

Diss. ETH No. 7676

# **ON THE MECHANISM OF PROTON - TRANSLOCATION BY CYTOCHROME C OXIDASE**

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

PRESENTED BY  
IRENE BEATRICE PUETTNER  
DIPL. NATW. ETH  
BORN 26th JUNE 1956  
CITIZEN OF LANGNAU, ZURICH

ACCEPTED ON THE RECOMMENDATION OF

PROF. E. CARAFOLI, EXAMINER

PROF. G. SCHATZ, CO-EXAMINER

## SUMMARY

Cytochrome c oxidases of eukaryotic and prokaryotic origin show very similar features concerning their redox centers, their electron transfer and their proton pumping activity. However, they differ significantly in their subunit composition which is much simpler with bacterial oxidases. Subunit III of beef heart oxidase has been claimed to have an important role in proton pumping, since this function was abolished in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) or upon removal of the polypeptide. The two-subunit cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans is however competent in proton translocation without a third subunit. In this study, this oxidase was used as a model system to explore further the mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase and to evaluate whether the bacterial and the eukaryotic oxidases share a common proton conducting pathway.

The stoichiometry of  $0.5 \text{ H}^+/\text{e}^-$  was verified with reconstituted Paracoccus oxidase, using cytochrome c reductant pulses for the proton translocation experiments. Different preparations were tested. The purest oxidase was found to exhibit the highest  $\text{H}^+/\text{e}^-$  stoichiometry, indicating that the observed pumping was not due to remnants of a third subunit.

Incubations with DCCD which greatly reduced proton pumping by bovine cytochrome c oxidase used as a control were found to exert only a minor effect on proton translocation by Paracoccus oxidase. Similarly, interaction of the bacterial enzyme with  $^{14}\text{C}$ -DCCD revealed unspecific labeling of both subunits with the cholate dispersed oxidase, whereas in the membrane embedded state (Paracoccus oxidase reconstituted into artificial liposomes or in natural membranes) no  $^{14}\text{C}$ -DCCD labeling of the subunits was detected. Clearly, the bacterial enzyme failed to reveal the specific covalent interaction previously demonstrated to occur with bovine cytochrome c oxidase and which is here also shown for the yeast oxidase. Thus, Paracoccus oxidase differs in its

interaction with DCCD from the functionally analogous eukaryotic enzymes, suggesting that another (further?) element than subunit III is involved in the proton pumping mechanism.

The results obtained with Paracoccus oxidase prompted further investigations concerning the role of subunit III in proton translocation. Dissociation of subunit III from the oxidase complex to study the features of the subunit III-deficient enzyme and isolation of subunit III to explore its function seemed in order.

Removal of subunit III was achieved by limited proteolysis with  $\alpha$ -chymotrypsin and subsequent separation of the fragments by passage through a DEAE-cellulose column. An oxidase which retained up to 90% of its electron transfer activity was obtained. The removal of subunit III was evaluated by SDS-PAGE and  $^{14}\text{C}$ -DCCD labeling experiments prior to the proteolytic step indicating that the oxidase was free of intact subunit III.

The removal of subunit III resulted in a spectral perturbation of the  $\alpha$ -band region. The absorption of the heme transition at 560 nm was decreased by approximately 20% compared to the control oxidase. This spectral perturbation was also found with a subunit III-free oxidase prepared by the alkali method which avoids proteolytic treatment, and with the Paracoccus oxidase. Subunit III-depleted oxidase was reconstituted by cholate dialysis and proteoliposomes having RCI ranging between 2.5 and 6 were obtained. Measurements of the proton ejection by means of cytochrome c reductant pulses demonstrated that subunit III-depleted oxidase is still competent in proton translocation. Values between 0.38 to 0.5  $\text{H}^+/\text{e}^-$  were observed. This redox-linked proton translocation could be observed only when respiratory control indexes were higher than 3 and the reductant pulse of a magnitude that allowed for no more than 5 turnovers ( $5\text{O}_2/\text{aa}_3$ ) of the oxidase. The results indicate that the role of subunit III in proton pumping is not obligatory. A similarity between the Paracoccus and the subunit III-depleted oxidase is evident suggesting that bacterial and eukaryotic oxidases may share a common mechanism.

Based on these results two models for a proton pumping mechanism are proposed. Either of them may account for the results obtained with the bacterial and the mammalian oxidase.

## ZUSAMMENFASSUNG

Cytochrom c Oxidasen eukaryotischen und prokaryotischen Ursprungs besitzen sehr ähnliche Eigenschaften bezüglich ihrer Redox-Zentren, ihrer Elektronentransport- und Protonenpumpaktivität. Sie unterscheiden sich jedoch stark in ihrer strukturellen Zusammensetzung, die bei den bakteriellen Oxidasen bedeutend einfacher ist. Untereinheit III von Rinderherz-Oxidase wurde eine wichtige Rolle im Protonenpump-Mechanismus beigemessen, weil diese Aktivität in der Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) gehemmt oder nach Entfernung dieses Polypeptides nicht mehr vorhanden war. Die Cytochrom c Oxidase von Paracoccus denitrificans, die aus zwei Untereinheiten besteht, ist jedoch fähig ohne eine dritte Untereinheit Protonen zu transportieren. Diese Oxidase wurde in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem benutzt um den Mechanismus des Protonenpumpens weiter zu erforschen und um zu bestimmen, ob die bakteriellen und die eukaryotischen Oxidasen einen gemeinsamen Weg für Protonentransport besitzen.

In Protonenpump-Experimenten wurde die Protonen pro Elektronen-Stoichiometrie von 0.5 mit rekonstituierter Paracoccus Oxidase durch Zugabe von reduziertem Cytochrom c bestätigt. Verschiedene Präparationen wurden getestet. Die Oxidase mit dem grössten Reinheitsgrad zeigte dabei den höchsten Wert für die  $H^+/e^-$ -Stoichiometrie. Dies deutete darauf hin, dass die beobachtete Pumpaktivität nicht allfälligen Ueberresten einer dritten Untereinheit zuzuordnen war. Inkubationen mit DCCD, welche die Protonenpump-Aktivität von Rinderherz-Cytochrom c Oxidase stark reduzierten, hatten nur einen geringen Einfluss auf die Protonenpump-Aktivität von Paracoccus Oxidase. Die Reaktion von DCCD mit dem in Cholat solubilisierten bakteriellen Enzym führte zur unspezifischen Markierung beider Untereinheiten, die jedoch, wenn die Oxidase in künstliche Liposomen inkorporiert wurde oder in natürlichen Membranen vorlag, keine radioaktive Markierung aufwies. Offensichtlich war das bakterielle Enzym unfähig, die spezifische kovalente Bindung einzugehen, wie sie zuvor mit Rin-

derherzoxidase gezeigt und die in der vorliegenden Arbeit auch mit Heferoxidase gefunden wurde. Paracoccus Oxidase unterscheidet sich daher in seiner Reaktionsweise gegenüber DCCD von den in ihrer Funktion analogen eukaryotischen Enzymen. Es liegt nahe, dass ein anderes (zusätzliches?) Element für die Protonenpump-Aktivität verantwortlich ist.

Diese Resultate gaben Anlass zu weiteren Studien hinsichtlich der Rolle von Untereinheit III im Pumpvorgang. Es schien vernünftig, einerseits Untereinheit III vom übrigen Oxidase-Komplex zu trennen um die Eigenschaften eines Untereinheit III-freien Enzyms zu untersuchen, andererseits Untereinheit III zu isolieren, um seine Funktion zu erforschen.

Untereinheit III wurde durch limitierte Proteolyse mit  $\alpha$ -Chymotrypsin entfernt und die Fragmente mittels Anionentauscher-Säule abgetrennt. Es resultierte eine Oxidase mit einer Elektronentransport-Aktivität, die 90% der ursprünglichen Aktivität erreichte.

Die Entfernung von Untereinheit III wurde durch SDS-Gelelektrophorese und  $^{14}\text{C}$ -DCCD-Markierung vor dem Proteolyse-schritt getestet. Es zeigte sich, dass die Oxidase frei von intakter Untereinheit III war.

Eine spektrale Veränderung in der Region der  $\alpha$ -Bande war der Entfernung von Untereinheit III zuzuordnen. Die Absorption in der Gegend von 560 nm war im Vergleich zur Kontroll-Oxidase, um ungefähr 20% reduziert. Diese Veränderung wurde bei einer Untereinheit III-freien Oxidase, die ohne Proteolyse mit einer andern Methode präpariert worden war und bei Paracoccus oxidase festgestellt.

Untereinheit III-freie Oxidase wurde durch Cholat-Dialyse in Liposomen eingebaut, deren Werte für den Atmungskontrollindex zwischen 2.5 und 6 lagen. Messungen der Protonenpump-Aktivität durch Zugabe von reduziertem Cytochrom c bewiesen, dass Untereinheit III-freie Oxidase fähig ist, Protonen zu pumpen, und Werte zwischen 0.38 und 0.5  $\text{H}^+/\text{e}^-$  wurden berechnet. Diese Protonenpump-Aktivität, die an die Redox-Reaktion gebunden ist, konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn der Atmungskontrollindex über dem Wert von 3 lag und wenn die Zugabe von reduzier-

tem Cytochrom c 5 Umsätze der Oxidase nicht überschritt. Die Resultate sprechen gegen eine obligatorische Rolle von Untereinheit III im Protonenpump-Mechanismus. Ähnlichkeiten zwischen Paracoccus Oxidase und der Untereinheit III-freien Oxidase sind offenbar und deuten an, dass bakterielle und eukaryotische Oxidasen einen gemeinsamen Mechanismus haben.

Zwei Modelle, die auf diesen Resultaten basieren und von denen jedes den Beobachtungen mit der bakteriellen und der Rinderherz-Oxidase gerecht wird, werden vorgeschlagen.