



Doctoral Thesis

Functional studies on mitochondrial cytochrome c oxidase in natural and reconstituted membrane systems

Author(s):

Sigel, Erwin

Publication Date:

1980

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000210671> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH No 6693

FUNCTIONAL STUDIES ON MITOCHONDRIAL
CYTOCHROME *c* OXIDASE
IN NATURAL AND RECONSTITUTED MEMBRANE SYSTEMS

A DISSERTATION SUBMITTED TO THE
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

PRESENTED BY
ERWIN SIGEL
DIPL.NATW.ETH
BORN 13th FEBRUARY 1952
CITIZEN OF BUENZEN, AARGAU

ACCEPTED ON THE RECOMMANDATION OF
PROF. E. CARAFOLI, REFEREE
PROF. K.H. WINTERHALTER, CO-REFEREE

1980

SUMMARY

A)

1. A system for the simultaneous measurement with a pH, an oxygen and an ion selective liquid membrane electrode has been developed. The 90% response times of all the measured parameters was below 0.8s at 25°C.
2. The system has been used for the determination of the proton to electron and the charge to electron stoichiometry of cytochrome c oxidase in the inner membrane of rat liver mitochondria and of beef heart cytochrome c oxidase reconstituted into phospholipid vesicles. The measurement was based on initial rate determinations after a pulse of ascorbate/N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylene diamine.
3. 0.6-0.8 protons were ejected in the external medium and 1.8-2.1 potassium ions were taken up in the presence of valinomycin by mitochondria or liposomes, respectively, when one electron was transferred from cytochrome c to oxygen.
4. Net proton extrusion could be observed for up to 11 turnovers of the enzyme (11 O₂/aa₃) in the reconstituted system.
5. It is concluded that cytochrome c oxidase operates as a redox-driven proton pump.

B)

A transient dichroism is detected after photolysis by a linearly polarized laser flash of the cytochrome c oxidase-CO complex in beef heart mitochondria, beef heart submitochondrial particles, rat heart mitochondria and in phospho-

lipid vesicles reconstituted with beef heart cytochrome c oxidase. A decay in the absorption anisotropy is characterized by a time constant of about 300-600 μ s. Since vesicle tumbling in the time range of less than 50 ms can be excluded in these experiments, it is concluded that cytochrome c oxidase rotates in the natural and in the reconstituted membrane with a relaxation time of several hundred microseconds. Whereas in the reconstituted membrane with a high phospholipid to protein ratio (30:1, by weight) all cytochrome c oxidase is mobile, a fraction of the enzyme seemed to be relatively immobile in mitochondria, submitochondrial particles (both ca. 40%) and in a reconstituted system with a low phospholipid to protein ratio (5:1). The fraction of mobile cytochrome c oxidase in the reconstituted system was not influenced by coreconstitution with the bc_1 complex in the presence or absence of cytochrome c.

ZUSAMMENFASSUNG

A)

1. Ein System für die gleichzeitige Messung mittels einer pH-, einer Sauerstoff- und einer ionenspezifischen Flüssigmembran-Elektrode wurde entwickelt. Die Antwortzeit (90%) aller Parameter lag unter 0.8 sec bei 25°C.
2. Dieses System wurde für die Bestimmung der Protonen zu Elektronen und Ladungen zu Elektronen Stöchiometrie verwendet. Die Messung basierte auf Bestimmungen der Anfangsgeschwindigkeiten nach der Zugabe von Ascorbat/Wurster's Blau zu intakten Mitochondrien einerseits und andererseits zu Rinderherz-Cytochromoxidase die in Phospholipidvesikeln rekonstituiert worden war.
3. Während des Transfers eines Elektrons von Cytochrom c zu Sauerstoff wurden in Gegenwart von Valinomycin 0.6-0.8 Protonen ins Aussenmedium abgegeben und 1.8-2.1 Kalium Ionen in die Vesikel aufgenommen.
4. Die Protonenabgabe der Vesikel konnte im rekonstituierten System während bis zu 11 Umsätzen des Enzyms ($11 \text{ O}_2/\text{aa}_3$) beobachtet werden.
5. Daraus kann gefolgert werden dass die Cytochromoxidase als Protonenpumpe funktioniert die von Redox-Reaktionen getrieben wird.

B)

Nach der Photolyse des Cytochromoxidase-CO Komplexes durch einen linear polarisierten Laserblitz wurde in Mitochondrien, submitochondrialen Partikeln und im rekonstituierten System ein transientser Dichroismus beobachtet. Der Zerfall der Absorptionsanisotropie ist durch eine Zeitkonstante von ca.

300-600 μ sec charakterisiert. Da Vesikelrotation im Zeitraum von 50 msec ausgeschlossen werden kann, zeigt dieses Resultat, dass die Cytochromoxidase sowohl in der natürlichen Membran als auch in der rekonstituierten Membran mit einer Relaxationszeit von mehreren hundert Microsekunden rotiert. Im rekonstituierten System mit einem hohen Phospholipid zu Protein Verhältnis (30:1) waren 100% der Cytochromoxidasemoleküle beweglich. Im Gegensatz dazu war in Mitochondrien, in submitochondrialen Partikeln, und im rekonstituierten System mit einem tiefen Phospholipid zu Protein Verhältnis (5:1) ein Teil der Cytochromoxidasemoleküle immobil (15-40%). Der Anteil an immobilen Cytochromoxidase war durch Korekonstitution mit Komplex III der Atmungskette nicht beeinflusst.