

**Über den Mechanismus
der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I)
aus *Escherichia coli***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dierk Scheide
aus Duisburg

Düsseldorf 2000

Wir können . . . auf der Grundlage strikt empirischer Untersuchungen definitiv behaupten, daß die bloße Umkehrung unserer vorherigen analytischen Zerstückelung des Universums dadurch, daß wir die Stücke in der Wirklichkeit oder auch nur in Gedanken wieder zusammensetzen, keine vollständige Erklärung des Verhaltens auch nur der elementarsten lebenden Systeme liefern kann.

Paul Alfred Weiss

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiß
2. Referent: Priv.-Doz. Dr. Thorsten Friedrich
3. Referent: Priv.-Doz. Dr. Joachim Heberle

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	3
2.2	Komplex I aus <i>Escherichia coli</i>	6
2.3	Verwandtschaft zu anderen prokaryontischen Enzymen	8
2.4	Spektroskopische Untersuchungen an Komplex I	13
2.5	Thema der Arbeit	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	20
3.2	Isolierung von Komplex I	20
3.3	Stabilität des Komplex I	22
3.4	Spaltung des isolierten Komplex I	22
3.5	Andere verwendete Enzyme	23
3.6	UV/Vis-Spektroskopie	23
3.6.1	Anaerobe Messungen	23
3.6.2	Die Laktat Dehydrogenase Reaktion	24
3.6.3	Die Hydroxybutyrat Dehydrogenase Reaktion	24
3.6.4	Reduktion mit Natriumdithionit und Reoxidation mit Sauerstoff	25
3.7	Elektrochemisch induzierte Redox-Differenzspektroskopie	25
3.8	ESR-Spektroskopie	27
3.9	Elektronenmikroskopie	28
3.10	Verschiedene analytische Methoden	28

4	Ergebnisse	30
4.1	Isolierung und Charakterisierung von Komplex I	30
4.2	Spaltung des isolierten Komplex I und Charakterisierung der Fragmente	35
4.3	Charakterisierung von zwei bislang unbekanntem [4Fe4S] Zentren in Komplex I	39
4.4	Charakterisierung einer unbekanntem Redoxgruppe im Chinon Reduktase Fragment	49
4.5	Beiträge aller nachgewiesenen Redoxgruppen zu dem UV/Vis-Spektrum des Komplex I	56
4.6	Kopplung der Redoxreaktion mit der Protonentranslokation	59
4.7	Elektronenmikroskopische Darstellung von Komplex I und Fragmenten	62
5	Diskussion	65
5.1	Der modulare Aufbau von Komplex I	65
5.2	Der Elektronentransport in Komplex I	68
5.3	Der Protonentransport in Komplex I	71
5.4	Die Kopplung von Elektronen- und Protonentransport in Komplex I: Ein modularer Mechanismus ?	72
6	Literatur	75

1 Zusammenfassung

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, der sogenannte Atmungsketten-Komplex I, koppelt die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon reversibel mit der Translokation von Protonen über die Membran. Der Komplex aus dem Bakterium *Escherichia coli* besteht aus den 13 verschiedenen Proteinuntereinheiten, NuoA bis NuoN, die dem Komplex eine molekulare Masse von 535 kDa geben. Sequenzvergleiche zeigen, daß der Komplex modular aus Teilen für den Elektronen- und den Protonentransport aufgebaut ist. Ein Flavinmononukleotid und eine unbekannte Anzahl Eisen-Schwefel (FeS) Zentren dienen als interne Redoxgruppen. In dem Komplex I aus *E. coli* wurden bislang 5 FeS Zentren (N1b, N1c, N2, N3 und N4) ESR-spektroskopisch nachgewiesen. Der Elektronenweg des Komplex I ist nicht vollständig bekannt. In dem Komplex I aus dem Pilz *Neurospora crassa* wurden in unserem Institut erstmalig Hinweise auf zwei weitere Redoxgruppen gefunden. Die Kopplung des Elektronentransports mit der Protonentranslokation ist nicht verstanden.

Phylogenetische Sequenzanalysen zeigen, daß der Komplex I aus drei großen Proteinmodulen, dem NADH Dehydrogenase Modul, dem Hydrogenase Modul und dem Translokase Modul aufgebaut ist. In dieser Arbeit wurde der isolierte Komplex I aus *E. coli* in zwei Fragmente gespalten, die in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung dem NADH Dehydrogenase Modul und dem Hydrogenase Modul zusammen mit dem Translokase Modul entsprechen. Sie wurden NADH Dehydrogenase Fragment bzw. Chinon Reduktase Fragment genannt. Die Redoxgruppen der Fragmente und des Komplex I wurden UV/Vis-, ESR- und FTIR-spektroskopisch charakterisiert.

Es wurde gezeigt, daß das Chinon Reduktase Fragment zwei FeS Zentren enthält, die bislang ESR-spektroskopisch nicht nachgewiesen wurden. Sie wurden durch UV/Vis-Redox-Differenzspektroskopie nachgewiesen und durch Vergleich mit Differenzspektren der Fragmente und verwandter Enzyme der Untereinheit NuoI zugeordnet. Diese FeS Zentren wurden N6a und N6b genannt und entsprechen einer der beiden Redoxgruppen, die erstmalig im *N. crassa* Komplex I gefunden

wurden. Die andere unbekannte Redoxgruppe wurde ebenfalls in dem Chinon Reduktase Fragment nachgewiesen. Mit einer elektrochemischen Titration wurde ihr Mittenpotential zu -80 mV bestimmt. Der Redoxwechsel ist mit der Übertragung von zwei Elektronen gekoppelt. Die FTIR-Differenzspektren dieser Gruppe zeigen, daß es sich nicht um ein proteingebundenes Ubichinon handelt, sondern eher um eine modifizierte Aminosäure. Die Lokalisation dieser Gruppe auf einer Untereinheit ist weiterhin ungeklärt.

Die FTIR-Spektren von elektrochemisch eingestellten Redoxzuständen des Komplex I zeigen, daß die Oxidation des FeS Zentrums N2 auf der Untereinheit NuoB mit der Protonierung eines Aspartats oder Glutamats gekoppelt ist. Auf diese Weise wurde erstmalig eine redoxgetriebene Protonierung in Komplex I direkt gezeigt. Die Rolle des FeS Zentrums N2 als Redox-Bohrgruppe für den Mechanismus wird diskutiert.

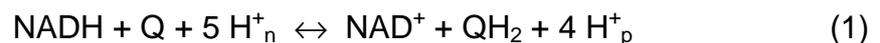
Die FTIR-Differenzspektren zeigen weiterhin, daß die Redoxreaktion von Komplex I mit großen konformativen Änderungen einhergeht. Dieses Ergebnis wird durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Komplex I – Einzelpartikeln bei einer mittleren Auflösung von 19 \AA bestätigt. Bei dieser Auflösung ist der Aufbau des Komplexes aus den drei Modulen gut zu erkennen. Durch Vergleich mit elektronenmikroskopischen Bildern der Fragmente wurden die Module erkannt. Modelle des oxidierten und des NADH-reduzierten Komplexes zeigen, daß sich mit der Reduktion der Abstand zwischen Translokase und Hydrogenase Modul vergrößert. Ob dieser Prozeß mit einer Protonentranslokation gekoppelt ist, ist unklar. Es wird diskutiert, daß dem Komplex I in Analogie zu seinem modularen Aufbau ein modularer Mechanismus aus redoxgetriebener Protonentranslokation im Hydrogenase Modul und konformativ getriebener Protonentranslokation im Translokase Modul zugrunde liegt.

2 Einleitung

2.1 Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase

Homologe Formen der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, dem sogenannten Komplex I der Atmungskette, kommen in allen Domänen des Lebens, den Eukaryonten, den Bakterien und den Archäen vor (Friedrich et al., 1995; Friedrich & Weiss, 1997; Friedrich & Scheide, 2000). Der Enzymkomplex ist in der inneren Membran der Mitochondrien, in der Thylakoidmembran der Chloroplasten bzw. in der Cytoplasmamembran der Prokaryonten lokalisiert.

Der „klassische“ Komplex I der Eukaryonten und Eubakterien koppelt die reversible Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon mit dem Transport von Protonen über die Membran nach folgender Reaktionsgleichung:



In dieser Gleichung steht Q für Ubichinon und H^+_{n} und H^+_{p} für Protonen auf der negativen inneren bzw. positiven äußeren Seite der Membran. Als Elektronendonator des archäalen Komplexes wurde reduziertes F_{420} nachgewiesen (Bäumer et al., 2000). Der Elektronendonator des Komplex I der Cyanobakterien und Chloroplasten ist noch unbekannt (Friedrich et al., 1995). Als Elektronenakzeptoren dienen in Bakterien neben Ubichinon auch Menachinon und Demethylmenachinon und in Chloroplasten Plastochinon (Tran et al., 1997; Uden & Bongaerts, 1997; Friedrich et al., 1995). Im Gegensatz zu diesen para-Chinonen verwenden methanogene Archäen einen Phenazinalkylether, Methanophenazin, als Elektronenakzeptor (Bäumer et al., 2000). Es wurde gezeigt, daß Komplex I aus *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* mit bislang unbekannter Stöchiometrie auch Natriumionen pumpen kann (Dimroth & Thomer, 1989; Krebs et al., 1999; Steuber et al., 2000).

2. Einleitung

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von zweidimensionalen Membrankristallen des mitochondrialen Komplex I aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* zeigen, daß etwa die Hälfte der Proteinmasse in der Membran liegt, während die andere Hälfte in die mitochondriale Matrix ragt (Hofhaus et al., 1991). Der bakterielle Komplex I besitzt nur die halbe Masse des mitochondrialen und wird daher als strukturelle Minimalform einer NADH:Ubichinon Oxidoreduktase angesehen. Der eukaryontische Komplex I besitzt neben den Homologen der 14 bakteriellen Untereinheiten bis zu 28 zusätzliche Untereinheiten (Schulte & Weiss, 1995; Friedrich et al., 1995). Aus der Einzelpartikelanalyse von negativ kontrastierten Komplex I Präparationen aus *N. crassa* und *E. coli* geht hervor, daß sowohl der mitochondriale Komplex aus 42 verschiedenen Untereinheiten, als auch der bakterielle Komplex aus 14 verschiedenen Untereinheiten eine L-förmige Überalles-Struktur aufweisen (Guénebaut et al., 1997; Guénebaut et al., 1998). Die offenbar typische L-Form des isolierten Enzyms wurde auch für den mitochondrialen Komplex I aus Rinderherz und *Yarrowia lipolytica* nachgewiesen (Grigorieff, 1999; Djafarzadeh et al., 2000). Abb. 1-1 zeigt die Überlagerung der dreidimensionalen Modelle des mitochondrialen und des bakteriellen Komplex I, mit einem peripheren Arm, der in das Cytosol bzw. die Matrix ragt, und einem in die Phospholipidschicht eingebetteten Membranarm. Beide Arme des bakteriellen und des mitochondrialen Komplexes sind jeweils 23 nm lang.

Der Winkel zwischen den Armen des *E. coli* Komplex I ist variabel, was auf eine gewisse Flexibilität der L-förmigen Struktur hinweist. Die zusätzlichen Untereinheiten des mitochondrialen Komplexes, die gleichmäßig um die bakterielle Minimalstruktur angeordnet sind, dienen vermutlich der Stabilisierung des Enzyms. Sie verhindern, daß hochenergetische Elektronen das Enzym verlassen. Der Vergleich mit der Succinat Dehydrogenase, der Cytochrom c Reduktase und der Cytochrom c Oxidase zeigt, daß auch die übrigen Atmungskettenkomplexe im Verlauf der Evolution mit einer Vielzahl weiterer Untereinheiten ausgestattet wurden (Engel et al., 1983; Yang & Trumpower, 1986; Saraste, 1990). Im Gegensatz zu den übrigen Atmungskettenkomplexen existiert für Komplex I keine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur.

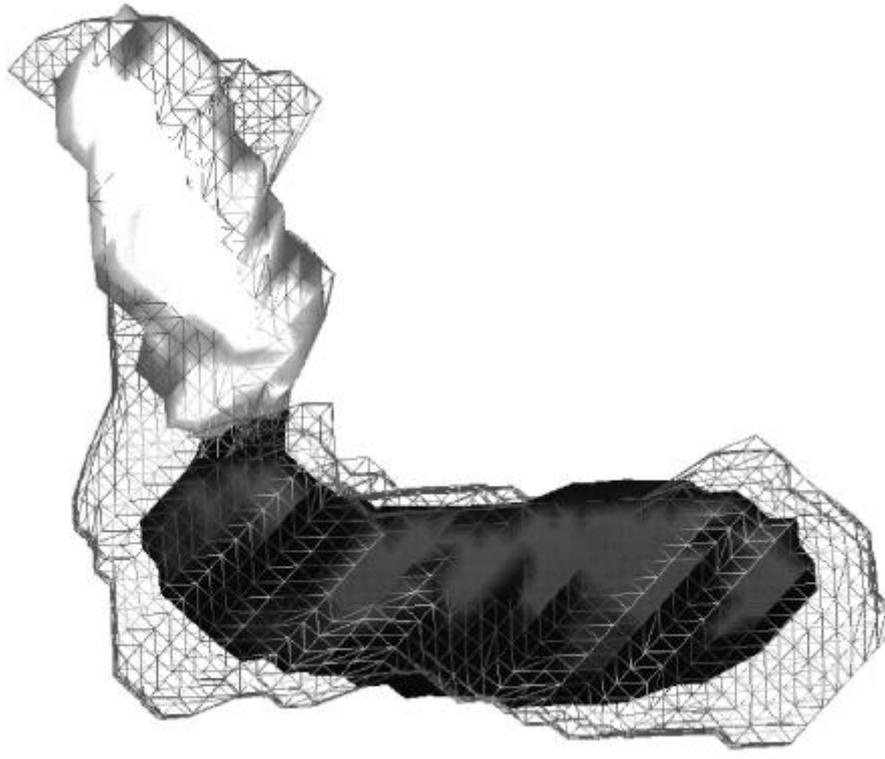


Abbildung 1-1: Überlagerung der dreidimensionalen Modelle des bakteriellen Komplex I aus *E. coli* und des mitochondrialen Komplex I aus *N. crassa*. Der *N. crassa* Komplex I ist durch das Drahtmodell dargestellt, das den ausgefüllt dargestellten *E. coli* Komplex umgibt. Der Membranarm ist schwarz, der periphere Arm grau dargestellt.

Der isolierte Komplex I enthält ein Flavinmononukleotid (FMN) und eine noch nicht genau bestimmte Anzahl Eisen-Schwefel (FeS) Zentren als Redoxgruppen. Der genaue Elektronenweg und der Mechanismus der redoxgetriebenen Protonentranslokation sind aufgrund seines komplexen Aufbaus noch weitgehend unbekannt. Im Gegensatz zu den übrigen Atmungskettenkomplexen sind alle bekannten Redoxgruppen von Komplex I im peripheren Arm des Enzyms lokalisiert. Daher ist ein besonderer Mechanismus für die Protonentranslokation im membranintrinsic Teil von Komplex I zu erwarten.

2.2 Komplex I aus *Escherichia coli*

Der bakterielle Komplex I besteht im Allgemeinen aus 14 Untereinheiten, von denen 7 peripher gelegen und 7 membranständig sind. Zusammen geben sie dem Komplex eine molekulare Masse von etwa 535 kDa (Friedrich et al., 1995). Die Homologen der 7 membranständigen Untereinheiten des bakteriellen Komplexes sind in Eukaryonten mitochondrial kodiert. Die Gene des Komplex I von *E. coli* sind in dem sogenannten *nuo*-Operon (von NADH:Ubichinon Oxidoreduktase) organisiert. Die davon abgeleiteten Proteine werden mit NuoA-N bezeichnet (Weidner et al., 1993). In *E. coli* sind die Gene *nuoC* und *nuoD* zu einem Gen *nuoCD* fusioniert (Braun et al., 1998); der Komplex besteht entsprechend aus 13 Untereinheiten. Er wurde zuerst in einem technischen Alkylglukosid-Detergenz bei pH 6,0 isoliert. In dieser Präparation wurden ein FMN und 5 FeS Zentren ESR-spektroskopisch nachgewiesen (Leif et al., 1995). Aufgrund der Anzahl der konservierten Sequenzmotive zur Bindung von FeS Zentren und dem hohen Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Sulfid aller Komplex I Präparationen ist es möglich, daß Komplex I neben den bislang ESR-spektroskopisch nachgewiesenen Zentren noch bis zu vier weitere Zentren enthält. Die Eigenschaften der FeS Zentren werden in einem folgenden Kapitel beschrieben.

Der isolierte Komplex I zerfällt bei Austausch des Detergenz gegen Triton X-100 bei pH 7,5 in drei Fragmente (Leif et al., 1995). Abb. 1-2 zeigt das aus dem Zerfallsmuster und elektronenmikroskopischen Daten abgeleitete topologische Modell des *E. coli* Komplex I zusammen mit einem Schema des *nuo*-Operons. Die Lage der Untereinheiten in den Fragmenten spiegelt sich größtenteils in der Anordnung ihrer Gene im Operon wider (Friedrich et al., 1995). Die durch Spaltung erhaltenen Fragmente wurden als NADH Dehydrogenase Fragment, verbindendes Fragment und Membranfragment bezeichnet.

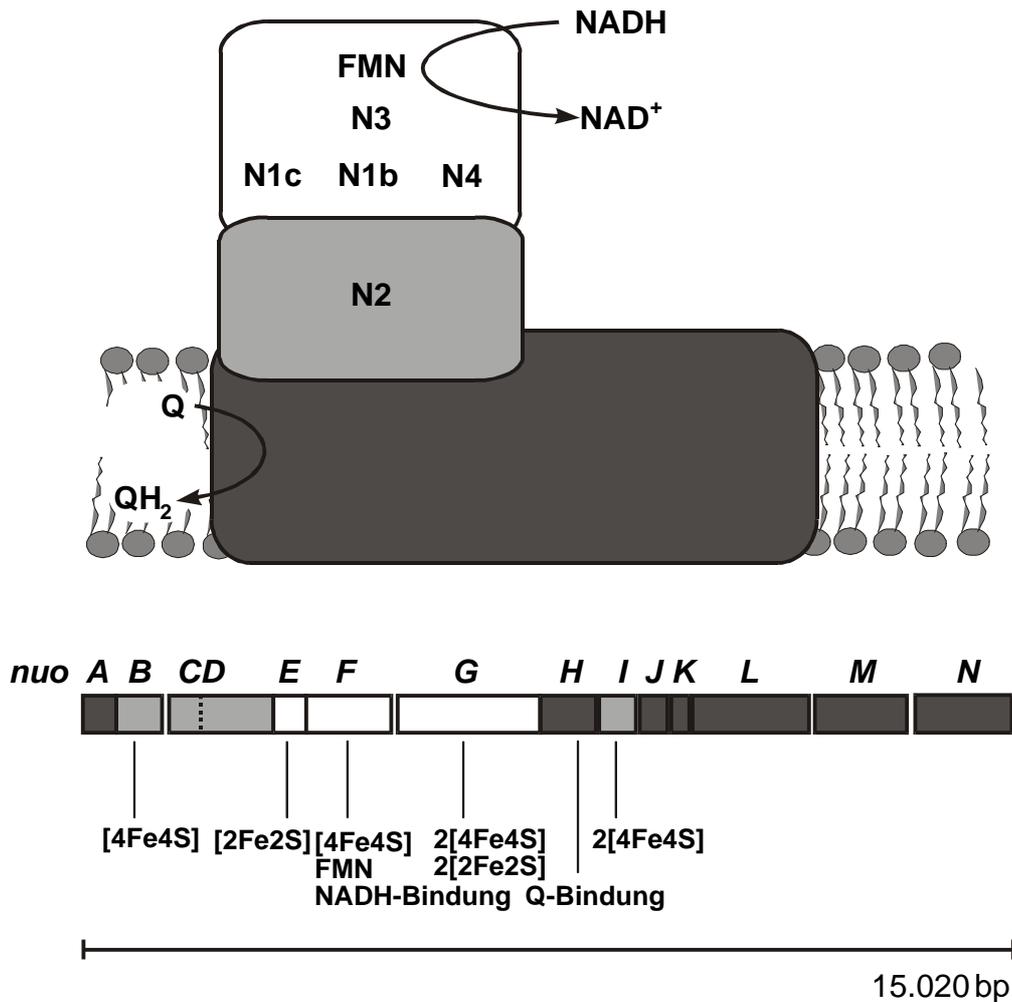


Abbildung 1-2: Modell des *E. coli* Komplex I und des *nuo*-Operons. A-N bezeichnen die Gene des Operons mit den vorhergesagten Bindemotiven für die Substrate und Kofaktoren. N1b, N1c, N2, N3 und N4 stehen für die ESR-spektroskopisch nachgewiesenen FeS Zentren und Q für Ubichinon. Das NADH Dehydrogenase Fragment und die zugehörigen Gene sind weiß, das verbindende Fragment und dessen Gene hellgrau und das Membranfragment mit Genen dunkelgrau dargestellt.

Das lösliche NADH Dehydrogenase Fragment besteht aus den Untereinheiten NuoE, F und G und besitzt eine molekulare Masse von 170 kDa. Es enthält die NADH-Bindestelle, das FMN und die ESR-spektroskopisch nachweisbaren FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4. Das amphipatische Fragment aus den Untereinheiten NuoB, CD und I verbindet das NADH Dehydrogenase Fragment mit dem Membranfragment und wird deshalb verbindendes Fragment genannt. Es besitzt eine molekulare Masse von 125 kDa und enthält das ESR-spektroskopisch nachweisbare FeS Zentrum N2.

Die sieben hydrophoben Untereinheiten, NuoA, H und J-N, bilden das nur in Detergenz lösliche Membranfragment mit einer molekularen Masse von 240 kDa. Nach Vorhersage der Sekundärstruktur bilden sie zusammen 54 transmembrane Helices aus (Weidner et al., 1993). Sie sind vermutlich an der Protonentranslokation beteiligt, bislang konnte jedoch kein Kofaktor in diesem Fragment nachgewiesen werden.

Für weitergehende biochemische Untersuchungen wurde der *E. coli* Komplex I homolog überproduziert und in Dodecylmaltosid als Detergenz isoliert (Schlitt, 1998; Spehr et al., 1999). Diese Präparation ist wesentlich stabiler als in dem technischen Detergenz. Auch das NADH Dehydrogenase Fragment wird durch Überproduktion erhalten (Braun et al., 1998; Bungert et al., 1999). Die Präparationen der überproduzierten Enzyme entsprechen in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung, ihrem Kofaktorgehalt und ihren kinetischen Eigenschaften den Präparationen aus dem Wildtyp, zeichnen sich aber durch ihre größere Stabilität aus (Spehr et al., 1999; Braun et al., 1998). Das verbindende Fragment und das Membranfragment werden bislang nicht als stabile Präparationen in größeren Mengen erhalten.

2.3 Verwandtschaft zu anderen prokaryontischen Enzymen

Komplex I ist durch die Fusion bereits existierender Proteine für den Elektronentransport und die Protonentranslokation entstanden (Friedrich et al., 1995). Die Module des Komplex I werden durch Homologie von Teilen des Komplexes zu anderen bakteriellen Enzymen definiert. Die Sequenzanalysen zeigen homologe Module in löslichen und membranständigen [NiFe] Hydrogenasen, in NAD⁺-abhängigen Dehydrogenasen und Hydrogenasen und in Na⁺ bzw. K⁺/H⁺ Antiportern. Die Verwandtschaft von Teilen des Komplex I zu anderen Elektronentransferenzymen oder Transportern ist schematisch in Abb. 1-3 dargestellt.

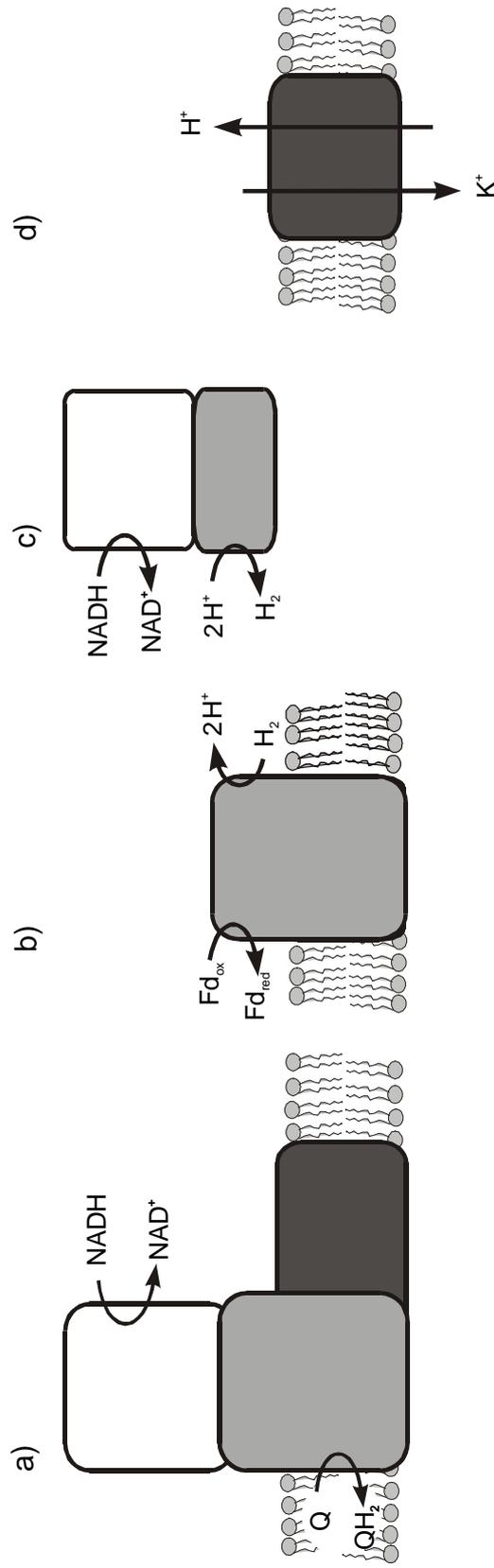


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Komplex I und des Vorkommens der Module in verwandten Enzymen. Das NADH Dehydrogenase Modul ist in weiß gezeigt, das Hydrogenase Modul in hellgrau und das Translokase Modul in dunkelgrau. (a) Der Komplex I aus *E. coli* (Friedrich & Scheide, 2000), (b) die Ech Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* als Beispiel aus der Familie der membranständigen [NiFe] Hydrogenasen (Tersteegen & Hedderich, 1999), (c) die NAD⁺-reduzierende Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* als Beispiel aus der Familie der NAD⁺-abhängigen Hydrogenasen (Tran-Betcke et al., 1990) und (d) der K⁺/H⁺ Antiporter aus *Sinorhizobium meliloti* als Beispiel aus der Familie der Alkaliionen/H⁺ Antiporter (Putnoky et al., 1998).

2. Einleitung

Aus der phylogenetischen Sequenzanalyse läßt sich die modulare Evolution des Komplex I ableiten (Friedrich & Weiss, 1997; Friedrich & Scheide, 2000). Der Ursprung des Komplexes läßt sich auf ein Elektronentransportmodul zurückführen, aus dem die heutigen, löslichen [NiFe] Hydrogenasen aufgebaut sind (Abb. 1-4). Durch Vereinigung mit einem Ferredoxin (dem Vorgänger von NuoI), einem chinonbindenden Protein (dem Vorläufer von NuoH), einem Ionentransport Protein (dem Vorläufer von NuoL) und einem Protein noch unbekannter Funktion (dem Vorläufer von NuoC) entstand ein gemeinsamer Vorläufer von Komplex I und einer Familie membranständiger [NiFe] Hydrogenasen (Tersteegen & Hedderich, 1999; Friedrich & Scheide, 2000). Im Laufe der evolutionären Diversifizierung verlor der Vorläufer des Komplex I das [NiFe] Zentrum und wurde unter anderem durch die Triplikation des Gens für das Ionentransporterprotein mit weiteren membranständigen Untereinheiten (den Vorläufern von NuoA, J, K, M und N) ausgestattet. Dadurch erwarb er die Fähigkeit, mit Chinonen zu reagieren. Der so entstandene Komplex aus 11 Untereinheiten ist der direkte Vorläufer des heutigen Komplex I der Bakterien, Archäen und Cyanobakterien. Durch Aufnahme des NADH Dehydrogenase Moduls aus den Untereinheiten NuoE, F und G entstand der bakterielle Komplex I. Ein homologes Modul wurde im Laufe der Evolution zum Beispiel auch von den oben erwähnten löslichen [NiFe] Hydrogenasen aufgenommen. Dies führte zur Entwicklung der in Abb. 1-3 gezeigten NAD⁺-reduzierende Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* (Tran-Betcke et al., 1990). Der Komplex I der Archäen erwarb das F₄₂₀H₂ Dehydrogenase Modul, das eine dem NADH Dehydrogenase Modul analoge Reaktion ausführt. Das Elektroneneingangsmodul des Komplex I in Cyanobakterien ist bislang unbekannt. Es wird diskutiert, daß dieser Komplex ein Modul für die Elektronenaufnahme von NADPH oder reduziertem Ferredoxin besitzt, oder daß eine der 11 Untereinheiten des direkten Vorläufers als Elektronenakzeptor fungiert (Friedrich & Weiss, 1997; Friedrich & Scheide, 2000). Einem generellen Phänomen folgend, entstand der mitochondriale Komplex I aus dem prokaryontischen Komplex, indem sich viele zusätzliche Untereinheiten um dessen Minimalstruktur anlagerten.

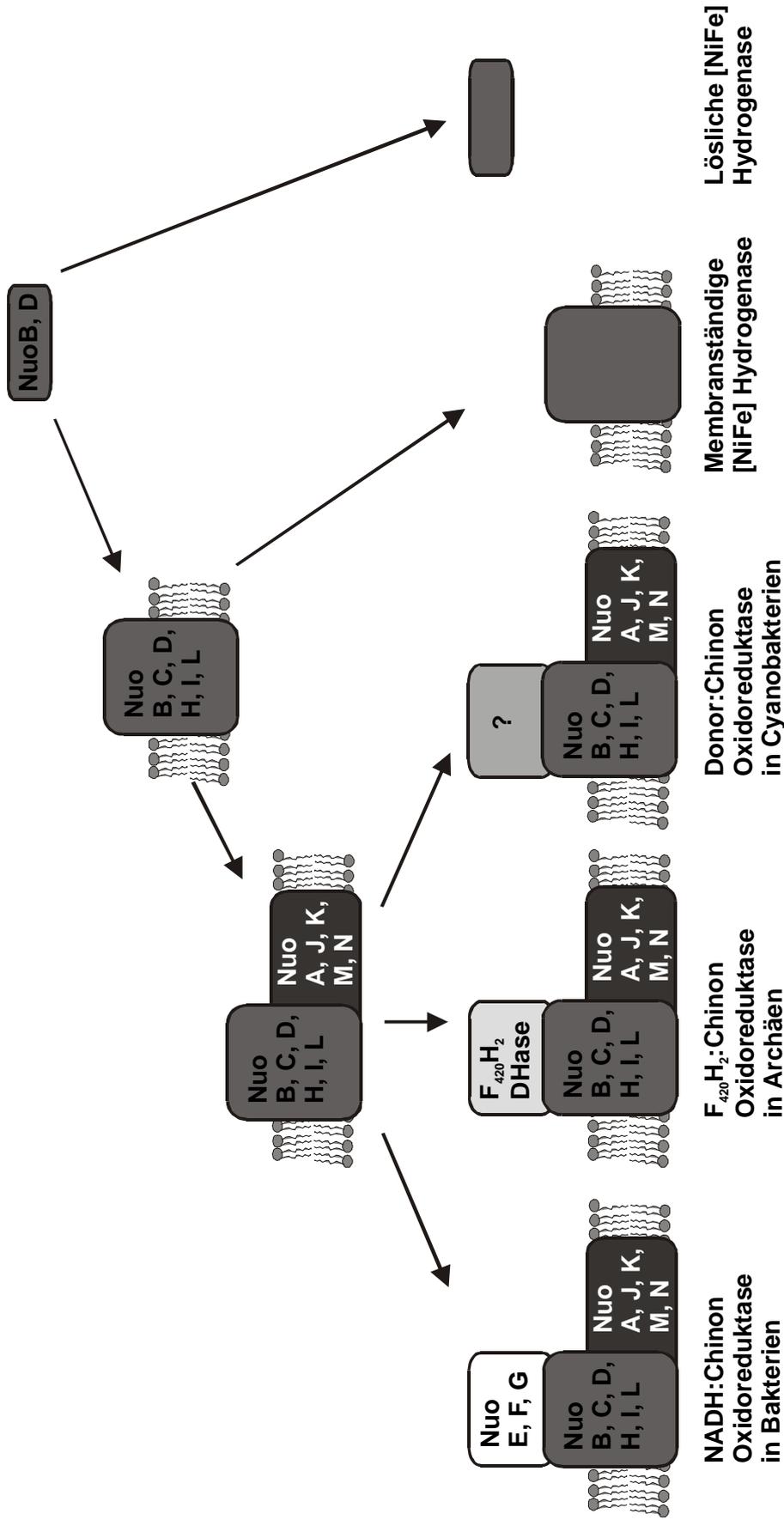


Abbildung 1-4: Hypothetisches Schema der modularen Evolution des Komplex I. Aus den Vorgängern von NuoB und NuoD entwickelten sich die löslichen [NiFe] Hydrogenasen und ein gemeinsamer Vorläufer des Komplex I und der Familie membranständiger [NiFe] Hydrogenasen aus den Untereinheiten NuoB, C, D, H, I und L. Durch Aufnahme der membranständigen Untereinheiten NuoA, J, K, M und N entstand der Vorläufer des heutigen Komplex I, der schließlich mit verschiedenen Elektroneneingangsmodulen ausgestattet wurde. Das Hydrogenase Modul ist in dunkelgrau dargestellt, das Translokase Modul in schwarz. Das NADH Dehydrogenase Modul des bakteriellen Komplex I ist in weiß gezeigt, das F₄₂₀H₂ Dehydrogenase Modul der Archäen in hellgrau und das noch unbekanntes Elektroneneingangsmodul des cyanobakteriellen Komplex I in grau.

2. Einleitung

Komplex I ist also im Laufe der Evolution durch den Zusammenschluß von drei großen Modulen entstanden (Abb. 1-4): einem Hydrogenase Modul aus 6 Untereinheiten, die auch Bestandteil der membranständigen [NiFe] Hydrogenasen sind, einem Translokase Modul aus 5 membranständigen Untereinheiten, von denen zwei homolog zu bakteriellen Antiportern sind und einem NADH Dehydrogenase Modul aus 3 Untereinheiten, das als reversibles Elektroneneingangsmodul auch in vielen löslichen Enzymen vorkommt. Die Untereinheiten-Zusammensetzungen des Komplex I und der homologen Enzyme sind in Tab. 1-1 zusammengefaßt. Bislang gibt es noch keine Präparationen von Fragmenten des Komplex I, die in ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung dem Hydrogenase oder Translokase Modul entsprechen.

Tabelle 1-1: Homologie von Komplex I Untereinheiten zu Untereinheiten bakterieller Enzyme

Modul	<i>E. coli</i> Komplex I	<i>M. barkeri</i> Ech	<i>R. eutropha</i> NAD ⁺ - reduzierende Hydrogenase	<i>D. gigas</i> lösliche [NiFe] Hydrogenase	<i>S. meliloti</i> K ⁺ / Na ⁺ Antiporter
NADH Dehydrogenase Modul	NuoE		HoxF ^N		
	NuoF		HoxF ^C		
	NuoG		HoxU		
Hydrogenase Modul	NuoB	EchC	HoxY	Hyn B	
	NuoCD ^N	EchD			
	NuoCD ^C	EchE	HoxH	HynA	
	NuoH	EchB			
	NuoI	EchF			
	NuoL	EchA			PhaA
Translokase Modul	NuoA				
	NuoJ				
	NuoK				
	NuoM				PhaD
	NuoN				

Die Indizes stehen für den N-terminalen bzw. C-terminalen Teil des jeweiligen Proteins.

2.4 Spektroskopische Untersuchungen an Komplex I

In den letzten Jahrzehnten wurde die Funktion des Komplex I durch verschiedene spektroskopische Techniken untersucht. Alle bekannten FeS Zentren in Komplex I wurden bislang ESR-spektroskopisch nachgewiesen und charakterisiert. Tab. 1-2 faßt die strukturellen und thermodynamischen Eigenschaften der FeS Zentren sowie deren Zuordnung zu einzelnen Untereinheiten von Komplex I zusammen.

Tabelle 1-2: Charakterisierung der FeS Zentren des Komplex I (nach: Ingledew & Ohnishi, 1980; Friedrich, 1998; Ohnishi, 1998)

Zentrum	Typ	Lokalisation	$E_{m,7}$ [mV]	pH-Abhängigkeit
N1a [*]	2Fe2S	NuoE	-330	+
N1b	2Fe2S	NuoG	-230	-
N1c ^{**}	2Fe2S	NuoG	-250	-
N2	4Fe4S	NuoB	-220	+
N3	4Fe4S	NuoF	-270	-
N4	4Fe4S	NuoG	-270	-
N5 ^{***}	4Fe4S	NuoG	-270	-

* nur in Rinderherz und *Paracoccus denitrificans* nachgewiesen

** nur in *E. coli* nachgewiesen

*** nur in Rinderherz und *P. denitrificans* nachgewiesen; T. Ohnishi, pers. Mitteilung

Der Elektronenweg innerhalb des Komplexes konnte mit Hilfe der ESR-Spektroskopie jedoch nicht aufgeklärt werden, da diese Methode nicht schnell genug ist, um die Reduktion der FeS Zentren durch NADH, die nach 5 ms abgeschlossen ist, zeitlich aufzulösen (van Belzen & Albracht, 1989). Aufgrund der Abfolge der Mittenpotentiale der Kofaktoren und verschiedener biochemischer Untersuchungen lässt sich folgender Elektronenweg in Komplex I formulieren. Das NADH bindet an die Untereinheit NuoF, die eine typische Rossman-Faltung aufweist, und überträgt zwei Elektronen auf FMN (Dooijewaard et al., 1978; Fecke et al., 1994). Das gebildete FMNH₂ gibt die Elektronen dann in zwei Einzelschritten an die FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 weiter, die einen isopotentiellen Elektronenspeicher bilden (Tab. 1-2; Krishnamoorthy & Hinkle, 1988). Von den isopotentiellen FeS Zentren werden die Elektronen auf das FeS Zentrum N2 übertragen, das ein pH-abhängiges Mittenpotential besitzt, welches positiver ist als das aller anderen

bekanntes Redoxgruppen in Komplex I. Von N2 gelangen die Elektronen auf noch unbekanntem Weg über zwei ESR-spektroskopisch unterscheidbare Semichinonradikale zum Substrat Ubichinon, das zum Ubichinol reduziert wird (Vinogradov et al., 1995). Bis auf die pH-Abhängigkeit des Mittenpotentials von N2 gibt es keine Hinweise darauf, welche Elektronenübertragung mit einer Protonentranslokation gekoppelt ist. Anhand der Potentialdifferenzen wird lediglich vorhergesagt, daß die bei der Elektronenübertragung freiwerdende Energie aus thermodynamischen Gründen zur Translokation von 4 Protonen pro 2 Elektronen ausreicht.

Die UV/Vis-Spektroskopie ist im Allgemeinen für die Beschreibung von FeS Zentren weit weniger geeignet. Mit dieser Methode werden sowohl das Protein, als auch die Kofaktoren erfaßt. Für interpretierbare Spektren sind optisch klare, monodisperse Präparationen erforderlich. Daher wurden bei ersten UV/Vis-spektroskopischen Charakterisierungen vorallem lösliche Fragmente des Komplex I untersucht, die in der Regel proteinchemisch nicht definiert waren (Hatefi & Stempel, 1969). Spektren von Triton-solubilisiertem Komplex I werden durch Streueffekte und Absorptionen des Detergenz überlagert. In den letzten Jahren gelang es durch die Wahl geeigneter Detergenzien, den Gesamtkomplex bis in den UV-Bereich hinein spektroskopisch zu charakterisieren (Schulte et al., 1998). Für kinetische Messungen konnte durch die Diodenarray Technologie das Spektrum von 200 bis 600 nm im ms-Bereich registriert werden.

Das UV/Vis-Spektrum von Komplex I in Dodecylmaltosid (Abb. 1-5) besteht aus einem großen Absorptionsgipfel bei 280 nm, der vorallem durch aromatische Aminosäuren hervorgerufen wird (Whitaker & Granum, 1980), und einer breiten Schulter von 300 bis 600 nm. In diesem Bereich absorbieren die Redoxgruppen von Komplex I. Die Reduktion des Enzyms (Abb. 1-5, Einschub) führt zu einer geringen Bleichung der Absorption in diesem Bereich (Schulte et al., 1998; Friedrich et al., 1998). Die Beiträge zu den Absorptionen zwischen 300 und 600 nm wurden den bekannten Redoxgruppen durch Vergleich mit Modellverbindungen zugeordnet. Durch Spektroskopie an Komplex I Fragmenten mit verschiedenen Gehalten an FeS Zentren und durch selektive Zerstörung der FeS Zentren wurden die spektralen Anteile von FMN und FeS Zentren separiert (King et al., 1966; Hatefi & Stempel,

1969). Die Zuordnungen der Absorptionsmaxima zu den einzelnen Kofaktoren aus Literaturdaten faßt Tabelle 1-3 zusammen.

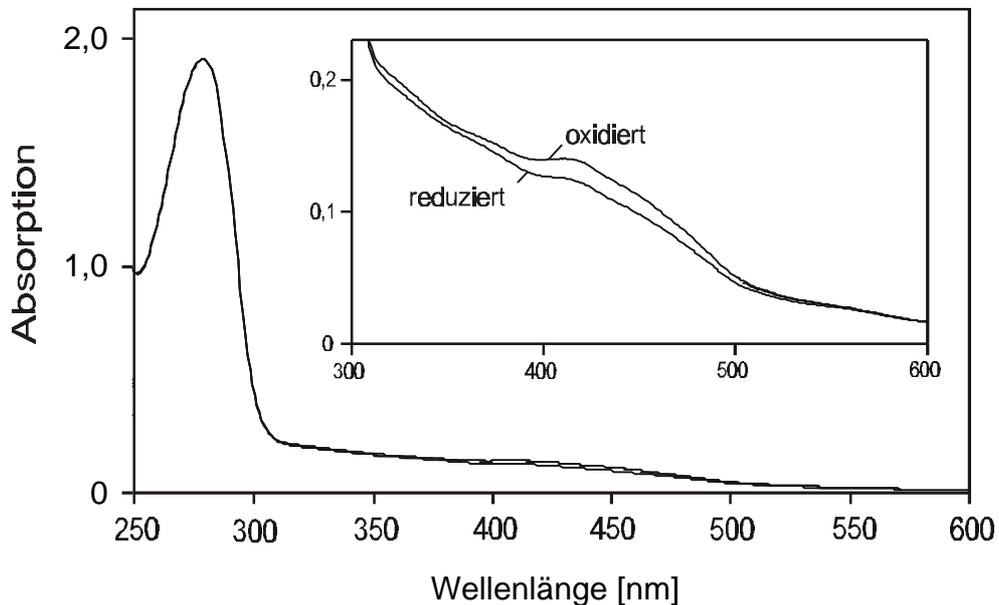


Abbildung 1-5: UV/Vis-Spektren von 2 μM *N. crassa* Komplex I im oxidierten und im reduzierten Zustand. Der Einschub zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von 300 bis 600 nm (nach Schulte et al., 1998).

Tabelle 1-3: Absorptionsmaxima von Komplex I und deren Zuordnung anhand von Literaturdaten

Redoxgruppe	λ_{max} [nm]	Literatur
FMN	373, 445	Gishla, 1980
[2Fe2S]	330, 420, 463, 550	Malkin, 1973
	332, 422, 466	Cheng et al., 1994
	330, 460, 550	Dailey et al., 1994
	423, 550	Khoroshilova et al., 1997
[4Fe4S]	380 – 400	Malkin, 1973
	410	Johnson et al., 1982
	409	Khoroshilova et al., 1997

2. Einleitung

Die Absorptionsänderungen bei Reduktion lassen sich besser in Differenzspektren darstellen. Üblicherweise werden Spektren des oxidierten Komplex I von denen des reduzierten abgezogen. Abb. 1-6 zeigt ein typisches Differenzspektrum des isolierten Komplex I aus *N. crassa*, mit Minima bei 330, 420 und 440 nm. Man erkennt, daß sich die einzelnen Komponenten vollständig überlagern.

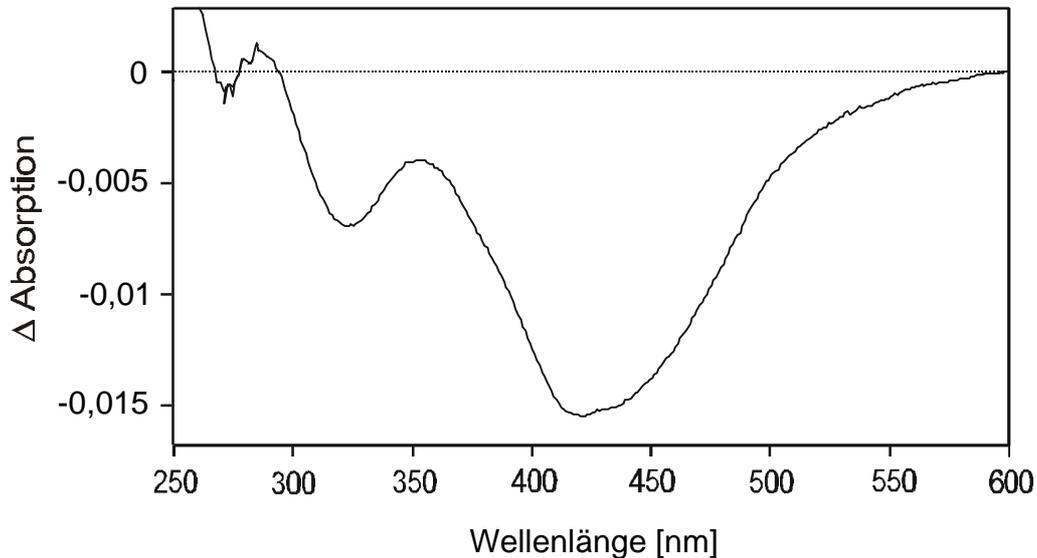


Abbildung 1-6: UV/Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektrum von 1 μ M *N. crassa* Komplex I.

Die Absorptionen der einzelnen Komponenten des Komplex I lassen sich kinetisch trennen, wenn die Spektren während der Reaktion zeitaufgelöst registriert werden. Da Komplex I durch einen Überschuß NADH in weniger als 3 ms reduziert ist, kann diese Reaktion selbst mit stopped-flow Methoden nicht aufgelöst werden (Schulte et al., 1998). Daher wurde die langsamere Reoxidation von reduziertem Komplex I durch NAD^+ untersucht. Komplex I aus *N. crassa* wurde zunächst mit einem 3- bis 5-fachen NADH Überschuß reduziert und dann mit Hilfe der Laktat Dehydrogenase (LDH) Reaktion reoxidiert. Die Laktat Dehydrogenase reduziert Pyruvat unter Verbrauch von NADH zu Laktat. Ein großer Überschuß an Pyruvat führt daher zu einer Oxidation von NADH zu NAD^+ . NAD^+ wiederum oxidiert Komplex I über den physiologischen Elektroneneingang. Es zeigt sich, daß die Redoxgruppen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten reoxidieren, was zu ersten Hinweisen auf die Existenz zweier neuer Redoxgruppen führte (Amling, 1996; Schulte et al., 1998; Friedrich et al., 1998). Zu einem frühen Zeitpunkt der Reoxidation wurde eine Komponente mit negativen Differenzabsorptionen bei 320 und 425 nm beobachtet

(Abb. 1-7). Da die chemische Struktur dieser Gruppe unbekannt war, wurde sie als Y bezeichnet (Schulte et al., 1998). Am Ende der Reoxidation bleibt eine Komponente mit einer breiten, negativen Differenzabsorption um 430 nm und positiver Differenzabsorption bei 300 nm sichtbar (Abb. 1-7). Sie wurde als Gruppe X bezeichnet (Schulte et al., 1998).

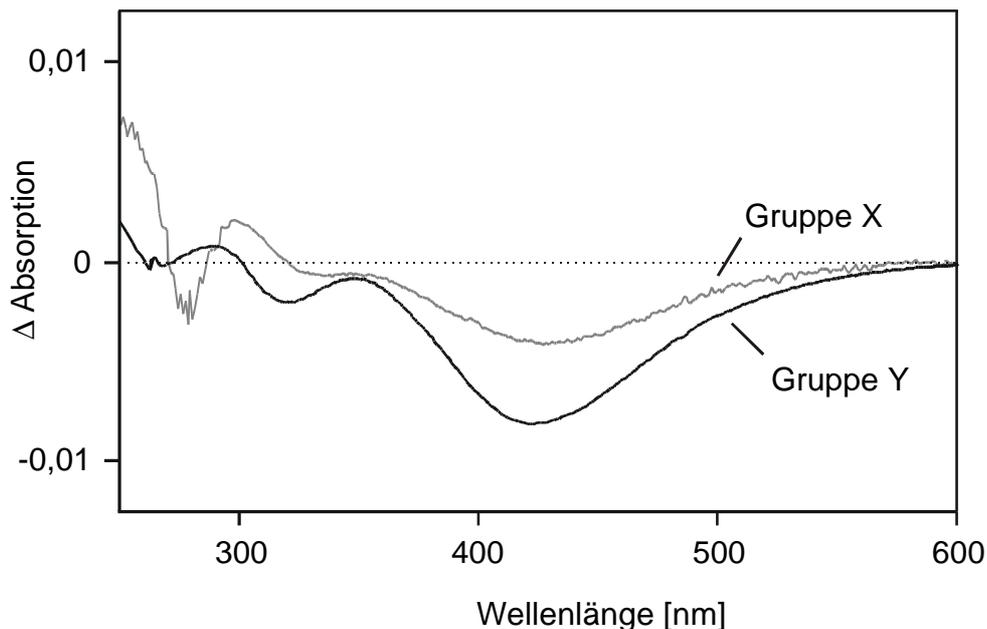


Abbildung 1-7: UV/Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektrn der unbekanntn Redoxgruppen X (grau) und Y (schwarz) in 1 μ M *N. crassa* Komplex I.

Die Gruppe Y wurde im isoliertem Komplex I aus *N. crassa* charakterisiert. Sie besitzt ein pH-unabhängiges Mittenpotential von -270 mV und überträgt zwei Elektronen (Brors, 1999; Rasmussen, 1999; Rasmussen et al., eingereicht). Die Gruppe befindet sich im peripheren Arm von Komplex I, eine genaue Zuordnung zu einer Untereinheit war aber nicht möglich.

Die Gruppe X wurde im *N. crassa* Komplex I als Zweielektronen-Überträger mit einem ungefähren Mittenpotential von -120 mV charakterisiert (Abelmann, 1999). Ihr Potential liegt damit zwischen dem Potential des FeS Zentrums N2 und dem von Ubichinon. Eine solche Gruppe wurde aus thermodynamischen Gründen postuliert

(Guénebaut et al., 1998), da sonst die Elektronenübertragung von N₂ auf Ubichinon aufgrund der großen Potentialdifferenz irreversibel wäre. Es wurde jedoch experimentell gezeigt, daß Komplex I reversibel arbeitet (Gutman et al., 1972). Aufgrund vielfältiger Untersuchungen in unserem Institut wurde vorgeschlagen, daß die Gruppe X eine chinoide Struktur aufweist und möglicherweise an der Protonentranslokation beteiligt ist. Weder die chemische Struktur der Gruppe X, noch ihre Lokalisation im Gesamtkomplex ist bekannt.

Außer ESR- und UV/Vis-Spektroskopie wurden noch Resonanz-Raman-Spektroskopie und magnetischer Zirkulardichroismus zur Untersuchung von löslichen Fragmenten des Komplex I aus Rinderherz und von einzelnen, überproduzierten Komplex I Untereinheiten aus *P. denitrificans* verwendet (Kowal et al., 1986; Crouse et al., 1994). Diese Untersuchungen tragen allerdings nicht zu dem weiteren Verständnis des Komplex I bei. Die FTIR-Spektroskopie wurde bislang noch nicht auf Komplex I angewendet. Mit Hilfe dieser Methode werden Änderungen sowohl der Kofaktoren als auch des Proteins erfaßt. In Kombination mit elektrochemischen Methoden werden Konformationsänderungen und Protonierungen einzelner Aminosäureseitenketten in Abhängigkeit des Redoxpotentials verfolgt (Mäntele, 1993; Hellwig et al., 1998). Dazu wird das Redoxpotential in einer spektroelektrochemischen Zelle über einen Potentiostaten eingestellt (Baymann et al., 1991). Die geringe Schichtdicke dieser Meßzelle von etwa 10 µm gestattet eine schnelle Einstellung des Potentials, erfordert aber auch eine hohe Proteinkonzentration von über 100 µM.

2.5 Thema der Arbeit

Wie oben beschrieben, gibt es spektroskopische Hinweise, daß der mitochondriale Komplex I zusätzlich zu den bekannten Redoxgruppen, FMN und den ESR-spektroskopisch nachgewiesenen FeS Zentren, noch weitere Redoxgruppen, X und Y, enthält. Die Eigenschaften dieser Gruppen in Komplex I aus *N. crassa* wurden in anderen Doktorarbeiten in unserem Institut erstmalig beschrieben (Amling, 1996; Abelmann, 1999; Rasmussen, 1999; Brors, 1999). Ihre chemische Struktur, ihre thermodynamischen Eigenschaften und ihre Lokalisation in Komplex I blieben jedoch bislang unbekannt. Weiterhin ist unbekannt, ob diese Gruppen auch in der bakteriellen Minimalform des Komplex I vorkommen.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit verschiedenen spektroskopischen Methoden die Art und die Anzahl der Redoxgruppen in dem bakteriellen Komplex I aus *E. coli* zu bestimmen. Die Zahl der Untereinheiten, auf denen die unbekannt Redoxgruppen lokalisiert sein könnten, ist dadurch auf 13 reduziert. Die Redoxgruppen sollten UV/Vis-, ESR- und FTIR-spektroskopisch detektiert und charakterisiert werden. Durch UV/Vis-Spektroskopie werden alle Redoxgruppen beschrieben, während die ESR-Spektroskopie selektiv die FeS Zentren des Komplex I erfaßt. Mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie sollten die Änderungen des Proteins und der Kofaktoren bei elektrochemisch induzierten Potentialwechseln und somit eine mögliche Beteiligung einzelner Kofaktoren an der Protonentranslokation nachgewiesen werden. Dazu sollte zum einen versucht werden, die Absorptionen der einzelnen Kofaktoren wie im Komplex I aus *N. crassa* kinetisch zu trennen. Zum anderen sollte versucht werden, den Komplex I in stabile Fragmente zu spalten, die proteinchemisch handhabbar sind. Die Kofaktoren der Fragmente sollten ebenfalls, wie oben beschrieben, spektroskopisch charakterisiert werden.

Darüberhinaus wurde versucht, die bereits beschriebene Homologie von Teilen des Komplex I zu Hydrogenasen und Ferredoxinen auszunutzen. Da diese Enzyme zu Komplex I homologe Untereinheiten enthalten, könnten sie auch die gleichen Redoxgruppen tragen. Um dies zu untersuchen, sollten die Spektren des *E. coli* Komplex I mit denen anderer bakterieller Enzyme verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Anzucht von *E. coli*

Der *E. coli* Stamm ANN003/pAR1219, ein Komplex I - Überproduzent (Spehr et al., 1999), wurde aerob bei 37 °C im Auftrag bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, angezogen. Ein 1000 l Fermenter mit LB-Medium (10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) und 0,005 g/l Eisenammoniumcitrat, 0,002 g/l Natriumsulfid und 0,01 g/l Riboflavin wurde mit 10 l Vorkultur in LB-Medium mit 0,11 g/l Ampicillin angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen mit 0,1 g/l IPTG induziert und abermals 0,005 g/l Eisenammoniumcitrat zugesetzt. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Aus 1000 l Kultur wurden zwischen 2,5 und 3,0 kg Zellen (Feuchtmasse) erhalten und bei -70°C gelagert.

3.2 Isolierung von Komplex I

Komplex I wurde aus dem *E. coli* Stamm ANN003/pAR1219 isoliert. Alle Präparationsschritte wurden bei 4°C und mit einer Endkonzentration von 200 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma) in allen Lösungen durchgeführt. 100 g tiefgefrorene Zellen wurden in 180 ml 50 mM 2-(N-Morpholino-) ethansulfonsäure (MES, Gerbu)/NaOH, 50 mM NaCl, pH 6,0 unter Zusatz von 0,6 g Lysozym (Fluka), einer Spatelspitze DNase I (Boehringer) und 250 µl Antischaum-Emulsion (Sigma) in einem Labormixer (Waring) zerkleinert und anschließend in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator homogenisiert. Die Zellen wurden in einer French Pressure Cell (SLM Aminco) bei 110 MPa aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden anschließend durch 30 min Zentrifugation bei 36.000 g (16.000 Upm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Kontron) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Plasmamembranen durch 90 min Zentrifugation bei 250.000 g (50.000 Upm, Rotor 60Ti, Ultrazentrifuge L7-65, Beckman) erhalten. Sie wurden in soviel 50 mM MES/NaOH, 1,8 M NaBr, pH 6,0 aufgenommen, daß die Endkonzentration 1,4 M NaBr betrug und erneut wie oben beschrieben bei 250.000 g für 1 h zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0

resuspendiert und erneut für 1 h zentrifugiert. Anschließend wurden die Membranen mit 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 auf 20 ml gebracht, unter Rühren mit 3,53 ml einer 20 %igen Lösung von n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid (Dodecylmaltosid, Calbiochem) versetzt und homogenisiert. Die 3 %ige Dodecylmaltosid-Suspension wurde 10 min inkubiert, mit weiteren 10 ml 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 versetzt, erneut homogenisiert und schließlich 1 h wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 verdünnt und auf eine 40 ml Anionenaustausch-Chromatographiesäule (Source 15Q, 26 mm x 7,5 mm, XK 26, Pharmacia Biotech) aufgetragen, die mit 50 mM MES/NaOH, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 äquilibriert war. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen 350 ml Gradienten von 50 bis 350 mM NaCl in 50 mM MES/NaOH, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 bei einer Flußgeschwindigkeit von 3 ml/min eluiert. Fraktionen mit NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurden vereinigt und auf eine Endkonzentration von 9 % (w/v) Polyethylenglykol 4000 (Boehringer) gebracht. Nach 5 min Inkubation wurde das ausgefällte Protein durch 5 min Zentrifugation bei 69.000 g (20.000 Upm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Kontron) sedimentiert und anschließend in 1,4 ml 50 mM MES/NaOH, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 gelöst. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine mit 50 mM MES/NaOH, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 äquilibrierte 180 ml Größenausschluß-Chromatographiesäule (Ultrogel AcA 34, 15 mm x 1000 mm, Serva) aufgetragen und im selben Puffer mit einer Flußgeschwindigkeit von 7,2 ml/h eluiert. Durch UV/Vis-Spektroskopie (Diodenarray-Spektrometer, Specord S10 UV-VIS, Zeiss) wurde der Gehalt an Cytochrom-Verunreinigungen anhand der γ -Absorptionsbande bei 412 nm abgeschätzt. Cytochromfreie Fraktionen mit NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Für spektroskopische Untersuchungen wurden die Fraktionen durch eine weitere Anionenaustausch-Chromatographie (1 ml MonoQ, HR 5/5, Pharmacia Biotech) nachgereinigt. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen 20 ml Gradienten von 50 bis 350 mM NaCl in 50 mM MES/NaOH, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,6 ml/min eluiert. Cytochromfreie Fraktionen mit NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurden für die UV/Vis- und FTIR-Differenzspektroskopie verwendet.

3.3 Stabilität des Komplex I

Die Stabilität des überproduzierten Komplex I in Dodecylmaltosid wurde wie beschrieben untersucht (Leif et al., 1995). Cytoplasmamembranen wurden auf definierte Salz- und pH-Bedingungen eingestellt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Membransuspension wurde auf eine Dodecylmaltosid-Konzentration von 3% (w/v) gebracht und 20 min bei 69.000 g (20.000 Upm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Kontron) zentrifugiert. Die extrahierten Proteine wurden durch 16 h Zentrifugation bei 180.000 g (36.000 Upm, Rotor SW40Ti, Ultrazentrifuge L7-65, Beckman) in 12 ml Gradienten aus 5 bis 25% (w/v) Saccharose im jeweiligen Puffer getrennt. In den Fraktionen der Zuckergradienten wurde die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität bestimmt.

3.4 Spaltung des isolierten Komplex I

Zur Spaltung wurde der isolierte Komplex I in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree-15 mit Biomax-100-Membran, Millipore) bei 2300 g ca. 30-fach aufkonzentriert (3000 Upm, Tischzentrifuge GS-6R, Rotor GH 3.7, Beckman), auf das Ausgangsvolumen mit 50 mM Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan/HCl (TrisCl), 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 9,0 aufgefüllt und erneut aufkonzentriert. Die so erhaltenen Komplex I - Fragmente wurden auf einer in 50 mM TrisCl, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 9,0 äquilibrierten 108 ml Größenausschluß-Chromatographiesäule (BioSep-Sec-4000, Phenomenex) bei einer Flußgeschwindigkeit von 2,5 ml/min im selben Puffer voneinander getrennt. Die Spektren der Proteine wurden kontinuierlich in einer Durchflußküvette (1 cm Schichtdicke, J&M) mit einem Diodenarray-Spektrometer mit Lichtleiter-Optik (TIDAS UVI/1001-1, J&M) aufgenommen.

3.5 Andere verwendete Enzyme

Die isolierte Ech Hydrogenase aus *M. barkeri* (Künkel et al., 1998) wurde freundlicherweise von Dr. Reiner Hedderich, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, die isolierte NAD⁺ - reduzierende Hydrogenase aus *R. eutropha* (Schneider et al., 1979) von Prof. Bärbel Friedrich, Humboldt Universität, Berlin zur Verfügung gestellt. Dr. Jacques Meyer und Dr. Jean-Marc Moulis, Departement de Biologie Moleculaire et Structurale, CEA-Grenoble, stellten freundlicherweise UV/Vis-Spektren des elektrochemisch oxidierten und reduzierten 8Fe Ferredoxins aus *Clostridium pasteurianum* zur Verfügung (Moulis & Meyer, 1982).

3.6 UV/Vis-Spektroskopie

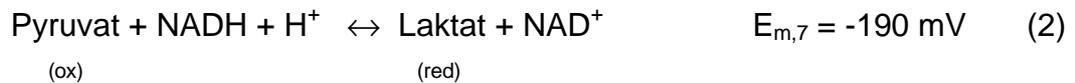
UV/Vis-Spektren im Bereich von 200 bis 600 nm wurden mit einem TIDAS UVI/1001-1 Diodenarray-Spektrometer mit 512 Dioden (J&M, Aalen) aufgenommen. Typischerweise wurden in Intervallen von 0,5 Sekunden 25 Spektren mit einer Integrationszeit von je 20 ms akkumuliert. Die Meßdaten wurden mit dem Programm „Spektrachrom“ (J&M, Aalen) ausgewertet. Alle Puffer, die für die UV/Vis-Spektroskopie verwendet wurden, wurden filtriert (Flachmembran mit 0,1 µm Porengröße, Millipore) und im Wasserstrahlpumpen-Vakuum entgast.

3.6.1 Anaerobe Messungen

Anaerobe Messungen wurden bei Raumtemperatur in einem Anaerobenzelt (COY, Grass Lake, USA) in einer Atmosphäre aus 95% Stickstoff und 5% Wasserstoff durchgeführt. Restsauerstoff wurde durch Platinkatalysatoren mit Wasserstoff zu Wasser umgesetzt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch fünfmal unter Rühren im Wasserstrahlpumpen-Vakuum entgast und mit Stickstoff begast. Die verwendeten Lösungen wurden mit diesen Puffern unmittelbar vor Gebrauch im Anaerobenzelt angesetzt. Die untersuchten Proteine wurden mindestens 20-fach in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree-15 mit Biomax-100-Membran, Millipore) aufkonzentriert und mit entgasten Puffern im Anaerobenzelt auf die jeweilige Endkonzentration gebracht.

3.6.2 Die Laktat Dehydrogenase Reaktion

Die Laktat Dehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Sie wurde mit einem Überschuß an Pyruvat zur Oxidation von NADH verwendet. Unter anaeroben Bedingungen wurden 600 µl Komplex I oder NADH Dehydrogenase Fragment in 50 mM MES/NaOH, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 und 0,5 mM Natriumpyruvat in einer Rührküvette vorgelegt. Das UV/Vis-Absorptionsspektrum wurde gegen Puffer als Referenz registriert und anhand der Absorption bei 280 nm die Proteinkonzentration – typischerweise etwa 2 µM – bestimmt. Das Spektrum des oxidierten Enzyms diente als Referenz für die folgenden Messungen, so daß automatisch (reduziert minus oxidiert)-Differenzspektren registriert wurden. Dazu wurde während der Messung zunächst ein 5-fach molarer Überschuß an NADH (grade I, Boehringer), dann 0,2 U Laktat Dehydrogenase (LDH, Typ II aus Kaninchenmuskel, Sigma) zugegeben. Das zugegebene Gesamtvolumen betrug maximal 2 µl.

3.6.3 Die Hydroxybutyrat Dehydrogenase Reaktion

Die Hydroxybutyrat Dehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Sie wurde hier verwendet, um langsam NADH zu bilden, das sofort mit Komplex I reagiert. Analog zur beschriebenen LDH-Reaktion wurden 600 µl Komplex I in Puffer mit 2 mM Acetoacetat, 5 µM NAD⁺ und 0,3 U Hydroxybutyrat Dehydrogenase (HDH, aus *Pseudomonas lemoignei*, Sigma) unter anaeroben Bedingungen vorgelegt. Während der Messung wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 1 M Hydroxybutyrat gestartet.

3.6.4 Reduktion mit Natriumdithionit und Reoxidation mit Sauerstoff

In einer Rührküvette wurden 600 µl Komplex I, NADH Dehydrogenase Fragment, Chinon Reduktase Fragment, Ech Hydrogenase oder NAD⁺-reduzierende Hydrogenase in 50 mM MES/NaOH, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 vorgelegt. Die Konzentrationen der Enzyme sind jeweils im Ergebnisteil angegeben. Nach Zugabe einiger Körnchen Dithionit wurde die langsame Reoxidation durch Luftsauerstoff kontinuierlich bei 315 nm verfolgt (Mayhew & Massey, 1973).

3.7 Elektrochemisch induzierte Redox-Differenzspektroskopie

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Hellwig am Institut für Biophysik der Universität Frankfurt/Main durchgeführt. FTIR- und Vis-Differenzspektren wurden simultan als Funktion des angelegten Potentials im Bereich von 4000 bis 1000 cm⁻¹ bzw. 400 bis 900 nm von der selben Probe registriert (Moss et al., 1990; Mäntele, 1993). Typischerweise wurden für jedes IR-Spektrum 128 Interferogramme bei einer Auflösung von 4 cm⁻¹ addiert.

Es wurde eine optisch transparente elektrochemische Dünnschichtzelle mit Dreielektrodenanordnung und Ag/AgCl/3 M KCl Referenzelektrode verwendet (Moss et al., 1990). Die Goldnetz-Arbeitslektrode wurde mit 2 mM Cysteamin modifiziert um die Denaturierung des Proteins an der Elektrodenoberfläche zu verhindern (Hellwig et al., 1998). Die Redoxreaktion wurde durch Zusatz von Mediatoren beschleunigt (Baymann, 1995). Die in Tabelle 3-1 aufgeführten Mediatoren wurden in einer Endkonzentration von je 42 µM eingesetzt (Hellwig, 1998). Etwa 7 µl 250 µM Komplex I in 50 mM MES/NaOH, 200 mM KCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 bzw. 250 µM NADH Dehydrogenase Fragment in 50 mM MES/NaOH, 200 mM KCl, pH 6,0 reichten für FTIR-Messungen bei einer Schichtdicke von 6 bis 8 µm aus. Für die Vis-spektroskopische Redoxtitration betrug die Schichtdicke 40 µm.

3. Material und Methoden

Tabelle 3–1: Eingesetzte Mediatoren und ihre Mittenpotentiale (nach Hellwig et al., 1998; Hellwig et al., 2000)

Mediator	$E_{m,7}$ [mV]
Ferrocenyl-trimethylammoniumiodid	645
Ferrocen-1,1'-dicarbonsäure	644
Kaliumhexacyanoferrat (II)	424
Dimethyl-paraphenylendiamin	371
Diethyl-3-methyl-paraphenylendiamin	367
1,1'-Dimethyl-ferrocen	341
Tetrachlor-benzochinon	280
Tetramethyl-paraphenylendiamin	270
2,6-Dichlorphenol-indophenol	217
Rutheniumhexaminchlorid	200
1,2-Naphthochinon	145
Trimethyl-hydrochinon	100
Menadion	-12
2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon	-125
Anthrachinon-2-sulfonat	-225
Neutralrot	-307
Benzylviologen	-360
Methylviologen	-446

Die Äquilibrierungszeit des Proteins wurde wie folgt bestimmt. Bei einem vollständig reduzierenden Potential von -500 mV wurden solange Spektren registriert, bis diese konstant waren. Dann wurde ein vollständig oxidierendes Potential von $+400$ mV angelegt und die Zeit bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung bestimmt. Differenzspektren wurden erhalten, indem das Einzelspektrum der reduzierten Probe vom Spektrum der oxidierten Probe abgezogen wurde. 10 bis 15 dieser Differenzspektren wurden gemittelt.

Zur Potentialtitration wurden ein Spektrum der Probe bei einem bestimmten Potential im Gleichgewichtszustand und anschließend alternierend Referenzspektren der vollreduzierten und der volloxydierten Probe aufgenommen. Die typische Abfolge der Potentialschritte einer Titration wäre zum Beispiel: -500 mV , -450 mV , $+400\text{ mV}$, $+350\text{ mV}$, -500 mV , -400 mV ... u.s.w., wobei die Potentiale bei -500 und $+400\text{ mV}$ die Referenzspektren liefern. Auf diese Weise werden Basislinienschwankungen eliminiert. Die Potentialtitrationen wurden mit dem Programm E_h -TIT (Baymann et al., 1991) ausgewertet. Die Differenzabsorption bei 420 nm wurde gegen das angelegte Potential aufgetragen. An diese Punkte wurden Nernst-Kurven interaktiv angepaßt. Das Mittenpotential, die Anzahl der übertragenen Elektronen und der Differenz-Extinktionskoeffizient wurden variiert, bis die berechnete Kurve möglichst gut mit den gemessenen Daten übereinstimmte.

3.8 ESR-Spektroskopie

ESR-spektroskopische Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Friedrich durchgeführt. Komplex I bzw. Fragmente des Komplexes wurden durch Ultrafiltration (Ultrafree-15 mit Biomax-100-Membran, Millipore) bei 2300 g aufkonzentriert (3000 Upm , Tischzentrifuge GS-6R, Rotor GH 3.7, Beckman) und mit einem 1000 -fach molaren Überschuß an NADH oder mit Natriumdithionit reduziert. Die Proben wurden zunächst in einer $1:5$ Isopentan/Methylcyclohexan Kältemischung bei 150 K , dann in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Messung bei -70 °C gelagert. Die Spektren wurden bei 40 K bzw. 13 K mit einem Bruker EMX 6/1 ESR Spektrometer mit einem ESR-9 Kryostaten (Oxford Instruments) aufgenommen. Die Mikrowellenfrequenz betrug $9,461\text{ GHz}$, die Modulationsamplitude 6 G , die Modulationsfrequenz 100 kHz , die Zeitkonstante 164 ms , die Mikrowellenleistung 2 mW und die Aufnahmegeschwindigkeit $17,9\text{ mT/min}$.

3.9 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung und die Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur des *E. coli* Komplex I wurde von Dr. Bettina Böttcher am EMBL in Heidelberg durchgeführt. Komplex I oder Fragmente des Komplexes wurden an einem mit Kohlenstoff überzogenen Gitter adsorbiert, durch Waschen mit 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 von überschüssigem Detergenz befreit und mit 1 % (w/v) Uranylacetat oder Goldthioglukose negativ kontrastiert. Der Waschpuffer enthielt für Aufnahmen des reduzierten Zustands der Enzyme 0,2 mM NADH und 5 mM Dithiothreitol (ICN). Die Probe wurde mit einem Philips Biotwin Elektronenmikroskop (100 kV) mit 52.000-facher Vergrößerung aufgenommen. Durch Analyse von bis zu 60.000 Einzelpartikeln wurde die dreidimensionale Struktur mit dem Programmpaket IMAGIC (van Heel et al., 1979; van Heel & Keegstra, 1981; van Heel et al., 1996) berechnet.

3.10 Verschiedene analytische Methoden

NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität: Die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurde photometrisch bei Raumtemperatur gemessen (Shimadzu UV102-02 Spektralphotometer). Die zeitliche Extinktionsänderung bei 410 nm nach Zugabe von 2-5 μ l Probe zum Testpuffer (50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,1 mM NADH) wurde registriert. Der molare Extinktionskoeffizient von $K_3[Fe(CN)_6]$ beträgt $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Friedrich et al., 1989).

SDS-Gelelektrophorese: Proben von 45 μ l wurden mit 15 μ l 4xProbenpuffer (8 % SDS, 20 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 M Trisacetat, 3,5 mM Dithiothreitol) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und auf ein diskontinuierliches Gel aus einem 3 %-igen Sammel- und einem 16 %-igen Trenngel (Laemmli, 1970) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 180 V und 35 mA über 16 h aufgetrennt. Der Kammerpuffer bestand aus 0,4 M Glycin, 0,05 M Tris, pH 8,3, 0,1 % SDS. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel 2 h in 0,1 % Coomassie-Blue R 250, 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure gefärbt und anschließend in 12,5 % Isopropanol und 10 % Essigsäure über mehrere Stunden entfärbt. Für eine

Silberfärbung wurden die Gele mindestens 1 h in 10 % Essigsäure und 30 % Ethanol fixiert und dreimal 15 min in 30 % Ethanol gewaschen. Nach 1 min Inkubation in 0,8 mM Natriumthiosulfat wurde das Gel zweimal 30 s mit Wasser gewaschen und in einer Lösung aus 0,6 M Natriumcarbonat, 16 μ M Natriumthiosulfat und 0,02 % Formaldehyd entwickelt. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 10 ml konzentrierter Essigsäure gestoppt (Dunbar, 1987).

Analytische Größenausschlußchromatographie: Die molekulare Masse von Komplex I und seinen Fragmenten wurde durch das Elutionsverhalten von einer in 50 mM MES/NaOH, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, pH 6,0 äquilibrierten TSK Fractogel G4000 Säule (TosoHaas) bestimmt. Als Referenz wurden Conalbumin (81 kDa), γ -Globulin (160 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) verwendet.

Proteinbestimmung: Die Proteinmenge wurde nach der Biuret-Methode (Gornall et al., 1949) oder nach der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Alle Werte wurden doppelt bestimmt. Darüberhinaus wurde die Proteinkonzentration UV/Vis-spektroskopisch bestimmt. Dazu wurden die Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm aus der Aminosäuresequenz mit Inkrementen für Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Cystein berechnet (Gill & von Hippel, 1989).

Flavinbestimmung: Aliquots einer 10 μ M Proteinlösung wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt und in lichtgeschützten Einmalreaktionsgefäßen 5 min bei 100 °C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort für 5 min in Eis abgekühlt und 5 min bei 14.000 Upm (Eppendorf Zentrifuge) bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei einer Excitationswellenlänge von 449 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm fluorimetrisch vermessen (Koziol, 1971). Als Standard wurde FMN (Boehringer) verwendet. Alle Werte wurden doppelt bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Komplex I

Der Komplex I aus *E. coli* wurde durch Waschen der Cytoplasmamembran mit Natriumbromid, Extraktion der Membranproteine mit Dodecylmaltosid, Anionenaustausch-Chromatographie an Source 15Q und Größenausschluß-Chromatographie auf Ultrogel AcA 34 isoliert. Für UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen wurde der isolierte Komplex I durch eine zweite Anionenaustausch-Chromatographie an Mono Q nachgereinigt. Komplex I eluierte bei beiden Anionenaustausch-Chromatographien bei 280 mM NaCl und bei der Größenausschluß-Chromatographie nach 66 ml. Tabelle 4-1 und Abb. 4-1 geben einen Überblick über den Verlauf einer typischen Präparation.

Tabelle 4-1: Isolierung von Komplex I aus 100 g Bakterienzellen (Feuchtmasse)

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Proteinmenge [mg]	NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität		Ausbeute [%]
			gesamt	spezifisch	
			[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	
Membranen	60	3710	12240	3,3	100
gewaschene Membranen	30	1320	4490	3,4	37
Extrakt	24	430	3740	8,7	31
Source 15Q	21	60	1370	24	11
Ultrogel AcA 34	11	14	750	54	6
Mono Q*	3	9	610	68	5

* nur als Nachreinigung für spektroskopische Untersuchungen

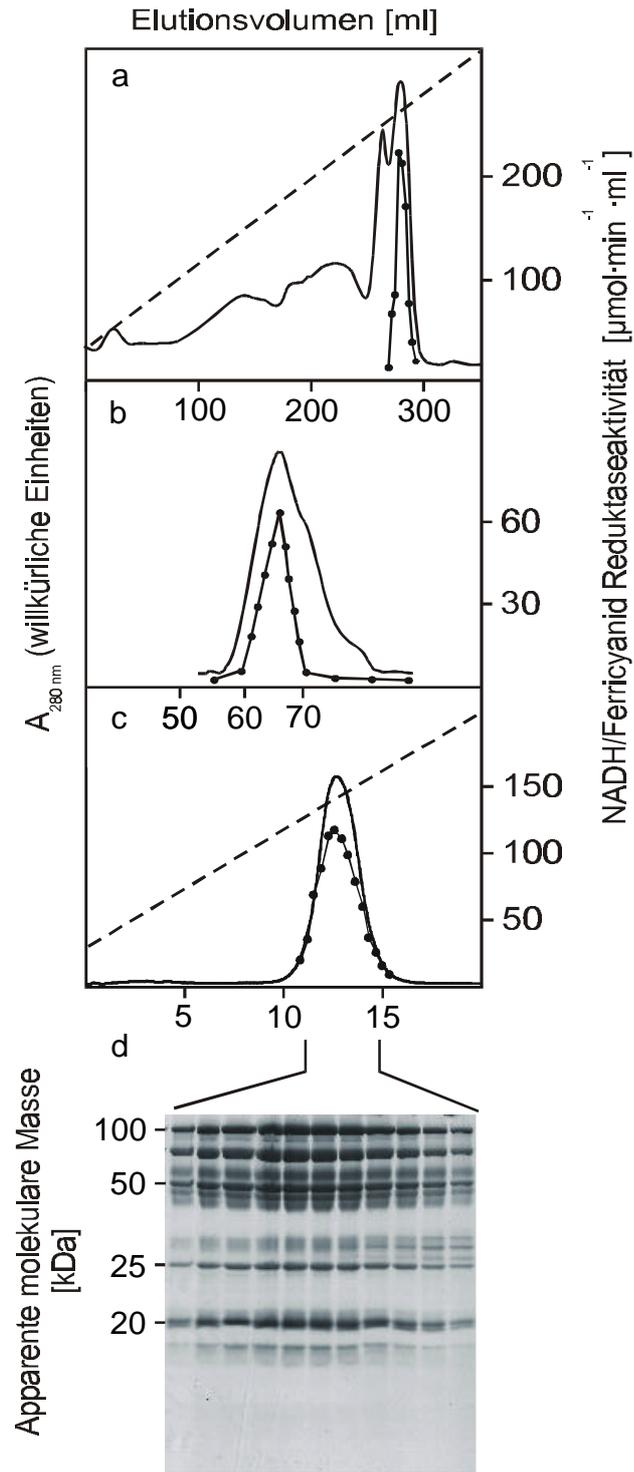


Abbildung 4-1: Reinigung von Komplex I durch erste Anionenaustausch-Chromatographie (a), Größenausschluß-Chromatographie (b) und zweite Anionenaustausch-Chromatographie (c). Die durchgezogene Linie gibt die Extinktion bei 280 nm wieder, die Punktstrich Linie die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität und die gestrichelte Linie die Lage des NaCl-Gradienten. Die Polypeptidzusammensetzung der Gipfelfractionen nach SDS-PAGE zeigt (d).

4. Ergebnisse

Der in Dodecylmaltosid isolierte Komplex I sedimentiert bei Zuckergradienten-Zentrifugation im pH-Bereich zwischen 5,0 und 7,5 und bis zu einer Salzkonzentration von 1,0 M immer im zweiten Drittel des Gradienten (Daten nicht gezeigt, Spehr et al., 1999). Er eluiert bei analytischer Größenausschluß-Chromatographie wie ein Protein mit einer Masse von 670 kDa. Dies stimmt gut mit der aus der Sequenz abgeleiteten Masse von 535 kDa überein, wenn man die Masse der gebundenen Detergenzmicelle von etwa 100 kDa berücksichtigt. Die Präparation enthält 0,9 bis 1,0 mol FMN pro mol Komplex I. Alle bekannten, ESR-spektroskopisch nachweisbaren FeS Zentren des *E. coli* Komplex I sind in der Präparation enthalten (Abb. 4-2).

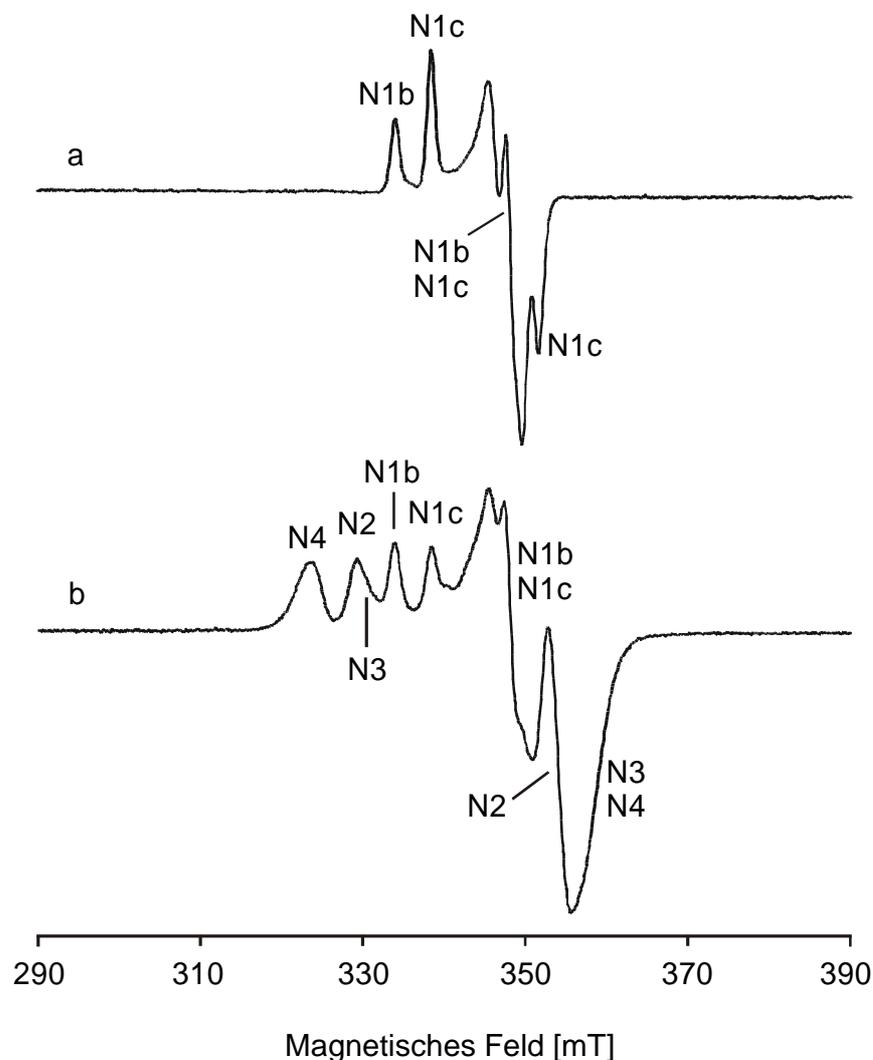


Abbildung 4-2: ESR-Spektren von 100 µM *E. coli* Komplex I bei 40 K (a) und 13 K (b).

Abb. 4-3 zeigt das UV/Vis-Absorptionsspektrum des *E. coli* Komplex I. Die Absorption bei 280 nm wird hauptsächlich durch die aromatischen Aminosäuren und Cysteine des Proteins hervorgerufen. Der Einschub in Abb. 4-3 zeigt die breiten, weniger intensiven Absorptionen der Kofaktoren des Enzyms zwischen 300 und 600 nm.

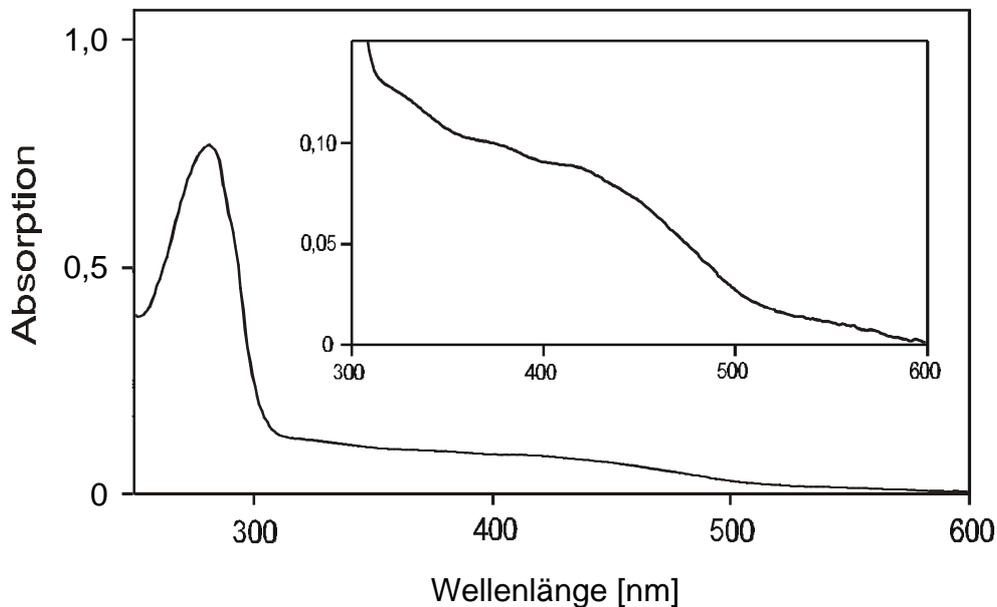


Abbildung 4-3: UV/Vis-Absorptionsspektrum von 1 µM Komplex I. Der Einschub zeigt den vergrößerten Bereich von 300 bis 600 nm.

Abb. 4-4 zeigt UV/Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektren von isoliertem Komplex I. Die Größe der Differenzabsorption hängt von dem Reduktionsgrad des Enzyms und damit von dem verwendeten Reduktionsmittel ab. Mit einem Überschuß an Natriumdithionit ($E_m = -420$ mV in wässriger Lösung; Dutton, 1978) als Reduktionsmittel ergibt sich eine maximale Differenzabsorption (Abb. 4-4 a). Das Spektrum ist allerdings im nahen UV-Bereich durch die Absorption von Natriumdithionit bei 315 nm gestört (Mayhew & Massey, 1973). Nach Oxidation des überschüssigen Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff ist die störende Absorption bei 315 nm nicht mehr vorhanden, die Redoxgruppen des Komplex I liegen jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits partiell reoxidiert vor.

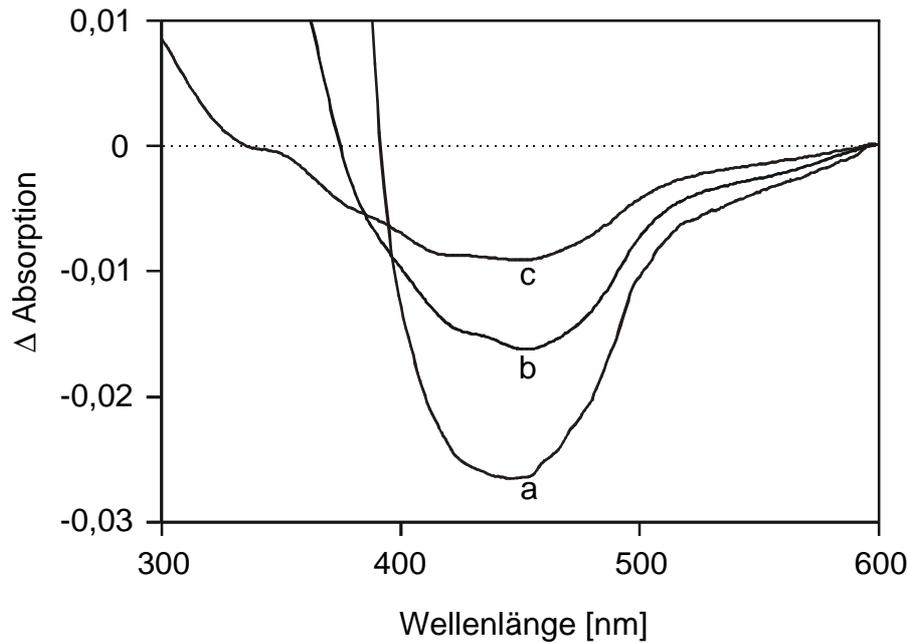


Abbildung 4-4: UV/Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektren von 1 μ M isoliertem Komplex I mit überschüssigem Natriumdithionit (a) bzw. NADH (b). Ein typisches Spektrum unmittelbar nach Oxidation des überschüssigen NADH zeigt (c).

Zur spezifischen Reduktion von Komplex I wurde ein 5-fach molarer Überschuss an NADH verwendet (Abb. 4-4 b). In diesem Fall überlagert die Absorption von NADH bei 340 nm das Differenzspektrum. Die maximale Differenzabsorption der Redoxgruppen ist aufgrund des positiveren Redoxpotentials von NADH ($E_m = -320$ mV) geringer als bei der Reduktion durch Natriumdithionit. Durch Oxidation des überschüssigen NADH mit Hilfe der Laktat Dehydrogenase Reaktion verschwindet die störende Absorption bei 340 nm (Abb. 4-4 c). Auch in diesem Fall liegen die Redoxgruppen je nach eingestelltem Redoxpotential nur noch partiell reduziert vor. Tab. 4-2 faßt die typischen Differenz-Extinktionskoeffizienten bei unterschiedlichen Reduktionszuständen von Komplex I zusammen.

Tabelle 4-2: Differenz-Extinktionskoeffizienten aus UV/Vis-Spektren des reduzierten minus oxidierten Komplex I bei unterschiedlichen Reduktionsbedingungen

Reduktionszustand	$\Delta\epsilon_{450\text{ nm}} [\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$
Reduktion durch Natriumdithionit	0,027
Reduktion durch NADH	0,016
partielle Reoxidation nach Reduktion durch NADH	0,009

Mit Natriumdithionit als Reduktionsmittel wird eine größere maximale Differenzabsorption erreicht, als mit einem 5-fach molaren Überschuß an NADH. Dies ist keine Folge einer unspezifischen Reduktion von zum Beispiel geschädigtem Komplex I, denn die maximale Differenzabsorption bei 450 nm nimmt bei spezifischer Reduktion durch einen größeren NADH Überschuß weiter zu. Die Absorption des NADH bei 340 nm überlappt dann jedoch die Absorptionen der Redoxgruppen bis 420 nm zu stark, um noch Aussagen über die Redoxgruppen des Komplex I zu machen.

4.2 Spaltung des isolierten Komplex I und Charakterisierung der Fragmente

Das NADH Dehydrogenase Fragment wird bei pH 9,0 von dem *E. coli* Komplex I in der Cytoplasmamembran abgespalten (T. Ohnishi, pers. Mitteilung). Um zu überprüfen, ob dies auch für den isolierten Komplex I zutrifft, und ob das restliche Enzym als ein weiteres Fragment erhalten bleibt, wurde der isolierte Komplex I mit Tris-Puffer auf pH 9,0 gebracht. Auf einer Größenausschluß-Chromatographie-Säule wurden die Fragmente in Tris-Puffer bei pH 9,0 getrennt (Abb. 4-5).

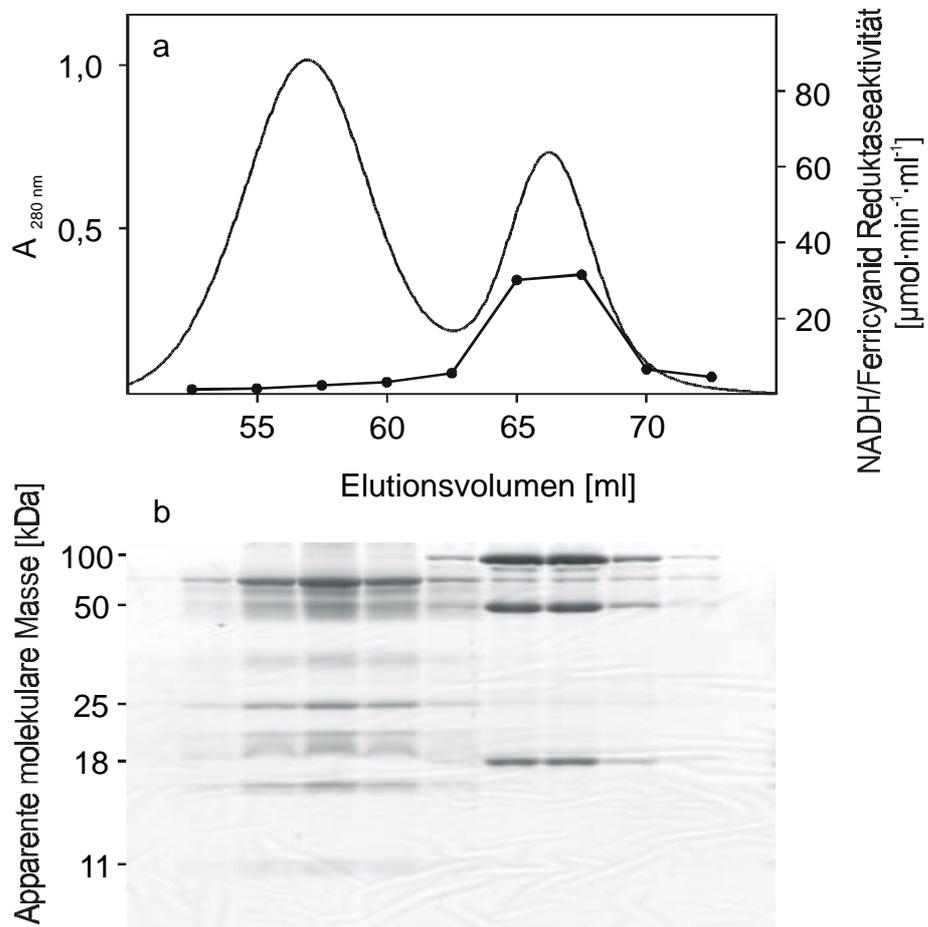


Abbildung 4-5: Spaltung von Komplex I durch Größenausschluß-Chromatographie bei pH 9,0. Die durchgezogene Linie zeigt das Elutionsprofil bei 280 nm, die Punktstrich Linie den Verlauf der NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität in den einzelnen Fraktionen (a). Die Polypeptidzusammensetzung der Fragmente nach SDS-PAGE zeigt (b).

Der Elutionsgipfel bei etwa 65 ml entspricht einem Protein mit einer Masse von 170 kDa. Dies stimmt mit der molekularen Masse des NADH Dehydrogenase Fragments überein. Die Fraktionen zeigen NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität und enthalten die Untereinheiten NuoE, F und G. ESR-Spektren zeigen, daß dieses Fragment die FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 enthält (Abb. 4-6). Es handelt sich somit um das NADH Dehydrogenase Fragment des Komplex I.

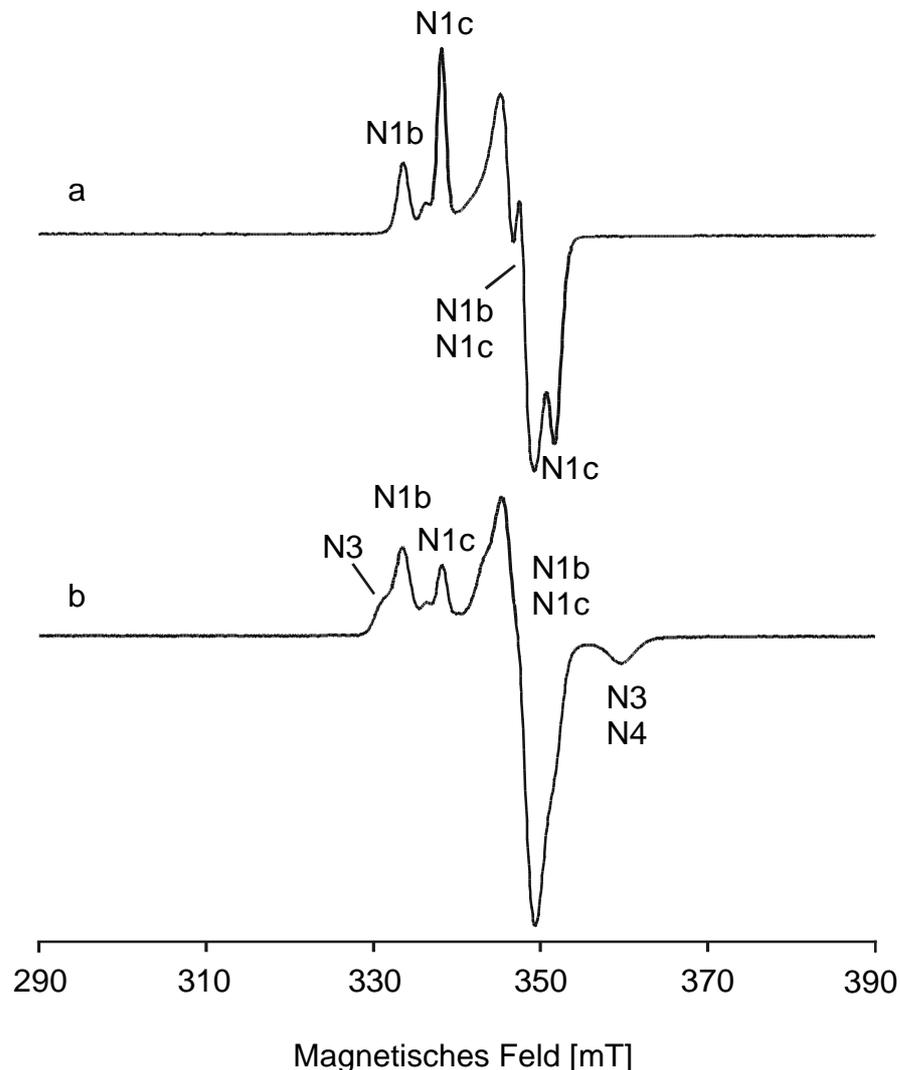


Abbildung 4-6: ESR-Spektren des NADH Dehydrogenase Fragments, erhalten aus der basischen Spaltung des Komplex I. Die Konzentration der Probe beträgt 150 μM , gezeigt sind die Spektren bei 40 K (a) und 13 K (b).

4. Ergebnisse

Die Fraktionen des Proteins, das bei etwa 57 ml eluiert, zeigen keine nachweisbare NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität. Sie enthalten die Untereinheiten NuoA, B, CD und H-N und eluieren einheitlich wie ein Protein mit einer Masse von über 700 kDa. Die aus der Sequenz abgeleitete Masse dieser Untereinheiten summiert sich zu 365 kDa, was dafür spricht, daß dieses Fragment als Dimer vorliegt. Dies wird dadurch unterstützt, daß es ein geringeres Elutionsvolumen als der gesamte Komplex I (etwa 59 ml, allerdings in MES-Puffer bei pH 6,0) aufweist. Dieses durch basische Spaltung des Komplex I erhaltene Fragment wird als Chinon Reduktase Fragment bezeichnet und in den folgenden Kapiteln spektroskopisch beschrieben. Komplex I wurde unter den gewählten Bedingungen quantitativ gespalten. Aus 21 mg Komplex I wurden 13 mg Chinon Reduktase Fragment und 8 mg NADH Dehydrogenase Fragment erhalten.

4.3 Charakterisierung von zwei bislang unbekanntem [4Fe4S] Zentren in Komplex I

Die Reoxidation des NADH-reduzierten Komplex I durch NAD^+ wurde mit Hilfe der Laktat Dehydrogenase Reaktion untersucht (Abb. 4-7). In Gegenwart von Pyruvat bildet die Laktat Dehydrogenase NAD^+ , welches als spezifisches Oxidationsmittel von Komplex I wirkt. Abb. 4-7 zeigt den typischen Verlauf einer Laktat Dehydrogenase Reaktion mit isoliertem Komplex I aus *E. coli*. Die Absorption bei 340 nm zeigt die Konzentration des NADH an, die bei 450 nm den Reduktionsgrad des Komplex I. Ab dem Zeitpunkt I (Abb. 4-7 a) kann die Reoxidation von Komplex I ohne Überlagerung durch Beiträge des NADH beobachtet werden. Das Spektrum des oxidierten Enzyms dient als Referenz für die gesamte Messung, so daß automatisch (reduziert minus oxidiert)-Differenzspektren registriert werden. Die Differenzspektren zu den gekennzeichneten Zeitpunkten zeigt Abb. 4-7 b. Man erkennt Beiträge mehrerer Komponenten, vor allem jedoch die des FMN mit Differenzabsorptionen bei 375 und 450 nm (Gishla, 1980). Abb. 4-7 c zeigt die Änderung zwischen den in Abb. 4-7 a gekennzeichneten Zeitpunkten III und V. Es entspricht dem Differenzspektrum eines partiell reduzierten minus einem fast vollständig reoxidierten Komplex I. Das Differenzspektrum entspricht qualitativ dem der Gruppe Y in Komplex I aus *N. crassa*, mit negativen Absorptionen bei 320 und 425 nm, allerdings mit spektralen Beiträgen des FMN bei 450 und 375 nm. Die Differenzabsorptionen sind sehr gering, da die gewählten Zeitpunkte dicht zusammenliegen. Wählt man einen früheren Zeitpunkt der Reoxidations-Kinetik, überlagern die Absorptionen des FMN das Differenzspektrum vollständig. Im Unterschied zu dem Komplex I aus *N. crassa* lassen sich die Absorptionen des FMN im *E. coli* Komplex I kinetisch nicht vollständig von denen der Gruppe Y trennen.

4. Ergebnisse

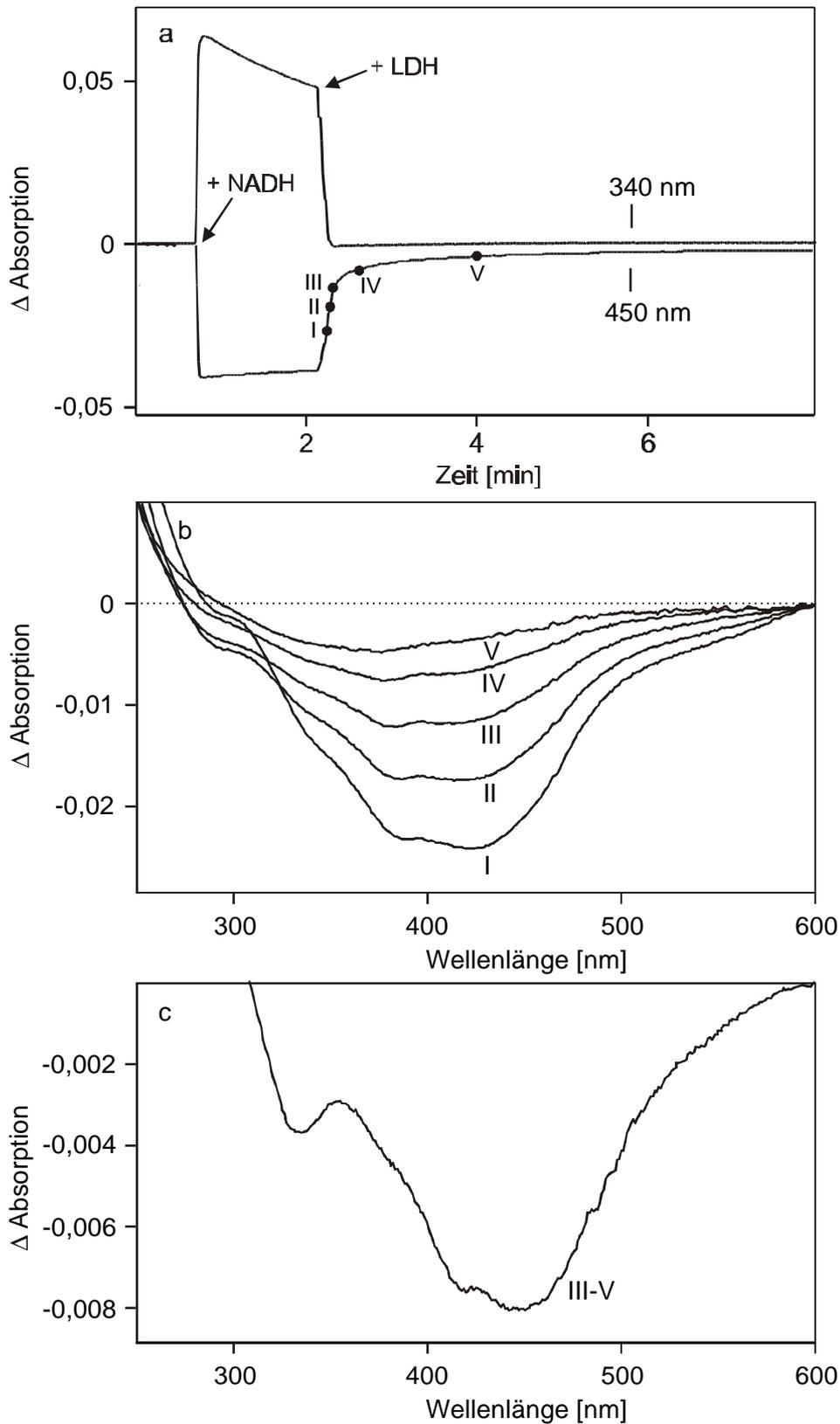


Abbildung 4-7: LDH-Experiment mit 2,6 μM isoliertem Komplex I. (a) Zeitverlauf der Absorptionen bei 340 und 450 nm. (b) Differenzspektrn während der Reoxidation bezogen auf das Spektrum des oxidierten Komplex I und (c) Differenzspektrum des Zeitpunkts III minus dem Zeitpunkt V.

Abb. 4-8 a zeigt den typischen Zeitverlauf eines LDH-Experiments mit dem isolierten NADH Dehydrogenase Fragment. Die Differenzspektren werden von den FMN-Absorptionsbanden bei 375 und 450 nm dominiert (Abb. 4-8 b), die Beiträge der zweikernigen FeS Zentren bei 330 und 550 nm (Dailey et al., 1994; siehe Tab. 1-3) und die der vierkernigen FeS Zentren bei 410 nm (Johnson et al., 1982) sind deutlich geringer. Die Differenzspektren zeigen im Verlauf der Reoxidation isobestische Punkte bei 288 und 360 nm, d.h. alle Redoxgruppen des Fragments reoxidieren mit der gleichen Geschwindigkeit. Absorptionen, die denen der Gruppe Y ähnlich sind, sind zu keinem Zeitpunkt zu erkennen.

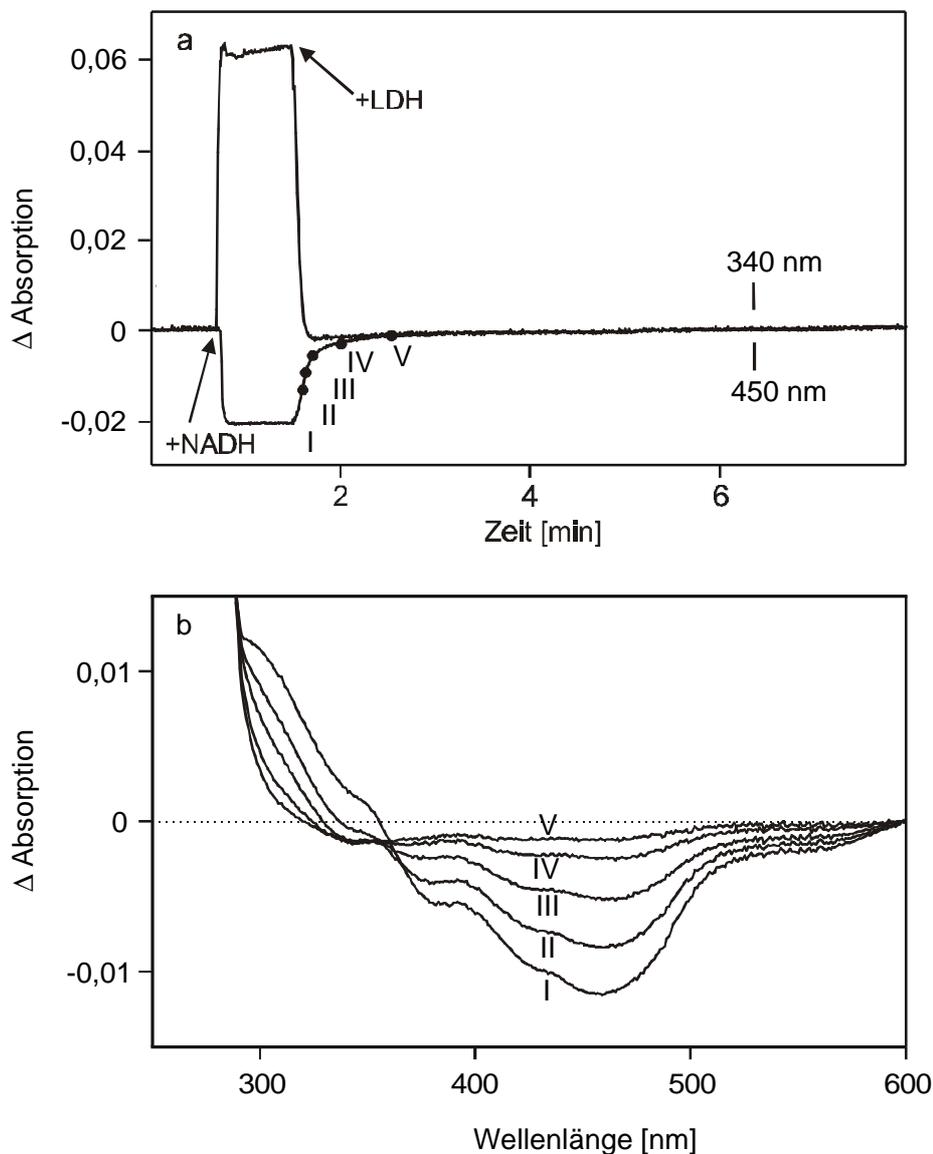


Abbildung 4-8: LDH - Experiment mit 2,6 μ M NADH Dehydrogenase Fragment. (a) Zeitverlauf der Absorptionen bei 340 und 450 nm, (b) Differenzspektren zu den angegebenen Zeitpunkten während der Reoxidation bezogen auf das Spektrum des oxidierten Fragments.

Das isolierte Chinon Reduktase Fragment kann nur noch unspezifisch, z.B. durch Natriumdithionit reduziert werden, da ihm das Elektroneneingangsmodul des Komplex I, das NADH Dehydrogenase Fragment, fehlt. Die Spektren dieses Fragmentes enthalten deswegen aber keine Beiträge des FMN. In Gegenwart von Luftsauerstoff wird das Dithionit-reduzierte Fragment langsam reoxidiert. Abb. 4-9 a zeigt den typischen Verlauf der Reoxidationskinetik. Die Absorption bei 315 nm gibt die Konzentration des Dithionits, der Verlauf bei 425 nm den Reduktionsgrad des Chinon Reduktase Fragments wieder. Unmittelbar nach dem Verbrauch des überschüssigen Dithionits werden überlagerungsfreie Differenzspektren aufgenommen. Die Differenzspektren des partiell reduzierten minus dem fast vollständig reoxidierten Fragment (Abb. 4-9 b) zeigen eine Gruppe mit negativen Absorptionen bei 320 und 425 nm und stimmen mit denen der Gruppe Y in Komplex I aus *E. coli* (Abb. 4-7 c) und *N. crassa* (Abb. 1-7) überein. Die Gruppe Y ist im Chinon Reduktase Fragment des *E. coli* Komplex I und im peripheren Arm des *N. crassa* Komplex I enthalten. Nur die Homologen der Untereinheiten NuoCD und I sind in beiden Präparationen enthalten und kommen somit für die Bindung der Gruppe Y in Betracht.

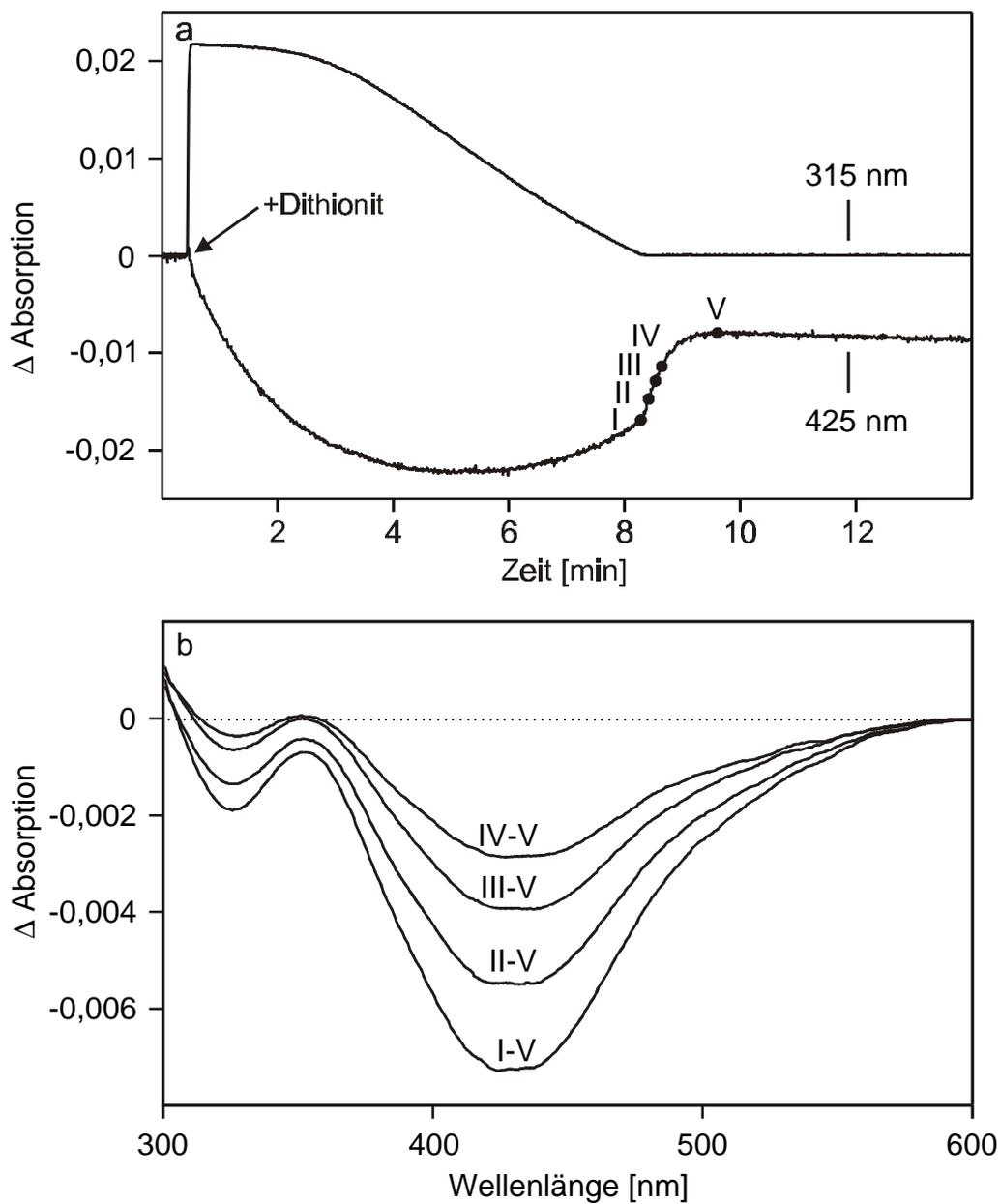


Abbildung 4-9: Reoxidation von 3,5 μ M Dithionit-reduziertem Chinon Reduktase Fragment durch Luftsauerstoff. (a) Zeitverlauf der Absorptionen bei 315 (100-fach verkleinert) und 425 nm. (b) Differenzspektren im Verlauf der Reoxidation bezogen auf den Zeitpunkt V.

4. Ergebnisse

Die Untereinheit NuoCD besitzt kein bekanntes Sequenzmotiv zur Bindung eines Kofaktors, während die Untereinheit Nuol zu einer Familie von 8Fe-Ferredoxinen gehört und ein typisches Sequenzmotiv für die Bindung von zwei vierkernigen FeS Zentren besitzt. Die Ech Hydrogenase aus *M. barkeri* enthält die zu Nuol und NuoCD homologen Untereinheiten (Tab. 1-1). Die isolierte Ech Hydrogenase wurde vollständig mit Dithionit reduziert und langsam durch Luftsauerstoff reoxidiert. Das UV/Vis-(reduziert minus reoxidiert)-Differenzspektrum entspricht dem der Gruppe Y (Abb. 4-10 b). Die lösliche NAD⁺-reduzierende Hydrogenase aus *R. eutropha* enthält homologe Untereinheiten zu NuoB, E, F und G sowie zu dem N-Terminus von NuoCD, aber keine zu Nuol homologe Untereinheit (Tab. 1-1). Die lösliche NAD⁺-reduzierende Hydrogenase wurde durch einen 5-fach molaren Überschuss NADH reduziert und durch Luftsauerstoff reoxidiert. Das (reduziert minus reoxidiert)-Differenzspektrum (Abb. 4-10 c) gleicht dem des NADH Dehydrogenase Fragments (Abb. 4-8 b). Es enthält aber keine spektralen Anteile der Gruppe Y. Das [NiFe] Zentrum beider Hydrogenasen scheint nicht zu den UV/Vis-Redox-Differenzspektren beizutragen, da es in beiden Präparationen in der gleichen Stöchiometrie vorhanden ist, die Differenzspektren aber völlig unterschiedlich sind (Abb. 4-10).

Das 8Fe-Ferredoxin aus *C. pasteurianum* ist homolog zu Nuol. UV/Vis-Absolutspektren des elektrochemisch oxidierten und reduzierten Ferredoxins wurden freundlicherweise von Dr. Jacques Meyer und Dr. Jean-Marc Moulis, CEA-Grenoble zur Verfügung gestellt. Das daraus berechnete UV/Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektrum entspricht dem der Gruppe Y (Abb. 4-10 d). Da es sich bei diesem Protein um ein einzelnes Polypeptid handelt, das 2 vierkernige FeS Zentren als einzige Redoxgruppen enthält (Moulis & Meyer, 1982), wird das beobachtete Differenzspektrum von dem Redoxwechsel dieser FeS Zentren hervorgerufen. Daraus folgt, daß auch in Komplex I und in der Ech Hydrogenase 2 vierkernige FeS Zentren auf der Untereinheit Nuol bzw. EchF lokalisiert sind. Das Redox-Differenzspektrum der FeS Zentren auf dieser Untereinheit wurde der Gruppe Y zugeordnet. In Fortsetzung der Nomenklatur nach Ohnishi (Ohnishi et al., 1971) wird die Bezeichnung N6a/N6b für diese FeS Zentren in Komplex I vorgeschlagen (Rasmussen et al., eingereicht). Die Differenzabsorption von N6a/N6b ist in dem Chinon Reduktase Fragment mit $5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ geringer als die Differenzabsorptionen der entsprechenden FeS Zentren in dem Komplex I aus *N. crassa* ($8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), in

der Ech Hydrogenase ($10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und in dem Ferredoxin ($12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Es ist möglich, daß das Chinon Reduktase Fragment durch die Spaltung einen Teil dieser FeS Zentren verloren hat. Der molare Gehalt an N6a/N6b kann nicht quantifiziert werden, da unklar ist, ob diese FeS Zentren in allen untersuchten Enzymen den gleichen Extinktionskoeffizienten besitzen. Das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten bei 320 und 425 nm zueinander ist jedoch in allen Fällen $\Delta\epsilon_{320} : \Delta\epsilon_{425} = 3 : 8$.

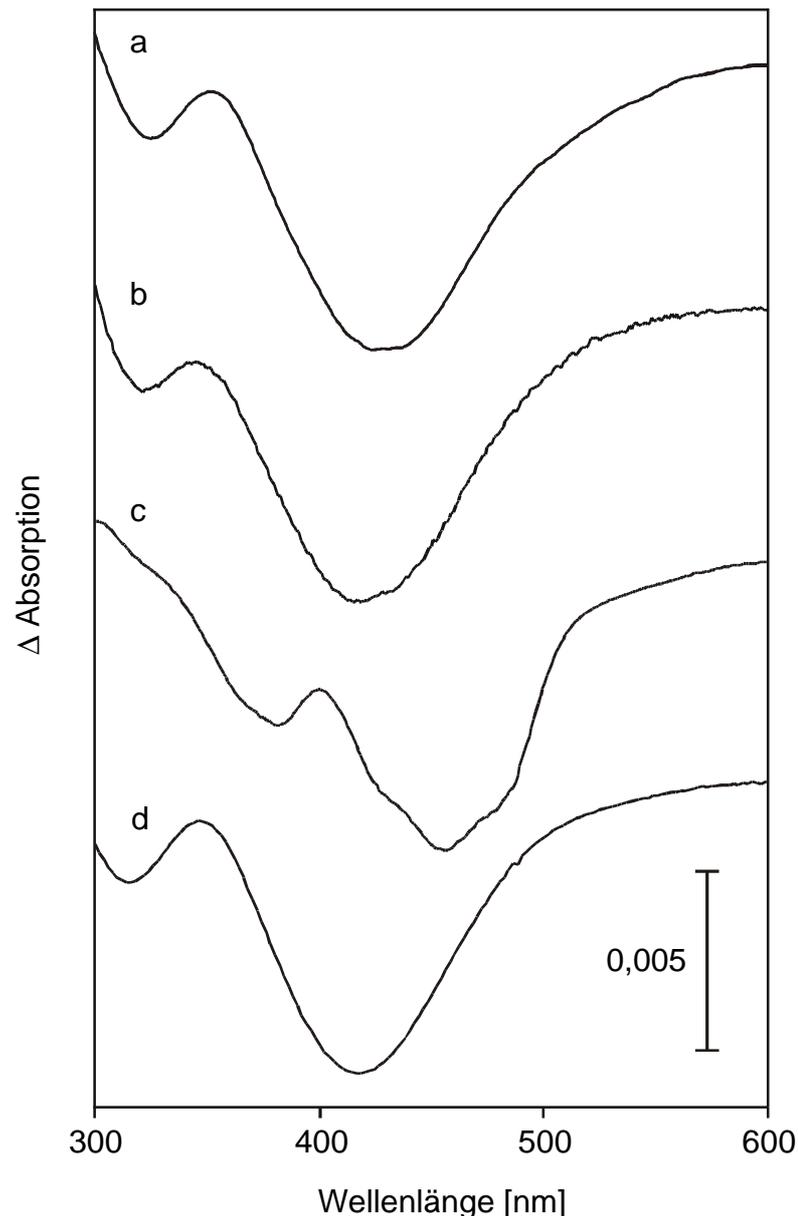


Abbildung 4-10: UV/Vis-(reduziert minus reoxidiert)-Differenzspektren von $3,5 \mu\text{M}$ Chinon Reduktase Fragment (a), $0,8 \mu\text{M}$ Ech Hydrogenase (b), $0,6 \mu\text{M}$ NAD^+ -reduzierender Hydrogenase (c) und $0,7 \mu\text{M}$ 8Fe-Ferredoxin (d). Die Differenzabsorption wurde bei 600 nm gleich Null gesetzt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß die Differenzabsorption bei 425 nm 0,008 beträgt.

4. Ergebnisse

Es stellt sich die Frage, warum N6a und N6b als FeS Zentren bislang ESR-spektroskopisch nicht nachgewiesen wurden. Abb. 4-11 zeigt die ESR-Spektren einer 80 μM Probe des Chinon Reduktase Fragments. Bei 40 K sind keine Signale zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies ist zu erwarten, da die Untereinheiten, die in Komplex I die [2Fe2S] Zentren binden, in diesem Fragment fehlen. Das 13 K ESR-Spektrum wird von den Signalen des FeS Zentrums N2 ($g_{\parallel} = 2,04$; $g_{\perp} = 1,92$) dominiert. Im Vergleich zu dem Gesamtkomplex sind die Signale etwas verschoben ($g_{\parallel} = 2,05$; $g_{\perp} = 1,91$). Diese Positionen stimmen aber mit der Lage der Signale von N2 in dem isolierten verbindenden Fragment überein (Leif et al., 1995). Die Quantifizierung der Signale über ihre Amplitude ergab, daß das isolierte Chinon Reduktase Fragment etwa 0,5 mol N2 pro mol Protein enthält. Durch die Spaltung oder im Verlauf der Präparation geht also etwa die Hälfte des Zentrums N2 verloren. Die Untereinheit NuoB, die dieses Zentrum bindet, liegt im Vergleich zu dem Gesamtkomplex in etwa gleicher Stöchiometrie vor (Abb. 4-12).

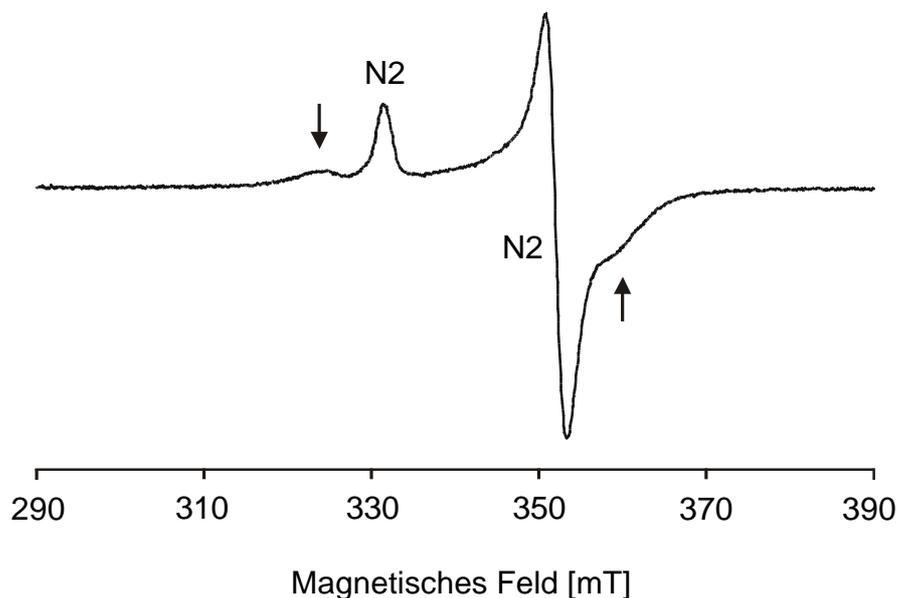


Abbildung 4-11: ESR-Spektren von 80 μM Dithionit-reduziertem Chinon Reduktase Fragment bei 13 K. Die g_x - und g_z -Werte des rhombischen Signals sind durch Pfeile markiert.

Man erkennt in dem 13 K Spektrum ein weiteres, schwächeres Signal. Es scheint eine rhombische Symmetrie mit $g_x = 1,88$ und $g_z = 2,086$ zu besitzen. Die Absorption von g_y ist völlig durch das Signal von N2 überlagert. Dieses Signal wurde bislang weder für Komplex I oder eines seiner Fragmente beschrieben und könnte ein ESR-spektroskopischer Hinweis auf N6a/N6b sein.

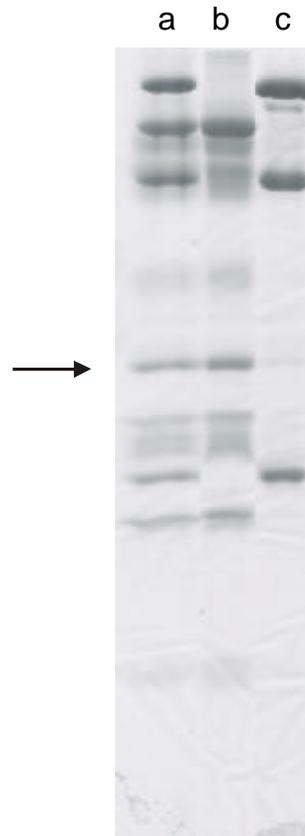


Abbildung 4-12: SDS-PAGE (a) des isolierten Komplex I, (b) des Chinon Reduktase Fragments und (c) des NADH Dehydrogenase Fragments. Der Pfeil markiert die Untereinheit NuoB.

Die Gruppe Y lässt sich im Komplex I aus *N. crassa* nahezu überlagerungsfrei darstellen, da sie sich kinetisch von anderen Kofaktoren abtrennen lässt. Dies gelingt mit dem Komplex I aus *E. coli* nicht. Dies scheint an den unterschiedlichen Reoxidationsgeschwindigkeiten der einzelnen Kofaktoren zu liegen. Eine mit einem 4-fach molaren Überschuss NADH reduzierte Probe des *E. coli* Komplex I wurde durch 20 sek Inkubation an Luft partiell reoxidiert. Das ESR-Spektrum dieser Probe zeigt die Signale der FeS Zentren N1b, N1c, N2, N3 und N4 (Abb. 4-13 b). Wird diese Probe zweimal aufgetaut und jeweils für weitere 60 sek durch Luftsauerstoff oxidiert, ist zuerst das Signal von N2 nicht mehr nachzuweisen, während die Signale

4. Ergebnisse

der übrigen FeS Zentren nur um 20 bis 30% kleiner sind (Abb. 4-13 b, c). Das Zentrum N2, das das höchste Redoxpotential aller FeS Zentren aufweist, ist bereits nach 20 sek größtenteils und nach 80 sek vollständig reoxidiert. Im Gegensatz dazu reoxidieren das FMN und die isopotentiellen FeS Zentren im Komplex I aus *N. crassa* innerhalb weniger Sekunden und die Reoxidation des Zentrums N2 beginnt erst nach etwa 3 Minuten (Rasmussen et al., eingereicht). Das mitochondriale Enzym wird anscheinend durch die Vielzahl der zusätzlichen Untereinheiten vor der Reaktion mit Sauerstoff geschützt. Dieser Schutz fehlt dem bakteriellen Komplex I (Guénebaut et al., 1998).

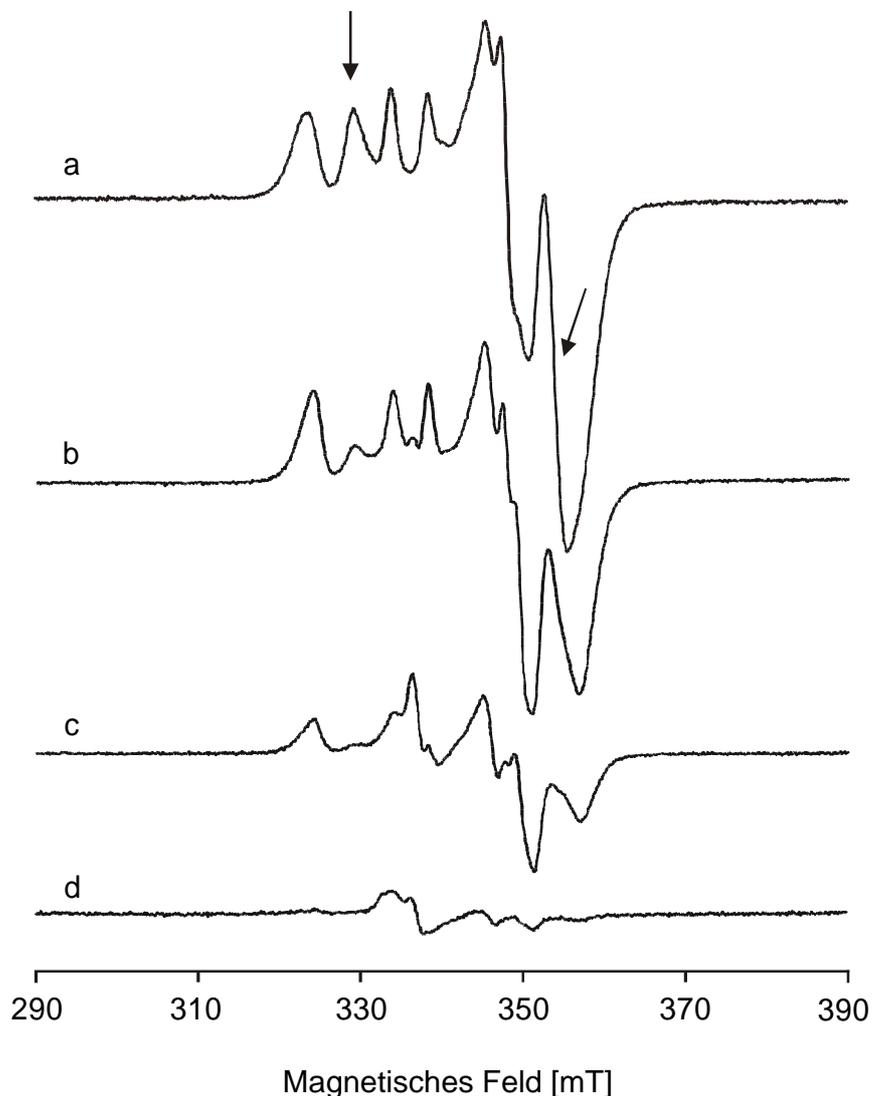


Abbildung 4-13: ESR-Spektren von 100 μM Komplex I bei 13 K. (a) vollständig reduzierter Komplex I, (b) mit 4-fach molarem Überschuß NADH reduzierter Komplex I nach 20 s Inkubation an Luft und nach jeweils weiteren 60 s Oxidation durch Luftsauerstoff (c, d). Die Pfeile kennzeichnen die Signale des FeS Zentrums N2.

4.4 Charakterisierung einer unbekanntes Redoxgruppe im Chinon Reduktase Fragment

Durch die im vorherigen Kapitel vorgestellte LDH-Reaktion wurde die als Y bezeichnete Gruppe erstmalig spektroskopisch dargestellt (Schulte et al., 1998). Mit Hilfe dieser Methode wurden weiterhin Hinweise auf die Existenz einer weiteren Gruppe X gefunden. Abb. 4-14 a zeigt den typischen Verlauf der LDH-Reaktion mit Komplex I. Die Absorption bei 450 nm, ein Maß für den Reduktionsgrad des Komplexes, geht im Verlauf der Reoxidation nicht auf den Ursprungswert zurück. Dies bedeutet, daß eine Redoxgruppe im Komplex unter diesen Bedingungen zumindest teilweise reduziert vorliegt. Durch die LDH-Reaktion wurde ein Potential von etwa -200 mV eingestellt. Das (reoxidiert minus oxidiert)-Differenzspektrum dieses Zustands zeigt eine breite, negative Absorption um 390 nm und eine positive Absorption unter 300 nm (Abb. 4-14 b). Beide Absorptionen wurden auch für die Gruppe X in Komplex I aus *N. crassa* beschrieben. Die Absorption bei 300 nm muß jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da sie in einem Wellenlängenbereich liegt, den bereits das Proteingerüst maßgeblich mitbestimmt. Das Differenzspektrum des Dithionit-reduzierten und Luft-reoxidierten Chinon Reduktase Fragments liefert ein ähnliches Bild wie im Fall des Gesamtkomplexes (Abb. 4-14 c, vgl. Abb. 4-9 a, Zeitpunkt V), die Absorptionen der Redoxgruppe X in dem Fragment scheinen durch die Spaltung oder die weitere Aufreinigung jedoch leicht verändert zu sein. In dem Fragment zeigt die Gruppe X eine negative breite Absorption um 410 nm und eine positive Absorption bei 300 nm.

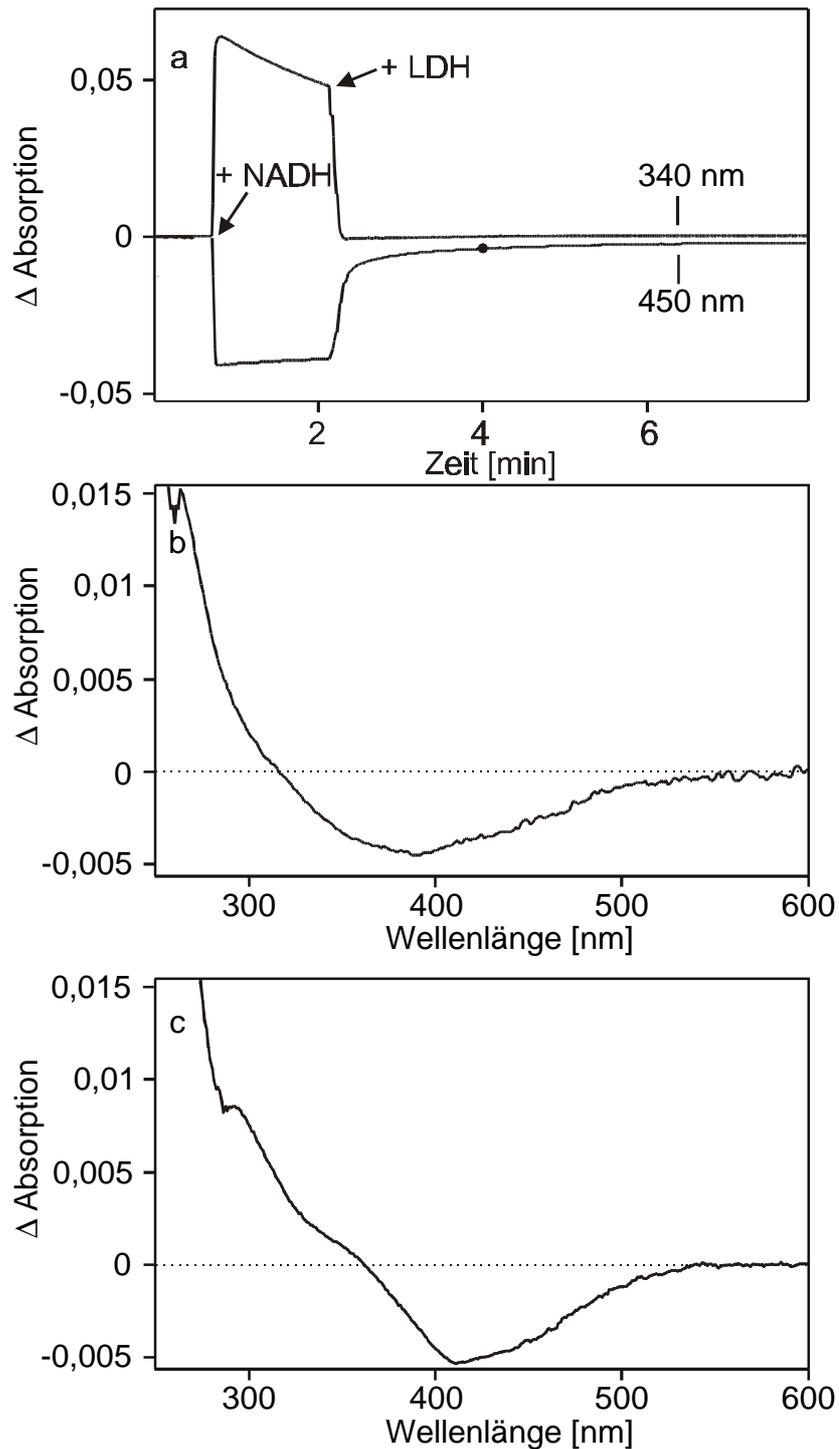


Abbildung 4-14: Die Redoxgruppe X in 2,6 μ M Komplex I und in 1 μ M Chinon Reduktase Fragment. (a) Zeitverlauf der Absorption von NADH bei 340 nm und die Bleichung der Komplex I Absorption bei 450 nm durch Reduktion. (b) Differenzspektrum nach Einstellung eines Redoxpotentials > -200 mV zu dem gekennzeichneten Zeitpunkt 4 min. Nach Reoxidation des Dithionit-reduzierten Chinon Reduktase Fragments (vgl. Abb. 4-9) wird das entsprechende Spektrum (c) erhalten.

Mit Hilfe der Hydroxybutyrat Dehydrogenase (HDH) Reaktion wird NAD^+ durch Hydroxybutyrat reduziert und NADH und Acetoacetat werden gebildet. Gebildetes NADH wird im Laufe der Reaktion in wenigen msec für die Reduktion der Kofaktoren von Komplex I verbraucht, so daß es deren UV/Vis-Differenzabsorptionen nicht stört. Durch die kontinuierliche Reaktion wird das Redoxpotential auf ein Endpotential abgesenkt, das durch die Konzentrationen von Hydroxybutyrat und Acetoacetat bestimmt wird. Mit dieser Methode werden zuerst die Redoxgruppen mit einem positiveren Mittenpotential reduziert. Abb. 4-15 zeigt den typischen Verlauf einer HDH-Reaktion, bei der ein Endpotential von -290 mV eingestellt wurde. Die Absorption bei 420 nm zeigt den Reduktionsgrad der Gruppe X in Komplex I an (Abb. 4-15 a). Die UV/Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektren zeigen zuerst die Absorptionen der Gruppe X (Abb. 4-15 b). Die übrigen Redoxgruppen, vorallem N6a/N6b und das FMN werden erst im weiteren Verlauf der Reaktion sichtbar. Die Redoxgruppe X wird demnach sowohl oxidativ (durch die LDH-Reaktion), als auch reduktiv (durch die HDH-Reaktion) angesprochen. Beide Methoden liefern identische Differenzspektren.

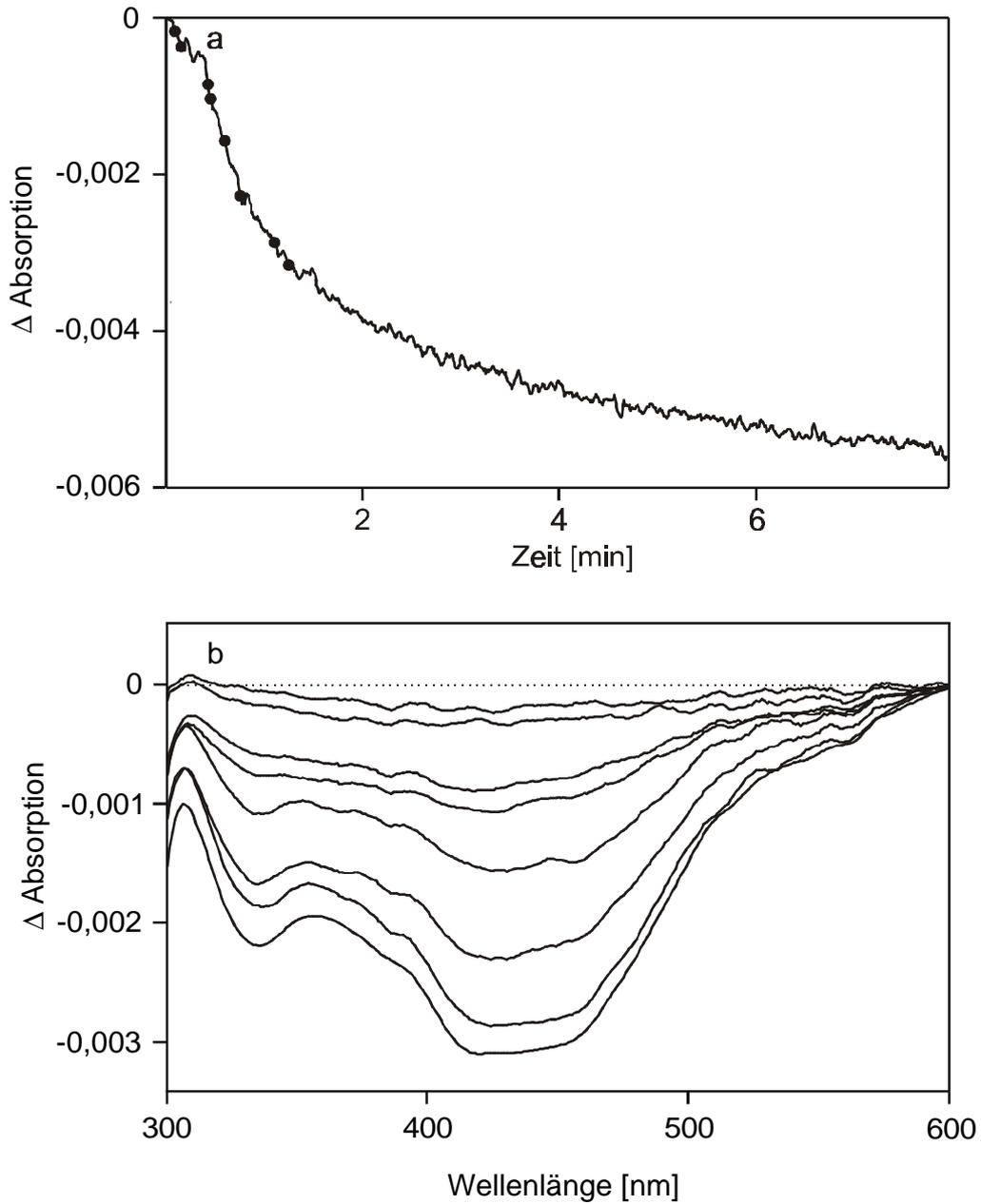


Abbildung 4-15: Langsame Reduktion von Komplex I mit Hilfe der HDH-Reaktion. (a) Zeitverlauf der Absorption bei 420 nm, als Maß für die Reduktion der Redoxgruppen, insbesondere der Gruppe X, in Komplex I. (b) Differenzspektren zu den gekennzeichneten Zeitpunkten bezogen auf das Spektrum vor Zugabe von Hydroxybutyrat. Beobachtet wird die fortschreitende Reduktion des Komplex I.

Abb. 4-16 zeigt die ESR-Spektren von Komplex I mit überschüssigem NADH und bei > -200 mV. In diesem Zustand liegen alle FeS Zentren oxidiert vor und sind deshalb ESR-spektroskopisch nicht nachweisbar. Die UV/Vis-Absorption der Gruppe X stammt also nicht von einem der bekannten FeS Zentren. Die Gruppe X liefert bei > -200 mV im isolierten Komplex kein ESR-Signal.

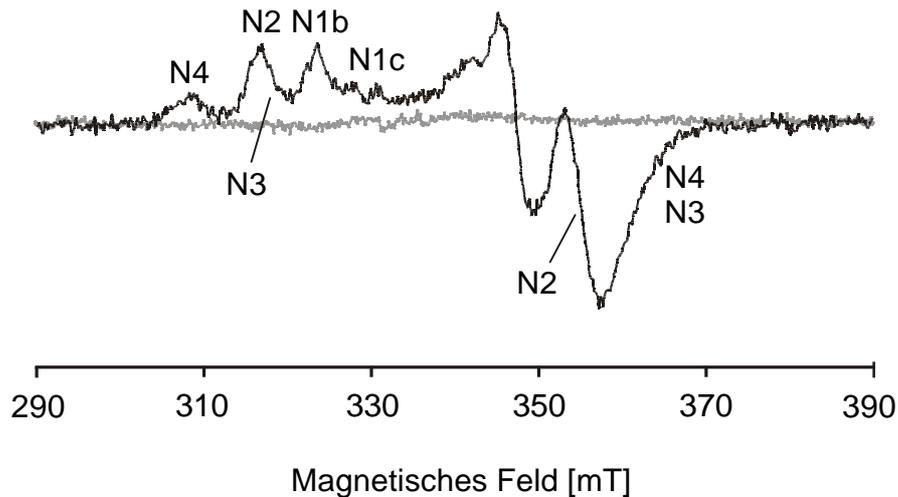


Abbildung 4-16: ESR-Spektren bei 13 K von $8 \mu\text{M}$ Komplex I, mit 4-fach molarem Überschuß NADH reduziert (schwarz) und bei einem Redoxpotential > -200 mV (grau). Die Proben wurden während der LDH-Reaktion entnommen und sofort tiefgefroren.

In Zusammenarbeit mit Dr. Petra Hellwig wurden in einer optisch transparenten, elektrochemischen Dünnschichtzelle parallel Vis- und FTIR-Differenzspektren des isolierten Komplex I bei elektrochemisch induzierten Potentialen aufgenommen (Friedrich et al., 2000). Die Vis-Differenzspektren wurden im Bereich von 400 bis 700 nm aufgenommen. Der elektrochemisch induzierte Redoxwechsel des Komplex I ist vollständig reversibel und das Enzym kann ohne Veränderungen im Differenzspektrum mehrfach reduziert und oxidiert werden (Abb. 4-17 a). Das Vis-(reduziert minus oxidiert)-Differenzspektrum von -150 mV minus 0 mV stimmt mit Differenzspektren der Gruppe X, die durch Reduktion mit Dithionit oder NADH erhalten wurden, überein. Abb. 4-17 b zeigt die elektrochemisch induzierte Potential-

4. Ergebnisse

titration von Komplex I im Bereich zwischen -150 und 200 mV. Die gegen das Potential aufgetragenen Differenzabsorptionen bei 420 nm lassen sich an eine theoretische Nernst-Kurve für eine Zweielektronen-Übertragung mit einem Mittenpotential von -80 mV bei pH 6,0 anpassen.

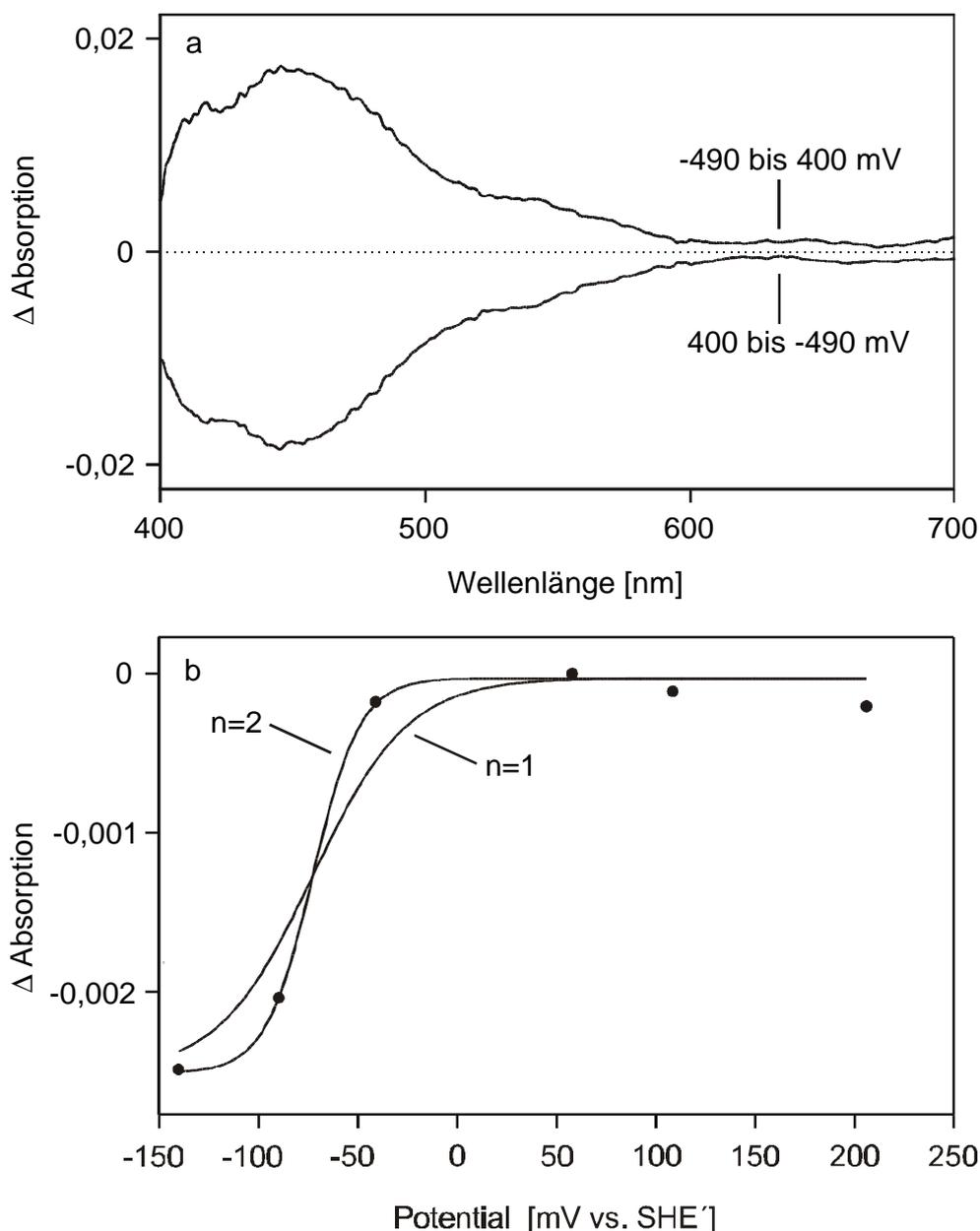


Abbildung 4-17: Elektrochemische Titration von Komplex I. (a) Vis-Differenzspektren für den vollen Potentialschritt von -490 nach $+400$ mV und von $+400$ nach -490 mV. (b) Die (reduziert minus oxidiert)-Differenzabsorptionen bei 420 nm bei Potentialen von -140 , -90 , -42 , $+58$, $+108$ und $+206$ mV bezogen auf die Absorption bei einem Potential von $+400$ mV sind gegen das Potential aufgetragen. An die Meßwerte wurden Nernst-Kurven für Ein- und Zweielektronenübertragungen angepaßt.

Um Informationen über die chemische Struktur der Gruppe X zu erhalten, wurde ein FTIR-(0 mV minus -130 mV)-Differenzspektrum von Komplex I aufgenommen (Abb. 4-18). In diesem Potentialbereich zeigen alle bekannten Redoxgruppen keine Reaktion, während die Gruppe X reduziert wird.

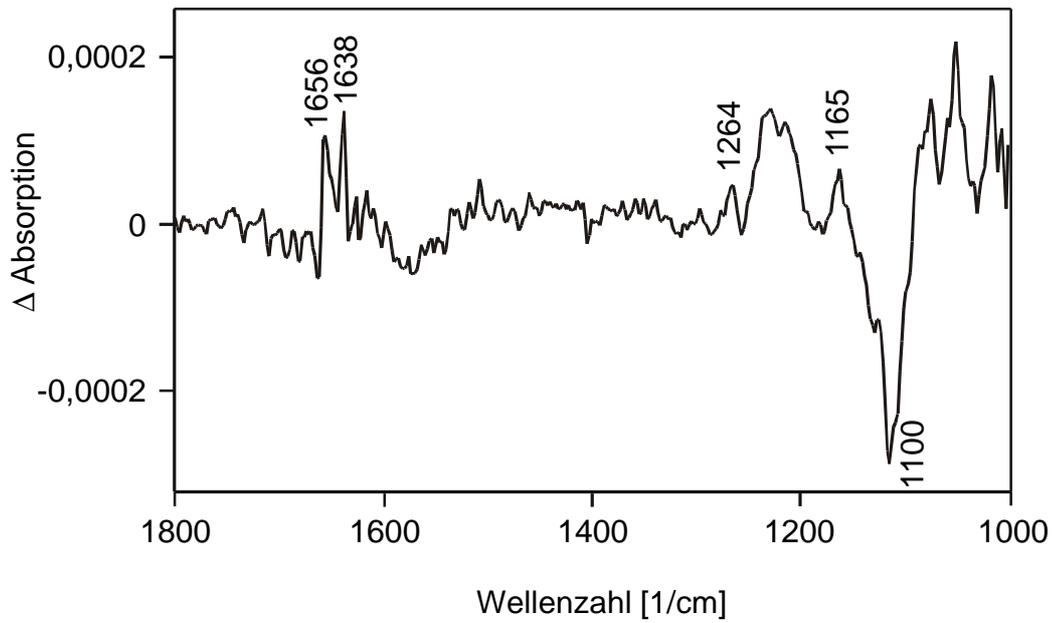


Abbildung 4-18: FTIR-(oxidiert minus reduziert)-Differenzspektrum von 250 μM Komplex I im Potentialbereich zwischen -130 und 0 mV. 10 Einzelspektren wurden gemittelt.

Das FTIR-Differenzspektrum zeigt positive Absorptionen bei 1656 und 1638 cm^{-1} , die C=O- und C=C-Schwingungen zugeordnet werden. Sie könnten aber auch von Umlagerungen des Proteingerüsts stammen. Die Gruppe X ist kein proteingebundenes Ubichinon, da die typischen Schwingungen der Methoxygruppe bei 1288 und 1264 cm^{-1} fehlen (Hellwig et al., 1998; Dejonghe et al., 1998). Die Bande bei 1264 cm^{-1} in Abb. 4-18 stammt von dem verwendeten MES-Puffer (Hellwig et al., 2000). Das Differenzspektrum der Gruppe X wird von einer positiven Bande bei 1165 cm^{-1} und einer negativen Bande bei 1100 cm^{-1} dominiert. Das Spektrum ähnelt dem eines hydroxylierten Tyrosinderivates (P. Hellwig, pers. Mitteilung). Es könnte sich bei der Gruppe X somit um eine modifizierte Aminosäure handeln.

4.5 Beiträge aller nachgewiesenen Redoxgruppen zu dem UV/Vis-Spektrum des Komplex I

Abb. 4-19 zeigt die UV/Vis-Absorptionsspektren des gesamten Komplex I, des NADH Dehydrogenase Fragments und des Chinon Reduktase Fragments. Aus der bekannten Aminosäuresequenz aller Untereinheiten wurden mit den Extinktionskoeffizienten für Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Cystein die Extinktionskoeffizienten des Proteins für das Absorptionsmaximum bei 280 nm berechnet (Gill & von Hippel, 1989) und die in Abb. 4-19 gezeigten Spektren auf eine Konzentration von 1 μM normiert. Der Einschub in Abb. 4-19 zeigt die breiten, weniger intensiven Absorptionen der Redoxgruppen des Enzyms zwischen 300 und 600 nm.

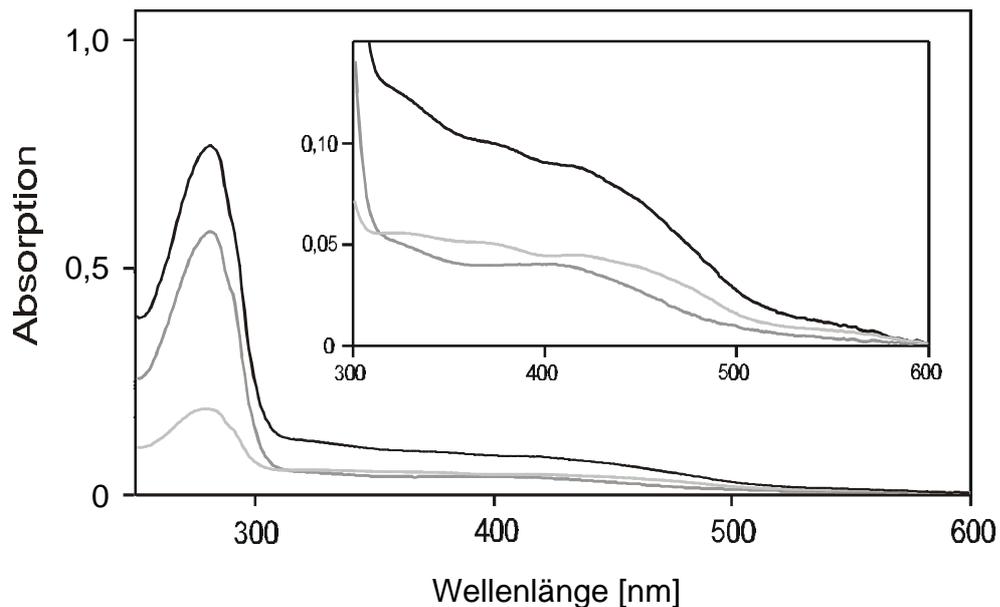


Abbildung 4-19: UV/Vis-Absorptionsspektren von je 1 μM Komplex I (schwarz), NADH Dehydrogenase Fragment (hellgrau) und Chinon Reduktase Fragment (dunkelgrau). Der Einschub zeigt den vergrößerten Bereich von 300 bis 600 nm.

Die berechneten bzw. aus den normierten Spektren ermittelten Extinktionskoeffizienten zeigt Tab. 4-3. Man erkennt, daß sich die berechneten spektralen Anteile der Redoxgruppen der beiden Fragmente im Rahmen der Meßgenauigkeit zu denen der Redoxgruppen in Komplex I aufsummieren. Somit ist die UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung der Redoxgruppen des Komplexes durch Analyse der Fragmente vernünftig.

Tabelle 4-3: UV/Vis-Extinktionskoeffizienten des Komplex I und seiner Fragmente. Die Koeffizienten für 280 nm wurden aus der Aminosäuresequenz abgeleitet (Gill & von Hippel, 1989). Die Spektren wurden entsprechend auf eine Proteinkonzentration von 1 μM berechnet und die Vis-Extinktionskoeffizienten bei 320, 375 und 450 nm bestimmt.

Protein	ϵ [$\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]			
	280nm*	320 nm	375 nm	450 nm
Komplex I	0,76	0,13	0,10	0,08
NADH Dehydrogenase Fragment	0,19	0,06	0,05	0,04
Chinon Reduktase Fragment	0,57	0,05	0,04	0,03

* Eventuelle Anteile der Redoxgruppen in diesem Bereich wurden nicht berücksichtigt.

In Abb. 4-20 wird das Redox-Differenzspektrum des Komplex I mit den Redox-Differenzspektren des NADH Dehydrogenase Fragments, sowie der FeS Zentren N6a/N6b und der Gruppe X in Komplex I verglichen. Die Differenzspektren der individuellen Redoxgruppen können zum Teil nur in dem partiell reduzierten Enzym ohne Überlagerungen von Absorptionen des Reduktionsmittels oder anderer Redoxgruppen beobachtet werden. Die Differenz-Extinktionskoeffizienten können dagegen nur aus Spektren des Enzyms in dem vollreduzierten und volloxidierten Zustand ermittelt werden. Eine quantitative Darstellung gelingt nur, wenn die Differenzextinktionen bei allen Wellenlängen mit Hilfe der Globalanalyse untersucht werden (Brors, 1999).

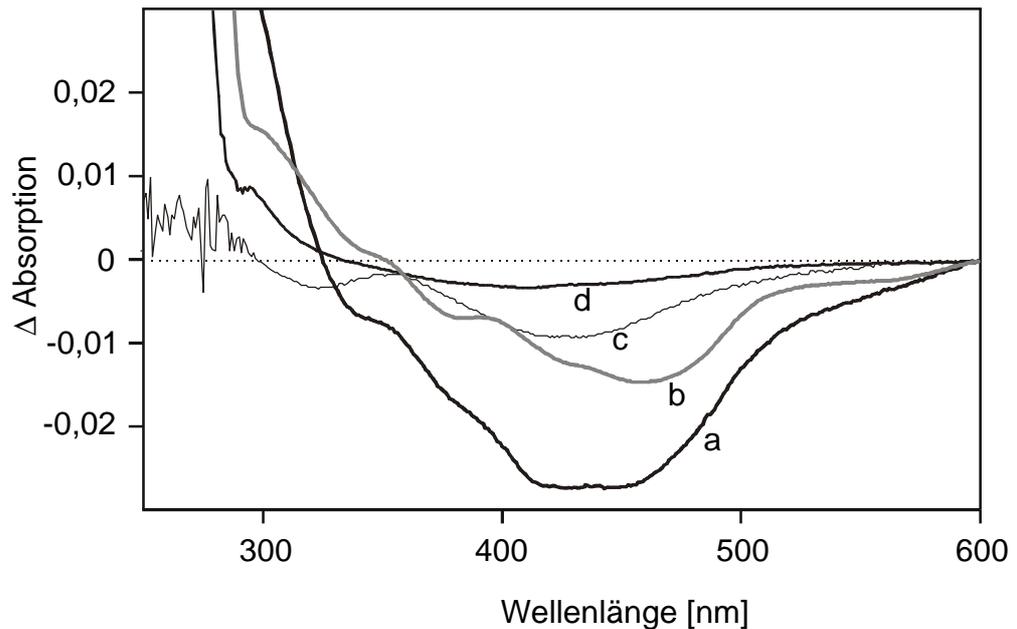


Abbildung 4-20: Differenzspektren des Komplex I (a), des NADH Dehydrogenase Fragments (b), der FeS Zentren N6a/N6b (c) und der Gruppe X in Komplex I (d). Die dargestellten Spektren wurden qualitativ überlagert, da nicht alle Gruppen exakt quantifiziert werden können.

Tabelle 4-4 zeigt die ungefähren Anteile der einzelnen Redoxgruppen am UV/Vis-Redox-Differenzspektrum von Komplex I. Die Differenz-Extinktionskoeffizienten wurden zwischen vollreduziertem und vollständig oxidiertem Zustand bestimmt. Mit $15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ wird der größte Teil der gesamten Differenzabsorption des Komplex I durch die Redoxgruppen des NADH Dehydrogenase Fragments hervorgerufen. Der Beitrag des proteingebundenen FMN wird mit Hilfe des Differenz-Extinktionskoeffizienten für freies FMN abgeschätzt (Tab. 4-4). Da das isolierte NADH Dehydrogenase Fragment etwa 1 mol FMN enthält (Braun et al., 1998; Bungert et al., 1999), entspricht der Beitrag der isopotentiellen FeS Zentren näherungsweise der Differenzabsorption des NADH Dehydrogenase Fragments minus der Differenzabsorption des freien FMN (Tab. 4-4). Das FeS Zentrum N1a wird weder mit NADH noch mit Dithionit reduziert und daher nicht berücksichtigt. Die Gruppe X in dem Chinon Reduktase Fragment trägt nur einen geringen Teil zur Differenzabsorption bei, der Beitrag des FeS Zentrums N2 ist unbekannt. Die FeS Zentren N6a/N6b weisen in den Präparationen der untersuchten Enzyme Differenz-Extinktionskoeffizienten zwischen 5 und $12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ auf. Eine genaue Quantifizierung war nicht möglich, da der Gehalt an N6a/N6b pro mol Protein in den Präparationen unbekannt ist. Ein mol Chinon Reduktase Fragment enthält wahrscheinlich weniger als 1,0 mol N6a/N6b.

Tabelle 4-4: Abschätzung der Differenz-Extinktionskoeffizienten der Redoxgruppen in Komplex I aus *E. coli* bei ihren charakteristischen Wellenlängen

Redoxgruppe	λ_{\max} [nm]	$\Delta\varepsilon_{\max}$ [mM ⁻¹ ·cm ⁻¹]
FMN ^a	448	9
isopotentielle FeS ^b	450	6
Gruppe X	410	3
N6a/N6b	425	5

^a Wert für freies FMN (Gishla, 1980).

^b Abschätzung aus der Differenz der Absorption des NADH Dehydrogenase Fragments minus der des freien FMN.

4.6 Kopplung der Redoxreaktion mit der Protonentranslokation

In Zusammenarbeit mit Dr. Petra Hellwig wurden elektrochemisch induzierte FTIR-Redox-Differenzspektren des *E. coli* Komplex I aufgenommen (Hellwig et al., 2000). Mit dieser Methode werden Protonierungen von Aminosäureseitenketten während der Redoxreaktion nachgewiesen. Die Carbonyl-Streckschwingungen von protonierten Aspartat- oder Glutamatseitenketten liefern im Bereich zwischen 1800 und 1710 cm⁻¹ ein charakteristisches FTIR-Signal (Chirgadze et al., 1975; Venyaminov & Kalnin, 1990a; Baymann, 1995). FTIR-Differenzspektren des NADH Dehydrogenase Fragments zeigen in dem gesamten Potentialbereich von -490 bis +400 mV keine signifikanten Signale zwischen 1800 und 1710 cm⁻¹ (Abb. 4-21 a). Dagegen zeigen Spektren des Komplex I FTIR-Differenzsignale im Bereich von 1710 bis 1720 cm⁻¹ (Abb. 4-21 b). Diese Signale treten bei den Spektren zwischen den Potentialdifferenzen von -290 und -90 mV auf. Abb. 4-21 c zeigt für diesen Potentialbereich das Doppeldifferenz-FTIR-Spektrum des (oxidiert minus reduziert)-Differenzspektrums des Komplex I minus dem (oxidiert minus reduziert)-Differenzspektrum des NADH Dehydrogenase Fragments. In diesem Doppeldifferenzspektrum sind nur die redoxabhängigen FTIR-Signale des Komplex I für diesen Potentialschritt enthalten, die nicht von dem NADH Dehydrogenase Fragment stammen.

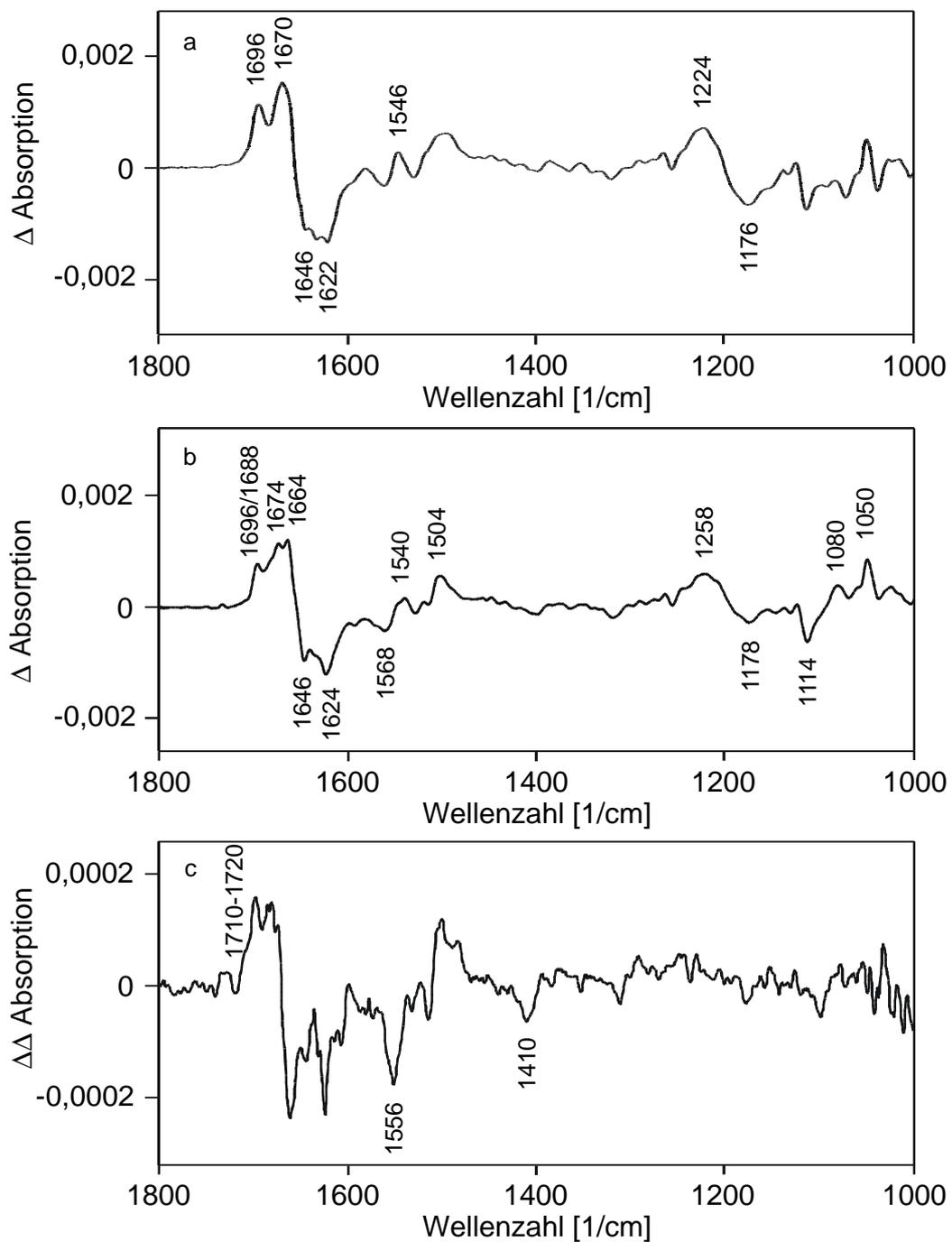


Abbildung 4-21: FTIR-Differenzspektren (a) des NADH Dehydrogenase Fragments und (b) des Komplex I jeweils in dem gesamten Potentialbereich von -490 bis $+400$ mV. (c) Doppeldifferenzspektrum des (-290 mV minus -90 mV)-Differenzspektrums des Komplex I minus dem (-290 mV minus -90 mV)-Differenzspektrum des NADH Dehydrogenase Fragments.

Die positive Absorption bei $1710\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ wurde der Streckschwingung einer Aspartat- oder Glutamatseitenkette zugeordnet, die im oxidierten Zustand protoniert vorliegt. Dem entsprechen die negativen Absorptionen bei 1556 und 1410 cm^{-1} , die als asymmetrische bzw. symmetrische Carboxylat-Streckschwingungen im reduzierten Zustand interpretiert werden (Hellwig et al., 2000). Diese Protonierung kann nur mit der Redoxreaktion der FeS Zentren N2 oder N6a/N6b oder der Gruppe X gekoppelt sein, da die übrigen Redoxgruppen im NADH Dehydrogenase Fragment enthalten sind. Da diese Reaktion in einem Potentialbereich auftritt, der dem Mittenpotential von N2 entspricht, wird angenommen, daß die Protonierung der Aspartat- oder Glutamatseitenkette mit der Oxidation des FeS Zentrums N2 verknüpft ist (Hellwig et al., 2000).

Die FTIR-Differenzspektren zeigen weiterhin, daß die Redoxreaktion in Komplex I mit großen konformativen Änderungen des Enzyms einhergeht (Abb. 4-21 b). Das FTIR-Differenzspektrum des Komplex I zwischen -490 und $+400\text{ mV}$ weist starke positive und negative Banden im Amid I Bereich zwischen 1700 und 1620 cm^{-1} und im Amid II Bereich zwischen 1575 und 1480 cm^{-1} auf. In diesen Bereichen treten unter anderem Schwingungen des Polypeptidrückgrats auf, die miteinander gekoppelt sind. Die Amid I Schwingung wird zum größten Teil von der C=O-Streckschwingung der Peptidcarbonyle und zu geringen Teilen von C-N-Streckschwingungen und N-H-Deformationsschwingungen hervorgerufen (Arrondo et al., 1993). Aufgrund der Sekundärstruktur des Proteins unterscheiden sich die Amid I Schwingungen der einzelnen Aminosäuren im Bereich zwischen 1700 und 1620 cm^{-1} . Die beobachteten Schwingungen bei 1696 , 1674 , 1664 , 1646 und 1624 cm^{-1} sind charakteristisch für β -Faltblatt Sekundärstrukturelemente (Baymann, 1995; Hellwig, 1998). Die Amid II Schwingung setzt sich überwiegend aus N-H-Deformationsschwingungen und aus C-N- und C-C-Streckschwingungen zusammen. Ihre Lage im Spektrum wird kaum von der Sekundärstruktur beeinflusst. Im gleichen Bereich treten auch Signale von Carboxylatseitenketten auf (s.o.). Die Absorptionen unterhalb von 1300 cm^{-1} wurden dem MES-Puffer zugeordnet. Die Signale des FMN tragen kaum zu dem Gesamtspektrum bei (Hellwig et al., 2000).

4.7 Elektronenmikroskopische Darstellung von Komplex I und Fragmenten

Der isolierte *E. coli* Komplex I wurde für die Elektronenmikroskopie auf einem Gitter adsorbiert, negativ kontrastiert, und es wurden Aufnahmen von Einzelpartikeln gemacht. Durch Klassifizierung der Einzelpartikel wurde die dreidimensionale Struktur des Komplex I mit einer Auflösung von 19 Å rekonstruiert (Abb. 4-22 a).

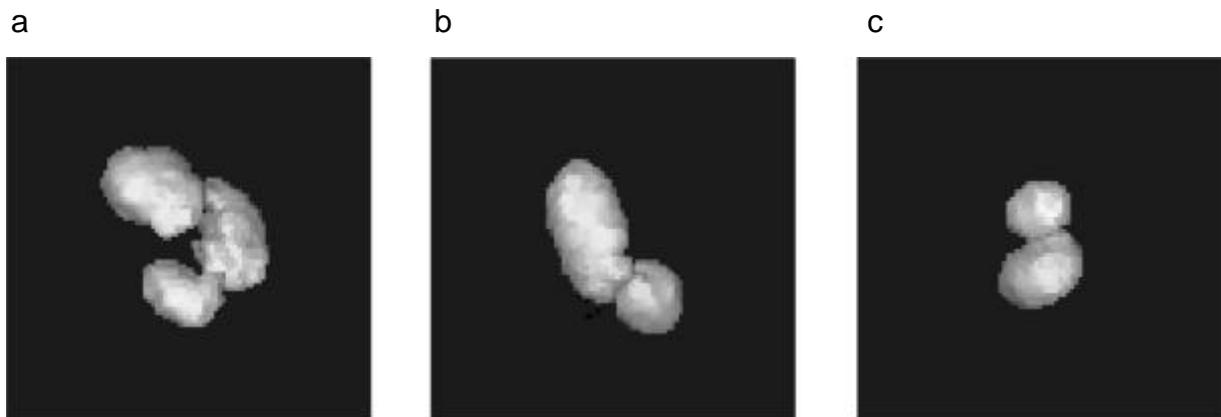


Abbildung 4-22: Rekonstruktionen (a) des Komplex I (4500), (b) des Chinon Reduktase Fragments (5700) und (c) des NADH Dehydrogenase Fragments (1400) aus elektronenmikroskopischen Daten. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Einzelpartikel angegeben. Die Präparation des NADH Dehydrogenase Fragments liegt in Übereinstimmung mit biochemischen Daten als Dimer vor (Bungert et al., 1999).

Die gekrümmte Überalles-Struktur des Komplexes ist ähnlich zu der L-förmigen Struktur, die bei ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefunden wurde (Guénebaut et al., 1997, vgl. Abb. 1-1). Die Struktur bei 19 Å Auflösung zeigt, daß der Komplex I aus drei Domänen besteht, deren jeweilige Masse in etwa den Massen des NADH Dehydrogenase Moduls, des Hydrogenase Moduls und des Translokase Moduls entspricht. Aufnahmen von Präparationen des isolierten NADH Dehydrogenase Fragments und des Chinon Reduktase Fragments bestätigen die Zuordnung der Fragmente (Abb. 4-22 b, c). Durch Vergleich der Strukturen der Fragmente mit der Struktur des Komplex I wurden die Fragmente den drei Domänen zugeordnet (Abb. 4-23).

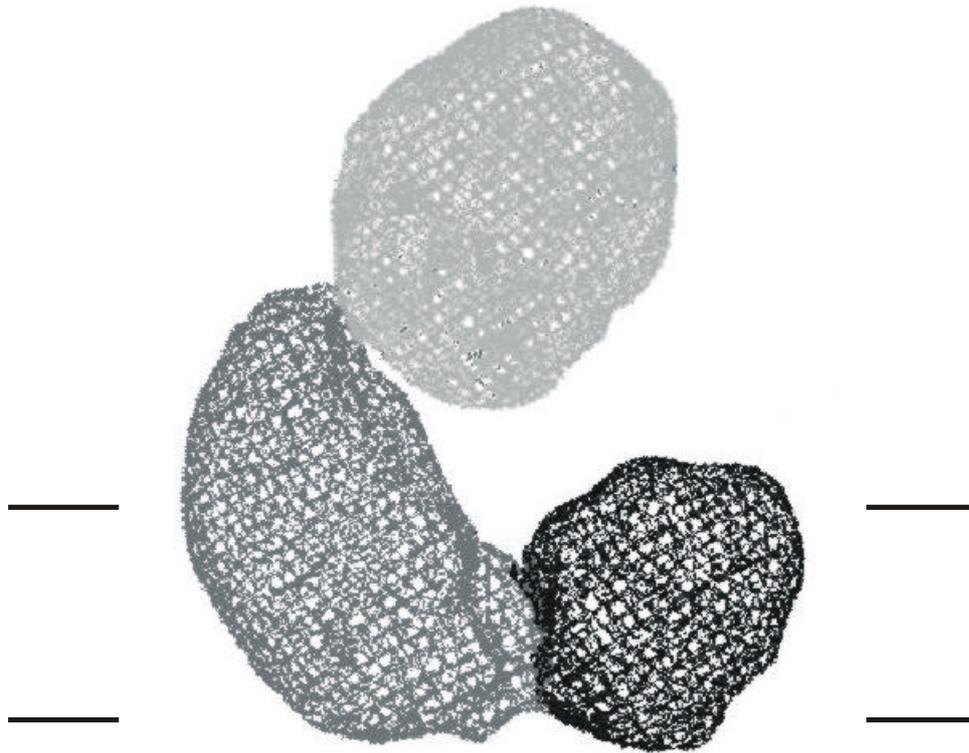


Abbildung 4-23: Rekonstruktion des *E. coli* Komplex I aus 60.000 negativ kontrastierten Einzelpartikeln als Gittermodell bei einer Auflösung von 19 Å. Die Linien deuten die Lage der Membran an. Das NADH Dehydrogenase Modul ist in hellgrau, das Hydrogenase Modul in dunkelgrau und das Translokase Modul in schwarz dargestellt.

Der Redoxzustand des Enzyms verändert die Überalles-Struktur des Komplex I (Abb. 4-24). Rekonstruktionen von Luft-oxidiertem und NADH-reduziertem Komplex I zeigen, daß der reduzierte Komplex eine stärkere Krümmung aufweist, als der oxidierte. Der Winkel zwischen peripherem und Membranarm scheint von dem Redoxzustand des Enzyms abzuhängen. Darüber hinaus scheint das Translokase Modul in dem reduzierten Komplex I getrennt vom Rest des Komplexes vorzuliegen. Offenbar wird die Konformation des Komplexes an dieser Stelle durch die Reduktion derart verändert, daß Kontrastmittel eindringen kann. Entgegen allen bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigt die Überalles-Struktur von Komplex I eine große konformative Beweglichkeit. Die jeweilige Konformation eines Partikels hängt unter anderem von dem Redoxzustand des Komplexes ab.

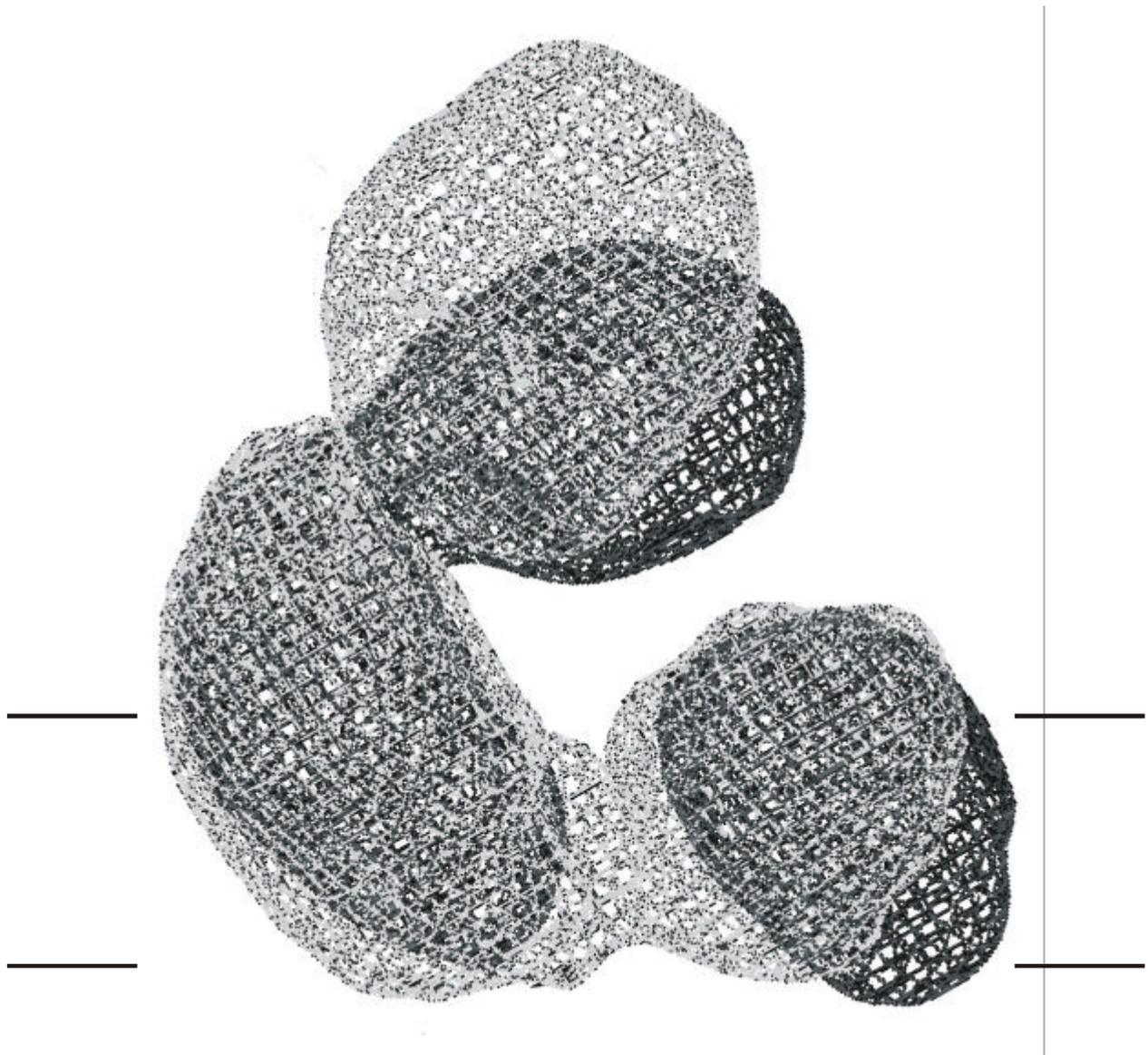


Abbildung 4-24: Rekonstruktion von *E. coli* Komplex I aus 60.000 negativ kontrastierten Einzelpartikeln bei einer Auflösung von 19 Å im oxidierten (grau) und reduzierten Zustand (schwarz).

5 Diskussion

5.1 Der modulare Aufbau von Komplex I

Sequenzvergleiche zeigen, daß Komplex I modular aus 3 großen Domänen, dem NADH Dehydrogenase Modul, dem Hydrogenase Modul und dem Translokase Modul, aufgebaut ist. Dies stimmt mit der Anordnung der Komplex I – Gene in Eubakterien überein. Gene, die funktionelle und strukturelle Einheiten des Komplexes kodieren, sind in Gruppen zusammengefaßt (Friedrich & Scheide, 2000).

Das NADH Dehydrogenase Modul aus den Untereinheiten NuoE, F und G stellt den Elektroneneingang des Komplex I dar. Dieses Modul kommt auch in anderen bakteriellen Enzymen, wie löslichen [NiFe] Hydrogenasen (Tran-Betcke et al., 1990) oder Formiat Dehydrogenasen (Oh & Bowien, 1999) vor. Elektronen werden jedoch auch von anderen Substraten auf homologe Formen des Komplex I übertragen. In *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni* aus der ϵ -Untergruppe der Proteobakterien fehlen die Untereinheiten NuoE und F und die Untereinheit NuoG trägt ein in anderen Organismen nicht konserviertes FeS Zentrum (Friedrich & Scheide, 2000). Es wird diskutiert, daß diese humanpathogenen Organismen Elektronen von NADPH aufnehmen (Smith et al., 2000). Der Komplex I der Archäen *Archaeoglobus fulgidus* und *M. mazei* verwendet das $F_{420}H_2$ Dehydrogenase Modul als Elektroneneingang (Klenk et al., 1997; Bäumer et al., 2000; Brüggemann et al., 2000). $F_{420}H_2$ ist wie NADH ein reversibler Hydrid-Donor, der in methanogenen Archäen vorkommt. Der Elektronendonator des Komplex I – Homologen von *Aeropyrum pernix*, einem nicht-methanogenen Archäon, ist nicht bekannt, da dessen Genom weder Gene für eine $F_{420}H_2$ Dehydrogenase, noch Gene für eine NADH Dehydrogenase enthält (Friedrich & Scheide, 2000). Cyanobakterien enthalten zwar zu NuoE, F und G homologe Untereinheiten, die aber dort Bestandteil einer löslichen [NiFe] Hydrogenase sind (Boison et al., 1999). Der Elektronendonator der Homologen des Komplex I aus Cyanobakterien und Chloroplasten ist bislang unbekannt. Es wird diskutiert, daß dieser Komplex I ein anderes Modul für die Reaktion mit NADPH oder Ferredoxin besitzt oder ein modifiziertes Hydrogenase Modul (s.u.) als Elektroneneingang dient (Friedrich & Scheide, 2000).

Diese Daten zeigen, daß im Verlauf der Evolution die unterschiedlichsten Elektroneneingangsmodule mit dem katalytischen Herz des Enzyms, dem Hydrogenase Modul und dem Translokase Modul, fusionierten. Die Familie der homologen Komplex I – Formen kann somit als protonenpumpende Donor:Chinon Oxidoreduktasen bezeichnet werden. Mitgliedern dieser Familie ist gemein, daß sie Homologe der 11 Untereinheiten besitzen, die das Hydrogenase Modul und das Translokase Modul aufbauen (Friedrich & Scheide, 2000). Die Tatsache, daß das Elektroneneingangsmodul austauschbar ist und in verschiedenen löslichen Enzymen vorkommt, macht es unwahrscheinlich, daß dieses Modul an der Protonentranslokation beteiligt ist. Es dient wahrscheinlich als Elektronensammler, um den übrigen Teil der Elektronentransportkette in einem reduzierten Zustand zu halten.

Das Hydrogenase Modul besteht aus den Untereinheiten NuoB, CD, H, I und L und das Translokase Modul aus den Untereinheiten NuoA, J, K, M und N. Die Funktion dieser Module wird in den nächsten Kapiteln diskutiert. Das Hydrogenase Modul enthält die Untereinheiten NuoB und CD, deren Homologe in allen [NiFe] Hydrogenasen vorkommen. In der Präparation des Komplex I aus *E. coli* konnte jedoch kein Nickel nachgewiesen werden und die Aminosäuren, die das [NiFe] Zentrum koordinieren, sind in der homologen Untereinheit NuoCD des Komplex I nicht konserviert (Friedrich & Weiss, 1997; Friedrich & Scheide, 2000). Die Untereinheiten NuoL, M und N stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab und zeigen eine entsprechend hohe Sequenzidentität. Anhand der Sequenzvergleiche kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß statt NuoL die homologen Untereinheiten NuoM oder N Bestandteil des Hydrogenase Moduls sind (Sazanov & Walker, 2000).

Das Translokase Modul enthält neben den Untereinheiten NuoM und N, die Sequenzähnlichkeit zu Antiportern und Permeasen aufweisen, die Untereinheiten NuoA, J und K. In den Sequenz-Datenbanken findet man bislang keine dazu homologen Proteine. Da diese extrem hydrophoben Untereinheiten kein Motiv für die Bindung eines Kofaktors oder eines Substrats zeigen, ist ihre Funktion völlig unverstanden.

Von diesen Modulen wurde bislang nur das NADH Dehydrogenase Fragment biochemisch isoliert und charakterisiert. Die anderen aus der Spaltung des *E. coli* Komplex I erhaltenen Fragmente zeigen eine andere Polypeptidzusammensetzung (Leif et al., 1995). Die Fragmentierung des mitochondrialen Komplex I aus Rind oder *N. crassa* liefert ebenfalls Subkomplexe, die nichts mit den evolutionären Modulen gemeinsam haben (Schulte & Weiss, 1995; Sazanov et al., 2000). Das in dieser Arbeit erstmalig beschriebene Chinon Reduktase Fragment dagegen entspricht dem Hydrogenase Modul zusammen mit dem Translokase Modul, und damit dem gemeinsamen Vorläufer der Donor:Chinon Oxidoreduktasen in allen drei Domänen des Lebens (Friedrich & Scheide, 2000).

Die elektronenmikroskopische Struktur des Komplex I bei einer Auflösung von 19 Å zeigt den aus der Evolution vorhergesagten modularen Aufbau aus 3 Domänen (Abb. 4-22 a). Durch Vergleich mit den elektronenmikroskopischen Strukturen des NADH Dehydrogenase Fragments und des Chinon Reduktase Fragments und anhand der aus der Sequenz abgeleiteten Massen wurden die Module dem Modell des Komplex I zugeordnet (Abb. 4-23). In dem verwendeten Rekonstruktionsverfahren wurden alle Einzelpartikel eines Gitters durch das Bildverarbeitungsprogramm erfaßt. Bei früheren Untersuchungen wurden dagegen die Einzelpartikel subjektiv ausgewählt (Guénebaut et al., 1998). Das Auswahlkriterium war die von dem mitochondrialen Komplex I bekannte L-förmige Struktur (Hofhaus et al., 1991). Die so erhaltene Rekonstruktion lieferte ein Bild des *E. coli* Komplex I, das mit der L-förmigen Struktur des *N. crassa* Komplex I übereinstimmte. Der Unterschied zu dem in dieser Arbeit gezeigten Modell ist wahrscheinlich auf die mittlerweile verbesserte Präparation, das andere Bildverarbeitungsprogramm und die höhere Auflösung der Rekonstruktion zurückzuführen. Die höhere Auflösung beruht darauf, daß bis zu 60.000 Einzelpartikel verwendet wurden, während das frühere Modell aus etwa 800 Einzelpartikeln berechnet wurde.

Das aus der Elektronenmikroskopie abgeleitete Modell zeigt außerdem, daß der bakterielle Komplex nicht in der typischen L-Form des mitochondrialen Komplex I vorliegt. Der Winkel zwischen den beiden Armen des *E. coli* Komplexes ist variabel. Bei geringen Salzkonzentrationen wurde ein Modell des Komplexes erhalten, bei dem beide Arme aufeinander liegen, der Winkel also Null Grad beträgt (Daten nicht

gezeigt). Diese kompakte Form stimmt mit elektronenmikroskopischen Daten des in Phospholipid rekonstituierten Komplex I aus *N. crassa* überein (Leonard et al., 1987). Die L-förmige Struktur ist nur schwer mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von submitochondrialen Partikeln oder bakteriellen invertierten Vesikeln in Einklang zu bringen. Während der 9 nm lange F_1 -Teil des ATPase Komplexes deutlich sichtbar aus der Membran herausragt (Stiles & Crane, 1966), wird der periphere Arm des Komplex I mit einer Länge von 23 nm nie beobachtet. Selbst wenn die ATPase etwa 10-fach häufiger in beiden Membranen vorkommt, hätte man den peripheren Arm des Komplex I vereinzelt erkennen müssen. Die L-Form ist möglicherweise nur für das isolierte Enzym in Detergenz typisch, das in allen Fällen mit Salzkonzentrationen über 50 mM präpariert wurde.

In Gegenwart des spezifischen Reduktionsmittels NADH wird die Überalles-Struktur des Komplexes ebenfalls verändert. Durch den Redoxwechsel vergrößert sich der Abstand zwischen dem Hydrogenase Modul und dem Translokase Modul (Abb. 4-24). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob dies möglicherweise mit der Protonentranslokation des Komplexes gekoppelt ist.

5.2 Der Elektronentransport in Komplex I

Für das Verständnis des Elektronentransports in Komplex I müssen alle beteiligten Redoxgruppen bekannt sein. Aus Sequenzvergleichen waren Untereinheiten mit Bindemotiven für FeS Zentren bekannt. Um die ESR-spektroskopisch sichtbaren FeS Zentren auf einer Untereinheit zu lokalisieren, wurden zum einen konservierte Aminosäuren der Bindemotive ausgetauscht und zum anderen einzelne Untereinheiten überproduziert. Aufgrund der Anzahl konservierter Sequenzmotive und des Gehalts an Eisen und säurelabilem Sulfid in Komplex I, ist es vernünftig anzunehmen, daß der Komplex I weitere FeS Zentren enthält, die bislang ESR-spektroskopisch nicht nachgewiesen wurden. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode der UV/Vis-Spektroskopie ist zwar weniger selektiv als die ESR-Spektroskopie, erfaßt aber alle Kofaktoren des Komplexes. Das Problem dieser Methode besteht darin, daß die Absorptionen aller Komponenten überlagert sind. Die FeS Zentren N6a/N6b auf der Untereinheit Nuol absorbieren ungewöhnlich stark im UV/Vis-Bereich und ihre Absorption konnte von der übrigen Komponenten des

Komplex I in *N. crassa* kinetisch abgetrennt werden. Die besondere räumliche Anordnung dieser zwei vierkernigen FeS Zentren führt offenbar durch elektronische Kopplung zu dieser für FeS Zentren ungewöhnlich starken Absorption (Mathews et al., 1974; Prince & Adams, 1987). Gleichzeitig tritt eine magnetische Kopplung auf, die zu einem komplexen ESR-Signal mit geringer Intensität führt (Prince & Adams, 1987). Das Chinon Reduktase Fragment enthält nur die FeS Zentren N6a/N6b und N2. Das ESR-Spektrum dieser Präparation zeigt die bekannten Signale des Zentrums N2 mit $g_{\perp} = 1,92$ und $g_{\parallel} = 2,04$, die im Vergleich zu Komplex I leicht verschoben sind ($g_{\perp} = 1,91$ und $g_{\parallel} = 2,05$). Eine leichte Verschiebung dieses Signals wurde bereits für das verbindende Fragment des *E. coli* Komplex I beschrieben (Leif et al., 1995). Das Spektrum enthält außerdem zwei weitere Absorptionen bei $g = 2,086$ und $1,88$. Diese Signale treten nur bei 13 K auf und stammen daher von einem vierkernigen FeS Zentrum. Das Signal könnte eine rhombische Symmetrie besitzen, wobei die g_y -Absorption komplett von der g_{\perp} -Absorption des Zentrums N2 überlagert ist. Diese Signale wurden bislang weder für Komplex I, noch für dessen Fragmente beschrieben. Sie werden daher N6a und N6b zugeordnet (Rasmussen et al., eingereicht). Das Signal könnte entweder nur von einem oder von beiden FeS Zentren herrühren. Im letzteren Fall könnte sich die Umgebung der beiden FeS Zentren durch die Präparation des Fragments so geändert haben, daß N6a und N6b nicht mehr interagieren. Es ist bekannt, daß die ESR-Spektren der beiden 4Fe4S Zentren in den homologen 8Fe-Ferredoxinen unter Bedingungen, bei denen keine Kopplung auftritt, identisch sind (Mathews et al., 1974).

Die FeS Zentren N6a/N6b zeigen ein identisches Mittenpotential von $E_m = -270$ mV. Beide Zentren scheinen stark genug zu interagieren, um ihre spektroskopischen Eigenschaften zu beeinflussen, aber nicht stark genug, um ihr Mittenpotential zu beeinflussen. Das niedrige Mittenpotential von N6a/N6b legt nahe, daß diese Zentren im Elektronenweg von NADH zu Ubichinon vor dem FeS Zentrum N2 ($E_{m,7} = -220$ mV) liegen. Sie sollten im Elektronenweg aber hinter den isopotentiellen FeS Zentren des NADH Dehydrogenase Fragments liegen, da sie langsamer reoxidieren. Eine *E. coli* Komplex I Präparation wurde unspezifisch geschädigt, so daß die Zentren N6a/N6b UV/Vis-spektroskopisch nicht nachzuweisen waren (van den Boom, 1998). Der Elektronenfluß war in dieser Präparation zwischen den

isopotentiellen FeS Zentren und N2 unterbrochen, das Zentrum N2 war jedoch durch unspezifische Reduktion mit Dithionit nachzuweisen. Dies spricht für einen linearen Elektronenweg von dem FMN zu den isopotentiellen FeS Zentren weiter über N6a/N6b zu N2.

Allen Sequenzmotiven für die Bindung von FeS Zentren wurde spektroskopisch ein Zentrum zugeordnet. Das FMN und die FeS Zentren decken den Potentialbereich von -360 bis -220 mV ab und damit weniger als ein Drittel der Potentialdifferenz zwischen NADH und Ubichinon. Diese Energiedifferenz reicht aus thermodynamischen Gründen nicht aus, um die gemessenen H^+/e^- Stöchiometrien von 4 zu erreichen (Pozzan et al., 1979; Di Virgilio & Azzone, 1982; Wikström, 1984; Weiss & Friedrich, 1991; Brown & Brand, 1988; Galkin et al., 1999). Daher muß die Potentialdifferenz zwischen N2 und Ubichinon zur Energiegewinnung genutzt werden. Dieser distale Teil des Elektronenwegs ist bislang kaum untersucht worden, was hauptsächlich an technischen Problemen liegt. Über die NADH-Bindestelle kann das Enzym zwar leicht reduziert werden, aber aufgrund seines negativen Mittenpotentials wird mit dem Redoxpaar NADH/NAD⁺ höchstens ein Potential von etwa -200 mV eingestellt. In Detergenz solubilisierter Komplex I kann nicht über die Ubichinonbindestelle in Form eines reversen Elektronenflusses reduziert werden. Mit elektrochemischen Methoden können dagegen beliebige Potentiale eingestellt werden. Redoxmediatoren mit geeigneten Mittenpotentialen übertragen die Elektronen zwischen der Elektrode und den Redoxgruppen des Enzyms. Dieser unspezifische Zugang zum Elektronenweg ist im mitochondrialen Komplex I erschwert, da die Redoxgruppen gegenüber dem bakteriellen Enzym durch zusätzliche Untereinheiten besser abgeschirmt sind. Dies führt zu Potential-Äquilibrierungszeiten über 30 Minuten und zu einer geringen Stabilität des Proteins an der Elektrode (Abelmann, 1999). Weiterhin erschwert die große Masse des mitochondrialen Komplex I, die benötigten Konzentrationen von über $100 \mu\text{M}$ einzustellen. Der bakterielle Komplex I wird elektrochemisch schnell angesprochen und kann auf eine Konzentration von $250 \mu\text{M}$ gebracht werden (Hellwig et al., 2000). Damit kann die Probe bei Schichtdicken von kleiner $10 \mu\text{m}$ vermessen werden und die IR-Absorptionen von Wasser werden minimiert. Auf diese Weise wurde das Mittenpotential der unbekannt Gruppe X zu -80 mV bestimmt und ein IR-Redox-Differenzspektrum der Gruppe erhalten. Die C=O- und C=C-Schwingungen der

Gruppe X lassen sich als eine chinoide Struktur interpretieren. Es ist unwahrscheinlich, daß es sich um ein proteingebundenes Ubichinon handelt, da die entsprechenden Schwingungen der Methoxygruppen im Spektrum fehlen. Weder aus der *E. coli* noch aus der *N. crassa* Komplex I Präparation ließ sich Chinon extrahieren (Schildwächter, 1996; Haupt, 1999). Deshalb wird angenommen, daß die chinoide Gruppe in Komplex I kovalent gebunden ist.

Das IR-Differenzspektrum der Gruppe X ist charakteristischer als die UV/Vis-Differenzabsorption und zeigt Ähnlichkeit zum Spektrum von Trihydroxy-Phenylalanin, einer Vorstufe eines Neurotoxins. Dies bestätigt die Vermutung, daß es sich bei der Gruppe X um eine modifizierte Aminosäure handelt (Friedrich et al., 2000).

In den anderen protonenpumpenden Komplexen der Atmungskette wurden Redoxgruppen in den membranständigen Untereinheiten gefunden, die dort den Elektronenfluß mit der Protonentranslokation koppeln (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1995; Xia et al., 1997). Es ist deshalb vernünftig anzunehmen, daß auch Komplex I eine Redoxgruppe in einer membranständigen Untereinheit enthält. Die Gruppe X als möglicher Kandidat für eine solche Gruppe wurde im Chinon Reduktase Fragment nachgewiesen. Durch Spaltung dieser Präparation in kleinere Fragmente wäre es möglich, die Gruppe X einer Untereinheit zuzuordnen.

5.3 Der Protonentransport in Komplex I

Es wird diskutiert, daß das FeS Zentrum N2 eine Kopplungsstelle des Elektronentransports mit einer Protonentranslokation darstellt. Die Gründe dafür sind seine Lage in der Nähe der Membran und die pH-Abhängigkeit seines Mittenpotentials (Ingledew & Ohnishi, 1980; Ohnishi, 1998). Seine Rolle als Redox-Bohrgruppe in Komplex I wurde diskutiert (Brandt, 1997). Dazu sollte N2 im reduzierten Zustand ein Proton aufnehmen und es bei der Oxidation wieder abgeben. N2 besitzt ein untypisches Bindemotiv für FeS Zentren, da der vierte Ligand kein Cystein ist. Ein konserviertes Glutamat wurde als vierter Ligand vorgeschlagen (Ohnishi, 1993). Damit würde auch die pH-Abhängigkeit des Mittenpotentials erklärt, weil durch die Reduktion des FeS Zentrums ein

ligandierendes Glutamat protoniert werden könnte. In dem Komplex I aus *Y. lipolytica* wurden allerdings alle sauren Aminosäuren der zu NuoB homologen Untereinheit gegen andere Aminosäuren ausgetauscht, ohne daß das Signal des Zentrums N2 verloren ging (Ahlers et al., 2000). Das FTIR-Doppeldifferenzspektrum des Komplex I minus dem NADH Dehydrogenase Fragment zeigt, daß die Reduktion von N2 mit der Protonierung eines Tyrosins gekoppelt ist (Ringschwingung bei 1515 cm^{-1}) und die Oxidation mit einer Deprotonierung (Ringschwingung bei 1500 cm^{-1} , Abb. 4-21 c). Dies ist im Einklang mit der Rolle von N2 als Redox-Bohrgruppe und bedeutet, daß ein Tyrosin der vierte Ligand des FeS Zentrums N2 sein könnte. Die Untereinheit NuoB enthält zwei konservierte Tyrosine, deren Mutagenese Gegenstand einer laufenden Diplomarbeit in unserem Institut ist.

Darüberhinaus zeigen die FTIR-Spektren, daß die Oxidation von N2 mit der Protonierung einer Aspartat- oder Glutamatseitenkette gekoppelt ist. Dieser Vorgang entspricht nicht dem erwarteten Verhalten einer Redox-Bohrgruppe. Unsere Arbeitshypothese ist, daß das Tyrosin, das als vierter Ligand von N2 in Frage kommt, bei der Reduktion von N2 ein Proton aufnimmt und es bei der anschließenden Oxidation an das Aspartat oder Glutamat weitergibt. Im Einklang mit den elektronenmikroskopischen Bildern ist auch im FTIR-Spektrum zu sehen, daß der Redoxwechsel des Komplex I mit großen konformativen Änderungen gekoppelt ist. Daher ist es möglich, daß die beobachteten Protonierungsreaktionen zu einem Protonentransport über die Membran beitragen.

5.4 Die Kopplung von Elektronen- und Protonentransport in Komplex I: Ein modularer Mechanismus ?

Der Mechanismus des Komplex I muß die Protonen- zu Elektronen-Stöchiometrie korrekt beschreiben. Für den mitochondrialen Komplex I wurde eine Protonen- zu Elektronen-Stöchiometrie von $4\text{ H}^+ / 2\text{ e}^-$ bestimmt (Pozzan et al., 1979; Di Virgilio & Azzone, 1982; Wikström, 1984; Weiss & Friedrich, 1991; Brown & Brand, 1988; Galkin et al., 1999). Für den bakteriellen Komplex I aus *E. coli* wurde eine Stöchiometrie von mindestens $3\text{ H}^+ / 2\text{ e}^-$ bestimmt (Bogachev et al., 1996). Aus den thermodynamischen Randbedingungen ergeben sich Obergrenzen für die H^+ / e^- Stöchiometrie, da die bei der Redoxreaktion freiwerdende Energie die maximale

Energie zur Protonentranslokation ergibt. Der Komplex I aus *E. coli* kann unter anaeroben Bedingungen auch mit Menachinon ($E_m = -80$ mV) anstelle von Ubichinon ($E_m = +60$ mV) reagieren, so daß eine Stöchiometrie von $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ nur bei einem niedrigeren Membranpotential möglich wäre. Messungen zeigen jedoch, daß das Membranpotential in *E. coli* bei anaerober Atmung kaum geringer ist als bei aerober Atmung (Tran & Unden, 1998). Falls sich die Substratkonzentrationen unter anaeroben Bedingungen nicht verändern, liefert die Reaktion mit Menachinon möglicherweise keine größere Stöchiometrie als $1,7 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$. Der Komplex I aus *M. mazei* kann aufgrund der Potentialdifferenz zwischen seinen Substraten nur maximal $2 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ pumpen (Bäumer et al., 2000). Es stellt sich die Frage, ob Komplex I prinzipiell mit einer Stöchiometrie von $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ arbeiten muß. Ein möglicher Mechanismus von Komplex I müsste in diesem Fall die variable Stöchiometrie berücksichtigen.

Der modulare Aufbau des Komplex I legt es nahe, zuerst den Mechanismus der einzelnen Module zu betrachten. Das NADH Dehydrogenase Modul leitet die Elektronen weiter, ohne eine Potentialdifferenz abzudecken, die ausreichend wäre, um Protonen zu pumpen. Die zu dem Hydrogenase Modul homologe Ech Hydrogenase aus *M. barkeri* pumpt Protonen mit einer Stöchiometrie von $1 \text{ H}^+ / 1 \text{ e}^-$ (Bott & Thauer, 1989; Künkel et al., 1998; Meuer et al., 1999). Es ist denkbar, daß in der Ech Hydrogenase der gleiche Mechanismus der Protonentranslokation existiert, der in Komplex I eine Protonierung mit der Oxidation von N_2 koppelt (Hellwig et al., 2000). Mit dem Erwerb des Translokase Moduls und der Chinonbindestelle wird in Komplex I wahrscheinlich die Translokation eines weiteren Protons pro Elektron ermöglicht. Daher ist anzunehmen, daß das Translokase Modul die zweite Kopplungsstelle enthält. Verschiedene Experimente deuten darauf hin, daß die Ubichinonbindestelle auf den Untereinheiten NuoB, D oder H liegt (Darrouzet et al., 1998; Schuler et al., 1999). Diese Untereinheiten liegen im Hydrogenase Modul, so daß der Elektronenweg wahrscheinlich in diesem Modul endet und daß das Translokase Modul nicht am Elektronentransport beteiligt ist. In diesem Fall müsste die zweite Kopplungsstelle auf eine indirekte Weise angetrieben werden. Die beobachtete konformative Bewegung von Komplex I während des Redoxwechsels könnte diesen Antrieb darstellen. Der Mechanismus von Komplex I kann formal in die redox-getriebene Translokation von $1 \text{ H}^+ / \text{e}^-$ durch das FeS Zentrum N_2 im

Hydrogenase Modul und durch die möglicherweise konformativ getriebene Translokation eines weiteren Protons im Translokase Modul zerlegt werden. Die Kopplung beider Prozesse ist völlig unklar. Die Rolle der Gruppe X ist hierbei unbekannt, es wäre jedoch denkbar, daß sie zur Konformationsänderung beiträgt und das Verbindungsglied in dem „modularen Mechanismus“ von Komplex I darstellt. Diese Hypothese würde auch die variable H^+ / e^- Stöchiometrie von Komplex I erklären. Das Hydrogenase Modul von Komplex I könnte sich im Laufe der Evolution durch die Verwendung von elektropositiveren Substraten ein größeres Redoxpotential erschlossen haben. Diese zusätzliche Energie würde dann dazu genutzt, die zweite Kopplungsstelle im Translokase Modul anzutreiben. Reagiert Komplex I mit einem elektronegativen Akzeptor wie Menachinon, wird derselbe Elektronenweg benutzt, aber es wird weniger Redoxenergie frei. In diesem Fall wird die zweite Kopplungsstelle nicht oder nur manchmal genutzt. Eine ungerade Stöchiometrie für Protonenpumpen wurde diskutiert (Ferguson & Sorgato, 1982; Murphy & Brand, 1987; Weiss & Friedrich, 1991). Auch die ATP Synthase, der hauptsächlichste Verbraucher der protonenmotorischen Kraft, arbeitet mit ungeraden Stöchiometrien zwischen $10/3$ und $14/3$, denn der membranständige Teil des Komplexes treibt je nach Organismus durch 10 bzw. 14 einzelne Protonierungsschritte indirekt die ATP Bildung im peripheren Teil durch Drehung in 120° Schritten an (Stock et al., 1999; Seelert et al., 2000).

6. Literatur

- Abelmann, A. (1999) Charakterisierung einer neuen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Ahlers, P. M., Zwicker, K., Kerscher, S. und Brandt, U. (2000) Function of Conserved Acidic Residues in the PSST-Homologue of Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23577-23582.
- Amling, N. (1996) UV/VIS-spektroskopischer Nachweis einer unbekanntenen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J. und Goni, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23-56.
- Bäumer, S., Ide, T., Jacobi, C., Johann, A., Gottschalk, G. und Deppenmeier, U. (2000) The F₄₂₀H₂ Dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* Is a Redox-driven Proton Pump Closely Related to NADH Dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **275** (24), 17968-17973.
- Baymann, F., Moss, D. A. und Mäntele, W. (1991) An Electrochemical Assay for the Characterization of Redox Proteins from Biological Electron Transfer Chains. *Anal. Biochem.* **199**, 269-274.
- Baymann, F. (1995) Der Cytochrom bc₁-Komplex des Purpurbakteriums *Rhodobacter capsulatus*: Infrarotspektroskopische und elektrochemische Untersuchungen. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.
- Bogachev, A. V., Murtazina, R.A. und Skulachev, V. P. (1996) H⁺/e⁻ Stoichiometry for NADH Dehydrogenase I and Dimethyl Sulfoxide Reductase in Anaerobically Grown *Escherichia coli* Cells. *J. Bacteriol.* **178** (21), 6233-6237.
- Boison, G., Bothe, H., Hansel, A. und Lindblad, P. (1999) Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 159-165.
- Bott, M. und Thauer, R. K. (1989) Proton translocation coupled to the oxidation of carbon monoxide to CO₂ and H₂ in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **179**, 469-472.
- Brandt, U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 79-91.
- Braun, M., Bungert, S. und Friedrich, T. (1998) Characterization of the Overproduced NADH Dehydrogenase Fragment of the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 1861-1867.

- Brors, B. (1999) Spektroskopische Charakterisierung einer bislang unbeschriebenen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Brown, G. V. und Brand, M. D. (1988) Proton/electron stoichiometry of mitochondrial complex I estimated from the equilibrium thermodynamic force ratio. *Biochem. J.* **252**, 473-479.
- Brüggemann, H., Falinski, F. und Deppenmeier, U. (2000) Structure of the F₄₂₀H₂:quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus*. Identification and overproduction of the F₄₂₀H₂-oxidizing subunit. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5810-5814.
- Bungert, S., Krafft, B., Schlesinger, R. und Friedrich, T. (1999) One-step purification of the NADH dehydrogenase fragment of the *Escherichia coli* complex I by means of *Strep*-tag affinity chromatography. *FEBS Lett.* **460**, 207-211.
- Cammack, R. (1995) Splitting molecular hydrogen. *Nature* **373**, 556-557.
- Cheng, H., Xia, B., Reed, G. H. und Markley, J. L. (1994) Optical, EPR, and ¹H NMR Spectroscopy of Serine-Ligated [2Fe-2S] Ferredoxins Produced by Site-Directed Mutagenesis of Cysteine Residues in Recombinant *Anabaena* 7120 Vegetative Ferredoxin. *Biochemistry* **33**, 3155-3164.
- Chirgadze, Y. N., Fedorov, O. V. und Trushina, N. P. (1975) Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers* **14** (4), 679-694.
- Crouse, B. R., Yano, T., Finnegan, M. G., Yagi, T. und Johnson, M. K. (1994) Properties of the Iron-Sulfur Center in the 25-Kilodalton Subunit of the Proton-translocating NADH-Quinone Oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **269** (33), 21030-21036.
- Dailey, H. A., Finnegan, M. G. und Johnson, M. K. (1994) Human Ferrochelatase Is an Iron-Sulfur Protein. *Biochemistry* **33**, 403-407.
- Darrouzet, E., Issartel, J.-P., Lunardi, J. und Dupuis, A. (1998) The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone related inhibitors. *FEBS Lett.* **431**, 34-38.
- Dejonghe, D., Andrianambinintsoa, S. und Breton, J. (1998) Light-induced FTIR difference spectroscopy of Q_A photoreduction in Photosystem II core particles. in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G., Ed.), Vol. II, pp. 1121-1124, Kluwer Academic Publishers.
- Di Virgilio, F. und Azzone, G. F. (1982) Activation of Site I Redox-driven H⁺ Pump by Exogenous Quinones in Intact Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257** (8), 4106-4113.
- Dimroth, P. und Thomer, A. (1989) A primary respiratory Na⁺ pump of an anaerobic bacterium: the Na⁺-dependent NADH:quinone oxidoreductase of *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **151**, 439-444.

- Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Rademacher, M., Lindahl, M., Schägger, H. und Brandt, U. (2000) Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 230-238.
- Dooijewaard, G., Slater, E. C., van Dijk, P. J. und de Bruin, G. J. (1978) Chaotropic resolution of high molecular weight (type I) NADH dehydrogenase, and reassociation of flavin-rich (type II) and flavin-poor subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **503** (3), 405-424.
- Dunbar, B. S. (1987) Two Dimensional Gel Electrophoresis and Immunological Techniques. Plenum Press, New York.
- Dutton, P. L. (1978) Redox Potentiometry: Determination of Midpoint Potentials of Oxidation-Reduction Components of Biological Electron-Transfer Systems. *in* Methods in Enzymology, Vol. **54**, pp. 411-435, Academic Press, New York.
- Engel, W. D., Schägger, H. und von Jagow, G. (1983) Isolation of complex III from various mitochondria. Comparison of the structural and functional properties of the preparations from beef heart, calf liver and *Neurospora crassa*. *Z. Physiol. Chem.* **364**, 1753-1763.
- Fecke, W., Sled, V. D., Ohnishi, T. und Weiss, H. (1994) Disruption of the gene encoding the NADH-binding subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase in *N. crassa*. Formation of partially assembled enzyme without FMN and the iron-sulfur cluster N-3. *Eur. J. Biochem.* **220**, 551-558.
- Ferguson, S. J. und Sorgato, M. C. (1982) Proton Electrochemical Gradients and Energy-Transduction Processes. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 185-217.
- Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B. und Weiss, H. (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 173-180.
- Friedrich, T., van Heek, P., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzsch-Kienast, W., Höfle, G., Reichenbach, H. und Weiss, H. (1994) Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). Relationship of one site with the ubiquinone-binding site of bacterial glucose:ubiquinone oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **219**, 691-698.
- Friedrich, T., Steinmüller, K. und Weiss, H. (1995) Minireview: The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* **367**, 107-111.
- Friedrich, T. und Weiss, H. (1997) Modular Evolution of the Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase and the Origin of its Modules. *J. theor. Biol.* **187**, 529-540.

- Friedrich, T. (1998) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 134-146.
- Friedrich, T., Abelmann, A., Brors, B., Guénebaut, V., Kintscher, L., Leonard, K., Rasmussen, T., Scheide, D., Schlitt, A., Schulte, U. und Weiss H. (1998) Redox components and structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 215-219.
- Friedrich, T. und Scheide, D. (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* **479**, 1-5.
- Friedrich, T., Brors, B., Hellwig, P., Kintscher, L., Rasmussen, T., Scheide, D., Schulte, U., Mäntele, W. und Weiss, H. (2000) Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 305-309.
- Galkin, A. S., Grivennikova, V. G. und Vinogradov, A. D. (1999) $H^+/2e^-$ Stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett.* **451**, 157-161.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gishla, S. (1980) Fluorescence and Optical Characteristics of Reduced Flavins and Flavoproteins. in *Methods in Enzymology* (Fleischer, S. und Fleischer, B., Eds.), Vol. **66**, pp. 360-373, Academic Press, New York.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. und David, M. M. (1949) Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- Grigorieff, N. (1999) Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** (4), 476-483.
- Guénebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H. und Leonard, K. (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J. Mol. Biol.* **265**, 409-418.
- Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K. und Friedrich, T. (1998) Consistent Structure Between Bacterial and Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105-112.
- Gutman, M., Singer, T. P. und Beinert, H. (1972) Relation of the respiratory chain-linked reduced nicotinamide-adenine dinucleotide dehydrogenase to energy-coupling site 1. *Biochemistry* **11**(4), 556-562.
- Hatefi, Y. und Stempel, K. E. (1969) Isolation and Enzymatic Properties of the Mitochondrial Reduced Diphosphopyridine Nucleotide Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **244**, 2350-2357.

- Haupt, V. (1999) NADPH als Cofaktor einer Reduktase/Isomerase-Untereinheit des Atmungsketten-Komplex I. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Hellwig, P. (1998) Elektronen- und Protonentransfer in der Cytochrom c Oxidase von *Paracoccus denitrificans*, Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg.
- Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O.-M., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H. und Mäntele, W. (1998) Involvement of Glutamic Acid 278 in the Redox Reaction of the Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans* Investigated by FTIR Spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 7390-7399.
- Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mäntele, W. und Friedrich, T. (2000) FT-IR Spectroscopic Characterization of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*: Oxidation of FeS Cluster N2 is Coupled with the Protonation of an Aspartate or Glutamate Side Chain. *Biochemistry* **39**, 10884-10891.
- Hofhaus, G., Weiss, H. und Leonard, K. (1991) Electron Microscopic Analysis of the Peripheral and Membrane Parts of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I). *J. Mol. Biol.* **221**, 1027-1043.
- Ingledeu, W. J. und Ohnishi, T. (1980) An Analysis of some Thermodynamic Properties of Iron-Sulphur Centres in Site I of Mitochondria. *Biochem. J.* **186**, 111-117.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. und Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669.
- Johnson, M. K., Robinson, A. E. und Thomson, A. J. (1982). in Iron-sulfur Proteins (Spiro, T. G., Ed.) pp. 367-406, Wiley-Interscience, New York.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H. und Kiley, P. J. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6087-6092.
- King, T. E., Howard, R. L., Kettman, J., Hegdekar, B. M., Kuboyama, M., Nickel, K. S. und Possehl, E. A. (1966) Comparison of Soluble NADH Dehydrogenases from the Respiratory Chain of Cardiac Mitochondria. in Flavins and Flavoproteins (Slater, E. C., Ed.), pp. 449-480, Elsevier, Amsterdam.
- Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Venter, J. C., et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-370.

- Kowal, A. T., Morningstar, J. E., Johnson, M. K., Ramsay R.R. und Singer, T. P. (1986) Spectroscopic Characterization of the Number and Type of Iron-Sulfur Clusters in NADH:Ubiquinone Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **261** (20), 9239-9245.
- Koziol, J. (1971) Fluorometric Analyses of Riboflavin and its Coenzymes. *in* Methods in Enzymology (McCormick, D. B. und Wright, L. D., Eds.), Vol. **18**, pp. 253-285, Academic Press, New York.
- Krebs, W., Steuber, J., Gemperli, A. C. und Dimroth, P. (1999) Na⁺ translocation by the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **33**, 590-598.
- Krishnamoorthy, G. und Hinkle, P. C. (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centres, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **263**, 17566-17575.
- Künkel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K. und Hedderich, R. (1998) An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **252**, 467-476.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H. und Friedrich, T. (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 538-548.
- Leonard, K., Haiker, H. und Weiss, H. (1987) Three-dimensional Structure of NADH:Ubiquinone Reductase (Complex I) from *Neurospora* Mitochondria Determined by Electron Microscopy of Membrane Crystals. *J. Mol. Biol.* **194**, 277-286.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. und Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Malkin, R. (1973) The Chemical Properties of Ferredoxins. *in* Iron Sulfur Proteins (Lovenberg, W., Ed.), Vol. 2, 235-244, Academic Press, Orlando, Florida.
- Mäntele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **18** (6), 197-202.
- Mayhew, S. G. und Massey, V. (1973) Studies on the kinetics and mechanism of reduction of flavodoxin from *Peptostreptococcus elsdenii* by sodium dithionite. *Biochim. Biophys. Acta* **315**, 181-190.
- Mathews, R., Charlton, S., Sands, R. H. und Palmer, G. (1974) On the Nature of the Spin Coupling between the Iron-Sulfur Clusters in the Eight-Iron Ferredoxins. *J. Biol. Chem.* **249**, 4326-4328.

- Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Künkel, A. und Hedderich, R. (1999) Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **265**, 325-355.
- Moss, D. A., Nabedryk, E., Breton, J. und Mäntele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the method with cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* **187**, 565-572.
- Moulis, J.-M. und Meyer, J. (1982) Characterization of the selenium-substituted 2 [4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **21**, 4762-4771.
- Murphy, M. P. und Brand, M. D. (1988) Membrane-potential-dependent changes in the stoichiometry of charge translocation by the mitochondrial electron transport chain. *Eur. J. Biochem* **173** (3), 637-644.
- Oh, J.-I. und Bowien, B. (1999) Dual control by regulatory gene *fdsR* of the *fds* operon encoding the NAD⁺-linked formate dehydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Mol. Microbiol.* **34**, 365-376.
- Ohnishi, T., Asakura, T., Yonetani, T. und Chance, B. (1971) Electron paramagnetic resonance studies at temperatures below 77 degrees K on iron-sulfur proteins of yeast and bovine heart submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* **246**, 5960-5964.
- Ohnishi, T. (1993) NADH-Quinone Oxidoreductase, the Most Complex Complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 325-330.
- Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur clusters / semiquinones in Complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 186-206.
- Pozzan, T., Miconi, V., Di Virgilio, F. und Azzone, G. F. (1979) H⁺/site, charge/site, and ATP/site ratios at coupling sites I and II in mitochondrial e⁻ transport. *J. Biol. Chem.* **254**, 10200-10205.
- Prince, R.C. und Adams, M. W. (1987) Oxidation-reduction properties of the two Fe₄S₄ clusters in *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. *J. Biol. Chem.* **262** (11), 5125-5128.
- Putnoky, P., Kereszt, A., Nakamura, T., Endre, G., Grosskopf, E., Kiss, P. und Kondorosi, A. (1998) The *pha* gene cluster of *Rhizobium meliloti* involved in pH adaptation and symbiosis encodes a novel type of K⁺ efflux system. *Mol. Microbiol.* **28**(6), 1091-1101.
- Ragan, C. I. und Hinkle, P. C. (1975) Ion transport and respiratory control in vesicles formed from reduced nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme Q reductase and phospholipids. *J. Biol. Chem.* **250**, 8472-8480.
- Rasmussen, T. (1999) Zur Funktionsweise des peripheren Arms der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Rasmussen, T., Scheide, D., Brors, B., Kintscher, L., Weiss, H. und Friedrich, T. (2000) Characterization of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Eingereicht.

Saraste, M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* **23**, 331-366.

Sazanov, L. A. und Walker, J. E. (2000) Cryo-electron Crystallography of Two Sub-complexes of Bovine Complex I Reveals the Relationship between the Membrane and Peripheral Arms. *J. Mol. Biol.* **302**, 455-464.

Sazanov, L. A., Peak-Chew, S. Y., Fearnly, I. M. und Walker, J. E. (2000) Resolution of the Membrane Domain of Bovine Complex I into Subcomplexes: Implications for the Structural Organization of the Enzyme. *Biochemistry* **39**, 7229-7235.

Schildwächter, C. (1996) Versuch des Nachweises einer chinoiden Redoxgruppe in der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I). Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Schlitt, A. (1998) Zuordnung von Eisen-Schwefel-Zentren in der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase aus *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Schneider, K., Cammack, R., Schlegel, H. G. und Hall, D. O. (1979) The iron-sulfur centres of soluble hydrogenases from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta* **578**, 445-461.

Schuler, F., Yano, T., Di Bernardo, S., Yagi, T., Yankovskaya, V., Singer, T. P. und Casida, J. E. (1999) NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4149-4153.

Schulte, U. und Weiss, H. (1995) Generation and characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase mutants in *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* **260**, 3-14.

Schulte, U., Abelmann, A., Amling, N., Brors, B., Friedrich, T., Kintscher, L., Rasmussen, T. und Weiss, H. (1998) Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by diode array UV/VIS spectroscopy. *BioFactors* **8**, 177-186.

Schulte, U., Haupt, V., Abelmann, A., Fecke, W., Brors, B., Rasmussen, T., Friedrich, T. und Weiss, H. (1999) A Reductase/Isomerase Subunit of Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (complex I) Carries an NADPH and is Involved in the Biogenesis of the Complex. *J. Mol. Biol.* **292**, 569-580.

Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N. A., Engel, A., Stahlberg, H. und Müller, D. J. (2000). Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature Structural Biology* **405**, 418-419.

- Smith, M. A., Finel, M., Korolik, V. und Mendz, G. L. (2000) Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* **174**, 1-10.
- Spehr, V., Schlitt, A., Scheide, D., Guénebaut, V. und Friedrich, T. (1999) Overexpression of the *Escherichia coli* *nuo*-Operon and Isolation of the Overproduced NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry* **38**, 16261-16267.
- Steuber, J., Schmid, C., Rufibach, M. und Dimroth, P. (2000) Na⁺ translocation by complex I (NADH:quinone oxidoreductase) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35** (2), 428-434.
- Stiles, J. W. und Crane, F. L. (1966) The demonstration of the elementary particles of mitochondrial membranes fixed with glutaraldehyde. *Biochim. Biophys. Acta* **126**, 179-181.
- Stock, D., Leslie, A. G. und Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705.
- Tersteegen, A. und Hedderich, R. (1999) *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **264**, 930-943.
- Tran, Q. H. und Uden, G. (1998) Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *Eur. J. Biochem.* **251**, 538-543.
- Tran, Q. H., Bongaerts, J., Vlad, D. und Uden, G. (1997) Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications. *Eur. J. Biochem.* **244**, 155-160.
- Tran-Betcke, A., Warnecke, U., Böcker, C., Zaborosch, C. und Friedrich, B. (1990) Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing Hydrogenases of *Alcaligenes eutrophus* H16, *J. Bacteriol.* **172**, 2920-2929.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawaitoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1995) Structures of the metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Ångström. *Science* **269**, 1069-1074.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawaitoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-1144.
- Uden, G. und Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli* : energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 217-234.
- van Belzen, R. und Albracht, S. P. J. (1989) The pathway of electron transfer in NADH:Q oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* **974**, 311-320.

- van den Boom, J. (1999) Suche nach unbekanntem Redoxgruppen in der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- van Heel, M. (1979) IMAGIC and its results. *Ultramicroscopy* **4**, 117.
- van Heel, M. und Keegstra, W. (1981) IMAGIC: A fast flexible and friendly image analysis software system. *Ultramicroscopy* **7**, 113-130.
- van Heel, M., Harauz, G. und Orlova, E. V., Schmidt, R. und Schatz, M. (1996) A new Generation of the IMAGIC Image Processing System. *J. Struct. Biol.* **116**, 17-24.
- Venyaminov, S. Y. und Kalnin, N. N. (1990a) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* **30** (13-14), 1243-1258.
- Venyaminov, S. Y. und Kalnin, N. N. (1990b) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in alpha-, beta-, and random coil conformations. *Biopolymers* **30** (13-14), 1259-1271.
- Vinogradov, A. D., Sled, V. D., Burbaev, D. S., Grivennikova, V. G., Moroz, I. A. und Ohnishi, T. (1995) Energy-dependent Complex I-associated ubisemiquinones in submitochondrial particles. *FEBS Lett.* **370**(1-2), 83-87.
- Walker, J. E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quart. Rev. Biophys.* **25** (3), 253-324.
- Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H. und Weiss, H. (1993) The Gene Locus of the Proton-translocating NADH:Ubiquinone Oxidoreductase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **233**, 109-122.
- Weiss, H. und Friedrich, T. (1991) Redox-Linked Proton Translocation by NADH-Ubiquinone Reductase (Complex I). *J. Bioenerg. Biomembr.* **23** (5), 743-754.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. und Preis, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576.
- Whitaker, J. R. und Granum, P. E. (1980) An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* **109** (1), 156-159.
- Wikström, M. (1984) Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett.* **169**, 300-304.
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. und Deisenhofer, J. (1997) Crystal Structure of the Cytochrome bc₁ Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science* **277**, 60-66.
- Yang, X. und Trumpower, B. L. (1986) Purification of a three subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **261**, 12283-12289.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Weiß für seine Betreuung, die kritische Durchsicht des Manuskripts und für seine gute Anleitung zu wissenschaftlichen Vorträgen.

Besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Friedrich: für die interessante Fragestellung und die intensive Betreuung, für seine Offenheit und sein persönliches Engagement für neue Ideen, für die geduldige Beantwortung aller Fragen und für noch vieles mehr, das ich in der Zeit dieser Doktorarbeit lernen konnte. Darüber hinaus auch ein Dankeschön für eine angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre.

Dank gilt auch Dr. Bettina Böttcher für die Elektronenmikroskopie und Dr. Petra Hellwig für die Elektrochemie und die IR-Spektroskopie.

Für ein freundschaftliches Arbeitsumfeld bedanke ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Instituts, besonders bei der „*E. coli* – Gruppe“ (Angela Schlitt, Stefanie Bungert, Monika Kerstan, Jörg van den Boom, Ewa Kraft, Abdelhakim Lgssiar und Micaela Hesterberg), bei Simone Bange, Tim Rasmussen und bei meinen Mitstreitern Lars Kintscher, Jörg Hennemann und Alexander Maaßen. Auch für die schönen Stunden nach der Arbeit danke ich Simone Bange, Benedikt Brors, Stefanie Bungert, Thorsten Friedrich, Verena Haupt, Micaela Hesterberg, Susanne Hochstein, Monika Kerstan, Lars Kintscher, Jürgen Lüttgen, Tim Rasmussen, Angela Schlitt, Regina Schneider.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern und meiner Familie danken, die mich immer unterstützt haben und für mich da waren.