

- [85] R. W. Grose, E. M. Flanigen, US-Pat. 4061724 (1977).
 [86] V. Gramlich, W. M. Meier, *Z. Kristallogr.* 133 (1971) 134.
 [87] J. J. Pluth, J. V. Smith, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 741.
 [88] a) L. A. Bursill, E. A. Lodge, J. M. Thomas, A. K. Cheetham, *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 2409; b) L. A. Bursill, E. A. Lodge, J. M. Thomas, *Nature (London)* 291 (1981) 265.
 [89] J. B. Nagy, J.-P. Gilson, E. G. Derouane, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 1129.
 [90] T. Rayment, J. M. Thomas, *Zeolites* 3 (1983) 2.
 [91] a) G. T. Kerr, *Inorg. Chem.* 5 (1966) 1537; b) D. E. W. Vaughan, A. J. Jacobson, unveröffentlicht; c) R. H. Jarman, unveröffentlicht.
 [92] G. R. Millward, J. M. Thomas, S. Ramdas, M. Barlow, *Proc. 6th Int. Conf. Zeolites, Reno 1983*, im Druck.
 [93] E. Oldfield, S. Schramm, M. D. Meadows, K. A. Smith, R. A. Kinsey, J. Ackerman, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 919.
 [94] C. A. Fyfe, G. C. Gobbi, J. Klinowski, A. Putnis, J. M. Thomas, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, im Druck.
 [95] E. G. Derouane, J. B. Nagy, P. Dejaive, J. H. C. van Hoof, B. P. Spekman, J. C. Vedrine, C. Naccache, *J. Catal.* 53 (1978) 40.
 [96] C. A. Fyfe, J. M. Thomas, J. R. Lyerla, *Angew. Chem.* 93 (1981) 104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 96.
 [97] C. A. Fyfe, J. M. Thomas, unveröffentlicht.
 [98] G. Boxhoorn, R. A. van Santen, W. A. van Erp, G. R. Hays, R. Huis, A. D. H. Clague, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 264; G. R. Hays, A. D. H. Clague, R. Huis, G. van der Velden, *Appl. Surf. Sci.* 10 (1982) 247; J. B. Nagy, Z. Gabelica, E. G. Derouane, *Zeolites* 3 (1983) 43.
 [99] G. C. Gobbi, C. A. Fyfe, J. Klinowski, M. Barlow, J. M. Thomas, unveröffentlicht.
 [100] G. E. Maciel, D. W. Sindorf, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 7607; S. J. Mann, R. J. P. Williams, G. C. Gobbi, C. A. Fyfe, G. W. Kennedy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, im Druck.
 [101] D. Freude, T. Fröhlich, H. Pfeiffer, G. Scheeler, *Abstr. 2nd Workshop Zeolites, Eberswalde 1982*, Vol. 2, S. 9; V. Bosáček, D. Freude, T. Fröhlich, H. Pfeiffer, H. Schmiedel, *J. Colloid Interface Sci.* 85 (1982) 502.
 [102] D. W. Breck in [2 a], S. 391; J. M. Thomas, J. Klinowski, P. A. Wright, R. Roy, *Angew. Chem.* 95 (1983) und *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983), im Druck.

Struktur und Evolution des Atmungsferments Cytochrom-c-Oxidase

Von Bernhard Kadenbach*

Zum Andenken an Otto Warburgs 100. Geburtstag

Vor ca. 50 Jahren erhielt *Otto Warburg* für seine grundlegenden Arbeiten über das „Atmungsferment“ den Nobelpreis. Doch erst gegen Ende der fünfziger Jahre gelang die Isolierung dieses komplizierten Membranenzymes, das für Atmung und Energiegewinnung der meisten Lebewesen auf der Erde unentbehrlich ist. Seitdem wurden intensive Untersuchungen durchgeführt, um den Mechanismus der Sauerstoffreduktion zu Wasser und die daran gekoppelte Protonentranslokation über die Membran, die zur ATP-Synthese dient, zu verstehen. Die Erkenntnisse sind bisher allerdings unbefriedigend, nicht zuletzt deshalb, weil die vier Schwermetall-Redoxzentren an Proteine gebunden sind, deren Struktur zu erforschen erst in jüngster Zeit begonnen wurde. Dabei entdeckte man, daß Cytochrom-c-Oxidase aus Bakterien nur zwei oder drei, der tierische Enzymkomplex dagegen dreizehn Protein-Untereinheiten enthält. In diesem Beitrag werden die möglichen Funktionen der einzelnen Protein-Untereinheiten erörtert; am Beispiel der Cytochrom-c-Oxidase wird gezeigt, daß die biochemische Evolution eine Zunahme an regulatorischer Kapazität mit sich bringt.

1. Historischer Überblick

Die katalytische Wirkung von Eisen bei der zellulären Atmung wurde von *Otto Warburg* 1924 erstmals nachgewiesen. Er fand, daß dieser Prozeß mit einem Wertigkeitswechsel des Metallions verbunden ist: Fe^{3+} wird durch organische Substanz zu Fe^{2+} reduziert, das durch molekularen Sauerstoff zu Fe^{3+} reoxidiert wird^[1]. 1926 entdeckte *Warburg*, daß Blausäure und Kohlenmonoxid die zelluläre Atmung hemmen, und daß die CO-Hemmung durch Licht wieder aufgehoben werden kann. Damit war es ihm möglich, das Wirkungsspektrum des Atmungsferments aufzunehmen; es stimmte weitgehend mit dem von anderen Eisenporphyrinen wie Hämoglobin und den von *Keilin* 1925 entdeckten Cytochromen^[2] überein, enthielt jedoch langwellige Absorptionen; diese verursachten die grüne Farbe der Häminkomponente^[3]. Bis dahin kannte man nur rote

Hämme. *Otto Warburg* erhielt für diese Arbeiten 1931 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Das von *Warburg* an intakten Hefezellen gemessene Wirkungsspektrum des Atmungsferments^[3] stimmt erstaunlich gut mit dem Differenzspektrum der isolierten, grünen Cytochrom-c-Oxidase überein^[4].

Zwischen *Warburg* und *Keilin* entstand eine Auseinandersetzung über die Frage, ob die von *Keilin* beschriebenen Cytochrome a, b und c^[2], eine Wiederentdeckung der von *McMunn* 1886 mit einem Handspektroskop erstmals beobachteten Histo- oder Myohämatine^[5,6], direkt an der Oxidation der Atmungssubstrate durch molekularen Sauerstoff beteiligt sind^[7]. Die Kontroverse wurde 1939 durch *Keilins* Entdeckung, daß Cytochrom a aus zwei Komponenten besteht, beendet; eine, Cytochrom a₃ oder Cytochrom-Oxidase genannt, reagiert mit CO und HCN und hat das gleiche Spektrum wie *Warburgs* „sauerstoffübertragendes Ferment“^[8,9].

Nachdem Methoden zur Isolierung der Cytochrom-c-Oxidase in den fünfziger Jahren entwickelt worden waren, konnten die molekularen Eigenschaften des Enzyms im

[*] Prof. Dr. B. Kadenbach

Fachbereich Chemie der Universität
Hans-Meerwein-Straße, D-3550 Marburg

Detail untersucht werden. Sie wurden in einer Reihe von Übersichtsartikeln ausführlich beschrieben^[10-26].

2. Die Funktion der Cytochrom-c-Oxidase

Cytochrom-c-Oxidase (EC 1.9.3.1, auch Cytochrom-Oxidase oder Cytochrom aa₃ genannt), das Sauerstoff-aktivierende Enzym der Zellatmung, kommt in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor, wo es in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist. Auch in einigen aeroben Bakterien findet sich Cytochrom-c-Oxidase, hier jedoch als Bestandteil der Plasmamembran. Die Cytochrom-c-Oxidase ist das terminale Enzym der Atmungskette, das vier Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser überträgt; dabei entstehen keine toxischen Intermediate wie H₂O₂ oder Superoxidradikale O₂[·]. Die vier Reduktionsäquivalente stammen von den Atmungssubstraten, die Wasserstoffäquivalente vorwiegend über das Coenzym NADH auf die Atmungskette übertragen. An der Atmungskette sind als Katalysatoren Flavoproteine, Nicht-Häm-Eisenproteine, Ubichinon und Cytochrome beteiligt^[27]; die Redoxenergie der Reduktionsäquivalente wird beim Übergang von einer Komponente zur anderen stufenweise vermindert, wobei die freiwerdende Energie an drei Stellen (NADH-Dehydrogenase-Komplex, Cytochrom-bc₁-Komplex und Cytochrom-c-Oxidase) zur Synthese von ATP (Adenosintriphosphat) genutzt wird (Fig. 1).

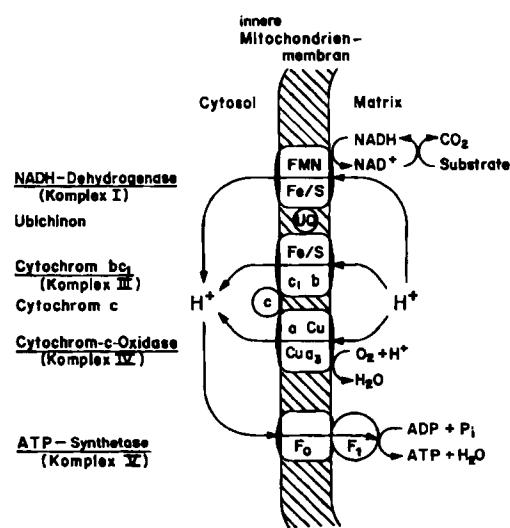


Fig. 1. Schematische Darstellung der Atmungskette der Mitochondrien. Die Atmungskette setzt sich aus den Multiproteinkomplexen I-V zusammen, die in der Lipiddphase der inneren Membran frei beweglich sind. Die Wasserstoff- bzw. Elektronenübertragung zwischen den Komplexen erfolgt über Ubichinon (UQ), ein Lipid, bzw. über Cytochrom c (c), ein lösliches Protein, das von der Außenseite an die Membrankomplexe gebunden wird; diese Prozesse sind an drei Stellen mit einem Protonentransport von der Matrix ins Cytosol gekoppelt. Der Succinat-Dehydrogenasekomplex (Komplex II) transportiert keine Protonen und wurde in der Figur weggelassen. Der Protonengradient wird von der ATP-Synthetase zur Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) genutzt.

Mitchells „chemiosmotische Hypothese“ besagt, daß als „energiereiches Zwischenprodukt“ dieser Reaktion ein Protonengradient an der Membran entsteht, dessen „protonmotive force“ (ΔP) sich aus einem elektrischen Poten-

tial ($\Delta \Psi$) und einem Konzentrationspotential (Δp) zusammensetzt [Gl. (a)]^[28].

$$\Delta P = \Delta \Psi - \frac{RT}{F} \Delta p \text{H} ; \quad \left(\Delta p = \frac{\mu \text{H}^+}{F} \right) \quad (a)$$

Zahlreiche Befunde beweisen, daß dieser Protonengradient das fast zwei Jahrzehnte lange gesuchte „energiereiche Intermediat“ der oxidativen Phosphorylierung, des wichtigsten Prozesses der Energiegewinnung aller aeroben Zellen, ist. Der Protonengradient wird von dem membrangebundenen ATP-Synthetase-Komplex zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P_i) genutzt^[27].

Die Cytochrom-c-Oxidase, die dritte energiekonservierende Komponente der Atmungskette, ist ein Enzymkomplex, der sich aus mehreren Polypeptiden („Untereinheiten“), zwei Häm-a-Gruppen, zwei Kupferionen sowie einem Phospholipid (Cardiolipin^[29-31], essentiell) zusammensetzt. Die beiden Häm-a-Gruppen sind zwar chemisch identisch, lassen sich aber spektroskopisch unterscheiden: Cytochrom a₃ bindet in der Fe^{II}-Form O₂ und CO, und in der Fe^{III}-Form HCN, HN₃ und H₂S; Cytochrom a dagegen bindet diese Liganden nicht, wie schon von *Keilin* und *Hartree* gezeigt wurde^[8]. Dies deutet auf unterschiedliche Umgebung oder Komplexierung der Häm-a-Gruppen hin. In der Tat wurden die beiden Häm-a-Gruppen in verschiedenen Polypeptiden des Enzymkomplexes (Polypeptid I und II) lokalisiert^[32], obwohl nach ESR-spektroskopischen Untersuchungen der Abstand zwischen den beiden Zentren nur 10-14 Å beträgt^[33]. Auch die beiden Kupferionen wurden am Polypeptid II lokalisiert^[32,34]; die vier Redoxzentren des Enzyms sind also eng benachbart. Dies scheint für den Mechanismus der Sauerstoffreduktion, bei dem vier Elektronen von den vier Redoxzentren extrem schnell auf O₂ übertragen werden, essentiell zu sein (Geschwindigkeitskonstante der Reaktion 2. Ordnung bei Raumtemperatur: $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[35]). Unter Anwendung verschiedener physikalischer Meßmethoden (Tief temperatur-Absorptionsspektroskopie, ESR-, CD-, MCD-Spektroskopie, Röntgenstrahlbeugung, EXAFS, ENDOR, magnetische Suszeptibilität, Mössbauer- und Raman-Resonanz-Spektroskopie) wurden der Mechanismus der Elektronenübertragung von Cytochrom c auf O₂, sowie die strukturelle Umgebung der vier Redoxzentren, untersucht. In Figur 2 sind die gegenwärtigen Vorstellungen schematisch skizziert^[26,36,37].

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an zweidimensionalen Kristallen konnte die Y-förmige, dreidimensionale Struktur des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes ermittelt werden^[38,39]. Die beiden oberen Enden des „Y“ ragen in die Matrix, das untere Ende in das Cytosol. Während sich die Bindungsstelle für Cytochrom c auf der cytosolischen Seite befindet, ist die Lage der für O₂ umstritten^[21,40]. Die für die Wasserbildung erforderlichen Protonen gemäß Gleichung (b)



stammen jedoch aus der Matrix^[40]. Damit werden bei dieser Reaktion vier Ladungsäquivalente durch die Membran transportiert.

Aus der Gleichung (b) geht nicht die Bildung eines Protonengradienten durch die Cytochrom-c-Oxidase hervor. *Mitchell* hat dies weder in seiner Hypothese gefordert^[28], noch in experimentellen Untersuchungen an Mitochondrien gefunden^[41]. *Wikström* et al. konnten aber im Gegensatz dazu, sowohl an intakten Mitochondrien^[42-44], als

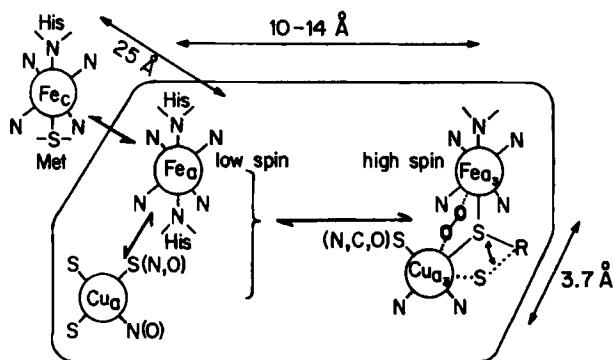


Fig. 2. Das aktive Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase (schematisch). Bei den vier Redoxzentren des Enzyms sind die vier N-Atome des Porphyrin-Ringsystems mit einem, die von Histidin (5. und 6. Ligand am Eisen) mit drei Bindungsstrichen symbolisiert. Die Natur der vier Liganden an den Kupferionen ist nicht exakt bekannt; in einigen Fällen ist selbst das Atom, über das der Ligand an Cu gebunden ist, noch unklar (andere Möglichkeiten jeweils in Klammern). Die vier Redoxzentren werden durch reduziertes Cytochrom c (Fe_a) sukzessive über Cytochrom a (Fe_a) reduziert. Die 6. Koordinationsstelle von Cytochrom a₃ (Fe_{a3}) wird im oxidierten Zustand ($Fe_{a3}^{3+}/Cu_{a3}^{2+}$) durch Schwefel, der zwischen Fe und Cu eine Brücke bildet, besetzt. Nach Reduktion beider Redoxzentren schwingt der Schwefelarm heraus, und O_2 wird von Fe_{a3}^{3+} und Cu_{a3}^{2+} gebunden, wobei ein Peroxid-Intermediat entsteht ($Fe_{a3}^{3+}-O-O-Cu_{a3}^{2+}$, „compound B“). Danach werden zwei Elektronen nahezu gleichzeitig von $Fe_a + Cu_a$ übertragen. Unbekannt ist, wann und woher die vier Protonen für die Wasserbildung kommen.

auch an isolierter, in Liposomen rekonstituierter Cytochrom-c-Oxidase eine Protonenpumpaktivität von der Matrix ins Cytosol (Stöchiometrie ca. 1 H^+ / e) nachweisen^[45]. Andere Autoren bestätigten dieses Ergebnis, wobei die gemessene H^+ / e -Stöchiometrie jedoch stets < 1 war^[40, 46].

Die funktionelle Einheit der Cytochrom-c-Oxidase ist ein dimerer Enzymkomplex, der vier Häm-a-Gruppen und vier Kupferionen enthält; dies geht auch aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen an zweidimensionalen Kristallen^[39] und aus Sedimentationsanalysen am isolierten Detergens-gelösten Enzym^[47, 48] hervor. Auch die vollständige Hemmung der Enzymaktivität nach kovalenter Bindung von nur einem halben Mol Azidoarylcytochrom c pro Mol Cytochrom aa₃^[49] deutet auf einen dimeren Komplex als funktionelle Einheit hin. Zwar könnte auch das monomere Enzym Elektronen von Cytochrom c auf O_2 übertragen^[47, 50, 51], doch scheint die Protonenpumpaktivität nur durch den dimeren Enzymkomplex möglich zu sein, wie es in dem „reciprocating site model“ von *Wikström* et al. gefordert wird^[26].

3. Polypeptidzusammensetzung tierischer Cytochrom-c-Oxidase

Die zahlreichen Untereinheiten der tierischen Cytochrom-c-Oxidasen sind im Enzymkomplex durch nichtkovalente Bindungen so fest assoziiert, daß sie beim Auflösen der Membran durch Detergentien wie Triton X-100

oder Na-Cholat (dem ersten Schritt zur Isolierung des Enzyms) nicht getrennt werden. Nach *Hackenbrock* et al. ist der Cytochrom-c-Oxidase-Komplex in der „zweidimensionalen Flüssigkeit“ der biologischen Membran mit den anderen Enzymkomplexen der Atmungskette nicht fest assoziiert, sondern frei beweglich: Spezifische Antikörper führen zur Aggregation des Enzymkomplexes^[52]; Vergrößerung der Membranoberfläche durch Fusion mit proteinfreien Liposomen ergibt eine elektronenmikroskopisch sichtbare „Verdünnung“ der Enzymkomplexe in der Membran, dabei verringert sich auch die Elektronentransportrate über die Atmungskette von NADH auf O_2 ^[53]. Die Beweglichkeit des Enzymkomplexes in der Membran folgt auch aus der Änderung des Dichroismus nach Photolyse des Cytochrom-c-Oxidase-CO-Komplexes mit einem linear polarisierten Laserblitz; die Relaxationszeit von einigen 100 μs spricht für die Rotation des Enzymkomplexes um eine zur Membran senkrecht stehende Achse^[54]. ESR-Messungen von Spin-markierter, in Liposomen rekonstituierter Cytochrom-c-Oxidase ergaben eine Rotation des Enzymkomplexes mit einer Korrelationszeit von 40^[55] oder 34 μs ^[56] bei 4 °C.

Die feste Assoziation mehrerer Polypeptide zu einem Komplex definierter Raumstruktur deutete auf eine spezifische Funktion der einzelnen Untereinheiten hin. Es war daher von großem Interesse, welche und wieviele Membranproteine zum Cytochrom-c-Oxidase-Komplex gehören. Dies herauszufinden erwies sich jedoch als besonders schwierig, zumal der Begriff „Untereinheit“ unterschiedlich interpretiert wurde. Wir bezeichnen alle Polypeptide, die im Komplex fest assoziiert sind, als Untereinheiten, unabhängig davon, ob diese katalytische oder regulatorische Funktion haben.

Die beiden wichtigsten Methoden zur Analyse der Polypeptidzusammensetzung des Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes sind: 1) Trennung der in 2proz. Na-Dodecylsulfat (SDS)-Lösung oder in 10-70proz. Essigsäure dissozierten Untereinheiten aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte durch Gelfiltration und Identifizierung der isolierten Proteine durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren und Sequenzanalyse. Mit dieser Methode wurden von zwei Arbeitsgruppen zwölf^[57] bzw. elf^[58] verschiedene Proteine identifiziert, von denen sieben bzw. sechs in stöchiometrischer und fünf in substöchiometrischer Menge gefunden wurden. 2) Trennung der durch SDS dissozierten Untereinheiten aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte durch SDS-Gelelektrophorese. Mit den am häufigsten angewendeten Trennsystemen^[59, 60] erhält man bei tierischer Cytochrom-c-Oxidase normalerweise nur sieben Polypeptidbanden. In Analogie zu dem sehr sorgfältig untersuchten Hefeenzym, bei dem ebenfalls sieben Untereinheiten identifiziert worden waren^[61, 62], wurde allgemein angenommen, auch das tierische Enzym bestehe aus sieben Untereinheiten^[16, 17, 19, 20, 22, 26, 50, 53, 55, 61, 63-75], obwohl sehr häufig mehr als sieben Polypeptidbanden bei der gelelektrophoretischen Trennung gefunden wurden^[55, 68, 69, 71, 73, 76-79].

Durch Weiterentwicklung der SDS-Gelelektrophorese-Trennung dieses Systems gelang es uns, hochgereinigte tierische Cytochrom-c-Oxidase in dreizehn verschiedene Polypeptide zu trennen (Fig. 3)^[24, 80]; deren Zugehörigkeit zum Enzymkomplex wurde durch zahlreiche Befunde be-

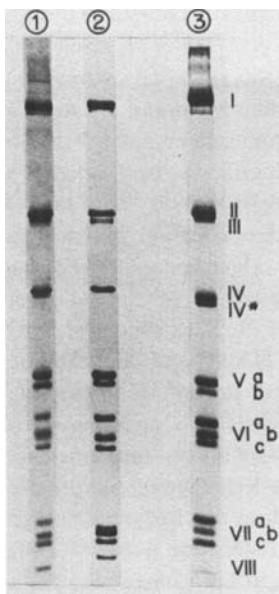


Fig. 3. Polypeptidzusammensetzung tierischer Cytochrom-c-Oxidase, die aus Mitochondrien von Schweineherz ①, Rinderherz ② und Rattenleber ③ nach der Vorschrift in [81] isoliert wurde. Nach hochauflösender SDS-Gelelektrophorese [80] wurden die Proteinbanden mit Coomassie Blau R 250 angefärbt.

wiesen: Das isolierte Enzym aus verschiedenen Organen (Leber, Niere, Herz) von sieben Säugetieren und vom Huhn ergab bei der Trennung stets dreizehn Polypeptide^[81-83], die eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung haben^[84] und in stöchiometrischer Menge vorkommen^[81]; alle zusammen sind mit einem spezifischen Antikörper gegen nur ein Polypeptid (IV) aus einem Triton-X-100-Extrakt von Rattenleber-Mitochondrien immunpräzipitierbar^[84]. Spezifische Antikörper gegen die isolierten Polypeptide I, II, III, IV, Vab, VIa, VIbc, VIIabc und VIII reagieren nur mit den entsprechenden Polypeptiden, wodurch proteolytische Artefakte ausgeschlossen wurden^[86]. Von zwölf Polypeptiden des Rinderherzenzyms sind die vollständigen Aminosäuresequenzen bekannt, die alle verschieden sind^[85].

4. Polypeptidzusammensetzung von Cytochrom-c-Oxidase aus Spezies unterschiedlicher Entwicklungsstufen

Bei Untersuchungen zur Biosynthese des Enzyms wurde die Polypeptidzusammensetzung der Cytochrom-c-Oxidase aus *Neurospora crassa* und aus Hefe sehr sorgfältig analysiert; es wurden acht^[87, 88] bzw. sieben^[61, 62] verschiedene Untereinheiten identifiziert. Dabei wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß die drei größten Polypeptide (I, II und III) von der mitochondrialen DNA codiert und in den Mitochondrien synthetisiert werden, während alle übrigen Polypeptide von der Kern-DNA codiert und im Cytoplasma synthetisiert werden (Fig. 4)^[63, 89]. Auch von tierischer Cytochrom-c-Oxidase werden die großen Polypeptide I-III in den Mitochondrien, alle übrigen im Cytoplasma synthetisiert^[90-94]. Die Information für den zielgerichteten Transport der cytoplasmatisch synthetisierten Polypeptide in die Mitochondrien ist in zusätzlichen Aminosäuresequenzen von 2000-6000 Dalton („Signalpep-

tide“) enthalten, die während des Transports oder danach durch die Mitochondrienmembran proteolytisch abgespalten werden^[95-99].

In den letzten Jahren wurde Cytochrom-c-Oxidase auch aus Bakterien isoliert; dabei überraschte, daß dieses Enzym hier nur zwei^[100-103] oder drei^[104, 105] Untereinheiten enthält. Trotzdem ist das isolierte Enzym voll funktionsfähig: Nach Rekonstitution des nur zwei Untereinheiten enthaltenden Enzyms aus *Paracoccus denitrificans* in Liposomen konnte eine Elektronentransport-abhängige Protonentranslokation mit einer Stöchiometrie von 0.6 H⁺/e nachgewiesen werden^[106]. Die Ursache dafür, daß auch das Enzym aus *P. denitrificans* eine Protonenpumpaktivität entfaltet, obwohl das Polypeptid III, das in eukaryotischen Enzymen die Protonentranslokation bewirkt, fehlt, ist bisher ungeklärt.

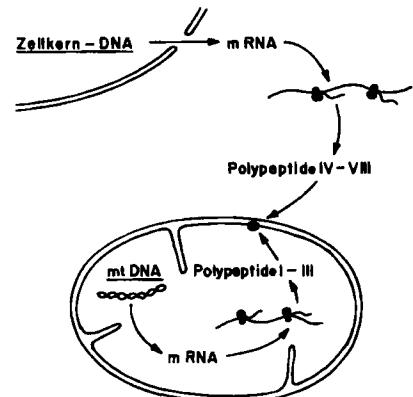


Fig. 4. Koordinierte Biosynthese der Cytochrom-c-Oxidase in den Mitochondrien und im Cytoplasma. Die Information für die Polypeptide I-III ist in der mitochondrialen DNA (mtDNA) gespeichert; nach Transkription in mRNA werden an mitochondrialen Ribosomen die Proteine synthetisiert, die schließlich in der inneren Membran verankert werden. Die Polypeptide IV-VIII sind in der Zellkern-DNA codiert und werden an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. Der Transport der Vorläufer-Polypeptide zur inneren Mitochondrienmembran erfolgt mit zusätzlichen Signalsequenzen, die beim Durchtritt durch die Membran abgespalten werden. Der Mechanismus des Zusammensetzung des intakten Enzymkomplexes (Bindung von zwei Häm a und zwei Kupferionen) ist ungeklärt.

Die Polypeptide der Cytochrom-c-Oxidase aus Prokaryoten sind mit den mitochondrial synthetisierten Polypeptiden des Enzyms aus Hefe verwandt: Ein Antikörper gegen das Polypeptid II aus *P. denitrificans* reagiert mit dem Polypeptid II des Hefezymms, und umgekehrt^[25]. Auch die Aminosäuresequenzen der Polypeptide I, II und III aus höheren Tieren ähneln denen der entsprechenden Polypeptide aus Hefe, wie der Vergleich der Sequenzen der mitochondrialen DNA aus Hefe, Rind und Mensch zeigt^[107-112]. Zwischen dem Polypeptid II aus Hefe^[107, 108] und dem aus Rind^[113] wurden 49%, zwischen dem aus Rind und dem aus Mensch 72%^[111] Sequenzhomologie gefunden.

5. Mitochondrial synthetisierte Polypeptide I-III – Träger der katalytischen Aktivität

Die in den Abschnitten 3 und 4 genannten Befunde deuten darauf hin, daß für die katalytische Funktion des tierischen Enzyms allein die mitochondrial synthetisierten Polypeptide I-III notwendig sind. Die Lokalisation der beiden Häm-a-Gruppen zu gleichen Teilen in den Polypepti-

den I und II sowie der beiden Kupferionen im Polypeptid II stützt diese Annahme^[32]. Die Komplexierung der Kupferionen durch das Polypeptid II wird plausibel, wenn man weiß, daß dessen Aminosäuresequenz der der kupferbindenden Proteine Azurin und Plastocyanin^[113] ähnelt. Das Polypeptid II enthält auch die Bindungsstelle für Cytochrome c, das über dieselben Lysinreste eines definierten Oberflächenbereichs (Lys-8, -13, -72, -87) sowohl an den Elektronenacceptor (Cytochrome aa₃) wie an den Elektronendonator (Cytochrome bc₁) gebunden wird^[114-116]. Aus kinetischen Daten wurde abgeleitet, daß die Cytochrome-c-Oxidase zwei Bindungsstellen für Cytochrome c, eine hochaffine und eine niedrigaffine, enthält^[114, 117]. Die hochaffine Bindungsstelle befindet sich am Polypeptid II, wie durch Quervernetzung mit Cytochrome c mit 3,3'-Dithiobis(succinimidopropionat)^[118] oder mit dem photoreaktiven, am Lys-13 modifizierten, Azido-3-nitrophenyl-cytochrome c^[49, 67, 119] gezeigt werden konnte. Niedrigaffin gebundenes, am Lys-13 oder Lys-22 modifiziertes Cytochrome c bindet dagegen nur an Phospholipide^[49].

Das Polypeptid III scheint den Protonenkanal der Oxidase zu enthalten: Wie bei der ATP-Synthetase^[120] hemmt N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid die Protonentranslokation in rekonstituierten Cytochrome-c-Oxidase-Vesikeln^[21]; damit verbunden ist eine partielle Hemmung der respiratorischen Aktivität und eine spezifische kovalente Bindung an das Polypeptid III^[122, 123]. Somit können alle bekannten funktionellen Aktivitäten der Cytochrome-c-Oxidase (Elektronentransport von Cytochrome c auf O₂ und Protonentranslokation) den drei mitochondrial synthetisierten Polypeptiden I-III zugeordnet werden. Wir bezeichnen sie daher als *katalytische Untereinheiten*. Obwohl bisher keine definierte Funktion der zehn cytoplasmatisch synthetisierten Polypeptide, die mit den Polypeptiden I-III fest assoziiert sind, bekannt ist, sprechen die folgenden Befunde für eine „regulatorische“ oder „modifizierende“ Funktion, die durch konformativ Wechselwirkung mit den katalytischen Untereinheiten I-III zustande kommt.

6. Gewebsspezifische Isoenzyme tierischer Cytochrome-c-Oxidase

Beim Vergleich des Polypeptidmusters bei der SDS-gel-elektrophoretischen Trennung der Cytochrome-c-Oxidase aus Leber und Herz des gleichen Tieres fanden wir unterschiedliche Molekulargewichte für die cytoplasmatisch synthetisierten Polypeptide VIa, VIIa und VIII^[82, 83]. Die Banden wurden aus dem Acrylamidgel eluiert und die N-terminalen Aminosäuresequenzen bestimmt^[124, 125]. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, sind die N-terminalen Sequenzen der Polypeptide VIa, VIIa und VIII aus Rinderleber und Rinderherz zwar unterschiedlich, aber doch sehr ähnlich. Die zwölf N-terminalen Aminosäuren der Polypeptide IV und Va aus dem Rinderleber- und Herzenzym sind dagegen völlig gleich. Daraus lassen sich zwei Schlußfolgerungen ziehen: 1) Für die Polypeptide VIa, VIIa und VIII kommen im Genom des Rindes jeweils zwei verschiedene Gene vor, von denen eines als Leber-, das andere als Herzenzym exprimiert wird. 2) Die Gene stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab, entwickelten sich aber im Laufe der Evolution unabhängig voneinander.

Tabelle 1. Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen einiger Polypeptide der Cytochrome-c-Oxidase aus Rinderherz und Rinderleber. Die Peptide des Enzyms aus Rinderherz wurden durch Gelchromatographie isoliert, diejenigen aus Rinderleber aus den Gelbanden nach SDS-Gelelektrophorese [124, 125].

Poly-peptid	Ge-webe	N-terminale Aminosäuresequenz
IV	Herz	H ₂ N-Ala-His-Gly-Ser-Val-Val-Lys-Ser-Glu-Asp-Tyr-Ala
	Leber	H ₂ N-Ala-His-Gly-Ser-Val-Val-Lys-Ser-Glu-Asp-Tyr-Ala
Va	Herz	H ₂ N-Ser-His-Gly-Ser-His-Glu-Thr-Asp-Glu-Glu-Phe-Asp
	Leber	H ₂ N-Ser-His-Gly-Ser-His-Glu-Thr-Asp-Glu-Glu-Phe-Asp
VIa	Herz	H ₂ N-Ala-Ser-Ala-Ala-Lys-Gly-Asp-His-Gly-Gly-Thr
	Leber	H ₂ N-Ser-Ser-Gly-Ala-Ala-His-Gly-Glu-Glu-Gly-Ser-Ala
VIIa	Herz	H ₂ N-Phe-Glu-Asn-Arg-Val-Ala
	Leber	H ₂ N-Phe-Glu-Asn-Lys-Val-Ala (Phe)
VIII	Herz	H ₂ N-Ile-Thr-Ala-Lys-Pro-Ala
	Leber	H ₂ N-Ile-His-Ser-Lys-Pro-Pro (Phe)

Um die immunologische Verwandtschaft von Polypeptiden der Cytochrome-c-Oxidase aus verschiedenen Organen und Spezies zu untersuchen, wurde die Methode der Immundetektion nach Transfer der Polypeptidbanden auf Nitrocellulose („western blot“) angewendet. Die auf einem Acrylamidgel getrennten Polypeptide werden elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen und mit einem spezifischen Antiserum inkubiert. Polypeptide, die den Antikörper gebunden haben, werden durch Fluorescein-markiertes Protein A, das mit Immunglobulinen einen Komplex bildet, sichtbar gemacht. Dabei fanden wir große Unterschiede in der immunologischen Reaktivität eines Antiseraums gegen Rattenleber-Cytochrome-c-Oxidase mit dem gewebsspezifischen Polypeptid VIa aus verschiedenen Geweben der Ratte (Leber, Herz, Skelettmuskel). Die Reaktivität des Antiseraums mit den gewebspezifischen Polypeptiden I-V aus den gleichen Organen verschiedener Spezies (z. B. Ratte und Amsel) war dagegen sehr ähnlich^[86]. Daraus folgt, daß der Zeitpunkt, an dem die getrennte Evolution gewebsspezifischer Polypeptide der gleichen Spezies begann, weit früher liegen muß als der Zeitpunkt, von dem an sich Säugetiere und Vögel getrennt entwickelten.

7. Cytoplasmatisch synthetisierte Polypeptide IV-VIII – Modulatoren der katalytischen Aktivität

Die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Polypeptide VIa, VIIa und VIII in Leber und Herz beeinflussen die katalytische Aktivität der Cytochrome-c-Oxidase: Das Enzym aus Rinderleber zeigt gegenüber dem aus Rinderherz eine höhere maximale Anfangsgeschwindigkeit V_{max} sowie unterschiedliche K_m -Werte, sowohl für die hochaffine als auch für die niedrigaffine Bindungsstelle für Cytochrome c. Diese Unterschiede treten an intakten Membranen, an desoxycholatgelösten Membranen und auch am isolierten Enzym auf^[126].

Die physiologische Bedeutung dieser Unterschiede könnte in der verschiedenen Enzymausstattung von Leber- und Herzmitochondrien begründet sein. In der äußeren Membran von Lebermitochondrien wurde eine NADH-

Cytochrom- b_5 -Reduktase nachgewiesen, die extramitochondriales NADH zu oxidieren vermag^[127-129]. Im Intermembranraum von Lebermitochondrien wurde eine lösliche Sulfit-Oxidase gefunden, die Molybdäanionen und ein b_5 -Typ-Häm als prosthetische Gruppen enthält und Sulfat zu Sulfat oxidiert^[130-133]. Die Sulfat-Oxidase ist die terminale Stufe des Schwefelmetabolismus in höheren Tieren; diese kann etwa 20% des Sauerstoffverbrauchs der Leber ausmachen (maximale Sulfatoxidationsrate der perfundierten Rattenleber bei 30 °C: 1.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[132]; O₂-Verbrauch der Rattenleber in vivo: ca. 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[134]). Die Sulfat-Oxidase und die NADH-Cytochrom- b_5 -Reduktase übertragen in Lebermitochondrien zusätzlich zum Cytochrom- bc_1 -Komplex der Atmungskette Elektronen über Cytochrom c auf die Oxidase (Fig. 5).

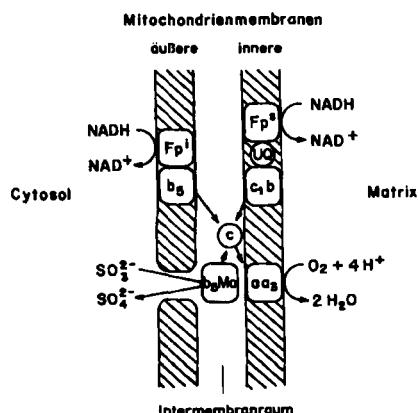


Fig. 5. Schematische Darstellung der Elektronentransportwege über Cytochrom c zur Cytochrom-c-Oxidase in Lebermitochondrien. Cytochrom c₀, ein kleines, wasserlösliches Protein, das im Intermembranraum lokalisiert ist, überträgt in allen Mitochondrien Elektronen vom Cytochrom- bc_1 -Komplex auf die Cytochrom-c-Oxidase (aa₃). In Lebermitochondrien können auch Elektronen von der Rotenon-insensitiven NADH-Dehydrogenase der äußeren Membran (Fp¹) über Cytochrom b₅ (b₅), und von der im Intermembranraum lokalisierten Sulfat-Oxidase (b₅Mo) über Cytochrom c auf die Cytochrom-c-Oxidase übertragen werden. Fp¹: Rotenon-sensitive NADH-Dehydrogenase; UQ: Ubichinon.

Lebermitochondrien scheinen diesen zusätzlichen Elektronendonoren angepaßt zu sein: das Verhältnis von Cytochrom c + Cytochrom c₁ zu Cytochrom aa₃ ist größer als z. B. in Herzmitochondrien (Tabelle 2). Die unterschiedliche katalytische Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase aus Leber und Herz^[126] könnte in den Unterschieden der Elektronentransportwege begründet sein.

Inkubiert man isolierte Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz mit Trypsin, so werden das Polypeptid I etwa zur

Tabelle 2. Das Verhältnis der Gehalte [nmol/mg Mitochondrienprotein] an Cytochrom c + c₁ zu Cytochrom aa₃ ist in Leber- und Herzmitochondrien verschieden.

Gewebe	c + c ₁	aa ₃	(c + c ₁)/aa ₃	Lit.
Rinderleber	0.23	0.08	2.9	[126]
Rinderherz	0.47	0.68	0.69	[126]
Rattenleber	0.38	0.27	1.4	[135]
Rattenherz	0.83	0.98	0.85	[135]
Huhnleber	0.44	0.36	1.2	[135]
Huhnherz	0.49	0.63	0.78	[135]

Hälfte und die Polypeptide VIa, VIb und VIc vollständig gespalten, während die übrigen Polypeptide unverändert bleiben^[83]. Dabei wird die Affinität zu Cytochrom c auf die Hälfte reduziert und V_{max} erhöht (Fig. 6). Dieses Ergebnis deutet auf einen modifizierenden Einfluß der Polypeptide VIa, VIb und/oder VIc auf die katalytische Aktivität des Enzyms hin.

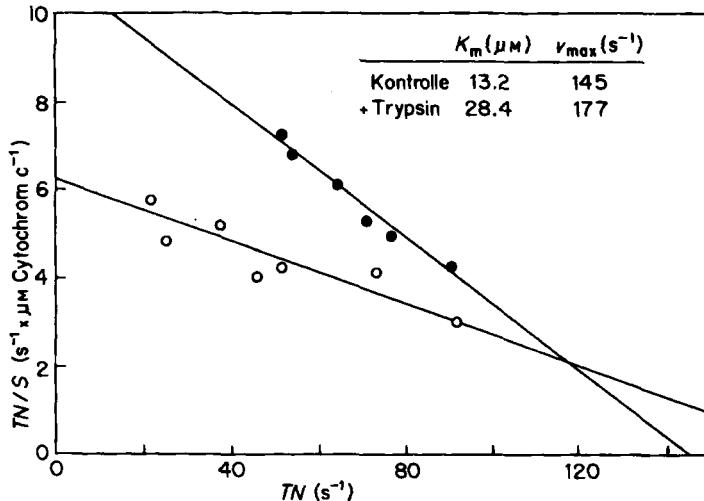


Fig. 6. Wirkung von Trypsin auf die kinetischen Eigenschaften der Cytochrom-c-Oxidase. Isolierte Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz (2 mg/mL) wurde in 2proz. Na-Cholat-Lösung, die 20 mg/mL Asolectin und 50 mM Na-phosphat enthält, bei pH 7.6 gelöst und 30 min in Gegenwart oder Abwesenheit von 0.02 mg/mL DPCC-Trypsin bei 23 °C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde photometrisch mit 2-20 μM reduziertem Cytochrom c gemessen [135]. In der reziproken Darstellung nach Eadie-Hofstee sind die molekularen Aktivitäten (TN) in mol Cytochrom c \times s^{-1} pro mol Cytochrom-c-Oxidase angegeben. S: Cytochrom-c-Konzentration. ● Kontrolle; ○ + Trypsin.

Isolierte Cytochrom-c-Oxidase aus Rattenleber wurde mit Dimethyl-3,3'-dithiobis(propionimidat), einem spaltbaren Quervernetzungsreagens, inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese in Abwesenheit und in Gegenwart von β -Mercaptoethanol, das die Addukte wieder spaltet, analysiert. Die Polypeptide VIa und VIb zeigten nur Quervernetzungen mit den Polypeptiden II und Va, Polypeptid VIc nur mit Polypeptid II^[136]. Dies deutet auf eine enge Nachbarschaft der Polypeptide VIa, VIb und VIc zum Polypeptid II hin, das die Bindungsstelle für Cytochrom c enthält. Diese Annahme wird durch Befunde von Bisson und Montecucco erhärtet, die nach Quervernetzung des Cytochrom-c-Cytochrom-c-Oxidase-Komplexes nicht nur Addukte zwischen Cytochrom c und dem Polypeptid II, sondern auch zwischen Cytochrom c und den Polypeptiden VIa, VIb und/oder VIc gefunden haben^[137].

Diese Ergebnisse deuten auf eine „regulatorische“ oder „modifizierende“ Wirkung der cytoplasmatisch synthetisierten Polypeptide hin. Ihre physiologische Bedeutung läßt sich bisher nur vermuten: Die Atmung, normalerweise durch das Angebot an ADP^[138] reguliert („Atmungskontrolle“), könnte je nach Substratangebot (intramitochondriales NADH, Sulfat, extramitochondriales NADH) zusätzlich gewebsspezifisch reguliert werden. Einige Polypeptide könnten als substratspezifische Rezeptoren wirken, die konformativ die Aktivität modifizieren. Die

Kopplung von Atmung und Protonentranslokation könnte variabel sein^[24] und durch gewebsspezifische Polypeptide, die z. B. Rezeptoren für zelluläre Effektoren sind (cAMP, cGMP, Ca^{2+} , P_i , Schilddrüsenhormone etc.), reguliert werden. Durch partielle „Entkopplung“ von Elektronen- und Protonentransport würde mehr Wärme produziert werden. Dadurch wäre eine gewebsspezifische Regulation der Thermogenese denkbar.

8. Die Evolution der Cytochrom-c-Oxidase

Beim Vergleich der Cytochrom-c-Oxidases aus Säugetieren mit denen aus Prokaryoten fällt eine erstaunliche strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit auf, die im Verlauf einer mehr als zwei Milliarden Jahre währenden, unabhängigen Evolution erhalten blieb: 1) Beide Enzyme reagieren mit „tierischem Cytochrom c“, wenn auch mit unterschiedlicher Aktivität^[25, 100]. 2) Das aktive Zentrum beider Enzyme enthält zwei Häm-a-Gruppen und zwei Kupferionen^[25]. 3) Der Elektronentransport von Cytochrom c auf O_2 ist in beiden Fällen mit einer aktiven Protonentranslokation durch die Membran gekoppelt^[40, 45, 46, 106]. Diese Einheitlichkeit der Atmung in den meisten aeroben Organismen wurde bereits von *Otto Warburg* erkannt, der 1928 schrieb^[139]: „Entsprechend gibt es in der Natur nicht nur 1 Atmungsferment, aber der Mechanismus der Atmung in einem bestimmten Falle ist, wie der Mechanismus des Sauerstofftransports, ein bestimmter und einheitlich. Wie zum Transport des Sauerstoffs, so benutzt die Natur zur Verbrennung durch Sauerstoff vorwie-

tät des Enzyms, die sich in einer zunehmenden Zahl von „Untereinheiten“ niederschlägt. Während die gleiche Funktion (O_2 -Reduktion und Protonentranslokation) beim prokaryotischen Enzym von zwei oder drei Polypeptiden bewirkt wird, sind beim eukaryotischen Einzeller sieben oder acht Polypeptide daran beteiligt. Die Differenzierung zu vielzelligen Organismen mit spezifischen Organen ist mit einer weiteren Zunahme der Polypeptidzahl, bei Säugetieren bis auf dreizehn, sowie mit einer Multiplikation und unabhängigen Evolution gewebsspezifischer Polypeptide innerhalb desselben Organismus verbunden (Fig. 7).

Betrachten wir die mitochondrial synthetisierten Polypeptide I-III als „katalytische“ und die cytoplasmatisch synthetisierten als „regulatorische“ oder „modifizierende“ Untereinheiten des Enzymkomplexes, so zeigt sich die Evolution der Cytochrom-c-Oxidase als eine Zunahme an regulatorischer Kapazität. Hier wird ein allgemeines Prinzip der Evolution biologischer Systeme deutlich: Die Grundprinzipien des Energie- und Metabolitstoffwechsels (Atmung, Glykolyse) sowie der Informationsspeicherung und -expression (DNA-Replikation, Proteinsynthese) sind in allen Lebewesen im Verlauf der Evolution weitgehend unverändert geblieben. Verändert hat sich jedoch die Regulierbarkeit der einzelnen Schritte, die in organdifferenzierten Lebewesen zu extrem komplizierten Mechanismen geführt hat (z. B. Regulation von Glykogensynthese und -abbau^[140, 141]).

9. Ausblick

Seit der Entdeckung des Atmungsferments durch *Otto Warburg* in den zwanziger Jahren sind unsere Kenntnisse über dieses Enzym außerordentlich gewachsen. Doch mit jeder neuen Erkenntnis nahm die Zahl der ungelösten Probleme zu. Gegenwärtig werden vor allem die Struktur des aktiven Zentrums und der Mechanismus der O_2 -Reduktion untersucht; hier ist eine umfassende Deutung in absehbarer Zeit zu erwarten. Wesentlich schwieriger erscheint dagegen die Untersuchung der Kopplung von Elektronen- und Protonentransport im Cytochrom-c-Oxidase-Komplex. Bisher konnte der Mechanismus des gerichteten Protonentransports noch für keines der dafür zuständigen Membranenzyme aufgeklärt werden, obwohl für ein Enzym (Bacteriorhodopsin) sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Raumstruktur bekannt sind. Von besonderem Interesse ist das Vorkommen von Isoenzymen der Cytochrom-c-Oxidase in verschiedenen Organen höherer Tiere, die sich in ihren katalytischen und strukturellen Eigenschaften unterscheiden. Die in diesem Fortschrittsbericht erörterten Unterschiede deuten auf eine komplexe Regulation des Enzyms hin. Intensive Forschungen, sowohl im Hinblick auf die strukturellen Unterschiede der Polypeptide als auch auf die funktionelle Bedeutung der einzelnen Untereinheiten, sind erforderlich, um die Anpassung der Atmung und der daran gekoppelten ATP-Synthese an die spezifischen Erfordernisse in den einzelnen Geweben höherer Organismen zu verstehen.

Ich danke Prof. R. Thauer für hilfreiche Kritik, Frau Röller-Müller für das Schreiben des Manuskripts, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 103, A2) für Sach- und Perso-

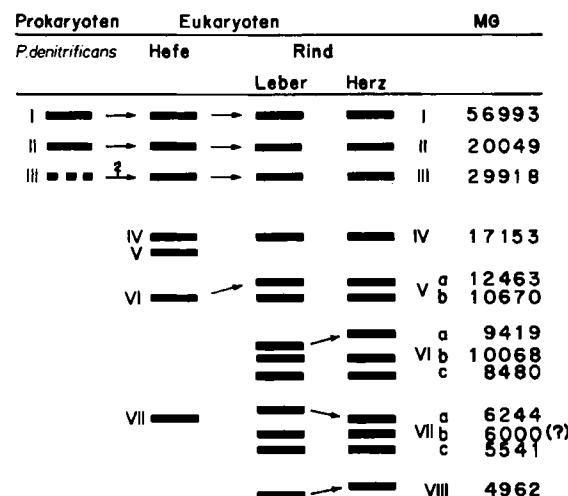


Fig. 7. Die Evolution des Cytochrome-c-Oxidase-Komplexes. Die Banden stellen individuelle Polypeptide dar, die den Banden bei der SDS-Gelektrophorese entsprechen. MG ist das aus DNA-Sequenz (I, III) oder Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht der Rinderherzpolypeptide[85]. Die Pfeile geben „evolutionäre Verwandtschaft“ an. Die Verwandtschaft der übrigen Banden zwischen dem Rinderleber- und dem Herzenzym ist noch nicht nachgewiesen. Es besteht eine Homologie von Polypeptid VI aus Hefe und V aus Rinderherz [142].

gend einen Mechanismus. Denn das Atmungsferment in Hefezellen und Chorion, in Leberzellen und Blutplättchen, in Leucocyten und Seeigeleiern verhält sich im Prinzip gleich“.

Trotzdem finden wir mit zunehmender Differenzierung und Spezialisierung der Zellen eine wachsende Komplexi-

Eingegangen am 20. Oktober 1982,
in veränderter Fassung am 24. Januar 1983 [A 449]

- [1] O. Warburg, *Biochem. Z.* 152 (1924) 479.
 [2] D. Keilin, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 98 (1925) 312.
 [3] O. Warburg, *Angew. Chem.* 45 (1932) 1.
 [4] T. Yonetani, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 845.
 [5] C. A. McMunn, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 177 (1886) 267.
 [6] C. A. McMunn, *J. Physiol. London* 8 (1887) 57.
 [7] O. Warburg, *Biochem. Z.* 207 (1929) 494.
 [8] D. Keilin, E. F. Hartree, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 127 (1939) 167.
 [9] J. Keilin: *The History of Cell Respiration and Cytochromes*. Cambridge University Press, Cambridge 1966.
 [10] E. C. Slater, B. V. Van Gelder, K. Minnaert in T. E. King, H. S. Mason, M. Morrison: *Oxidases and Related Redox Systems*. Wiley, New York 1965, S. 667.
 [11] M. R. Lemberg, *Physiol. Rev.* 49 (1969) 48.
 [12] R. Lemberg, J. Barrett: *Cytochromes*. Academic Press, New York 1973, S. 17.
 [13] B. G. Malmström, *Q. Rev. Biophys.* 6 (1973) 389.
 [14] P. Nicholls, B. Chance in D. Hayashi: *Molecular Mechanism of Oxygen Activation*. Academic Press, New York 1974, S. 479.
 [15] M. Florkin in M. Florkin, E. H. Stotz: *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 31. Elsevier, Amsterdam 1975, S. 187.
 [16] W. S. Caughey, W. J. Wallace, J. A. Volpe, S. Yoshikawa in P. D. Boyer: *The Enzymes*, 3. Aufl., Vol. 13C. Academic Press, New York 1976, S. 299.
 [17] R. A. Capaldi, M. Briggs in A. Martonosi: *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol. 4. Wiley, New York 1976, S. 87.
 [18] M. K. F. Wikström, H. J. Harmon, W. J. Ingledew, B. Chance, *FEBS Lett.* 65 (1976) 259.
 [19] M. Erecinska, D. F. Wilson, *Arch. Biochem. Biophys.* 188 (1978) 1.
 [20] B. G. Malmström, *Biochim. Biophys. Acta* 549 (1979) 281.
 [21] M. Wikström, K. Krab, *Biochim. Biophys. Acta* 549 (1979) 177.
 [22] A. Azzi, R. P. Casey, *Mol. Cell. Biochem.* 28 (1979) 169.
 [23] A. Azzi, *Biochim. Biophys. Acta* 594 (1980) 231.
 [24] B. Kadenbach, P. Merle, *FEBS Lett.* 135 (1981) 1.
 [25] B. Ludwig, *Biochim. Biophys. Acta* 594 (1980) 177.
 [26] M. Wikström, K. Krab, M. Saraste: *Cytochrome Oxidase. A Synthesis*. Academic Press, London 1981.
 [27] G. von Jagow, W. D. Engel, *Angew. Chem.* 92 (1980) 684; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 (1980) 659.
 [28] P. Mitchell, *Biol. Rev.* 41 (1966) 445.
 [29] N. C. Robinson, F. Strey, L. Talbert, *Biochemistry* 19 (1980) 3656.
 [30] M. Frey, D. E. Green, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93 (1980) 1238.
 [31] N. C. Robinson, *Biochemistry* 21 (1982) 184.
 [32] D. B. Winter, W. J. Bruyninckx, F. G. Foulke, N. P. Grinich, H. S. Mason, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11408.
 [33] T. Ohnishi, R. LoBrutto, J. C. Salerno, R. C. Bruckner, T. G. Frey, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
 [34] Siehe Diskussion in [26], S. 34–38.
 [35] C. Greenwood, Q. H. Gibson, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1782.
 [36] L. Powers, B. Chance, Y. Ching, P. Angiolillo, *Biophys. J.* 34 (1981) 465.
 [37] M. Brunori, M. T. Wilson, *Trends Biochem. Sci.* 1982, 295.
 [38] R. Henderson, R. A. Capaldi, J. S. Leigh, *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 631.
 [39] S. D. Fuller, R. A. Capaldi, R. Henderson, *J. Mol. Biol.* 134 (1979) 305.
 [40] E. Sigel, E. Carafoli, *Eur. J. Biochem.* 111 (1980) 299.
 [41] J. Moyle, P. Mitchell, *FEBS Lett.* 88 (1978) 268.
 [42] M. Wikström, K. Krab, *FEBS Lett.* 91 (1978) 8.
 [43] M. Wikström, *Nature* 266 (1977) 271.
 [44] M. Wikström, H. T. Saari, *Biochim. Biophys. Acta* 462 (1977) 347.
 [45] K. Krab, M. Wikström, *Biochim. Biophys. Acta* 504 (1978) 200.
 [46] R. P. Casey, J. B. Chappel, A. Azzi, *Biochem. J.* 182 (1979) 149.
 [47] R. A. Capaldi, M. Briggs in A. Martonosi: *The Enzymes of Biological Membranes*. Wiley, London 1976, S. 87.
 [48] N. C. Robinson, R. A. Capaldi, *Biochemistry* 16 (1977) 375.
 [49] R. Bisson, B. Jacobs, R. A. Capaldi, *Biochemistry* 19 (1980) 4173.
 [50] M. T. Wilson, W. Lalla-Maharajh, V. M. Darley-Usmar, J. Bonaventura, C. Bonaventura, M. Brunori, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 2722.
 [51] V. M. Darley-Usmar, N. Alizai, A. I. Al-Ayash, G. D. Jones, A. Sharpe, M. T. Wilson, *Comp. Biochem. Physiol. B* 68 (1981) 445.
 [52] M. Höchli, C. R. Hackenbrock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 1236.
 [53] H. Schneider, J. J. Lemasters, M. Höchli, C. R. Hackenbrock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 442.
 [54] S. Kawato, E. Sigel, E. Carafoli, K. J. Cherry, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 5508.
 [55] M. S. Swanson, A. T. Quintanilha, D. D. Thomas, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7494.
 [56] B. H. Ariano, A. Azzi, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 93 (1980) 478.
 [57] G. Buse, G. J. Steffens, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 1005.
 [58] F. E. A. M. Verheul, J. C. P. Boomman, J. W. Draijer, A. O. Muijsers, D. Borden, G. E. Tarr, E. Margoliash, *Biochim. Biophys. Acta* 548 (1979) 397.
 [59] U. K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680.
 [60] N. W. Dower, N. C. Robinson, R. A. Capaldi, *Biochemistry* 15 (1976) 230.
 [61] M. S. Rubin, A. Tzagoloff, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 4269.
 [62] R. Poyton, G. Schatz, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 752.
 [63] G. Schatz, T. L. Mason, *Annu. Rev. Biochem.* 43 (1974) 51.
 [64] C.-A. Yu, L. Yu, *Biochim. Biophys. Acta* 495 (1977) 248.
 [65] S. H. P. Chan, R. P. Tracy, *Eur. J. Biochem.* 89 (1978) 595.
 [66] L. Höchli, C. R. Hackenbrock, *Biochemistry* 17 (1978) 3712.
 [67] R. Bisson, A. Azzi, H. Gutweniger, R. Colonna, C. Montecucco, A. Zanotti, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1874.
 [68] T. G. Frey, S. H. P. Chan, G. Schatz, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 4389.
 [69] B. Ludwig, N. W. Dower, R. A. Capaldi, *Biochemistry* 18 (1979) 1401.
 [70] T. Nagasawa, H. Nagasawa-Fujimori, P. C. Heinrich, *Eur. J. Biochem.* 94 (1979) 31.
 [71] J. F. Hare, E. Ching, G. Attardi, *Biochemistry* 19 (1980) 2033.
 [72] M. Swanson, L. Packer, *Arch. Biochem. Biophys.* 204 (1980) 30.
 [73] M. Frey, D. E. Green, *J. Bioenerg. Biomembr.* 13 (1981) 61.
 [74] J. Kolarov, A. Wielburski, I. Mendel-Hartwig, B. D. Nelson, *Biochim. Biophys. Acta* 652 (1981) 334.
 [75] Y.-H. Wei, T. E. King, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 10999.
 [76] J. R. Bucher, R. Penniall, *FEBS Lett.* 60 (1975) 180.
 [77] E. Hundt, B. Kadenbach, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358 (1977) 1309.
 [78] C. Bonaventura, J. Bonaventura, M. Brunori, M. Wilson, *FEBS Lett.* 85 (1978) 30.
 [79] R. D. Poyton, E. McKemmie, C. George-Nascimento, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6303.
 [80] B. Kadenbach, J. Jarausch, R. Hartmann, P. Merle, *Anal. Biochem.* 129 (1983), im Druck.
 [81] P. Merle, B. Kadenbach, *Eur. J. Biochem.* 105 (1980) 499.
 [82] P. Merle, B. Kadenbach, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361 (1980) 1257.
 [83] B. Kadenbach, U. Büge, J. Jarausch, P. Merle in F. Palmieri, E. Quagliariello, N. Siliprandi, E. C. Slater: *Vectorial Reactions in Electron and Ion Transport in Mitochondria and Bacteria*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1981, S. 11.
 [84] P. Merle, J. Jarausch, M. Trappe, R. Scherka, B. Kadenbach, *Biochim. Biophys. Acta* 669 (1981) 222.
 [85] G. Buse, G. C. M. Steffens, G. J. Steffens, L. Meinecke, R. Biewald, M. Erdweg, *Eur. Bioenerg. Conf. Rep.* 2 (1982) 163.
 [86] J. Jarausch, B. Kadenbach, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 1133.
 [87] W. Sebald, W. Machleidt, J. Otto, *Eur. J. Biochem.* 38 (1973) 311.
 [88] S. Werner, *Eur. J. Biochem.* 79 (1977) 103.
 [89] H. Weiss, A. J. Schwab, S. Werner in A. Tzagoloff: *Membrane Biogenesis*. Plenum, London 1975, S. 125.
 [90] G. Koch, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 6097.
 [91] R. W. Yatcoff, K. G. Freeman, W. J. Vail, *FEBS Lett.* 81 (1977) 7.
 [92] J. D. Bernstein, J. R. Bucher, R. Penniall, *J. Bioenerg. Biomembr.* 10 (1978) 59.
 [93] E. Hundt, M. Trapp, B. Kadenbach, *FEBS Lett.* 115 (1980) 95.
 [94] J. Kolarov, S. Kuzela, A. Wielburski, B. D. Nelson, *FEBS Lett.* 126 (1981) 61.
 [95] A. S. Lewin, I. Gregor, T. L. Mason, N. Nelson, G. Schatz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3998.
 [96] K. Mihara, G. Blobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4160.
 [97] E. Schmelzer, P. C. Heinrich, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7503.
 [98] S. Parimoo, G. Padmanaban, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 1673.
 [99] E. Schmelzer, W. Northemann, B. Kadenbach, P. C. Heinrich, *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 177.
 [100] B. Ludwig, G. Schatz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 196.
 [101] T. Amanaka, K. Fujii, Y. Kanuta, *J. Biochem.* 86 (1979) 821.
 [102] T. Yamanaka, K. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta* 591 (1980) 53.
 [103] J. A. Fee, M. G. Choc, K. L. Findling, R. Lorence, T. Yoshida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 141.
 [104] R. B. Gennis, R. P. Casey, A. Azzi, B. Ludwig, *Eur. J. Biochem.* 125 (1982) 189.
 [105] A. Azzi, K. Bill, R. Bolli, C. Broger, R. P. Casey, M. Corbley, *Eur. Bioenerg. Conf. Rep.* 2 (1982) 125.
 [106] M. Solioz, E. Carafoli, B. Ludwig, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 1579.
 [107] G. Coruzzi, A. Tzagoloff, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 9324.
 [108] T. D. Fox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 6534.
 [109] B. E. Thalenfeld, A. Tzagoloff, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 6173.

- [110] S. G. Bonitz, G. Coruzzi, B. E. Thalenfeld, A. Tzagoloff, G. Macino, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11927.
- [111] S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Brujin, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, I. G. Young, *Nature* 290 (1981) 457.
- [112] S. Anderson, M. H. L. de Brujin, A. R. Coulson, I. C. Eperon, F. Sanger, I. G. Young, *J. Mol. Biol.* 156 (1982) 683.
- [113] G. Steffens, G. Buse, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360 (1979) 613.
- [114] S. Ferguson-Miller, D. L. Brautigan, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 149.
- [115] H. T. Smith, N. Staudenmayer, F. Millet, *Biochemistry* 16 (1977) 4971.
- [116] R. Rieder, H. R. Bosshard, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4732.
- [117] S. Ferguson-Miller, D. L. Brautigan, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 1104.
- [118] M. M. Briggs, R. A. Capaldi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978) 553.
- [119] R. Bisson, H. Gutweniger, C. Montecucco, R. Colonna, A. Zanotti, A. Azzi, *FEBS Lett.* 81 (1977) 147.
- [120] R. B. Beechy, A. M. Roberton, C. T. Holloway, I. G. Knight, *Biochemistry* 6 (1969) 3867.
- [121] R. P. Casey, M. Thelen, A. Azzi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 (1979) 1044.
- [122] R. P. Casey, M. Thelen, A. Azzi, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 3994.
- [123] L. J. Prochaska, R. Bisson, R. A. Capaldi, G. C. M. Steffens, G. Buse, *Biochim. Biophys. Acta* 637 (1981) 360.
- [124] B. Kadenbach, R. Hartmann, R. Glanville, G. Buse, *FEBS Lett.* 138 (1982) 236.
- [125] G. Buse, B. Kadenbach, unveröffentlicht.
- [126] P. Merle, B. Kadenbach, *Eur. J. Biochem.* 125 (1982) 239.
- [127] P. Bernardi, G. F. Azzone, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7187.
- [128] A. A. Jasaitis, Z. J. Krivickiene, *Eur. Bioenerg. Conf. Rep.* 1 (1980) 111.
- [129] P. Bernardi, G. F. Azzone, *Biochim. Biophys. Acta* 679 (1982) 19.
- [130] M. Heimberg, J. Fridovich, P. Handler, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 913.
- [131] J. L. Johnson, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 2017.
- [132] N. Oshino, B. Chance, *Arch. Biochem. Biophys.* 170 (1975) 514.
- [133] S. H. Speck, W. H. Koppenol, J. D. Dethmers, N. Osheroff, E. Margoliash, K. V. Rajagopalan, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7394.
- [134] M. Sato, M. Shichiri, N. Hayashi, T. Kamada, H. Abe, B. Hagihara in T. E. King, J. Orii, B. Chance, K. Okunuki: *Cytochrome Oxidase*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979, S. 319.
- [135] J. N. Williams, *Biochim. Biophys. Acta* 162 (1968) 175.
- [136] J. Jarausch, B. Kadenbach, unveröffentlicht.
- [137] R. Bisson, C. Montecucco, *FEBS Lett.* 150 (1982) 49.
- [138] W. E. Jacobus, R. W. Moreadith, K. M. Vandegaer, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2397.
- [139] O. Warburg, *Biochem. Z.* 201 (1928) 486.
- [140] P. B. Chock, S. G. Rhee, E. R. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 813.
- [141] R. J. Fletterick, N. B. Madsen, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 31.
- [142] I. Gregor, A. Tsugita, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13081.

Proximitätseffekte in der Organischen Chemie – Die photoelektronenspektroskopische Untersuchung nichtbindender und transanularer Wechselwirkungen**

Von Hans-Dieter Martin* und Bernhard Mayer

Klassische Strukturformeln vermitteln häufig die Vorstellung, *einzig und allein* jene Beziehungen zwischen den Atomen seien von Bedeutung, welche für den Zusammenhalt des Moleküls sorgen und durch Bindungsstriche wiedergegeben werden. Viele Wechselwirkungen zwischen Atomen oder Atomgruppen werden jedoch durch diese Schreibweise nicht erfaßt. Ihre Anwesenheit hat dennoch mitunter wichtige Konsequenzen für *Grundzustandsenergien* (*cis*-Difluorethen ist stabiler als *trans*-Difluorethen), *Konformationen* (*syn*-Methylvinylether ist stabiler als die *anti*-Form), *Reaktivitäten* (ein *endo*-ständiger Cyclopropanring in 7-*anti*-Norbornylderivaten beschleunigt die Solvolyse um den Faktor 10¹⁴), *UV-Spektren* (die π -Systeme von Acridin und Purin – durch eine viergliedrige Kette verbunden – ergeben beim „Übereinanderlegen“ Hypochromie), *CD-Spektren* (der inhärent symmetrische, disymmetrisch gestörte Chromophor von 2-Deuterionorbornadien lässt drei Übergänge im nahen UV erkennen) und *ESR-Spektren* (die Fernkopplung mit H-4 im Brückenkopf-Radikal Bicyclo[2.1.1]hex-1-yl beträgt 22.5 G). An den meisten intramolekularen Effekten dieser Art sind Orbitalwechselwirkungen beteiligt; die *Photoelektronenspektroskopie* hat sich wie erwartet als aussagekräftige und wertvolle Ergänzung der anderen Methoden erwiesen.

1. Einleitung

1.1. Substituenteneffekte

Die auf Erfahrung beruhende Erkenntnis, daß funktionelle Gruppen das Reaktionsverhalten organischer Verbin-

dungen entscheidend bestimmen, hat zur Formulierung von Substituenteneffekten geführt, die sich grob in drei Kategorien einteilen lassen: Polare oder elektrostatische Effekte sowie Konjugationseffekte und sterische Effekte^[1]. Die literaturfüllende Diskussion der polaren Effekte und ihre Unterteilung in induktive Komponenten (durch die Bindungen) und Feldanteile (durch den Raum) ist bedeutsam^[2], für unsere Zwecke aber weniger entscheidend. Die klassische π -Konjugation und π -Delokalisation kann innerhalb der Gruppen oder Chromophore, die nichtbindend in Wechselwirkung treten, vorhanden oder abwesend sein. Sterische Effekte (sterische Hinderung) werden im allgemeinen mit nichtbindender Kompression und Absto-

[*] Prof. Dr. H.-D. Martin, B. Mayer
Institut für Organische Chemie I der Universität
Universitätsstraße 1, D-4000 Düsseldorf

[**] Der Terminus „Nachbargruppenbeteiligung“ ist den Wechselwirkungen zwischen einem Substituenten und einem Reaktionszentrum durch den Raum vorbehalten [19]; in diesem Beitrag werden alle Wechselwirkungen zwischen nicht direkt benachbarten Gruppen oder Orbitalen – unabhängig davon, ob es sich um „through space“- oder „through bond“-Wechselwirkungen handelt – als Proximitätseffekte bezeichnet.