationen bestimmter Anionen den physiologischen Phosphattransport inhibierten. Die Tabelle 4.6.1 belegt, daß die Inkubation des Phosphatcarriers mit den stark polarisierbaren Iodidanionen die stärkste Inhibition verursachte. Die übrigen Halogenide zeigten eine deutlich geringere inhibitorische Wirkung, wobei das Ausmaß der Inhibition interessanterweise mit der Abnahme der Größe des betreffenden Anions (und damit auch der Polarisierbarkeit) korrelierte. Weiterhin wurde der Effekt verschiedener Carboxylsäuren sowie anderer (physiologisch wichtiger) Anionen auf die Transportaktivität des rekonstituierten Carriers untersucht (s. Tabelle 4.6.1). Aus der gezeigten Tabelle geht deutlich hervor, daß alle Anionen den Phosphatcarrier inhibierten.

Tabelle 4.6.1: **Der physiologische Phosphattransport wird durch Anionen inhibiert.**
Die Tabelle zeigt die jeweilige Anionenkonzentration die zu einer Inhibition des Phosphattransports um 50 % führt (I_{50}-Wert). Bei allen Untersuchungen wurde der interne Substratpool der Proteoliposomen (30 mM Phosphat/ pH 6.5) durch Äquilibrierung nach Gabe von [^{32}P]Phosphat markiert. Der Carrier wurde anschließend durch 5 μM *p*CMBS inaktiviert und die nicht inkorporierte Radioaktivität mittels Sephadex G-75 Passage abgetrennt. In allen Experimenten wurden die jeweiligen Anionen (in unterschiedlichen Konzentrationen) direkt den verwendeten Säulenpuffern zugesetzt, die zudem 50 mM HEPES (pH 6.5) und eine entsprechende Menge an Sucrose (zur Gewährleistung stabiler osmotischer Bedingungen) enthielten. Transportmessungen wurden durch Gabe von 5 mM DTE in Kombination mit 30 mM externen, unmarkierten Phosphat (P_i^-/P_i^--Antiport) oder durch Zugabe von 5 mM DTE in Abwesenheit von externem Phosphat (P_i^-/OH^--Antiport bzw. P_i^-/H^+-Symport) gestartet. Die Bestimmung der gezeigten I_{50}-Werte erfolgte generell auf der Basis von vier unterschiedlichen Konzentrationen (0.5, 5, 50 & 500 [mM]) der eingesetzten Anionen. Die unterstrichenen Werte besagen, daß die inhibitorische Wirkung dieser Anionen detailliert untersucht wurde (vgl. Abbildung 4.6.1). Bei diesen Werten handelt es sich um exakte K_I-Werte. n.b. = nicht bestimmt.

zugesetztes Anion	I_{50}-Wert [mM]	
	P_i^-/P_i^--Austausch	P_i^-/OH^--Antiport (P_i^-/H^+-Symport)
Fluorid	≥ 300	≥ 300
Chlorid	<u>91.2</u>	<u>85.4</u>
Bromid	22	26
Iodid	<u>1.1</u>	<u>0.9</u>
Acetat	105	112
Lactat	≥ 350	n.b.
Citrat	40	n.b.
Succinat	30	n.b.
Aspartat	60	n.b.
HCO_3^-	10	100
NO_3^-	n.b.	85
SO_4^{2-}	58	41
ATP^{4-}	10.5	n.b.

In Hinblick auf die Aufklärung der Art der beobachteten Inaktivierung des rekonstituierten Phosphatcarriers durch Chlorid- und Iodidanionen wurden Kompetitionsexperimente in beiden Transportfunktionen durchgeführt. Ein Experiment dieser Versuchsreihe, welches die Inaktivierung der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion durch Zugabe externer Iodidionen untersuchte, zeigt Abbildung 4.6.1. Die erhaltenen Werte wurden zuerst mit Hilfe einer Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abb. 4.6.1/A) ausgewertet. Offensichtlich wird der K_m-Wert des Carriers gegenüber externen Phosphationen nicht beeinflußt, doch nehmen die maximalen Transportraten in Gegenwart der extern vorgelegten Iodidionen, stark ab. Das erhaltene Geradenmuster ist kennzeichnend für eine nichtkompetitive Hemmung. Mit Hilfe des gezeigten Dixon-Diagramms (Dixon 1953) wurde die Inhibitionskonstante (K_I) für die reversible Inaktivierung des Carriers durch externe Iodidionen zu ca. 1.0 mM bestimmt (Abb.: 4.6.1/B). Anzumerken ist an dieser Stelle, daß eine nichtkompetitive Hemmung des Phosphatcarriers durch die getesteten I^- und Cl^--Ionen sowohl auf der externen Membranseite als auch auf der internen Membranseite festgestellt wurde. Für beide Anionen lagen die internen K_I-Werte um ca. 20 % unter den entsprechenden externen K_I-Werten (vgl. Tabelle 4.6.1). Im Falle der untersuchten Cl^--Ionen kann zudem ausgeschlossen werden, daß der Carrier dieses Ion im physiologischen Zustand transportiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

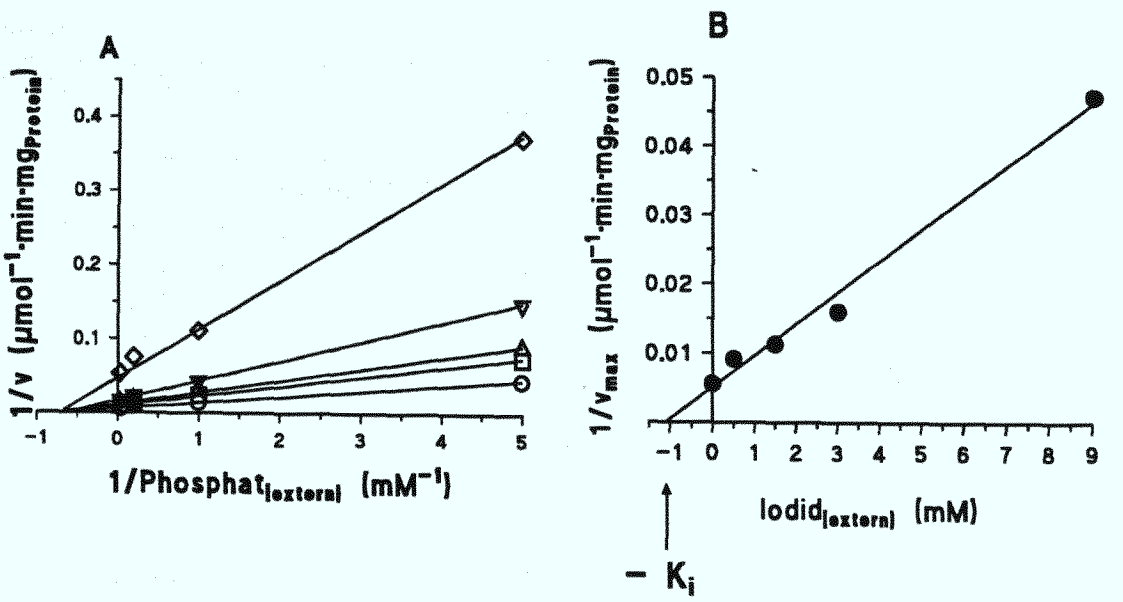


Abb. 4.6.1: **Inhibition des rekonstituierten Phosphatcarriers durch externe Iodidionen.**
A: Lineweaver-Burk-Diagramm der gemessenen Abhängigkeit der P_i^-/P_i^--Austauschaktivität bei verschiedenen (externen) Phosphat- (0.2, 1.0, 5.0 und 25.0 mM) und I^--Konzentrationen. Folgende Konzentrationen an I^--Ionen wurden eingesetzt: 0 (o), 0.5 (□), 1.5 (△), 3.0 (▽) und 9.0 mM (◇). Der externe pH-Wert lag bei pH 6.5, die interne Phosphatkonzentration bei 30 mM. Die Messungen erfolgten unter Anwendung der Vortauschtechnik in Gegenwart von Valinomycin und Nigericin zur Gewährleistung deenergetisierter Bedingungen (vgl. Abschnitt 2.3.1.1).
B: Dixon-Diagramm zur Bestimmung der Inhibitionskonstante (K_I) für externe Iodidanionen.

4.7 Funktionelle Charakterisierung des rekonstituierten Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*

Kürzlich wurde die Primärstruktur des mitochondrialen Phosphatcarriers aus dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm ATCC 24657 (PIC_{SC}) von der Arbeitsgruppe um H. Wohlrab (Phelps et al. 1991) aufgeklärt. Charakteristischerweise sind in der Primärstruktur dieses Carriers nur 3 Cysteine enthalten, im Gegensatz zu den 8 Cysteinresten die für den Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien (PIC_{RHM}) kennzeichnend sind (Aquila et al. 1987, Runswick et al. 1987). Zudem zeichnet den PIC_{SC} seine hohe Insensitivität gegenüber einer Zugabe von NEM aus (Guérin et al. 1990). Dieser Sachverhalt beruht auf dem Austausch des reaktiven Cys_{42} (vgl. Abschnitt 4.1) gegen ein Threonin in der Primärsequenz des PIC_{SC}. Im Abschnitt 4.5 wurden Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Cysteins an Position 42 der Primärstruktur des PIC_{RHM} bei der Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion aufgezeigt. Diese Ansicht konnte mit Hilfe funktioneller Untersuchungen des rekonstituierten Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* überprüft werden.

Zu Beginn der Experimente standen Untersuchungen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens von *Saccharomyces cerevisiae* im Schüttelkolben bzw. im Fermenter an. Die Wachstumskurve einer *Batch*-Kultur ist in der Abbildung 4.7.1 dargestellt. Unter den eingestellten Bedingungen erreicht die Kultur nach ca. 26 Stunden die stationäre Phase. Entsprechend der gängigen Vorschriften zur Präparation von Hefemitochondrien wurden die Hefen in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Es folgte die Protoplastierung der Hefezellen durch Zugabe von Lyticase (Zymolase), der Aufschluß der Zellen im *Dounce*-Homogenisator und die Aufreinigung der Mitochondrien mit Hilfe verschiedener Zentrifugationsschritte (zur detaillierten Beschreibung der Methode: s. Gawaz et al. 1990). Die Reinigung des PIC_{SC} aus den erhaltenen Mitochondrien erfolgte analog der publizierten Aufreinigung des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien (vgl. Abschnitte 2.2.4 & 2.2.5). Bedingt durch die hohen Proteaseaktivitäten in Hefemitochondrien wurde allen Lösungen bis zur abschließenden Rekonstitution des Carriers 1 mM PMSF (zur Inhibition von Serinproteasen; z.B. (Chymo)-Trypsin oder Proteinase K) sowie 5 mM EGTA und 2 mM EDTA (zur Inhibition von Proteasen deren Aktivität auf der Anwesenheit zweiwertigen Kationen beruhen, z.B. Thermolysin oder Carboxypeptidase A/B) hinzugesetzt. Anzu-

merken ist in diesem Zusammenhang, daß alle übrigen Parameter zur Rekonstitution des Carriers aus *Saccharomyces cerevisiae* unverändert von der etablierten Methode zur Rekonstitution des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien übernommen wurden (vgl. Abschnitt 4.2).

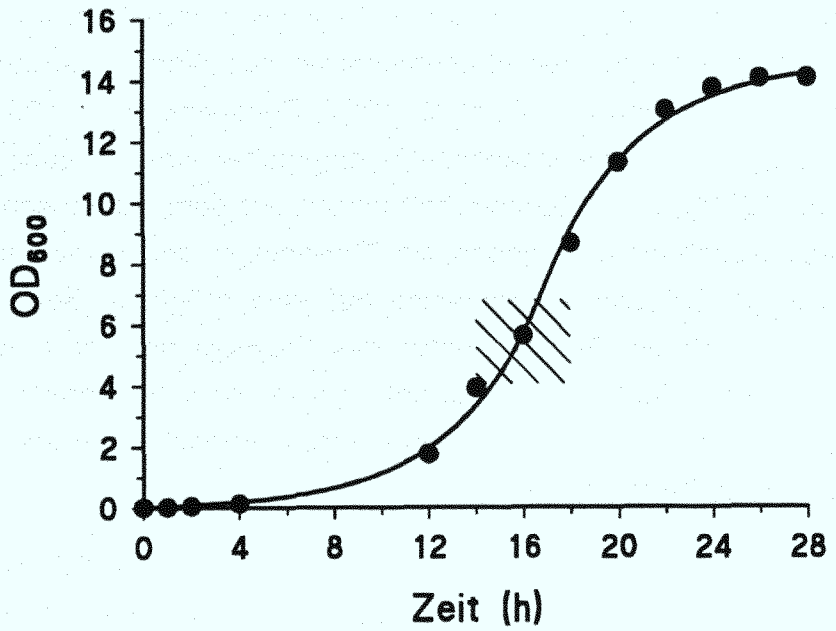


Abb. 4.7.1: **Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* unter aeroben Bedingungen in *Batch*-Kultur.** Hefezellen des *Saccharomyces cerevisiae* Stammes ATCC 24657 wurden in einem semisynthetischen Medium bestehend aus 2% Lactat, 0.5% Hefeextrakt, 0.3% Pepton, 0.12% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Glucose, 0.1% KH_2PO_4, 0.07% $Mg_2SO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.05% $CaCl_2$, 0.05% NaCl und 0.0005% $FeCl_3$ (vgl. Gawaz et al. 1990) angeimpft und unter aeroben Bedingungen bei 30°C in *Batch*-Kultur angezogen. Der schraffierte Bereich kennzeichnet den günstigsten Zeitpunkt des Erntens der Hefezellen in Hinblick auf eine anschließende Präparation von Mitochondrien.

Zur Charakterisierung des aufgereinigten Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden verschiedene Studien in den beiden physiologischen Transportfunktionen durchgeführt. Die Abbildung 4.7.2 zeigt ein Experiment bei dem Transportaktivität der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion in Gegenwart bzw. in Abwesenheit eines Phosphatgradienten sowie nach Inkubation des Carriers mit unterschiedlichen Inhibitoren untersucht wurde. Die Abtrennung des externen Substrates erfolgte in diesem Experiment nach Inaktivierung des Carriers durch 0.25 mM Mersalylsäure in Analogie zur Beschreibung von Guérin et al. (1990). Dieser Inhibitor,

sowie die quecksilberorganischen Verbindungen *p*CMB und *p*CMBS, ermöglichen eine reversible Inaktivierung des PIC_{SC} ohne zugleich effluxinduzierende Eigenschaften zu besitzen (vgl. Tabelle 4.7.1 & 4.7.2). Die Abbildung 4.7.2 belegt die erfolgreiche Isolierung und Rekonstitution des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae*. Zudem zeigt die Abbildung, daß der Carrier sowohl durch lysin- als auch durch cysteinspezifische Inhibitoren wie PLP oder Mersalylsäure inaktiviert wird. Im Vergleich zum Phosphattransport der durch den Carrier aus Rinderherzmitochondrien katalysiert wird, sind die gemessenen Transportraten um ca. 60% erniedrigt. Dieser Befund deutet daraufhin, daß die vom PIC_{RHM} unverändert übernommenen Parameter zur Aufreinigung und Rekonstitution des PIC_{SC} an die spezifischen Anforderungen des Carriers aus Hefemitochondrien angepaßt werden sollten.

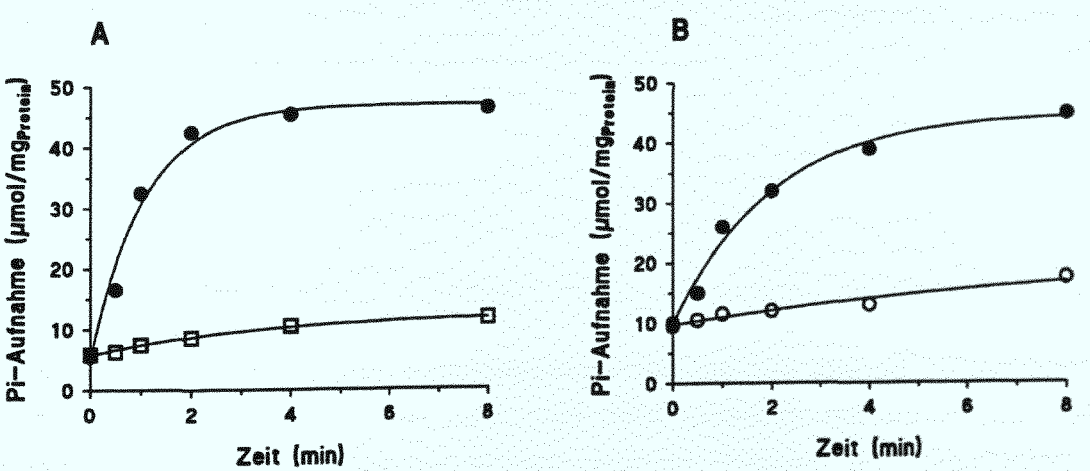


Abb. 4.7.2: **Phosphataufnahme in Proteoliposomen katalysiert durch den rekonstituierten Phosphatcarrier aus *Saccharomyces cerevisiae*.**

A: Proteoliposomen (30 mM internes/30 mM externes Phosphat - pH 6.5) wurden mit Puffer (•) bzw. mit 5 mM PLP (□) inkubiert. Der Start der Aufnahmekinetik erfolgte anschließend durch Zugabe von [^{33}P]Phosphat. Folgende Transportraten wurden berechnet: 39.8 µmol/min•mg$_{Protein}$ (•) und 2.64 µmol/min•mg$_{Protein}$ (□).

B: Phosphataufnahme nach Abtrennung des externen Phosphats (in Anwesenheit von 0.25 mM Mersalylsäure/4°C) mittels Sephadex G-75 Passage. Die Phosphataufnahme in die Proteoliposomen (30 mM internes Phosphat - pH 6.5) nach Zugabe von 2 mM [^{33}P]Phosphat in Kombination mit 5 mM DTE (•) bzw. nur nach Zugabe von 2 mM [^{33}P]Phosphat (o) ist gezeigt. Folgende Transportraten wurden gemessen: 17.3 µmol/min•mg$_{Protein}$ (•) bzw. 1.31 µmol/min•mg$_{Protein}$ (o).

Tabelle 4.7.1: Inhibition des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* durch unterschiedliche Modifizierungsreagenzien.
Nach der Rekonstitution des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden die Proteoliposomen (30 mM internes/externes Phosphat - pH 6.5) mit den unterschiedlichen Reagenzien für jeweils 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Transportaktivität des Carriers nach Zugabe von markiertem Phosphat in hoher spezifischer Radioaktivität gemessen. Die Aktivität der unmodifizierten Kontrolle betrug (v = 33.6 μmol/min·mg$_{Protein}$) angegeben. Ein hochgesetzter Stern (*) indiziert, daß die entsprechenden Reagenzien reversibel sind.

Zugabe von:	Restaktivität %
Puffer	100
0.15 mM *p*CMB*	31
0.35 mM *p*CMB*	8
0.10 mM *p*CMBS*	22
0.35 mM *p*CMBS*	5
0.15 mM Mersalylsäure*	17
0.30 mM Mersalylsäure*	4
1.0 mM NEM	78
1.0 mM PLP	44
0.1 mM DEPC	15

4.7.1 Die Induktion der unphysiologischen Transportfunktion beim PIC_{SC}

Einleitend wurde bereits auf die unterschiedlichen Primärstrukturen des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien bzw. aus Hefemitochondrien (*Saccharomyces cerevisiae*) und die sich hieraus ableitenden Möglichkeiten verwiesen. Die Tabelle 4.7.2 belegt, daß auch im Falle des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* eine unphysiologische Transportfunktion nach Inkubation der Proteoliposomen mit $HgCl_2$ induziert wird. In Analogie zu den Befunden mit dem aufgereinigten Carrier aus Rinderherzmitochondrien wird die Effluxinduktion nach Inkubation des Carriers mit Mersalylsäure, *p*CMB oder *p*CMBS nicht beobachtet. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß aufgrund der Verwendung identischer Liposomen bei der Rekonstitution der unterschiedlichen Phosphatcarrier (PIC_{SC} bzw. PIC_{RHM}) die Messungen der Membranpermeabilität der einzelnen Substanzen in Abwesenheit des Carriers nicht wiederholt wurden (vgl. Tabelle 4.5.1).

Tabelle 4.7.2: **Induktion einer unphysiologischen Effluxfunktion beim Phosphatcarrier aus *Saccharomyces cerevisiae*.**
Der interne Substratpool der Proteoliposomen (30 mM internes Phosphat/pH 6.5) wurde durch Äquilibrierung nach Gabe von [^{33}P]Phosphat markiert. Nachfolgend wurde die nicht inkorporierte Radioaktivität mittels Sephadex G-75 Passage nach vorheriger Inaktivierung des Carriers durch 0.25 mM Mersalylsäure (s.o.) abgetrennt (vgl. auch Abschnitt 2.3.1.2). Abschließend wurden die Proteoliposomen mit den angegebenen, cysteinspezifischen Reagenzien inkubiert. Apparente Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (*k*) wurden in allen Ansätzen ermittelt.

Zugabe von:	*k* [min^{-1}]
Puffer	0.021
5 mM DTE	0.163
5 mM DTE/30 mM Phosphat (extern)	0.225
0.25 mM Mersalylsäure	0.032
0.75 mM Mersalylsäure	0.048
1.0 mM *p*CMB	0.023
1.0 mM *p*CMBS	0.028
0.25 mM $HgCl_2$	0.148
0.75 mM $HgCl_2$	0.371

Eine charakteristische Eigenschaft der induzierten Effluxfunktion ist bei allen bisher untersuchten mitochondrialer Carrierproteinen die drastisch verringerte Substratspezifität (vgl. Abschnitte 1.5 & 4.5). Exemplarisch für die bereits vorgestellten Untersuchungen am PIC_{RHM} (s. Tabelle 4.5.3) wurden analoge Studien mit dem Phosphatcarrier aus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Die Tabelle 4.7.3 belegt, daß nach der Induktion der Effluxfunktion auch unphysiologische Substrate wie beispielsweise Sulfat transportiert werden, hingegen ist die Transportrate für Aspartat (im Vergleich zur unmodifzierten Kontrolle) nur unwesentlich erhöht.

Als klares Fazit dieser Studien kann somit festgehalten werden, daß die beiden Phosphatcarrier aus Hefe- bzw. aus Rinderherzmitochondrien bezüglich der charakteristischen Eigenschaften der Effluxfunktion übereinstimmen. Demzufolge ist das Cystein an Position 42, das lediglich in der Primärstruktur des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien vorhanden ist, weder zur Katalyse der physiologischen Transportfunktionen noch für die Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion erforderlich.

Tabelle 4.7.2: **Efflux verschiedener Substrate nach Inkubation des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* mit $HgCl_2$.**
Die Durchführung des Versuchs entspricht dem Experiment, das in der Tabelle 4.5.3 vorgestellt wurde. Zur Inhibition des physiologischen unidirektionalen Phosphattransports wurde der Carrier vor der Gelfiltration durch Zugabe von 0.35 mM *p*CMBS inaktiviert. Apparente Geschwindigkeitskonstanten (*k*) erster Ordnung wurden für alle Ansätze ermittelt.

Inkorporiertes Substrat	Inkubation der Proteoliposomen mit:	Apparente Geschwindigkeitskonstante (*k*) [min^{-1}]
[^{33}P]Phosphat	5 mM DTE	0.156
	Puffer	0.013
	0.75 mM $HgCl_2$	0.309
	0.75 mM Mersalylsäure	0.038
[^{35}S]Sulfat	5 mM DTE	0.016
	Puffer	0.011
	0.75 mM $HgCl_2$	0.126
	0.75 mM Mersalylsäure	0.026
[^{14}C]Aspartat	5 mM DTE	0.014
	Puffer	0.011
	0.75 mM $HgCl_2$	0.032
	0.75 mM Mersalylsäure	0.021

4.8 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte detaillierte kinetische Charakterisierung des mitochondrialen Phosphatcarriers beruht insbesondere auf der Adaptierung der sogenannten Amberlite-Methode (Krämer & Heberger 1986) zur optimalen Rekonstitution dieses Carriers. Die Anwendung dieses Verfahrens führte zur Ausbildung von Proteoliposomen die sich durch hohe spezifische Transportraten und eine nahezu völlige (≤ 99%) Inhibierbarkeit des Phosphattransports auszeichnen (s. Abb. 4.2.2). Weiterhin wurde ein Verfahren zur reversiblen Inaktivierung des Phosphatcarriers entwickelt (vgl. Abschnitt 4.2). Diese Methode ermöglichte die Anwendung chromatographischer Verfahren zur freien Variation der externen Phosphatkonzentration bei konstanter interner Phosphat-

konzentration. Basierend auf der Verwendung von *p*CMBS (bzw. *p*CMB) kann sowohl der Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien als auch der Carrier aus *Saccharomyces cerevisiae* effizient inhibiert werden, wenngleich sich die jeweilig einzusetzenden Konzentrationen deutlich unterscheiden (vgl. Abschnitte 4.2 & 4.7). Beide Inhibitoren zeichnen sich durch eine völlige Inaktivierung der physiologischen Transportfunktionen des Phosphatcarriers aus, sie sind vollkommen reversibel und induzieren nicht die unphysiologische Effluxfunktion.

4.8.1 Grundlegende funktionelle Eigenschaften des Phosphatcarriers

In unseren System wurde eine spezifische Transportaktivität von ≈ 90 μmol·min^{-1}·(mg$_{Protein}$)$^{-1}$ für den P_i^-/P_i^--Austausch bestimmt. Dieser Wert liegt um den Faktor 3 über der Mehrzahl der publizierten Werte bei denen der Carrier mit Hilfe der *freeze/thaw/sonication*-Methode rekonstituiert wurde (Mende et al. 1982, Kaplan et al. 1986). Ein vergleichbare Aktivität von 71 μmol·min^{-1}·(mg$_{Protein}$)$^{-1}$ wurde andererseits von der Arbeitsgruppe um F. Palmieri (Palmieri et al. 1987, 1990) für den aus frischen Mitochondrien aufgereinigten Phosphatcarrier veröffentlicht. In unseren Experimenten werden hingegen eingefrorene Mitochondrien verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.1). Entsprechend der Publikationen von Müller et al. (1984) sollten unter diesen Bedingungen generell niedrigere Transportaktivitäten erhalten werden. Diese Beobachtung trifft jedoch auf unserer Meßsystem nicht zu, was somit wiederum für die Verwendung der Amberlite-Methode spricht. Die apparente Transportaktivität des elektroneutralen, unidirektionalen Phosphattransports liegt bei pH 6.5 bei ca. 30 μmol·min^{-1}·(mg$_{Protein}$)$^{-1}$ (vgl. Tabelle 3.4.1). Diese Rate liegt um den Faktor 3 höher als der von Wohlrab und Flowers (1982) publizierte Wert. Kürzlich wurde die maximale Transportaktivität für den unidirektionalen Phosphattransport, der durch den rekonstituierten Phosphatcarrier aus *Saccharomyces cerevisiae* katalysiert wird, zu 70 μmol·min^{-1}·(mg$_{Protein}$)$^{-1}$ bestimmt (Guérin et al. 1990). Dieser Wert gleicht der von uns berechneten maximalen Transportrate für den Carrier aus Rinderherzmitochondrien (vgl. Abb. 4.4.2).

Mit Hilfe der neu etablierten Techniken konnten die Substrataffinitäten des Carriers in der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion auf beiden Seiten der proteoliposomalen Membran bestimmt werden. Kennzeichnenderweise wurde auf den beiden verschiedenen Seiten jeweils nur ein K_m-Wert gemessenen, wobei die Affinität des Carriers gegenüber externem Substrat (1.8 mM) signifikant höher als die Affinität

gegenüber internem Substrat (9.4 mM) ist. Der bekannte K_m-Wert des Phosphatcarriers in intakten Mitochondrien für externes Phosphat liegt bei 1.6 mM (Coty & Pedersen 1974, Ligeti et al. 1985). Unsere Messungen schließen somit eine partielle Denaturierung des rekonstituierten Carrierproteins (zur möglichen Erklärung der erniedrigten internen Substrataffinität) aufgrund des unveränderten externen K_m-Wertes aus. Die Beobachtung unterschiedlicher K_m-Werte auf beiden Seiten der Membran impliziert eine asymmetrische Inkorporation des Phosphatcarriers in die Proteoliposomen. Hieraus lassen sich zwei wichtige Befunde ableiten: (i) Der Vergleich des gemessenen externen K_m-Wertes mit den publizierten Daten (s.o.) deutet auf eine *right-side-out* Orientierung des rekonstituierten Carriers hin. Hierbei ist jedoch zu ergänzen, daß diese Herleitung auf kinetischen Messungen basiert und folglich nur für den Anteil der Carrier gilt der funktionell aktiv inkorporiert wurde. (ii) Unter Annahme einer *right-side-out* Orientierung des rekonstituierten Carriers kann ein Wert von ca. 10 mM für den internen K_m-Wert des Phosphatcarriers in intakten Mitochondrien abgeleitet werden. Diese Auslegung zeigt eine auffallend gute Übereinstimmung mit der abgeschätzten Konzentration des freien intramitochondrialen Phosphats [≥ 6 mM] (Wehrle & Pedersen 1989). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß bei Anwendung der Amberlite-Methode eine asymmetrische (*right-side-out*) auch für folgende Carrier: den Aspartat/Glutamat-Carrier (Dierks & Krämer 1988, Sluse et al. 1991), den Oxoglutarat/Malat-Carrier (Indiveri et al. 1991) sowie für den Protonencarrier (Klingenberg & Winkler 1986) publiziert wurde. Zusätzlich konnte die interne Substrataffinität des Phosphatcarriers gegenüber Phosphat bei Katalyse des elektroneutralen, unidirektionalen Phosphattransports bestimmt werden. Der ermittelte Wert (11.2 ± 0.9 mM) entspricht im Rahmen der Meßgenauigkeit dem internen K_m-Wert bei Katalyse der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion (9.4 ± 0.5 mM). Insofern gleicht der Phosphatcarrier dem mitochondrialen Carnitincarrier der in beiden physiologischen Transportfunktionen ebenfalls übereinstimmende (interne) Substrataffinitäten aufweist (Indiveri et al. 1991*a*, 1991*b*).

Weitere fundamentale Eigenschaften des Phosphattransports in Proteoliposomen, wie beispielsweise die Beeinflussung des Carriers durch $\Delta\Psi$ oder ΔpH, stimmen mit den Daten aus intakten Mitochondrien vollkommen überein. Sie beweisen somit die grundlegende Übertragbarkeit der Messungen im rekonstituierten System auf die Funktion des Carriers in seiner physiologischen Umgebung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die allgemein akzeptierte Ansicht wonach der unidirektionale Phosphattransport durch den Cotransport eines Pro-

tons, respektive eines Hydroxylions kompensiert wird, unter den definierten Bedingungen des rekonstituierten Systems nachhaltig belegt werden. Dieser Befund, in Kombination mit der beobachten Insensitivität des Phosphattransports gegen eine Energetisierung der Membran, bestätigte gleichfalls die Rolle des monovalenten Dihydrogenphosphations ($H_2PO_4^-$) als transportierte Spezies. Handelte es sich bei diesen Beobachtungen um erwartete Ergebnisse, so überraschte doch der starke Abfall der apparenten Transportaktivität des Phosphatcarriers bei pH-Werten ≥ 6.75 (vgl. Abb. 4.3.3). Zur besseren Deutung der Meßwerte wurden die apparenten Transportaktivitäten mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung in maximale Transportraten umgerechnet und abermals gegen den pH-Wert aufgetragen (s. Abb. 4.8.1). Diese Transformation in eine "echte" pH-Abhängigkeit wurde sowohl für die P_i^-/P_i^--Antiportfunktion als auch für den elektroneutralen, unidirektionalen Phosphattransport (unter Annahme des Cotransports eines Protons [P_i^-/H^+-Symport] bzw. eines Hydroxylions [P_i^-/OH^--Antiport]) durchgeführt. Die Abbildung 4.8.1 belegt, daß die korrigierten Werte der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion nur geringfügig von den entsprechenden apparenten Werten abweichen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die transformierten Werte des unidirektionalen Phosphattransports erheblich von den apparenten Werten. Nach der Transformation der gemessenen Werte unter Annahme einer P_i^-/OH^--Antiportfunktion, stimmen die korrigierten Werte mit der (echten) pH-Abhängigkeit der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion erstaunlich gut überein. Demgegenüber ergibt sich ein vollkommen unterschiedlicher Kurvenverlauf unter Annahme einer P_i^-/H^+-Symportfunktion. Insbesondere überrascht hierbei die berechnete maximale Transportaktivität für den pH-Wert 6.75. Diese Auffälligkeit beruht auf dem angewendeten Verfahren zur Korrektur der Meßwerte (vgl. Abschnitt 2.3.4). Bei einem pH von 6.75 liegt die Protonenkonzentration bereits über dem entsprechenden pK_S-Wert von 6.5 (s. Abb. 4.2) der in Michaelis-Menten-Gleichung zur Beschreibung der Substrataffinität des Carrier gegenüber Protonen eingesetzt wurde. Gleichwohl sind die apparenten Transportaktivitäten noch nahezu optimal, es resultiert folglich ein hoher Wert für die berechnete Maximalgeschwindigkeit. Zwischen pH 7.0 und 7.25 sind die gemessenen (apparenten) Transportraten bereits deutlich niedriger, dementsprechend liegen auch die korrigierten Werte unter der berechneten Transportaktivität für den pH-Wert von 6.75. Zu stärker alkalischen pH-Werten werden dann die (weiter abfallenden) apparenten Aktivitäten mit schnell zunehmenden Korrekturfaktoren multipliziert worauf der starke Anstieg der gezeigten Werte in diesem pH-Bereich beruht. Die entscheidende Schlußfolgerung aus der Abbildung 4.8.1 ergibt sich aus der bemerkenswerten

Übereinstimmung der berechneten maximalen Transportaktivitäten der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion mit den entsprechenden Werten des unidirektionalen Phosphattransports unter Annahme einer P_i^-/OH^--Antiportfunktion. Dieser Befund ist als deutliches Indiz dafür zu werten, daß der elektroneutrale, unidirektionale Phosphattransport (möglicherweise) als P_i^-/OH^--Antiport katalysiert wird. Der weiterhin zu beobachtende starke Aktivitätsabfall der maximalen Transportaktivitäten (für den P_i^-/P_i^-- und P_i^-/OH^--Antiport) bei einem pH-Wert von ≥ 6.5 deutet auf Protonierungs-/Deprotonierungsprozesse bestimmter Aminosäurereste im Carrierprotein hin. Vermutlich ist hierbei ein essentielles Histidin von Bedeutung. Dieser Schluß kann aus der hohen Sensitivität des Phosphatcarriers gegenüber dem histidinspezifischen Reagenz DEPC (Kaplan et al. 1986), unter Berücksichtigung des pK_S-Wertes von Histidin (vgl. Abschnitt 3.2) gezogen werden.

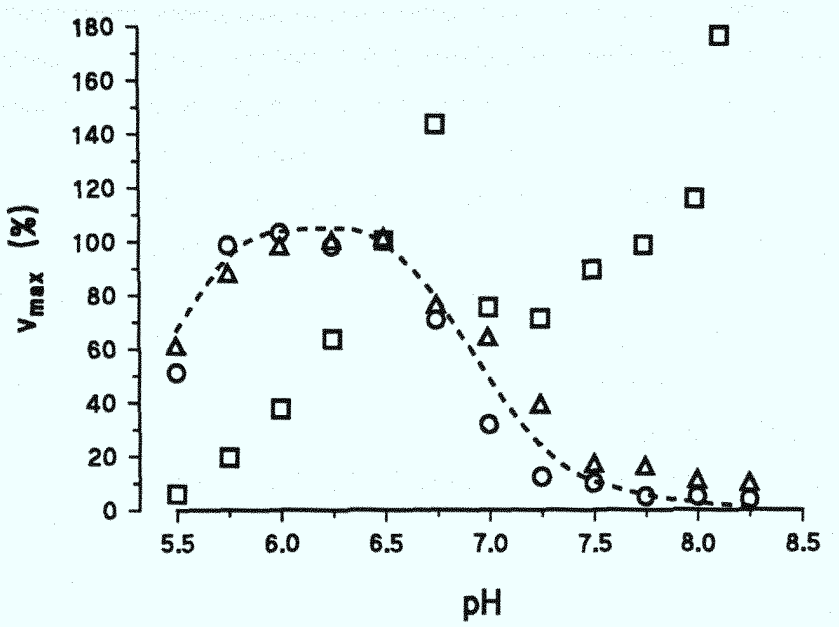


Abb. 4.8.1: **pH-Abhängigkeit der (möglichen) Transportfunktionen des mitochondrialen Phosphatcarriers nach Umrechnung auf maximale Transportraten.**
Die berechneten maximalen Transportaktivitäten (V_{max}) leiten sich direkt von den in Abb. 4.3.3 gezeigten (apparenten) Werten ab. Das Prinzip der Transformation wird im Abschnitt 2.3.4 detailliert beschrieben. Alle Werte sind auf den V_{max}-Wert bei pH 6.5 der entsprechenden Transportfunktion (= 100 %) normiert. Die gestrichelte Linie zeigt nochmals die pH-Abhängigkeit der apparenten Transportraten der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion. Folgende Symbole wurden verwendet: offene Dreiecke, (auf V_{max}-Werte transformierte) pH-Abhängigkeit der P_i^-/P_i^--Antiportfunktion; offene Kreises, (auf V_{max}-Werte transformierte) pH-Abhängigkeit der (theoretischen) P_i^-/OH^--Antiportfunktion; offene Vierecke, (auf V_{max}-Werte transformierte) pH-Abhängigkeit der (theoretischen) P_i^-/H^+-Symportfunktion. Die zur Transformation der Meßwerte verwendeten K_m-Werte wurden den Abbildungen 4.4.1 sowie 4.4.2 entnommen.

4.8.2 Bisubstrat-Mechanismus des Phosphattransports

Basierend auf der Optimierung des rekonstituierten Systems konnten Bisubstratanalysen in beiden physiologischen Transportfunktionen des Phosphatcarriers durchgeführt werden. Die gezeigten Abbildungen (s. Abb. 4.4.1 & 4.4.2) erlaubten eine Unterscheidung zwischen dem sogenannten Ping-Pong-Mechanismus bzw. dem simultanen Mechanismus als Modelle proteinkatalysierter Bisubstrat-Reaktionen.

Für den mitochondrialen Phosphatcarrier wurde in beiden Transportfunktionen ein sequentieller (simultaner) Mechanismus bestimmt. Der Translokationszyklus des Carriers beinhaltet folglich die Ausbildung eines ternären [Substrat•Carrier•Substrat]-Komplexes als katalytisch-aktive Komponente. Interessanterweise stimmen die K_m-Werte der einzelnen Substrate nahezu exakt mit den entsprechenden K_i-Werten überein. Beide untersuchten Transportreaktionen folgen eindeutig einem Sonderfall des simultanen (sequentiellen) Mechanismus, dem sogenannten *rapid-equilibration random* Mechanismus (Cleland 1970, Segel 1975). Dieser spezielle Mechanismus wurde bereits für die Mehrzahl der bisher untersuchten mitochondrialen Carrierproteine bestimmt (vgl. Abschnitt 1.4). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß der mitochondriale Phosphatcarrier das erste Mitglied dieser Gruppe von Translokatoren ist, der im physiologischen Zustand zwei unterschiedliche Transportfunktionen katalysiert. Unsere Untersuchungen belegen somit nachdrücklich die Existenz einer Funktionsfamilie der mitochondrialen Carrier (Indiveri et al. 1991, Krämer & Palmieri 1992, Bisaccia et al. 1993).

Von einem identischen Transportmechanismus in beiden physiologischen Transportfunktionen des Phosphatcarriers konnte vorab nicht ausgegangen werden. Diese Einwand soll mit Hilfe eines Vergleichs des beschriebenen Mechanismus des mitochondrialen Phosphatcarriers mit dem Mechanismus der Lactosepermease (*Lac* Permease) aus *E. coli* verdeutlicht werden. Auch die *Lac* Permease katalysiert zusätzlich zum Lactose/H^+-Symport einen Lactose/Lactose-Austausch (Kaback et al. 1990, Lolkema et al. 1991, Garcia et al. 1991). Für den unidirektionalen Lactosetransport wurde ein Transportmechanismus publiziert, der die Translokation eines neutralen [Lactose•C^-•H^+]-Komplexes und die Reorientierung des negativ geladenen Carriers [C^-] beinhaltet. Im Gegensatz dazu tritt bei der Katalyse der Austauschreaktion ($Lactose_{intern}$ gegen $Lactose_{extern}$) ausschließlich ein [Lactose•C^-•H^+]-Komplex als katalytisch-aktives Intermediat auf. Diese Bisubstrat-Reaktion folgt dem Ping-Pong-Mechanismus (Lolkema et al. 1991, Garcia et al. 1991).

Diese signifikante Differenz zwischen dem mitochondrialen Phosphatcarrier und der bakteriellen *Lac* Permease weist möglicherweise auf generell unterschiedliche Transportmechanismen prokaryotischer bzw. eukaryotischer Carrier hin. Dieser Befund könnte, neben den bereits publizierten strukturellen (Walker 1992, Krämer 1994) und evolutionären Unterschieden (Kuan & Saier 1993), eine weitere charakteristische Eigenschaft der verschiedenartigen Carrier darstellen.

4.8.3 Argumente für eine P_i^-/OH^--Antiportfunktion, katalysiert durch den mitochondrialen Phosphatcarrier

Im Abschnitt 4.3 wurden die internen K_m-Werte des rekonstituierten Carriers für das Substrat Phosphat vorgestellt. Bemerkenswert ist die gute Übereinstimmung der internen Substrataffinitäten in beiden physiologischen Transportfunktionen. Dieser Befund deutete somit bereits eine "mechanistische" Ähnlichkeit der entsprechenden Transportfunktionen hin. Diese Betrachtungsweise konnte mit Hilfe der durchgeführten Bisubstratanalysen (vgl. Abschnitt 4.4) bestätigt werden. Beide Befunde favorisieren offenkundig die Auffassung, wonach der Phosphatcarrier entweder einen P_i^-/P_i^--Antiport oder einen P_i^-/OH^--Antiport katalysiert. Unterstützt wird diese Ansicht zudem durch die bereits diskutierte pH-Abhängigkeit des Carriers (vgl. Abschnitt 4.8.1), die übereinstimmende Kurvenverläufe der maximalen Transportraten für die P_i^-/P_i^-- und P_i^-/OH^--Antiportfunktion aufzeigte (vgl. Abb 4.8.1). Als Fazit dieser unterschiedlichen Experimente ist folglich davon auszugehen, daß die beiden (physiologischen) Transportfunktionen durch den gleichen Transportmechanismus charakterisiert werden. Diese Ansicht impliziert, daß (zumindest) die externe Bindungsstelle des Phosphatcarriers möglicherweise sowohl $H_2PO_4^-$ als auch OH^- als Substrat erkennt.

4.8.4 Bildung des (katalytisch-aktiven) ternären Komplexes

Der festgestellte simultane (sequentielle) Mechanismus, der für beide physiologischen Transportfunktionen des mitochondrialen Phosphatcarriers Gültigkeit besitzt, beruht auf der Bildung eines ternären Komplexes als katalytisch-aktives Intermediat. Es sich stellt nun die Frage nach der Ausbildung des ternären Komplexes. Bei der Mehrzahl der bisher untersuchten mitochondrialen Carrierproteine (Dierks et al. 1988, Indiveri et al. 1991, Bisaccia et al. 1993) wurde die Existenz von je einer Bindungsstelle auf den beiden unterschiedlichen Seiten der proteoliposomalen Membran nachgewiesen (Fall *A*). Weiterhin sind identische kinetische Grundmuster jedoch auch möglich falls der Carrier zwei Bindungsstellen auf der gleichen Membranseite exponiert (Fall *B*), bzw. sogar beim Vorhandensein

von je zwei Bindungsstellen auf den beiden unterschiedlichen Seiten der proteoliposomalen Membran (Fall *C*). Die Möglichkeit *C* wurde beispielsweise für den Dicarboxylatcarrier publiziert (Indiveri et al. 1993), hingegen wurden für den ADP/ATP-Carrier alle drei Möglichkeiten (*A*, *B* und *C*) formuliert (Duyckaerts et al. 1980, Duyckaerts et al. 1983, Barbour & Chan 1981, Block & Vignais 1984).

Die Existenz von zwei Bindungsstellen auf derselben Seite der Membran (Fall *B*) kann für den mitochondrialen Phosphatcarrier eindeutig ausgeschlossen werden, da in allen entsprechenden Experimenten niemals biphasische Diagramme, die auf unterschiedliche K_m-Werte hinweisen, erhalten wurden (vgl. Abschnitt 4.3 & 4.4). Die Möglichkeit, wonach der Carrier je zwei Bindungsstellen (für die beiden verschiedenen Substrate) auf den beiden unterschiedlichen Seiten der proteoliposomalen Membran besitzt, bleibt jedoch weiterhin bestehen. Unglücklicherweise sinkt die Aktivität des Phosphatcarriers bei pH-Werten ≥ pH 7.5 (sehr) stark ab, folglich konnten keine detaillierten Kompetitionsstudien zwischen OH^- und $H_2PO_4^-$ durchgeführt werden. Die Bisubstratanalyse des unidirektionalen Phosphattransports (vgl. Abb. 4.4.2) läßt keine Beeinflussung der Bindung des externen Phosphats bei steigenden externen (sowie internen) pH-Werten erkennen. Dieser Befund spricht eventuell für den Fall *C*, doch ist eine abschließende Klärung dieser Fragestellung auf Basis der gezeigten Ergebnisse nicht möglich. Es wurde weiterhin beschrieben, daß der Phosphatcarrier durch verschiedene Anionen (z. B. Halogenide) unabhängig von der katalysierten Transportfunktion nichtkompetitiv gehemmt wird (vgl. Abschnitt 4.6). Dieser Befund impliziert somit die Existenz einer weiteren Bindungsstelle für die beschriebenen Anionen die nicht mit der Bindungsstelle für $H_2PO_4^-$ identisch sein sollte. Hinsichtlich der Kompetitionsstudien zwischen den inhibitorisch-wirkenden Anionen und OH^- gilt jedoch die gleiche Einschränkung, wie im Falle der untersuchten Kompetion zwischen $H_2PO_4^-$ und OH^- (s.o.).

Zusammenfassend soll an dieser Stelle angemerkt werden, daß insbesondere aufgrund des experimentell schwer erfaßbaren (postulierten) Substrates OH^- eine eindeutige Klärung der Anzahl der Bindungsstellen des Phosphatcarriers nicht möglich war. In Analogie zum mitochondrialen Dicarboxylat- und Protonencarrier könnte der Phosphatcarrier eine Bindungsstelle für die Substrate $H_2PO_4^-$ und OH^- sowie eine weitere Bindungsstelle für die inhibitorisch-wirkenden Anionen besitzen. Den kinetischen Messungen entsprechend sind beide Bindungsstellen auf beiden Seiten der proteoliposomalen Membran lokalisiert. Der Befund, wonach keine Interaktion zwischen den OH^--Ionen und Phosphat auf kinetischer Ebene festgestellt wurde, kann durch die Annahme einer völlig unterschiedlichen Substraterkennung und/oder Substratbindung für beide Ionen erklärt werden. Diese Auffassung beruht wesentlich auf den erheblichen Differenzen der bestimmten K_m-Werte [$\approx 10^{-3}$ M ($H_2PO_4^-$) bzw. $\approx 10^{-9}$ M (OH^-)].

In gewisser Hinsicht ähnelt der Phosphatcarrier dem mitochondrialen Protonencarrier (dem *Uncouplingprotein*). Auch dieser mitochondriale Translokator wird nichtkompetitiv durch externe Purinnukleotide inhibiert (Rafael & Heldt 1976) beruht. Weiterhin wurde für diesen Carrier ebenfalls eine starke pH-Abhängigkeit und eine hohe Substrataffinität ($< 10^{-6}$ M) bestimmt (eine Übersicht gibt: Klingenberg 1990, 1993). Diese Analogie wirft erneut die Frage nach einer möglichen unmittelbaren evolutionären Verwandtschaft beider Transportproteine auf. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß das *Uncouplingprotein* als ein "amputierter" Substrat/H^+-Symportcarrier (oder Substrat/OH^--Antiportcarrier) aufgefaßt wird (Klingenberg 1985*a*). Über die physiologische Funktion der Inhibition des Phosphatcarriers durch die verschiedenen Anionen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Festzuhalten bleibt jedoch, daß eine halbmaximale Hemmung des Phosphatcarriers nach Zugabe von ≈ 10 mM ATP (vgl. Tabelle 4.6.1) erfolgte. Dieser Wert ähnelt der ATP-Konzentration in Mitochondrien (Holian et al. 1977) und läßt somit auf mögliche regulatorische Funktionen schließen.

4.8.5 Phänomenologie der $HgCl_2$-induzierten Effluxfunktion des Phosphatcarriers

Im Verlauf der Untersuchungen zur Etablierung der Rücktauschmethode (vgl. Abschnitt 4.2) wurden erste Hinweise auf eine mögliche dritte Transportfunktion des Phosphatcarriers nach Inkubation mit $HgCl_2$ erhalten. Eine unphysiologische Effluxfunktion nach Modifikation bestimmter Cysteinreste war zu diesem Zeitpunkt bereits für den Aspartat/Glutamat-, den ADP/ATP-Carrier sowie für den Carnitincarrier publiziert (vgl. Abschnitt 1.5). Interessanterweise führt lediglich die Inkubation mit $HgCl_2$ zur Effluxinduktion beim Phosphatcarrier, hingegen tritt dieser Effekt bei Zugabe voluminöser Reagenzien (Mersalylsäure, *p*CMBS oder $HgCl_2$•EDTA) nicht auf. Überzeugende Argumente für das Vorliegen eines carriervermittelten Phosphatefflux wurden erhalten: (i) Die Zugabe von $HgCl_2$ in Konzentrationen ≤ 1.25 mM führt nicht zum Ausfluß vom markierten Phosphat aus proteinfreien Liposomen (vgl. Tabelle 4.5.1). (ii) Eine partielle Denaturierung des Carriers ist ausgeschlossen. Nach Zugabe von DTE stoppt der Phosphatefflux umgehend (vgl. Abb. 4.5.1). (iii) Die Zugabe von externem Phosphat reduziert den Efflux von internem [^{32}P]Phosphat (vgl. Tabelle 4.5.2). Dieser Befund, der deutlich gegen eine (unspezifische) Permeabilisierung der Membran nach Gabe von $HgCl_2$ spricht, wurde bereits für die induzierbare Uniportfunktion des Aspartat/Glutamat-Carriers beschrieben (Dierks et al. 1990*b*). Generell wird die

Veringerung eines auswärtsgerichteten unidirektionalen Transportprozesses in Gegenwart von externem Substrat als "Transinhibition" bezeichnet (Fröhlich 1988). (iiii) Die Effluxinduktion tritt ausschließlich nach Inkubation der Proteoliposomen mit $HgCl_2$ auf. Diese hohe Spezifität ist ebenfalls mit der Annahme unspezifischer Membraneffekte unvereinbar. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß bereits in intakten Mitochondrien ein, durch Zugabe cysteinspezifischer Reagenzien nicht inhibierbarer Phosphatefflux beobachtet wurde. Dieser Transport soll durch einen bestimmten Teil der Phosphatcarrierproteine katalysiert werden, deren Zustand sich vom physiologischen Zustand des Carriers unterscheidet. (Kaplan & Pedersen 1983). Unter Umständen induziert die Zugabe von $HgCl_2$ zum rekonstituierten Carrier exakt diese Bedingungen.

Eine Inhibition der induzierten Effluxfunktion des mitochondrialen Phosphatcarriers durch Zugabe anderer Modifizierungsreagenzien war nicht möglich, obwohl die getesteten Reagenzien wie PLP oder DEPC den physiologischen Phosphattransport effizient inaktivierten (vgl. Abschnitte 4.2 & 4.5). Eine mögliche Erklärung dieses überraschenden Befundes lehnt sich eng an die Ausführungen zur Inhibition des Aspartat/Glutamat-Carriers durch argininspezifische Reagenzien an (vgl. Abschnitt 3.7). Es ist denkbar, daß die modifizierten positiven Aminosäurereste ausschließlich in den Prozeß des (physiologischen) *gatings* des Carriers involviert sind (vgl. Abschnitt 1.4). Die unphysiologische Effluxfunktion des Phosphatcarriers beruht hingegen auf einem deutlich einfacheren Transportmechanismus bei dem vermutlich der *gating*-Mechanismus nicht mehr stattfindet (s. auch: Dierks et al. 1990*b*). Diese Simplifizierung zeigt sich in der gemessenen Unspezifität (vgl. Tabelle 4.5.3) und dem völligen Verlust der Substrataffinität (vgl. Abb. 4.5.2) des carriervermittelten Transports nach Gabe von $HgCl_2$. Ergänzend ist in diesem Zusammenhang anzufügen, daß der unphysiologische Substrattransport, in Analogie zu Transportkatalyse durch Porenproteine, kein streng unidirektionaler Prozeß ist. Nach Zugabe von $HgCl_2$ zeigte sich sowohl ein auswärts gerichteter als auch ein einwärts gerichteter Substrattransport.

Die Beobachtung einer dritten (unphysiologischen) Transportfunktion beim Phosphatcarrier stüzt die Forderung wonach die Effluxfunktion ein einheitliches Charakteristikum aller mitochondrialen Carrierproteine (Dierks et al. 1990*b*, Indiveri et al. 1992) bzw. möglicherweise sogar ein generelles Merkmal aller sekundäraktiver Carrierproteine (Krämer & Palmieri 1992) bildet. Das Ergebnis spricht eindeutig für die Existenz einer Funktionsfamilie (zumindest) der mitochondrialen Carrier.

4.8.6 Mechanistische Studien zur Effluxinduktion beim Phosphatcarrier

Der eigentliche Mechanismus der Effluxinduktion beim Phosphatcarrier konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar nicht endgültig aufgeklärt werden, doch ermöglichten die durchgeführten Experimente detaillierte Einblicke in diesen Prozeß. Unter Berücksichtigung der bekannten Primärstruktur des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien (PIC_{RHM}), in der 8 Cysteinreste identifiziert wurden (s.o.), sowie unter Zuhilfenahme der bereits publizierten Modelle zur Effluxinduktion beim Aspartat/Glutamat-Carrier bzw. beim Carnitincarrier (vgl. Abschnitt 1.5), wurde ein erstes hypothetisches Modell zum Mechanismus der Effluxinduktion beim mitochondrialen Phosphatcarrier entworfen (Stappen & Krämer 1993). Diese (vorläufige) Deutung basierte im wesentlichen auf den in der Tabelle 4.5.1 zusammengefaßten Experimenten. In Analogie zu den beiden vorweg genannten Carriern sollte die Effluxinduktion beim Phosphatcarrier demnach ebenfalls auf der Modifikation zweier verschiedener Cysteine beruhen, wobei mutmaßlich das Cystein an Position 42 der Primärsequenz des PIC_{RHM} in den Induktionsprozeß involviert ist. Diese Ansicht beruht auf früheren Publikationen (Fonyo 1974, Coty & Pedersen 1975), die eindeutig belegen, daß NEM oder DTNB (vgl. Tabelle 4.5.1) mit diesen Cysteinrest reagieren. Diese Modifikation bewirkt die Inaktivierung beider physiologischer Transportfunktionen des Phosphatcarriers. Hieran anschließend induziert der Zusatz von $HgCl_2$, das zumindest an ein weiteres Cystein bindet, die unphysiologische Uniportfunktion.

Zur Überprüfung dieser These wurden ergänzende Messungen mit dem Phosphatcarrier aus Hefemitochondrien, dessen Primärsequenz lediglich 3 Cysteinreste enthält, durchgeführt (Phelps et al. 1991). Interessanterweise ist einzig der Cysteinrest an Position 28 in der Primärstruktur des Phosphatcarrier aus Hefemitochondrien (entspricht Cys_{27} des PIC_{RHM}) in beiden Sequenzen konserviert (vgl. Abb. 4.8.2). Aus Arbeiten von Guérin et al. (1990) ist bekannt, daß dieser konservierte Cysteinrest mit quecksilberhaltigen Verbindungen reagiert. Diese Modifikation führt zur sofortigen Inaktivierung des Phosphatcarriers aus Hefemitochondrien (vgl. auch Tabelle 4.7.1). Wie die vorliegende Arbeit zeigte, führt die Zugabe von $HgCl_2$ zum PIC aus Hefemitochondrien ebenfalls zur Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion. Überraschenderweise stimmen die charakteristischen Eigenschaften der induzierbaren Uniportfunktion bei beiden (Phosphat-) Carriern trotz ihrer unterschiedlichen Primärsequenzen überein. Zwei wichtige Folgerungen können aus dieser Beobachtung abgeleitet werden: (i) Die Modifikation des Cysteins an Position 42 in der Primärstruktur des Carriers aus Rinderherzmitochondrien ist für die Induktion der Effluxfunktion nicht erforderlich. (ii)

Die übereinstimmenden Merkmale der Effluxfunktion beider Phosphatcarrier (PIC_{RHM} & PIC_{SC}) sollten unser Ansicht nach auf einer identischen Modifikation beruhen. Folglich sind alle nachfolgenden Überlegungen auf die Rolle des einzig konservierten Cys_{27} (PIC_{RHM}) (respektive des Cys_{28} (PIC_{SC})) als "efflux-vermittelndem" Cystein zu konzentrieren.

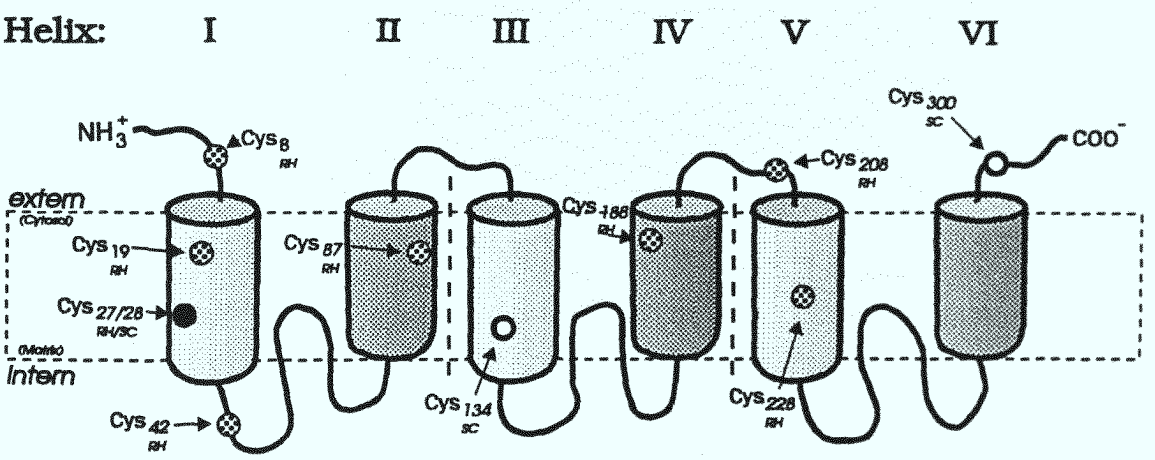


Abbildung 4.8.2: **Modell der Sekündärstruktur des mitochondrialen Phosphatcarriers.**
Vermutete Sekundärstruktur des Phosphatcarriers (umgezeichnet nach: Capobianco et al. 1991, Palmieri et al. 1992, Ferreira & Pedersen 1993). Die Lage der identifizierten Cysteine des Phosphatcarriers aus Rinderherzmitochondrien (gepunktete Kreise), der identifizierten Cysteine des Phosphatcarriers aus *Saccharomyces cerevisiae* (offene Kreise) sowie des einzig konservierten Cysteins in beiden Primärsequenzen (ausgefüllter Kreis) sind eingezeichnet. Zu besseren Übersichtlichkeit wurden die folgende Kennzeichnung verwendet: *RH*, Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien; *SC*, Phospahtcarrier aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die ausschließliche Modifikation des konservierten Cysteins ($Cys_{27/28}$) führt nicht zur Induktion der unphysiologischen Effluxfunktion des Phosphatcarriers. Andernfalls müßten beispielsweise die quecksilberhaltigen Reagenzien Mersalylsäure oder *p*CMBS, die bekanntlich an diesem Aminosäurerest binden (s.o.) effluxinduzierende Eigenschaften besitzen. Eine mögliche Interpretation unser Meßergebnisse beruht auf der Annahme, daß nur die gleichzeitige Modifikation beider essentieller Cysteine [Cys_{27} (PIC_{RHM}), bzw. Cys_{28} (PIC_{SC})] der beiden Phosphatcarriermonomere zur Effluxinduktion führt. Aufgrund des wechselseiti-

gen *gating*-Mechanismus ist immer nur das zur externen Membranseite hin exponierte $Cys_{27(28)}$ für die sperrigen Reagenzien wie Mersalylsäure, *p*CMBS oder den [$HgCl_2$•EDTA]-Komplex zugänglich. Der Carrier wird durch diese Inhibitoren unmittelbar inaktiviert ein weiterer Konformationswechsel findet nicht mehr statt. Folglich wird so das entsprechende Cystein ($Cys_{27/28}$) des zweiten Monomers vor der Modifikation geschützt. Lediglich $HgCl_2$ modifiziert scheinbar auch dieses zur internen Membranseite hin exponierte Cystein. Diese Annahme wird durch den Befund gestärkt, wonach keine Effluxinduktion durch $HgCl_2$ in Proteoliposomen beobachtet wurde die intern DTE enthielten (Ergebnis nicht gezeigt). Anzumerken ist in diesem Zusammenhang hingegen, daß weder die Frage, wie $HgCl_2$ in relativ kurzer Zeit (≤ 5 Sekunden) dieses (interne) Cystein erreicht und somit die Effluxfunktion induziert, noch die Frage nach der möglichen physiologischen Bedeutung der identifizierten Cysteine ($Cys_{27/28}$) gegenwärtig geklärt ist. Denkbar ist, daß die beiden Cysteine in der physiologischen Funktion des Carriers für die Kopplung der auswärts- und einwärts gerichteten (Substrat-) Ströme von essentieller Bedeutung sind. Eine graduelle Störung dieser Interaktion sollte die intrinsische Bindungsenergie direkt beeinflussen. Nach der Theorie des Übergangszustandes (Krupka 1989) könnte diese Störung zu einem entkoppelten Transport mit völlig veränderten (z.B. Poren-)Eigenschaften führen. Möglicherweise besteht sogar eine direkte Wechselbeziehung zwischen den Cysteinresten. Diese Aussage stützt sich auf experimentelle Befunde von Hüther und Kadenbach (1984), die die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken im solubilisierten Phosphatcarrier-Dimer nach Zugabe von Kupfer-Di(1,10-Phenanthrolin) aufzeigten.

5 Zusammenfassung

Der Aspartat/Glutamat-Carrier katalysiert sowohl einen Substrat/Substrat-Antiport, als auch einen (durch SH-Gruppen-Modifizierung induzierbaren) unphysiologischen Substratuniport. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Inhibitorstudien eine Struktur/Funktions-Korrelation des rekonstituierten Carriers durchgeführt.

① Die Bindung von 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), das in einer 1:1 Stöchiometrie zur Inaktivierung des Aspartat/Glutamat-Carriers führt, erfolgt an einem Cysteinrest (Cys_a) der in exofazialen Bindungsstelle des Carriers lokalisiert ist. Die Modifikation dieses Aminosäurerestes durch NBD-Cl wird durch alle übrigen cysteinspezifischen Inhibitoren vollständig verhindert. Folglich binden diese Reagenzien an das gleiche Cystein. Der bifunktionelle Inhibitor DIDS modifiziert neben Cys_a ein Lysin (*Lys*). Befunde für eine räumliche Nähe beider Aminosäurereste wurden vorgestellt, eine intramolekulare Verbrückung von Cys_a und *Lys* durch DIDS ist wahrscheinlich.

② Die Durchführung der Modifikation unter definierten Bedingungen führte zur Identifikation eines weiteren funktionell wichtigen Cysteins (Cys_b), eines Histidins (*His*) sowie eines Arginins (*Arg*). Die Überprüfung der Zugänglichkeit der identifizierten Aminosäurereste unter verschiedenen Bedingungen ergab Hinweise auf die Lokalisation und (mögliche) Funktion der einzelnen essentiellen Gruppen in der exofazialen Bindungsstelle des Carriers.

③ Alle bekannten Modifizierungsreagenzien konnten aufgrund ihrer charakteristischen Wirkungen auf die Funktion des Aspartat/Glutamat-Carriers in vier Klassen eingeordnet werden. Reagenzien der Klasse A binden an Cys_a. Sie führen zur Inhibition der Antiportfunktion und stimulieren eine nachfolgende Effluxinduktion. Reagenzien der Klasse B binden an Cys_a und Cys_b. Diese Modifikation führt zur (reversiblen) Effluxinduktion. Reagenzien der Klasse C binden an *Lys* oder *His* und bewirken so die Inhibition sowohl der Antiport- als auch der Effluxfunktion. Die Modifikation des Carriers durch argininspezifische Reagenzien (Klasse D) führt ausschließlich zur Hemmung der Antiportfunktion. Die Effluxfunktion wird nicht beeinflußt.

④ Es wurde gezeigt, daß die Modifikation der einzelnen Aminosäurereste unterschiedliche Auswirkungen auf den physiologischen Antiport bzw. auf den unphysiologischen Uniport hat. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eigenschaften des Carriers in beiden Transportfunktionen waren Rückschlüsse auf die katalytischen Funktionen der identifizierten Aminosäurereste möglich. Abschließend wurden diese geforderten Funktionen mit dem theoretischen Modell der Transportkatalyse, dem *single binding centre gated pore model*, verglichen.

Der Phosphatcarrier katalysiert die Nettoaufnahme von Phosphat in Mitochondrien. Die ausgeführten Experimente ermöglichten eine exakte kinetische Charakterisierung des Carriers und erbrachten zudem zusätzliche Argumente für die Existenz einer universellen mitochondrialen Carrierfamilie.

⑤ Der Einsatz wichtiger methodischer Verbesserungen, wozu beispielsweise die Etablierung der Amberlite-Methode zur Rekonstitution des Phosphatcarriers zählt, ermöglichte die Bestimmung der Substrataffinitäten auf beiden Seiten der liposomalen Membran. Diese Werte erlaubten nicht nur Rückschlüsse auf den bisher unbekannten internen K_m-Wert in intakten Mitochondrien, sondern belegen zudem einen asymmetrischen (*right-side-out*) Einbau des Carriers in den Proteoliposomen. Weiterhin wurde der Einfluß des Membranpotentials, des pH-Wertes oder eines Protonengradienten über der Membran am rekonstituierten Carrier untersucht und mit den Werten aus intakten Mitochondrien verglichen.

⑥ Aufbauend auf der detaillierten kinetischen Charakterisierung des Carriers wurde der Reaktionsmechanismus in beiden physiologischen Transportfunktionen des Carriers mittels Bisubstratanalysen bestimmt. Der Phosphattransport erfolgt in beiden Funktionen entsprechend des simultanen (sequentiellen) Mechanismus. Die durchgeführten Untersuchungen belegen somit die Existenz einer universellen mitochondrialen Carrierfamilie. Ein Vergleich des Mechanismus des Phosphatcarriers mit der prokaryotischen *Lac* Permease zeigte hingegen deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Carriern auf.

⑦ Im Zusammenhang mit der Untersuchung der pH-Abhängigkeit des rekonstituierten Phosphatcarriers deuten der identische Reaktionsmechanismus und die übereinstimmenden internen K_m-Werte daraufhin, daß der Phosphatcarrier neben der bekannten P_i^-/P_i^--Antiportfunktion (mutmaßlich) auch einen P_i^-/OH^--Antiport katalysiert. Dies impliziert daß (zumindest) die externe Bindungsstelle des Carriers $H_2PO_4^-$ oder OH^- als Substrat akzeptiert.

⑧ Der Phosphatcarrier zeigt nach Zugabe von $HgCl_2$ eine unphysiologische Uniportfunktion, die durch eine geringe Spezifität und den Verlust der Substrataffinität gekennzeichnet ist. Diese Effluxfunktion wurde sowohl beim Phosphatcarrier aus Rinderherzmitochondrien als auch beim Phosphatcarrier aus Hefemitochondrien beobachtet. Vor dem Hintergrund unterschiedlicher Primärstrukturen beider Carrier konnte somit das "Efflux-vermittelnde" Cystein mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden.

⑨ Der Phosphatcarrier wird durch Anionen auf beiden Seiten der Membran (nicht-kompetitiv) inhibiert. Die Auswirkungen dieser Beobachtung in Hinsicht auf ein Funktionsmodell des Phosphatcarriers sowie eine mögliche Verwandtschaft des Phosphatcarriers mit dem mitochondrialen Protonencarrier wurden diskutiert.

6 Literaturverzeichnis

Aboderin, A.A., Boedefeld, E. und Luisi, P.L. (1973)
Reaction of Chicken Egg White Lysozyme with 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan
Biochim. Biophys. Acta 328, 20-30.

Allegrini, R., Sigrist, H., Schaller, J. und Zahler, P. (1983)
Site-directed Fluorogenic Modification of Bacteriorhodpsin by 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan
Eur. J. Biochem. 132, 603-608.

Andrews, W.W., Hill, F.C. und Allison, W.S. (1984)
Identification of the Essential Tyrosine Residue in the ß-Subunit of Bovine Heart Mitochondrial F_1F_0-ATPase that is Modified by 7-Chloro-4-Nitro-[^{14}C]Benzofurazan
J. Biol. Chem. 259, 8219-8225.

Anfinsen, C.B. und Haber, E. (1961)
Studies on the Reduction and Reformation of Protein Disulfide Bonds
J. Biol. Chem. 236, 1361-1363.

Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M. und Klingenberg, M. (1982)
Complete Amino Acid Sequence of the ADP/ATP Carrier from Bovine Heart Mitochondria
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 345-349.

Aquila, H., Link, T.A. und Klingenberg, M. (1987)
Solute Carriers Involved in Energy Transfer of Mitochondria form a Homologous Protein Family
FEBS Lett. 212, 1-9.

Aquila, H., Link, T.A. und Klingenberg M. (1985)
The Uncoupling Protein from Brown Fat Mitochondria is Related to the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. Analysis of Sequence Homologies and of Folding of the Protein in the Membrane.
EMBO J. 6, 2369-2376.

Auld, D.S. und Vallee, B S. (1970)
Inhibition of Carboxypeptidase A by N-Acetylimidiazole
Biochemistry 9, 4352-4359.

Bagert, U. und Röhm, K.H. (1989)
On the role of Histidine and Tyrosine Residues in *E. coli*. Asparaginase. Chemical Modification and ^{1}H-Nuclear Magnetic Resonance Studies
Biochim. Biophys. Acta 999, 36-41.

Bailin, G., Shah, T. und Huang, J.R. (1990)
Thiol Groups of Gizzard Myosin Heavy Chains with 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan
Arch. Biochem. Biophys. 281, 6-12.

Barbour, R.L. und Chan, S.H.P. (1981)
Characterization of the Kinetics and the Mechanism of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier
J. Biol. Chem. 256, 1940-1948.

Benz, R. (1985)
Porin from Bacterial and Mitochondrial Outer Membranes
CRC Crit. Rev. Biochem. 19, 145-190

Bickel-Sandkötter, S. und Strümper, P (1989)
Investigations on Nucleotide Binding Sites of Isolated Chloroplast ATPase by Modification with 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan
FEBS Lett. 258, 309-312.

Birkett, D.J., Price, N.C., Radda, G.K. und Salmon, A.G. (1970)
The Reactivity of SH-Groups with a Fluorogenic Reagent
FEBS Lett. 6, 346-348.

Bisaccia, F. und Palmieri, F. (1984)
Specific Elution from Hydroxylapatide of the Mitochondria Phosphate Carrier by Cardiolipin
Biochim. Biophys. Acta 766, 386-394.

Bisaccia, F., de Palma, A. und Palmieri, F. (1992)
Identification and Purification of the Aspartate/Glutamate Carrier from Bovine Heart Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta. 1106, 291-296.

Bisaccia, F., de Palma, A., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F. (1993)
Reaction Mechanism of the Reconstituted Tricarboxylat Carrier from Rat Liver Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta. 1142, 139-145.

Block, M.R., Pougeois, R. und Vignais, P.V. (1980)
Chemical Radiolabeling of Carboxyatracyloside by [^{14}C]Acetic Anhydride. Binding Properties of [^{14}C]Acetylcarboxyatractyloside to the Mitochondrial ADP/ATP Carrier
FEBS Lett. 117, 335-340.

Block, M.R. und Vignais, P.V. (1984)
Substrate-Site Interactions in Membrane-Bound Adenine Nucleotide Carrier as Disclosed by ADP and ATP Analogs
Biochim. Biophys. Acta 767, 369-376.

Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P. und Vignais, P.V. (1989)
Orientation of N-Terminal Region of the Membrane Bound ADP/ATP Carrier Protein Explored by Antipeptide Antibodies and an Arginine-Specific Endoprotease. Evidence that Accessibility of the N-Terminal Residues Depends on the Conformational State of the Carrier
Biochemistry 28, 1093-1100.

Brandolin, G., Marty, I. und Vignais, P.V. (1992)
Topographical Changes of the ADP/ATP Carrier in the Mitochondrial Membrane Related to Conformational Changes;
E. Quagliariello und F. Palmieri (Eds.) In *Molecular Mechanisms of Transport*, Elsevier, Amsterdam, S. 135-142.

Bünning, P., Holmqiust, B. und Riordan, J.F. (1978)
Functional Residues at the Active Site of Angiotensin Converting Enzyme
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 1442-1449.

Burstein, Y., Walsh, K.A. und Neurath, H. (1974)
Evidence of an Essential Histidine Residue in Thermolysin
Biochemistry 13, 205.

Capobianco, L., Brandolin, G. und Palmieri, F. (1991)
Transmembrane Topography of the Mitochondrial Phosphate Carrier Explored by Peptide-Specific Antibodies and Enzymatic Digestion
Biochemistry 30, 4963-4969.

Ceccarelli, E. A., Verburg, J. G., Zhuo, S. und Allison, W. S. (1989)
Selectivity of Modification when Latent and Active Forms of the Chloroplast F_1F_0-ATPase are Inactivated by 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan
Arch. Biochem. Biophys 272, 400-411.

Chen, P.S., Jr, Toribara, T.Y. und Warner, H. (1956)
Microdetermination of Phosphorus
Anal. Chem. 28, 1756-1758.

Cleland, W.W. (1970)
Steady State Kinetics
In *The Enzymes*, Vol.2 (Boyer, P.D., ed.) S. 1-65, Academic Press, New York.

Coty, W.A. und Pedersen, P.L. (1974)
Phosphate Transport in Rat Liver Mitochondria
J. Biol. Chem. 249, 2593-2598.

Coty, W.A. und Pedersen, P.L. (1975)
Phosphate Transport in Rat Liver Mitochondria: Membrane Components Labeled by N-Ethlymaleimide during Inhibition of Transport
J. Biol. Chem. 250, 3515-3521.

Crompton, M., Ellinger, H. und Costi, A. (1988)
Inhibition by Cyclosporin A of Ca^{2+}-dependent Pore in Heart Mitochondria Activated by Inorganic Phosphate and Oxidative Stress
Biochem. J. 255, 357-360.

Daum, G., Böhni, P. und Schatz, G. (1982)
Import of Proteins into Mitochondria - Cytochrome b_2 and Cytochrome c Peroxidase are Located in the Intermembrane Space of Yeast Mitochondria.
J. Biol. Chem. 257, 13028-13033.

De Blas, A. L. und Cherwinski, H.M. (1983)
Detection of Antigens on Nitrocellulose Paper Immunoblots with Monoclonal Antibodies
Anal. Biochem. 133, 214-219.

Deters, D.W., Nelson, N., Nelson, H. und Racker, E. (1975)
Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Photophosphorylation
J. Biol. Chem. 250, 1041-1047.

Dierks, T. und Krämer, R. (1988)
Assymetric Orientation of the Reconstituted Aspartate/Glutamate Carrier from Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 937, 112-126.

Dierks, T., Riemer, E. und Krämer, R. (1988)
Reaction Mechanism of the Reconstituted Aspartate/Glutamate Carrier from Bovine Heart Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 943, 231-244.

Dierks, T. und Krämer, R. (1989)
Reaction Mechanism of the Reconstituted Aspartate/Glutamate Antiporter from Mitochondria. Reversible Switching to Uniport Function
A. Azzi, K.A. Nalecz, M.J. Nalecz, und L. Wojtczak (Eds.) In *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes*, Springer Verlag, Berlin, S. 99-110.

Dierks, T., Salentin, A., Heberger, C. und Krämer, R. (1990*a*)
The Mitochondrial Aspartate/Glutamate Carrier and ADP/ATP Carrier Switch from Obligate Counterexchange to Unidirectional Transport after Modification by SH-Reagents
Biochim. Biophys. Acta 1028, 268-280.

Dierks, T., Salentin, A., und Krämer, R. (1990*b*)
Pore-Like and Carrier-Like Properties of the Mitochondrial Aspartate/Glutamate Carrier after Modification by SH-Reagents: Evidence for a Preformed Channel as Structural Requirement of Carrier-Metiated Transport
Biochim. Biophys. Acta 1028, 281-288.

Dierks, T., Stappen, R., Salentin, A. und Krämer, R. (1992)
Probing the Active Site of the Reconstituted Aspartate/Glutamate Carrier From Mitochondria - Carbodiimide-Catalyzed Acylation of a Functional Lysine Residue
Biochim. Biophys. Acta 1103, 13-24.

Dixon, M. (1953)
The Determination of Enzyme Inhibitor Constants
Biochem. J. 55, 170-171.

Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C.M., Fux, J.P., Sluse, F.E. und Liebecq, C. (1980)
Kinetic Mechanism of the Exchanges Catalysed by the Adenine-Nucleotide Carrier
Eur. J. Biochem. 106, 1-6.

Eckerskorn, C. und Klingenberg, M. (1987)
In the Uncoupling Protein from Brown Adipose Tissue the C-Terminus Protudes to the C-Side of the Membrane as Shown by Tryptic Cleavage
FEBS Lett. 226, 166-170.

Edsall, J.T. und Wyman, J. (1958)
In *Biophysical Chemistry*, London/New York-Academic Press, chapter 8.

Falke, J.J. und Chan, S.I. (1986)
Molecular Mechanisms of Band 3 Inhibitors. 1. Transport Site Inhibitors
Biochemistry 25, 7888-7894

Fayer, R.S., Katina, C.B. und Abrahamson, E.W. (1973)
The Use of 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan in Detecting Amino Acids and as N-Terminal Reagent
Anal. Biochem. 53, 290-294.

Feeney, R.E. (1987)
Chemical Modification of Proteins: Comments and Perspectives
Int. J. Peptide Protein Res. 29, 145-161.

Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. und Radda, G.K. (1975*a*)
Selective Modification of a Nitrogen Residue in the Beta-Subunit of F_1F_0-ATPase
Eur. J. Biochem. 54, 117-126.

Ferguson, S.J., Lloyd, W.J. und Radda , G.K. (1975*b*)
The Mitochondrial ATPase - Evidence for a Single Essential Tyrosine Residue
Eur. J. Biochem. 54, 127-133.

Ferreira, G.C., Pratt, R.D. und Pedersen, P.L. (1989)
Energy-Linked Anion Transport. Cloning, Sequencing and Characterization of a Full Lengh cDNA Encoding the Rat Liver Mitochondrial Proton/Phosphate Symporter.
J. Biol. Chem. 264, 15628-15633.

Ferreira, G.C. und Pedersen, P.L. (1992)
Overexpression of Higher Eukaryotic Membrane Proteins in Bacteria - Novel Insights Obtained with the Liver Mitochondrial Proton/Phosphate Symporter.
J. Biol. Chem. 267, 5460-5466.

Ferreira, G.C. und Pedersen, P.L. (1993)
Phosphate Transport in Mitochondrial: Past Accomplishments, Present Problems, and Future Challenges
J. Bioenerg. Biomembr. 25, 483-491.

Fiermonte, G., Walker, J.E. und Palmieri, F. (1993)
Abundant Bacterial Expression and Reconstitution of an Intrinsic Membrane-Transport Protein from Bovine Mitochondria
Biochem. J. 294, 293-299.

Fohlman, J., Eakler, D., Dowdall, M.J., Lüllmann-Rauch, R., Sjödin, T. und Leander, S. (1979)
Chemical Modification of Taipoxin and Consequences for Phospholipase Activity, Pathaphysiology, and Inhibition of High-Affinity Choline Uptake
Eur. J. Biochem. 94, 531-540.

Fonyo, A. und Bessman, S.P. (1968)
Inhibitiom of Inorganic Phosphate Penetration into Liver Mitochondria by p-Mercuribenzoate
Biochem. Med. 2, 145-163.

Fonyo, A. (1974)
Phosphate Carrier of Liver Mitochondria: Two Equivalent SH-Groups in the Carrier Unit.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1069-1073.

Fournier, N., Ducet, G. und Crevat, A. (1987)
Action of Cyclosporine on Mitochondrial Calcium Fluxes
J. Bioenerg. Biomembr. 19, 297-303.

Freitag, H. und Kadenbach, B. (1978)
Transport of Phosphate Analogues in Rat Liver Mitochondria
Eur. J. Biochem. 83, 53-57.

Fröhlich, O. (1988)
The "Tunneling" Mode of Biological Carrier-Mediated Transport
J. Membrane Biol. 168, 189-198.

Garcia, M.L., Viitanen, P., Forster, D.L. und Kaback, H.R. (1991)
Mechanism of the Lactose Translocation in Proteoliposomes Reconstituted with the Lac Carrier Protein Purified from Escherichia Coli. - 1) Effect of pH and Imposed Membrane Potential on Efflux, Exchange, and Counterflow.
Biochemistry 22, 2524-2531.

Gawaz, M., Douglas, M.G. und Klingenberg, M. (1990) J. Biol. Chem.
Structure-Function Studies of Adenine Nucleotide Transport in Mitochondria. II. Biochemical Analysis of Distinct AAC 1 and AAC 2 Proteins in Yeast
265, 14202-14208.

Genchi, G., Petrone, G., de Palma, A., Bisaccia, F. und Palmieri, F. (1988)
Interaction of Phenylisothiocyanates with the Mitochondrial Phosphate Carrier. I. Covalent Modification an Inhibition of Phosphate Transport
Biochim. Biophys. Acta 936, 413-420.

Ghosh, P.B. und Whitehouse, M.W. (1968)
7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan; A New Fluorogenic Reagent for Amino Acids and other Amines
Biochem. J. 108, 155-156.

Greenbaum, N.L. und Wilson D.F.(1985)
The Distribution of Inorganic Phosphate and Malate between Intra- and Extramitochondrial Spaces
J. Biol. Chem. 260, 873-879.

Grubmeyer, C.T. und Gray, W.R. (1986)
A Cysteine Residue (Cysteine-116) in the Histidinol Binding Site of the Histidinol Dehydrogenase
Biochemistry 25, 4778-4784.

Guérin, B., Labbe, P. und Somlo, M. (1979)
Preparation of Yeast Mitochondria (Saccharomyces cerevisiae) with good P/O and respiratory control ratios
Methods Enzymol. 125, 149-159.

Guérin, B., Bukusoglu, C., Rakotomanana, F. und Wohlrab, H. (1990)
Mitochondrial Phosphate Transport - N-Ethlymaleimide Insensitivity Correlates with Absence of Beef Heart-Like Cys_{42} from the Saccharomyces Cerevisiae Phosphate Transport Protein
J. Biol. Chem. 265, 19736-19741.

Hackenberg, H. und Klingenberg, M. (1980)
Molecular Weight and Hydrodynamic Parameters of the Adenosine 5'-Diphosphate/Adenosine 5'-Triphosphate Carrier in Triton X-100
Biochemistry 19, 548-555.

Harold, F.M. (1986)
In *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*, Freeman, New York.

Hartman, F.C. und Norton, I.L. (1977)
Active-Site-Directed Reagents of Glycolytic Enzyms
Methods Enzymol. 47, 479-498.

Helenius, A. und Simons, K. (1972)
The Binding of Detergens to Lipophile and Hydrophile Proteins
J. Biol. Chem. 247, 3656-3661.

Maiden, M.J.C., Davis, E.O., Baldwin, S.A., Moore, D.C.M. und Henderson, P.J.F. (1987)
Mammalian and Bacterial Sugar Transporter Proteins are Homologous
Nature 325, 641-643.

Henderson, P.J.F. (1991)
Sugar Transport Proteins
Curr. Opinion Struct. Biol. 1, 590-601.

Holian, A., Owen, C.S. und Wilson, D.F. (1977)
Control of Resiration in Isolated Mitochondria: Quantitative Evaluation of the Dependence of Respiratory Rates on [ATP], [ADP] and $[P_i]$
Arch. Biochem. Biophys. 181, 164-171.

Hüther, F.-J. und Kadenbach, B. (1984)
Reactivity of the SH-Groups of the Mitochondrial Phosphate Carrier under Native, Solubilized and Reconsituted Conditions.
Eur. J. Biochem. 143, 79-82.

Indiveri, C., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F.
Reaction Mechanism of the Reconstituted Oxoglutarate Carrier from Bovine Heart Mitochondria
(1991) Eur. J. Biochem. 198, 339-347.

Indiveri, C., Tonazzi, A., Prezioso, G. und Palmieri, F. (1991*a*)
Kinetic Characterization of the Reconstituted Carnitine Carrier from Rat Liver Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 1065, 231-238.

Indiveri, C., Tonazzi, A. und Palmieri, F. (1991*b*)
Characterization of the Unidirectional Transport of Carnitine Catalyzed by the Reconstituted Carnitine Carrier from Rat Liver Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 1069, 110-116.

Indiveri, C., Tonazzi, A., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F. (1992)
The Mitochondrial Carnitine Carrier. Characterization of SH-Groups Relevant for its Function
Biochim. Biophys. Acta 1040, 53-58.

Indiveri, C., Prezioso, G., Dierks, T., Krämer, R. und Palmieri, F. (1993)
Kinetic Characterization of the Reconstituted Dicarboxylate Carrier from Mitochondria - A 4-Binding-Site Sequential Transport System
Biochim. Biophys. Acta 1143, 310-318.

Indiveri, C., Tonazzi, A. und Palmieri, F. (1994)
The Reconstituted Carnitine Carrier from Rat Liver Mitochondria. Evidenve for a Transport Mechanism Different from other Mitochondrial Carriers.
Biochim. Biophys. Acta 1189, 65-73.

Julien, T., Betakis, E. und Zaki, L. (1990)
Chemical Properties of the Anion Transportinhibitory Binding Site of Arginine-Specific Reagents in Human Red Blood Cell Membranes.
Biochim. Biophys. Acta 1026, 43-50.

Kaback, H.R. und Barnes, E.M. (1971)
Transport Across Isolated Bacterial Cytoplasmic Membranes
J. Biol. Chem. 246, 5523-5531.

Kaback, H.R., Bibi, E. und Roepe, P.D. (1990)
ß-Galactoside Transport in Escherichia Coli: a Functional Dissection of the Lac Permease
Trends Biochem. Sci. 15, 309-314.

Kaback, H.R. (1992)
In and Out and Up and Down with the Lac Permease
Int. Rev. Cytology 137A, 97-125.

Kadenbach, B., Freitag, H. und Kolbe, H.V.J. (1978)
On the Mechanism of Phosphate and Dicarboxylate Transport in Mitochondrial.
FEBS. Lett. 89, 161-164.

Kadenbach, B., Mende, P., Kolbe, H.V.J., Stipani, I. und Palmieri, F. (1982)
The Mitochondrial Phosphate Carrier Has an Essential Requirement for Cardiolipin
FEBS Lett. 139, 109-112.

Kaplan, R.S. und Pedersen, P.L. (1983)
Characterization of Phosphate Efflux in Rat Liver Mitochondria
Biochem. J. 212, 279-288.

Kaplan, R.S., Pratt, R.D. und Pedersen, P.L. (1986)
Purification and Characterization of the Reconstitutively Active Phosphate Carrier from Rat Liver Mitochondria
J. Biol. Chem. 261, 12767-12773.

Kaplan, R.S., Mayor, J.A. und Wood, D.O. (1993)
The Mitochondiral Tricarboxylate Transport Protein, cDNA Cloning, Primary Structure, and Comparison with other Mitochondrial Transport Proteins
J. Biol. Chem. 268, 13682-13960.

Kasahara, M. und Hinkle, P.C. (1977)
Reconstitution and Purification of the D-Glucose Transporter from Human Erythocytes
J. Biol. Chem. 252, 7384-7390.

Kennedy, E.P., Rumley, M.K. und Armstrong, J.B. (1974)
Direct Measurement of the Binding of Labeled Sugars to the Lactose Permease M Protein
J. Biol. Chem. 249, 33-39.

Khorana, H.G. (1993)
2 Light-Transducing Membrane Proteins - Bacteriorhodpsin and the Mammalian Rhodopsin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1166-1171.

Klingenberg, M. und Appel, M. (1980)
Is There a Common Binding Center in the ADP,ATP Carrier for Substrates and Inhibitors? Amino Acid Reagents and the Mechanism of the ADP,ATP Translocator
FEBS Lett. 119, 195-200.

Klingenberg, M. (1981)
Membrane Protein Oligomeric Structure and Transport Function
Nature 290, 449-454.

Klingenberg, M. (1985)
The ADP/ATP Carrier in Mitochondrial Membranes
in: A.N. Martonisi (Ed.) In *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol. 4, Plenum Press, New York, S. 511-553.

Klingenberg, M. (1985*a*)
Catalytic Energy and Carrier-Catalyzed Solute Transport in Biomembranes
in: E. Quagliariello, E.C. Slater und F. Palmieri (Eds.) In *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*, Vol. 1, Elsevier, New York, S. 303-315.

Klingenberg, M. und Winkler, E. (1986)
Reconstitution of a H^+ Translocator, The "Uncoupling Protein" from Brown Adipose Tissue Mitochondria in Phospholipid
Methods Enzymol. 127, 772-779.

Klingenberg, M. und Appel, M. (1989)
The Uncoupling Protein Dimer can Form Disulfide Cross-Link Between the Mobile C-Terminal SH-Groups
Eur. J. Biochem. 180, 123-131.

Klingenberg, M. (1989)
Molecular Aspects of the Adenine Nucleotide Carrier
Arch. Biochem. Biophys. 270, 1-14.

Klingenberg, M. (1990)
Mechanism and Evolution of the Uncoupling Protein of Brown Adipose Tissue
TIBS 15, 108-112.

Klingenberg, M. (1992)
Structure-Function of the ADP/ATP Carrier
Biochem. Soc. Trans. 20, 547-549.

Klingenberg, M., Gawaz, M., Douglas, M.G. und Lawson, J.E. (1992)
Mutagenized ADP/ATP Carrier from Saccharomyces
E. Quagliariello und F. Palmieri (Eds.) In *Molecular Mechanisms of Transport*, Elsevier, Amsterdam, S. 187-195.

Klingenberg, M. (1993)
Dialectics in Carrier Research: the ADP/ATP-Carrier and the Uncoupling Protein
J. Bioener. Biomembr. 25, 447-457.

Knirsch, M., Gawaz, M.P. und Klingenberg, M. (1989)
The Isolation and Reconstitution of the ADP/ATP Carrier from Wild-Type Saccharomyces Cerevisea: Identification of Primarily One type (AAC-2)
FEBS Lett. 244, 427-432.

Kobashi, K. (1968)
Catalytic Oxidation of Sulfhydryl Groups by o-Phenantroline
Biochim. Biophys. Acta 158, 239-245.

Kolbe, H.V.J und Wohlrab, H. (1985)
Sequence of the N-Terminal Fromic Acid Fragment and Location of the N-Ethlymaleimide-Binding Site of The Phosphate Transport Protein from Bovine Heart Mitochondria
J. Biol. Chem. 260, 15899-15906.

Koshland, D.E. (1958)
Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis
Proc. Natl, Acad. Sci. U.S.A. 44, 98-99.

Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B. und Correa, W.S. (1969)
Diamide, a New Reagent for the Intracellular Oxidation of Glutathione to the Disulfide
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593-596.

Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977)
Reconstitution of The Adenine Nucleotide Transport with Purified ADP/ATP Carrier Protein
FEBS Letters 82, 363-367.

Krämer, R. und Klingenberg, M. (1982)
Electrophoretic Control of Reconstituted Adenine Nucleotide Translocation
Biochemistry 21, 1082-1089.

Krämer, R. (1984)
Functional Reconstitution of the Partially Purified Aspartate/Glutamate Carrier from Mitochondria
FEBS Lett. 176, 351-354.

Krämer, R. und Heberger, C. (1986)
Functional Reconstitution of Carrier Proteins by Removal of Detergent with a Hydrophobic Ion Exchange Column
Biochim. Biophys. Acta 863, 289-296.

Krämer, R., Kürzinger, G. und Herberger, C. (1986)
Isolation and Functional Reconstitution of the Aspartate/Glutamate Carrier from Mitochondria
Arch. Biochem. Biophys. 251, 166 -174.

Krämer, R. und Palmieri, F. (1989)
Molecular Aspects of Isolated and Reconstituted Carrier Proteins from Animal Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 974, 1-23.

Krämer, R. und Palmieri, F. (1992)
Metabolite Carriers in Mitochondria
L. Ernster (Ed.) In *Molecular Mechanisms in Bioenergetics - New Comprehensive Biochemistry* Vol. 23, Elsevier, Amsterdam, S. 359-384.

Krämer, R. (1994)
Functional Principles of Solute Transport Systems: Concepts and Perspectives
Biochim. Biophys. Acta, im Druck

Krupka, R.M. (1989)
Role of Substrate Binding Forces in Exchange-Only Transport Systems: I. Transition-State Theory
J. Membrane Biol. 109, 151-158.

Kuan, J. und Saier, M.H. (1993)
The Mitochondrial Carrier Family of Transport Proteins - Structural, Functional, and Evolutionary Relationships
Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 28, 209-233.

LaNoue, K.F. und Schoolwerth, A.C. (1979)
Metabolite Transport in Mitochondria
Ann. Rev. Biochem. 48, 871-922.

LaNoue, K.F. und Schoolwerth, A.C. (1984)
Metabolite Transport in Mammalian Mitochondria
L. Ernster (Ed.) In *Bioenergetics*, Elsevier, Amsterdam S. 221-268.

Lehninger, A.L. und Reynafarje B. (1982)
Cycles in the Function of Mitochondrial Membrane Transport Systems
Curr. Topic Cell Regul. 18, 329-341.

Levy, H.M., Leber, P.D. und Ryan, E.M. (1963)
Inactivation of Myosin by 2,4-Dinitrophenol and Protection by Adenosine Triphosphate and other Phosphate Compounds
J. Biol. Chem. 238, 3654-3659.

Ligeti, E., Brandolin, G., Dupont, Y. und Vignais, P.V. (1985)
Kinetics of P_i/P_i-Exchange in Rat Liver Mitochondria; Rapid Filtrations Experiments in the Milliseconds Time Range
Biochemistry 24, 4423-4428.

Lin, C.S., Hackenberg, H. und Klingenberg, M. (1980)
The Uncoupling Protein from Brown Adipose Tissue Mitochondria is a Dimer. A Hydrodynamic Study
FEBS Lett. 113, 304-306.

Lolkema, J.S., Carrraco, N. und Kaback, H.R. (1991)
Kinetic Analysis of Lactose Exchange on Proteoliposomes Reconstituted with the Purified Lac Permease
Biochemistry 30, 1284-1290.

Maddy, A.H. (1964)
A Fluorescent Label for the Outer Components of the Plasma Membrane
Biochim. Biophys. Acta 88, 390-399.

Maloney, P.C. (1989)
Resolution and Reconstitution of Anion Exchange Reactions
Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 326, 437-454.

Manella, C.A., Forte, M. und Colombini, M. (1992)
Toward the Molecular Structure of the Mitochondrial Channel
J. Bioenerg. Biomembr. 24, 7-19.

March J. (1985)
Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms And Structure
J. Wiley & Sons, New York, S. 576-607.

Marger, M.D. und Saier, M.H. (1993)
A Major Superfamily of Transmembrane Facilitators that Catalyse Uniport, Symport, and Antiport.
TIBS 18,13-20.

McGivan, J.D. und Klingenberg, M. (1971)
Correlation between H^+ and Anion Movement in Motochondria and the Key Role of the Phosphate Carrier.
Eur. J. Biochem. 20, 392-399.

Meijer, A.J., Groot, G.S.P. und Tager, J.M. (1970)
Anion Translocators in Rat Heart Mitochondria
FEBS Lett. 8, 41-44.

Meijer, A.J. und Van Dam, K. (1981)
Mitochondrial Ion Transport
S.L. Bonting und J.J.H.H.M. de Pont (Eds.) In *Membrane Transport*, Elsevier, Amsterdam, S. 235-255.

Mende, P., Kolbe, H.V.J., Stipani, I. und Palmieri, F. (1982)
Reconstitution of the Isolated Phosphate Carrier from Pig Heart Mitochondria
Eur. J. Biochem. 128, 91-95.

Menick, D.R., Lee, J.A., Brooker, R.J., Wilson, T.H. und Kaback, H.R. (1987)
Role of Cysteine Residues in the Lac Permease of Escherichia Coli
Biochemistry 26, 1132-1136

Miles, W.E. (1977)
Modification of Histidyl Residues in Proteins by Diethylpyrocarbonate
Methods Enzymol. 47, 431-442.

Miroux, B., Casteilla, L., Klaus, S., Raimbault, S., Grandin, S., Clément, J.M., Ricquier, D. und Bouillaud, F. (1992)
Antibodies Selected from whole Antiserum by Fusion Proteins as Tools for the Study of the Topology of Mitochondrial Membrane Proteins. Evidence that the N-Terminus of the Sixth A-Helix of the Uncoupling Protein is Facing the Matrix
J. Biol. Chem. 267, 13603-13609.

Miroux, B., Frossard, V., Raimbault, S., Ricquier, D. und Bouillaud, F. (1993)
The Topology of the Brown Adipose Tissue Mitochondrial Uncoupling Protein Determined with Antibodies Against its Antigenic Sites Revealed by a Libary of Fusion Proteins.
EMBO J. 12, 3739-3745.

Mitchell, P. (1966)
Chemisomotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation
Biol. Rev. 41, 445-502

Mitchell, P. (1976)
Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanisms of Chemisomotic Coupling
Biochem. Soc. Trans. 4. 399-430

Miyamoto, Y., Ganapathy, V. und Leibach, F. H. (1986)
Identification of Histidine and Thiol Groups at the Active Site of Rabbit Renal Dipetide Transporter
J. Biol. Chem. 261, 16133-16140.

Müller, M., Cheneval, D. und Carafoli, E. (1984)
Doxorubin Inhibits the Phosphate-Transport Protein Reconstituted in Liposomes - A Study on the Mechanism of the Inhibition
Eur. J. Biochem. 140, 447-452.

Nelson, D.R., Lawson, J.E., Klingenberg, M.und Douglas M.G. (1993)
Site-directed mutagenesis of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator - 6 arginines and one lysine are essential
J. Mol. Biol. 230, 1159-1170.

Nelson, D.R. und Douglas M.G. (1993)
Function-Based Mapping of the Yeast Mitochondrial ADP/ATP Translocator by Selections for 2nd Site Revertants
J. Mol. Biol. 230, 1171-1182.

Oesterhelt, D., Tittor, J. und Bamberg, E. (1992)
A Unifying Concept for Ion Translocation by Retinal Proteins
J. Bioenerg. Biomembr. 24, 181-191.

O'Malley, K., Pratt, P., Robertson, J., Lilly, M. und Douglas, M.G. (1982)
Selection of the Nuclear Gene for the Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator by Genetic Complementation of the OP_1 Mutation in Yeast.
J. Biol. Chem. 257, 2097-2103.

Palmieri F., Prezioso, G., Bisaccia, F., Indiveri, C. Zara, V., De Pinto, V. und Genchi, G. (1987)
Isolation and Reconstitution of Substrate Carriers from Mitochondria: An Overview
G. Benz, (Ed.) In *Advances in Myochemistry*, John Libbey Eurotext Ltd, S. 87-104,

Palmieri, F., Bisaccia, F., Capobianco, L., Iacobazzi, V., Indiveri, C. und Zara, V. (1990)
Structural and Functional Properties of Mitochondrial Anion Carriers
Biochim. Biophys. Acta. 1018, 147-150.

Palmieri, F., Bisaccia, F., Capobianco, L., Dolce, V., Iacobazzi, V. Indiveri, C. und Zara, V. (1992)
Structural and Functional Properties of Two Mitochondrial Transport Proteins. The Phosphate Carrier and the Oxoglutarate Carrier
E. Quagliariello und F. Palmieri (Eds.) In *Molecular Mechanisms of Transport*, Elsevier, Amsterdam, S. 151-158.

Palmieri, F., Bisaccia, F., Iacobazzi, V., Indiveri, C. und Zara, V. (1992*a*)
Mitochondrial Anion Carriers
Biochim. Biophys. Acta 1101, 223-227.

Palmieri, F., Indiveri, C., Bisaccia, F. und Krämer R. (1993)
Functional Properties of Purified and Reconstituted Mitochondrial Metabolite Carriers
J. Bioener. Biomembr. 25, 525-535.

Peterson, G.L. (1977)
A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. which Is more Generally Applicable
Anal. Biochem. 83, 346-356.

Phelps, A., Schobert, C.T. und Wohlrab, H. (1991)
Cloning and Characterization of the Mitochondrial Phosphate Transport Protein Gene from Saccharomyces Cerevisae
Biochemistry 30, 248-252.

Pratt, R.D. und Pedersen, P.L. (1989)
Inhibition of Na^+-dependent Phosphate Transport by Group-Specific Covalent Reagents in Rat Kidney Brush Border Membrane Vesicles
Arch. Biochem. Biophys. 268, 9-19.

Rafael, J. und Heldt, H.W. (1976)
Binding of Guanine Nucleotides to the Outer Surface of Inner Membrane of Guinea-Pig Grown Fat Mitochondria in Correlation with Thermogenic Capacity of the Tissue
FEBS Lett. 63, 304-308.

Randall, S.K. und Sze, H. (1987)
Probing of the Catalytic Subunit of the Tonoplast H^+-ATPase from Oar Roots. Binding of 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole
J. Biol. Chem. 262, 7135-7141.

Robillard, G.T. und Konings, W.N. (1982)
A Hypothesis for the Role of Dithiol-Disulfid Interchange in Solute Transport an Energy-Transducing Process
Eur. J. Biochem. 127, 597-604.

Riordan, J.F., Wacker, W.E.C. und Vallee, B.L. (1965)
N-Acetylimidiazole: A Reagent for Determination of "Free" Tyrosyl Residues of proteins
Biochemistry 4, 1758-1765.

Riordan, J.F. (1979)
Arginyl Residues and Anion Binding Sites in Proteins
Mol. Cell. Biochem. 26, 71-91.

Robinson, B.H. und Chapell, J.B. (1967)
The Inhibition of Malate, Tricarboxylate and Oxoglutarate Entry into Mitochondria by 2-N-Butlymalonade.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 249-255.

Runswick, M.J., Powell, S.J., Nyren, P. und Walker, J.E. (1987)
Sequence of the Bovine Mitochondria Phosphate Carrier Protein: Structural Relationship to ADP/ATP Translocase and the Brown Fat Mitochondria Uncoupling Protein
EMBO J. 5, 1367-1373.

Runswick, M.J., Walker, J E., Bisaccia, F., Iacobazzi, V. und Palmieri, F. (1990)
Sequence of the Bovine 2-Oxoglutarate/Malate Carrier Protein - Structural Relationship to other Mitochondrial Transport Proteins
Biochemistry 29, 11033-11040.

Saier, M.H.Jr. und Reizer J (1991)
Families and Superfamilies of Transport Proteins Common to Prokaryotes and Eukaryotes
Curr. Opinion Struct. Biol. 1, 362-368.

Saraste, M. und Walker, J.E. (1982)
Internal Sequence Repeats and the Path of Polypeptide on Mitochondrial ADP/ATP Translocase
FEBS Lett. 144, 250-254.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1987)
Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyarcylamid Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa
Anal. Biochem. 166, 368-379.

Scott, R.K., Knight, V.A., Settlemire, C.T. und Brierly, G.P. (1970)
Differential Effects of Mercurial Reagents on Membrane Thiols and on the Permeability of the Heart Mitochondrion
Biochemistry 9, 714-724.

Scrutton, M.C. und Utter, M.F. (1965)
Pyruvate Carboxylase - 5. Interaction of the Enzyme with Adenosine Triphosphate
J. Biol. Chem. 240, 3714-3723.

Segel, I. H. (1975)
Enzyme Kinetics
Wiley, New York, S. 274-320.

Smith, A.L. (1967)
Preparation, Properties, and Conditions for Assay of Mitochondria: Slaughterhouse Material, Small Scale
Meth. Enzymol. 10, 81 - 86.

Sluse, F.E., Duyckaerts, C., Liebecq, S. und Sluse-Goffart, C.M. (1979)
Kinetic and Binding Properties of the Oxoglutarate Translocator from Rat Heart Mitochondria
Eur. J. Biochem. 100, 3-17.

Sluse-Goffart, C M., Sluse, F.E., Duyckaerts, C., Richard, M., Hengesh, P. und Liébecq, C. (1983)
Conformational Changes and Possible Structures of the Oxoglutarate Translocator of Rat Heart Mitochondria Revealed by Kinetic Study of Malate and Oxoglutarate Uptake
Eur. J. Biochem. 134, 397-406.

Sluse, F.E., Sluse-Goffart, C.M. und Duyckaerts, C. (1989)
Kinetic Mechanism of the Adenylic and the Oxoglutaric Carriers: A Comparison
A. Azzi, K.A. Nalecz, M.J. Nalecz und L. Wojtczak (Eds.) In *Anion Carriers of Mitochondrial Membranes*, Springer Verlag, Berlin, S. 183-195.

Sluse, F.E., Evens, A., Dierks, T., Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C.M. und Krämer, R. (1991)
Kinetic Study of the Aspartate/Glutamate Carrier in Intact Rat Heart Mitochondria and Comparison with the Reconstituted System
Biochim. Biophys. Acta 1058, 329-338.

Sorgato, M.C. und Moran, O. (1993)
Channels in Mitochondrial Membranes: Knowns, Unknowns, and Prospects for the Future
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 18, 127-171.

Stappen, R., Dierks, T., Bröer, A. und Krämer, R. (1992)
Probing the Active Site of the Reconstituted Aspartate/Glutamate Carrier From Mitochondria - Structure/Function Relationship Involving One Lysine and 2 Cysteine Residues.
Eur. J. Biochem. 210, 269-277.

Stappen, R. und Krämer, R. (1992)
Kinetic Characterization of the Reconstituted Phosphate Carrier from Bovine Heart Mitochondria
Abstr. Seventh Eur. Bioenerg. Conf. (Helsinki) 7: 86

Stappen, R. und Krämer, R. (1993)
Functional Properties of the Reconstituted Phosphate Carrier from Bovine Heart Mitochondria - Evidence for Asymmetric Orientation and Characterization of 3 Different Transport Modes
Biochim. Biophys. Acta 1149, 40-48.

Stappen, R. und Krämer, R. (1993*a*)
New Evidence for a Common Functional Family of all Mitochondrial Carrier Proteins Revealed by Studying the Phosphate Carrier
Biological Chemistry Hoppe-Seyler 374: 146

Stappen, R. und Krämer, R. (1993*b*)
Is the Phosphate Carrier a Typical Member of the Mitochondrial Carrier Protein Family?
Biological Chemistry Hoppe-Seyler 374: 750

Stappen, R. und Krämer, R. (1994)
Kinetic Mechanism of Phosphate/Phosphate- and Phosphate/OH^--Antiport Catalyzed by the Reconstituted Phosphate Carrier from Beef Heart Mitochondria
J. Biol. Chem. 269, 11240-11246.

Stipani, I., Zara, V., Zaki, L., Prezioso, G. und Palmieri, F. (1986)
Inhibition of the Mitochondrial Tricarboxylate Carrier by Arginine-Specific Reagents
FEBS Lett. 205, 282-286.

Vallee, B.L. und Riordan, J.F. (1969)
Chemical Approches to the Properties of Active Sites of Enzymes
Ann. Rev. Biochem. 38, 733-781.

Van Iwarden, P.R., Pastore, J.C., Konings, W.N. und Kaback, H.R. (1991)
Construction of a Functional Lactose Permease Devoid of Cysteine Residues
Biochemistry 30, 9595-9600.

Volwerk, J.J., Pieterson, W.A. und de Haas, G.H. (1974)
A Histidine at the Active Site Phosholipase A(2)
Biochemistry 13, 1446-1454.

Walker, J.E. (1992)
The Mitochondrial Transporter Family
Curr. Opinion Struct. Biol. 2, 519-526.

Walker, J.E. und Runswick, M.J. (1993)
The Mitochondrial Transport Protein Superfamily
J. Bioenerg. Biomembr. 25, 435-446.

Weber, K. und Osborn, M. (1969)
The Releability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
J. Biol. Chem. 244, 4406-4409.

Wehrle, J.P. und Pedersen, P.L. (1989)
Phosphate Transport Processes in Eukaryotic Cells
J. Membrane Biol. 111, 199-213.

Wohlrab, H. (1980)
Purification of a Reconstitutively Active Mitochondrial Phosphate Carrier
J. Biol. Chem. 255, 8170-8173.

Wohlrab, H. und Flowers, N. (1982)
pH Gradient-Depend Phosphate Transport Catalyzed by the Purified Mitochondrial Phosphate Carrier
J. Biol. Chem. 257, 28-31.

Wohlrab, H., Collins, A. und Costello, D. (1984)
Purified Mitochondrial Phosphate Carrier, Improved Proteoliposomes and some Properties of the Transport Protein SH-Groups
Biochemistry 23, 1057-1064.

Wohlrab, H., Kolbe, H.V.J. und Collins, A. (1986)
Isolation and Reconstitution of the Phosphate Carrier from Mitochondria
Methods Enzymol. 125, 697-709.

Wohlrab, H. (1986)
Molecular Aspects of Inorganic Phosphate Transport in Mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 853, 115-134.

Zaki, L. und Julien, T. (1985)
Anion Transport in Red Blood Cells and Arginine-Specific Reagents. Interaction Between the Substrate-Binding Site and the Binding Site of Arginine-Specific Reagents
Biochim. Biophys. Acta 818, 325-332.

Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E. und Colombini, M. (1994)
NADH Regulates the Gating of VDAC, the Mitochondrial Outer Membrane Channel
J. Biol. Chem. 269, 1614-1616.

Die Versuche zu der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Biotechnolgie 1 des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Sahm für die Möglichkeit der Ausführung der Arbeit und für sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Krämer für die Überlassung des Themas, für seine exzellente Unterstützung und für seine fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen direkten Mitstreitern A. Bröer, Dr. T. Dierks und K. Herick herzlich bedanken. Sie hatten maßgeblichen Anteil am Gelingen der Untersuchungen zur Struktur/Funktions-Korrelation des rekonstituierten Aspartat/Glutamat-Carriers.

Bedanken möchte ich mich auch für die Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. F. Palmieri (Bari) und mit seinen Mitarbeitern Prof. Dr. F. Bisaccia, Prof. Dr. I. Stipani, Dr. C. Indiveri, Dr. A. De Palma, N. Giangregorio und L. Palmieri.

Herrn. Prof. Dr. H. Weiß und Frau I. Eggeling gilt, stellvertretend für den gesamten Sonderforschungsbereich 189, mein Dank für die ausgezeichnete Arbeit und die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis.

Ferner möchte ich Prof. Dr. M. Klingenberg (München) für die Bereitstellung des Hefe-Stammes ATCC 24657 und seiner Mitarbeiterin Ilse Prinz für die zuverlässige Präparation der Rinderherzmitochondrien danken.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere jedoch Brita Weil, Marcella Gutmann und Andreas Erdmann, möchte ich für das gute Arbeitsklima, Ihre Hilfsbereitschaft, Ihre Zuverlässigkeit und für viele kleine "Annehmlichkeiten" danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen namentlich nicht aufgeführten MitarbeitererInnen des Instituts für Biotechnolgie 1, für die herzliche Aufnahme und stete Hilfsbereitschaft.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2930
Juli 1994
ISSN 0944-2952