

**Charakterisierung einer unbekanntenen
Redoxgruppe sowie der Konformation 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
Micaela Hesterberg
aus Wuppertal

Düsseldorf 2002

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

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiss
2. Referent: Prof. Dr. Thorsten Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	3
2.2	Der Komplex I aus <i>Escherichia coli</i>	7
2.3	Hinweise auf eine neue Redoxgruppe im Komplex I	11
2.4	Thema der Arbeit	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	17
3.2	Isolierung des Komplex I	17
3.3	Präzipitation des Komplex I mit PEG 4.000	19
3.4	Analytische Ultrazentrifugation	20
3.5	Spaltung des Komplex I	21
3.6	Aufarbeitung des Chinon Reduktase Fragmentes	21
3.7	UV/Vis Spektroskopie	22
3.8	ESR Spektroskopie	23
3.9	Elektronenmikroskopie	23
3.10	Elektrochemisch induzierte Redoxtitration des Chinon Reduktase Fragmentes und Vis Spektroskopie	24
3.11	Verschiedene analytische Methoden	26
4	Ergebnisse	29
4.1	Isolierung und Charakterisierung des Komplex I	29
4.2	Präzipitation des Komplex I mit PEG 4.000	33
4.3	Elektronenmikroskopie	36
4.4	Analytische Ultrazentrifugation	39
4.5	Katalytische Eigenschaften des Komplex I	43

4.6	Spaltung des isolierten Komplex I und Charakterisierung der Fragmente	45
4.7	Die Kofaktoren im Chinon Reduktase Fragment	48
5	Diskussion	60
5.1	Die Konformation des <i>E. coli</i> Komplex I	60
5.2	Die unbekannte Redoxgruppe im Chinon Reduktase Fragment des Komplex I	65
6	Literatur	68

1. Zusammenfassung

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, der sogenannte Atmungskettenkomplex I, koppelt die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon mit der Translokation von Protonen über die Membran. Der genaue Elektronenweg und die Kopplung zwischen Elektronen- und Protonentransport sind nur wenig verstanden. Der Komplex I aus dem Bakterium *Escherichia coli* besteht aus 13 Untereinheiten, NuoA bis N, und hat eine molekulare Masse von 535 kDa. Als Redoxgruppen wurden in dem isolierten Komplex I bislang ein Flavinmononukleotid (FMN) und 9 Eisen-Schwefel (FeS) Zentren nachgewiesen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einer Auflösung von etwa 35 Å zeigen eine L-förmige Über-Alles-Struktur des Enzyms mit einem peripheren Arm, der in das Cytosol ragt, und einem Membranarm, der in der Lipiddoppelschicht angeordnet ist. Der Winkel zwischen beiden Armen ist variabel. Alle bisher bekannten Redoxgruppen sind im peripheren Arm des Komplexes lokalisiert. Darüberhinaus gibt es spektroskopische Hinweise aus unserem Institut auf eine weitere Redoxgruppe im Enzym, die aufgrund ihrer unbekanntem chemischen Struktur als Gruppe X bezeichnet wird.

Die Aufklärung der Struktur des Komplex I ist ein Forschungsschwerpunkt in unserem Institut. In dieser Arbeit wurde die Struktur des Komplex I durch Elektronenmikroskopie an mit Goldthioglukose kontrastierten Einzelpartikeln bei einer Auflösung von 17 Å erhalten. Es zeigte sich, daß Komplex I neben der bekannten L-förmigen Struktur noch eine weitere stabile Konformation besitzt, in der die beiden Arme parallel zueinander angeordnet sind. Die Konformation wurde als Hufeisen-Struktur bezeichnet. Beide Konformationen wurden durch Fällung des Komplexes mit Polyethylenglykol und durch analytische Ultrazentrifugation voneinander unterschieden. Der Wechsel zwischen den Konformationen wird durch die Ionenstärke des Puffers induziert und ist vollständig reversibel. Bei niedriger Ionenstärke herrscht die Hufeisen-Struktur vor. In detergenzhaltiger Lösung ist nur der Komplex in der Hufeisen-Struktur enzymatisch aktiv. Durch Zugabe von Salz wird die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität vollständig blockiert. Es wird diskutiert, daß die Hufeisen-Struktur die native Konformation des Komplexes darstellt.

Um beide Arme der Hufeisen-Struktur dem peripheren und dem Membranarm zuzuordnen, wurde in dieser Arbeit Komplex I durch Inkubation bei pH 9,0 in das NADH Dehydrogenase Fragment und das Chinon Reduktase Fragment gespalten. Das NADH Dehydrogenase Fragment besteht aus den Untereinheiten NuoE, F und G und enthält das FMN und 6 FeS Zentren. Das Chinon Reduktase Fragment besteht aus den Untereinheiten NuoA bis D und NuoH bis N und enthält 3 FeS Zentren. Während das NADH Dehydrogenase Fragment für elektronenmikroskopische Untersuchungen zu klein ist, wurden anhand der Struktur des Chinon Reduktase Fragmentes bei 19 Å Auflösung der periphere Arm und der Membranarm der Hufeisen-Struktur des Komplex I identifiziert. Das Chinon Reduktase Fragment enthält die FeS Zentren N2, N6a und N6b und ein weiteres Chromophor, das UV/Vis spektroskopisch nachgewiesen wurde. Das Differenzspektrum dieses Chromophors ist dem der Gruppe X im Gesamtkomplex sehr ähnlich, mit breiten negativen Gipfeln um 325 und 420 nm. Durch Dialyse wurden die FeS Zentren fast vollständig aus dem Chinon Reduktase Fragment entfernt. Das Differenzspektrum des dialysierten Fragmentes zeigt ebenfalls das Spektrum der Gruppe X. Die Form des Spektrums änderte sich nach Zugabe des Detergenz SDS nicht, obwohl die Intensität der Absorptionen geringer wurde. Dies deutet auf eine kovalente Verknüpfung der Gruppe X mit dem Protein. Durch eine elektrochemisch induzierte Redoxtitration wurde ein Mittenpotential der Gruppe X von -100 ± 30 mV bei pH 6,5 abgeschätzt und der Gruppe X eine Zwei-Elektronenübertragungsreaktion zugeordnet. Eine pH-Abhängigkeit des Mittenpotentials konnte nicht gezeigt werden, da die Gruppe X bei Wechsel des pH-Wertes von 9,0 auf 6,5 anscheinend eine chemische Reaktion eingeht.

2. Einleitung

2.1 Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase

Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase ist das erste Enzym vieler Atmungsketten und wird entsprechend auch als respiratorischer Komplex I bezeichnet. Homologe Formen des Komplexes sind in vielen Eukaryonten, Bakterien und Archäen zu finden (Friedrich *et al.*, 1995; Friedrich und Weiss, 1997; Friedrich und Scheide, 2000). Der Komplex I ist in der Cytoplasmamembran der Prokaryonten, der inneren Mitochondrienmembran der Eukaryonten und der Thylakoidmembran von Chloroplasten von Pflanzen lokalisiert. Am besten untersucht sind der mitochondriale Komplex I aus *Bos taurus* (Fearnley *et al.*, 2001) und dem Pilz *Neurospora crassa* (Schulte und Weiss, 1997), sowie der bakterielle Komplex I aus *Escherichia coli* (Friedrich, 2001) und *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 1998).

Der Komplex I koppelt den Elektronentransport von NADH auf Ubichinon mit der Translokation von Protonen über die Membran. Dieser Vorgang wird durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben:



Hierbei bezeichnet Q Ubichinon; H^+_{n} und H^+_{p} stehen für Protonen auf der negativen inneren bzw. auf der positiven äußeren Seite der Membran. Der so erzeugte elektrochemische Protonengradient wird zur ATP-Synthese und für aktive Transportvorgänge genutzt (Schultz und Chan, 2001).

Der Komplex I enthält ein Flavinmononukleotid (FMN) und bis zu 9 Eisen-Schwefel (FeS) Zentren als Redoxgruppen. Der genaue Elektronenweg innerhalb des Enzyms und der Mechanismus der redoxgetriebenen Protonentranslokation sind bisher

weitgehend unverstanden. Der bakterielle Komplex I stellt eine strukturelle Minimalform der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase dar. Er besteht im allgemeinen aus 14 Untereinheiten. Dabei handelt es sich um 7 periphere und 7 membranständige Proteine. Der mitochondriale Komplex I besitzt neben den Homologen der bakteriellen Untereinheiten bis zu 29 zusätzliche Untereinheiten, die zusammen eine molekulare Masse von 1 MDa besitzen. In Eukaryonten sind die Homologen der membranständigen Untereinheiten mitochondrial kodiert (Friedrich *et al.*, 1995; Fearnley *et al.*, 2001).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ gefärbten Einzelpartikeln des Komplex I aus *N. crassa* zeigen eine L-förmige Über-Alles-Struktur des Enzyms bei einer Auflösung von 30 Å (Hofhaus *et al.*, 1991). Ein Arm des „L“ ragt in das wässrige Milieu und wird peripherer Arm genannt. Der andere Arm des „L“ liegt in der Lipiddoppelschicht und wird entsprechend Membranarm genannt. Durch Behandlung mit NaBr werden die hydrophilen Untereinheiten des peripheren Arms von dem Komplex abgelöst, während der Membranarm in homogener Form isoliert werden kann. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen dieser Präparation wurden die beiden Arme des „L“ dem peripheren Arm und dem Membranarm zugeordnet (Hofhaus *et al.*, 1991). Der bakterielle Komplex I aus *E. coli* hat ebenfalls eine L-förmige Über-Alles-Struktur, die mit der des mitochondrialen Komplex I zur Deckung zu bringen ist (Guénebaut *et al.*, 1998; Abb. 1-1). Die Auflösung der Struktur des bakteriellen Komplexes betrug etwa 35 Å. Es zeigte sich, daß beide Arme des mitochondrialen und bakteriellen Komplexes jeweils gleich lang sind, nämlich 23 nm (Guénebaut *et al.*, 1998). Anhand der Überlagerung der dreidimensionalen Modelle beider Komplexe wurde vermutet, daß sich die zusätzlichen Untereinheiten des mitochondrialen Komplex I gleichmäßig um den katalytischen Kern, den das bakterielle Enzym darstellt, anordnen (Abb. 1-1). Sie dienen vermutlich der Stabilisierung des Enzyms und verhindern, daß hochenergetische Elektronen aus dem Enzym entweichen (Friedrich und Weiss, 1997; Guénebaut *et al.*, 1998).

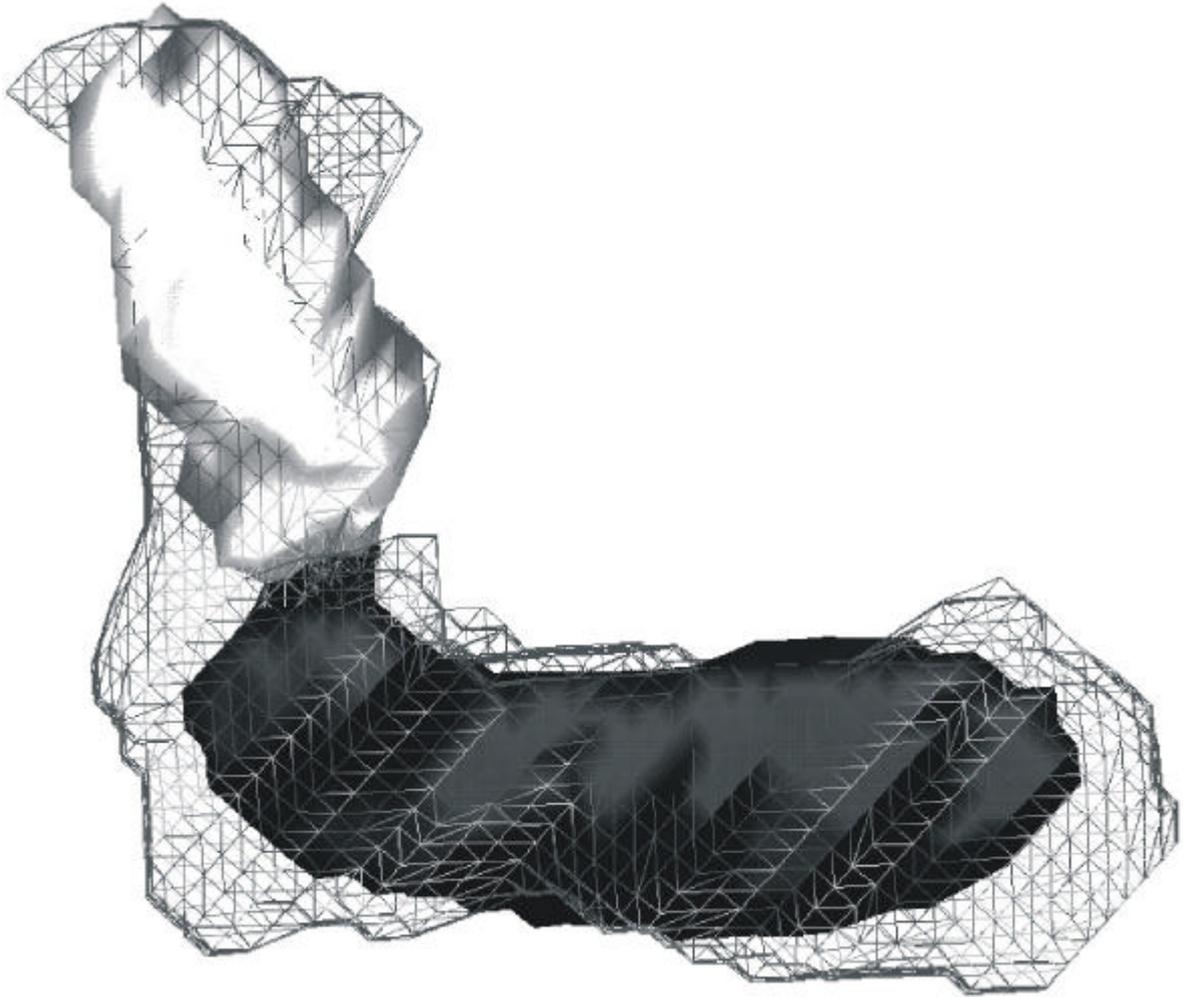


Abbildung 1-1: Überlagerung der dreidimensionalen Modelle des bakteriellen Komplex I aus *E. coli* und des mitochondrialen Komplex I aus *N. crassa*. Der *N. crassa* Komplex I ist durch das Drahtmodell dargestellt, das den ausgefüllt dargestellten *E. coli* Komplex I umgibt. Der Membranarm ist schwarz, der periphere Arm grau dargestellt (nach Guénebaut *et al.*, 1998).

Ein Unterschied zwischen dem Modell des bakteriellen und dem des mitochondrialen Komplexes ist die Variabilität des Winkels zwischen peripherem Arm und Membranarm. Im mitochondrialen Komplex ist dieser Winkel bei etwa 90° fixiert. Dagegen ergab die Klassifizierung der Einzelpartikelaufnahmen des *E. coli* Komplex I vier Hauptklassen von Bildern, die sich nur durch den Winkel zwischen peripherem Arm und Membranarm unterschieden. Der unterschiedliche Winkel ist nicht auf die unterschiedliche Orientierung ähnlicher Partikel auf dem Gitter

zurückzuführen (Guénebaut *et al.*, 1998). Der zweite Unterschied besteht in der wesentlich schmalere Verbindung des peripheren Arms zum Membranarm in dem Modell des *E. coli* Komplex I.

Die L-förmige Struktur des Komplex I wurde durch negativ kontrastierte Einzelpartikelaufnahmen des Komplexes aus *B. taurus* und der Hefe *Yarrowia lipolytica* bestätigt (Grigorieff, 1998; Djafarzadeh *et al.*, 2000; Sazanov und Walker, 2000). Mit Eis kontrastierte Einzelpartikel des Rinderherz Komplex I zeigten ebenfalls eine L-förmige Über-Alles-Struktur. Auch in diesem Modell ist die Verbindung zwischen dem peripheren Arm und dem Membranarm sehr schmal (Grigorieff, 1998).

Der Komplex I ist durch den Zusammenschluß bereits existierender Module für den Elektronentransport und die Protonentranslokation entstanden (Friedrich *et al.*, 1995). Die Module des Komplex I werden durch ihre Homologie zu anderen bakteriellen Enzymen definiert. Sie wurden in löslichen und membranständigen [NiFe] Hydrogenasen, in NAD^+ abhängigen Hydrogenasen und Dehydrogenasen, sowie in Alkali/ H^+ Antiportern gefunden. Entsprechend werden die Module, aus denen der Komplex I aufgebaut ist, als NADH Dehydrogenase Modul, Hydrogenase Modul und Transporter Modul bezeichnet (Abb. 1-2).

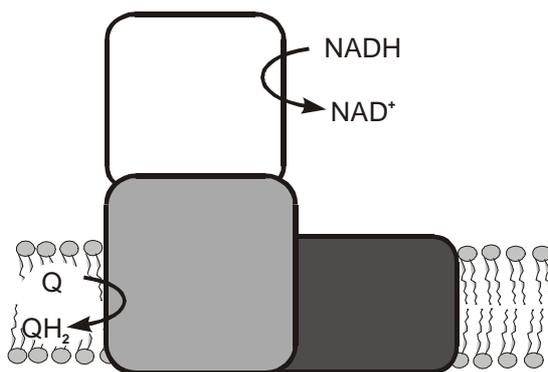


Abbildung 1-2: Modularer Aufbau des Komplex I. Das NADH Dehydrogenase Fragment ist in weiß gezeichnet, das Hydrogenase Modul in hellgrau und das Translokase Modul in dunkelgrau.

2.2 Der Komplex I aus *Escherichia coli*

Die Gene des Komplex I von *E. coli* sind im sogenannten *nuo*-Operon (von NADH:Ubichinon Oxidoreduktase) organisiert. Die davon abgeleiteten Proteine bezeichnet man mit NuoA bis N (Weidner *et al.*, 1993). Die Anordnung der Gene in dem *nuo*-Operon ist konserviert. Dieselbe Anordnung findet man bei fast allen Bakterien und vielen Cyanobakterien (Friedrich und Scheide, 2000). Als Besonderheit von *E. coli* sind die Gene *nuoC* und *nuoD* zu einem Gen *nuoCD* fusioniert (Braun *et al.*, 1998). Dementsprechend besteht der Komplex I aus 13 Untereinheiten, die zusammen eine molekulare Masse von etwa 535 kDa ergeben (Friedrich *et al.*, 1995). Komplex I aus *E. coli* wurde bei pH 6,0 in einem technischen Alkylglukosid-Detergenz (APG) isoliert (Leif *et al.*, 1995). Die Präparation enthält ein FMN und zwei zweikernige (N1b und N1c), sowie fünf vierkernige FeS Zentren (N2, N3, N4, N6a und N6b) (Sled' *et al.*, 1993; Leif *et al.*, 1995; Rasmussen *et al.*, 2001). Der nach einer verbesserten Vorschrift in Gegenwart von Dodecylmaltosid isolierte Komplex I bindet ca. 240 kDa Detergenz, was zu einer gesamten molekularen Masse der Präparation von 775 ± 25 kDa führt (Böttcher *et al.*, 2002). Abb. 1-3 zeigt das topologische Modell des Komplex I aus *E. coli* zusammen mit einem Schema des *nuo*-Operons.

Durch Anheben des pH-Wertes auf 7,5 und Detergenzwechsel zu Triton-X-100 zerfällt Komplex I in drei Fragmente (Leif *et al.*, 1995). Die durch die Spaltung entstehenden Fragmente werden als NADH Dehydrogenase Fragment, verbindendes Fragment und Membranfragment bezeichnet. Anhand biochemischer Charakterisierung der Fragmente und des Vergleichs der Primärstrukturen der Komplex I Untereinheiten verschiedener Organismen wurden die Substrat- und Kofaktorbindestellen einzelnen Untereinheiten zugeordnet (vgl. Abb. 1-3).

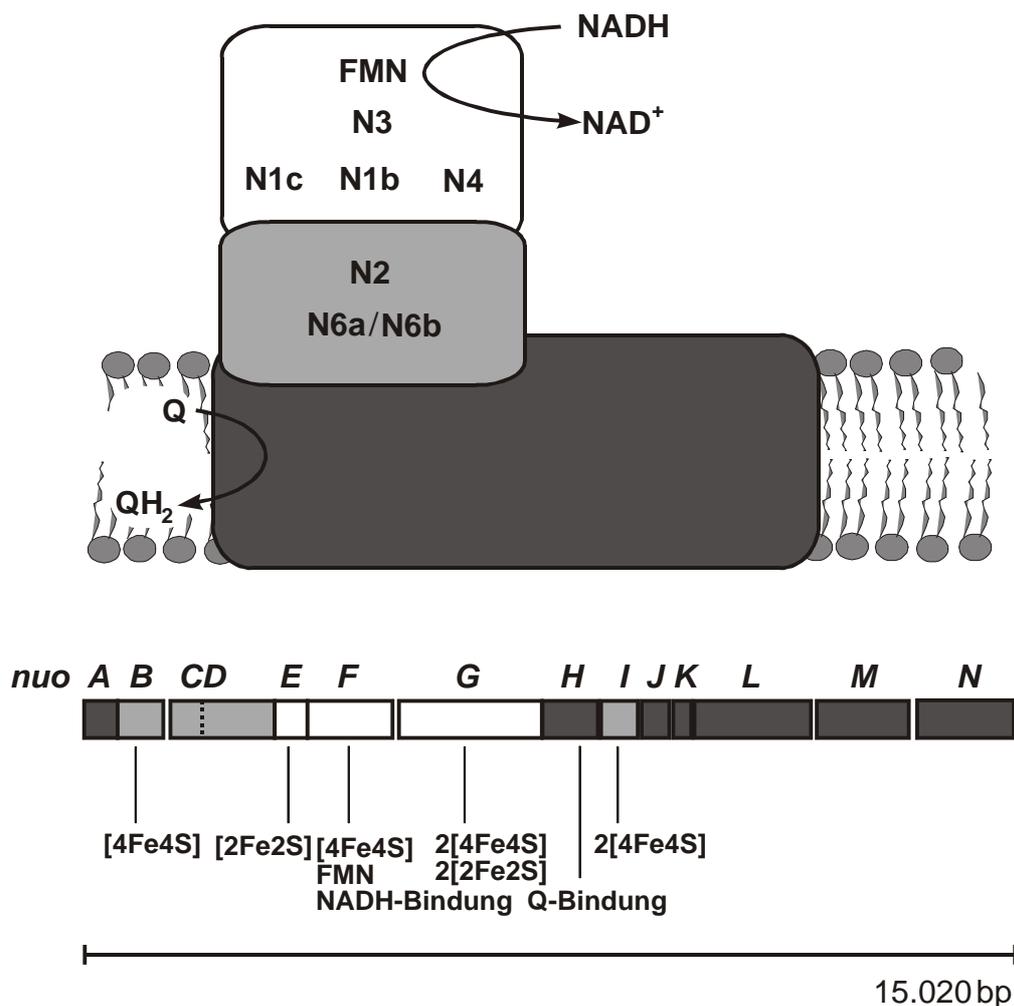


Abbildung 1-3: Modell des *E. coli* Komplex I und des *nuo*-Operons. A-N bezeichnen die Gene des Operons mit den vorhergesagten Bindemotiven für die Substrate und Kofaktoren. N1b, N1c, N2, N3, N4, N6a und N6b stehen für die nachgewiesenen FeS Zentren und Q für Ubichinon. Das NADH Dehydrogenase Fragment 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 hat eine molekulare Masse von 170 kDa und wird von den Untereinheiten NuoE, F und G gebildet. Es enthält die NADH Bindestelle, das FMN und die ESR spektroskopisch nachweisbaren FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 (Leif *et al.*, 1995; Friedrich, 1998). Wahrscheinlich enthält es noch das Zentrum N1a, das aufgrund seines negativen Mittenpotentials nicht von NADH reduziert wird und deshalb ESR spektroskopisch nicht nachzuweisen ist. Das typische Cystein Motiv für die Bindung dieses Zentrums ist

auf NuoE vorhanden (Weidner *et al.*, 1993). Das NADH Dehydrogenase Fragment bildet den Elektroneneingang des Enzyms und stellt ein konserviertes Proteinmodul dar, das auch in verschiedenen bakteriellen Hydrogenasen und Dehydrogenasen vorkommt (Friedrich und Weiss, 1997). Die Funktion dieses Moduls ist die reversible Umwandlung einer ZweiElektronenübertragung in zwei EinElektronenübertragungen. Die Elektronen werden vom NADH auf das FMN übertragen, welches sie auf die sogenannten isopotentiellen FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 weiterleitet (Sled' *et al.*, 1994). Das Mittenpotential des FMN bei pH 6,0 beträgt -320 mV (Bungert, 1999). Die isopotentiellen FeS Zentren umspannen den Bereich von -330 bis -220 mV (Leif *et al.*, 1995). Das Potential von N1a ist wahrscheinlich negativer als -400 mV (Ohnishi, 1998), und es ist unklar, ob es am Elektronentransfer beteiligt ist.

Das amphipatische verbindende Fragment setzt sich aus den Untereinheiten NuoB, CD und I zusammen und hat eine molekulare Masse von 125 kDa. Es enthält die FeS Zentren N2, N6a und N6b. Das FeS Zentrum N2 ist auf NuoB lokalisiert (Friedrich, 1998) und besitzt ein pH-abhängiges Mittenpotential von -220 mV (Leif *et al.*, 1995). Aufgrund dieser pH-Abhängigkeit wird vermutet, daß N2 an der Protonentranslokation beteiligt ist. Die beiden vierkernigen FeS Zentren N6a und N6b sind auf NuoI lokalisiert (Rasmussen *et al.*, 2001). Sie wurden bislang nur UV/Vis spektroskopisch nachgewiesen (Schulte *et al.*, 1998 und 1999; Friedrich *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 2001). Möglicherweise verhindert eine spin-spin Kopplung der magnetischen Momente der beiden Zentren den ESR spektroskopischen Nachweis (Johnson, 1998). Es ist auch möglich, daß beide magnetischen Momente in einem höheren Grundzustand als $S = \frac{1}{2}$ vorliegen und sie deshalb im bisher verwendeten X-Band Spektrometer nicht nachgewiesen werden konnten (Duderstadt *et al.*, 1999). N6a und N6b besitzen ein pH-unabhängiges Mittenpotential von -270 mV und übertragen zusammen 2 Elektronen (Rasmussen *et al.*, 2001).

Das nur in Detergenz lösliche Membranfragment hat eine molekulare Masse von 240 kDa und besteht aus den sieben hydrophoben Untereinheiten NuoA, H und J bis N. Sie bilden nach Vorhersage der Sekundärstruktur 54 transmembrane Helices (Weidner *et al.*, 1993). Die Homologen dieser Untereinheiten sind im eukaryontischen Komplex I mitochondrial kodiert. Sie sind vermutlich an der Ubichinon Bindung und der Protonentranslokation beteiligt. In diesem Fragment konnte bisher kein Kofaktor nachgewiesen werden, und die Primärstruktur der Untereinheiten enthält kein typisches Motiv für die Bindung eines Kofaktors.

Das NADH Dehydrogenase Fragment wurde überproduziert und ist biochemisch gut charakterisiert (Leif *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1998; Bungert *et al.*, 1999). Das verbindende Fragment sowie das Membranfragment zerfallen hingegen leicht bzw. aggregieren, so daß sie nicht als stabile Präparationen zur Verfügung stehen (Leif *et al.*, 1995).

Der im Folgenden beschriebene Elektronenweg im Komplex I wird aufgrund der Abfolge der Mittenpotentiale der Kofaktoren und anderer biochemischer Untersuchungen angenommen: Das NADH überträgt zwei Elektronen auf FMN (Dooijewaard *et al.*, 1978). Hierbei wird intermediär FMNH₂ gebildet, das die Elektronen in zwei Einzelschritten an die isopotentiellen FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 weitergibt, die einen Elektronenspeicher bilden (Krishnamoorthy und Hinkle, 1988). Von hier aus gelangen die Elektronen über die FeS Zentren N6a und N6b zum FeS Zentrum N2, dessen Mittenpotential positiver ist als das aller anderen bekannten Redoxgruppen im Komplex I. Von N2 aus werden die Elektronen auf das Substrat Ubichinon übertragen, das dabei zu Dihydrubichinon reduziert wird (Vinogradov *et al.*, 1995). An der Reduktion und Protonierung des Ubichinons sind mindestens zwei ESR spektroskopisch unterscheidbare Semichinon-Radikale beteiligt (Ohnishi *et al.*, 1999). Die Redoxreaktion des Zentrums N2 ist mit der Protonierung/Deprotonierung saurer Aminosäurereste gekoppelt (Hellwig *et al.*, 2000). Dies bestätigt die anhand der pH-Abhängigkeit seines Mittenpotentials vorhergesagte Beteiligung dieses Zentrums an der Protonentranslokation. Es gibt keine weiteren Hinweise darauf, welche Elektronenübertragung neben der Redoxreaktion von N2 mit der Protonentranslokation gekoppelt ist. Die bei der Elektronenübertragung freiwerdende Energie reicht thermodynamisch zur

Translokation von vier Protonen pro zwei Elektronen aus. Dieser Wert wurde experimentell bestätigt (Hinkle *et al.*, 1991; Bogachev *et al.*, 1996; Galkin *et al.*, 1999). Es wurde berichtet, daß der *E. coli* Komplex I in der Lage ist, Na⁺ Ionen statt Protonen zu translozieren (Steuber *et al.*, 2000).

2.3 Hinweise auf eine neue Redoxgruppe im Komplex I

Erste Einblicke in den Elektronentransport des Komplex I wurden bislang durch die ESR- und die UV/Vis Spektroskopie erhalten. Alle FeS Zentren werden durch NADH innerhalb von 3 ms reduziert, und der Elektronenweg kann somit ESR spektroskopisch zeitlich nicht weiter aufgelöst werden (van Belzen und Albracht, 1989). Darüberhinaus besitzen die FeS Zentren nur einen geringen Extinktionskoeffizienten und unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Absorptionsmaxima, so daß auch die UV/Vis Spektroskopie nur wenige Aussagen über den Elektronentransfer innerhalb des Komplexes ermöglicht. Durch die UV/Vis Spektroskopie werden sowohl das Protein als auch die Kofaktoren erfaßt. Für interpretierbare Spektren benötigt man optisch klare, monodisperse Proteinlösungen. Außerdem darf das Detergenz nicht im interessierenden Spektralbereich absorbieren. In unserem Institut ist es in den letzten Jahren unter Verwendung von Dodecylmaltosid als Detergenz gelungen, den Gesamtkomplex I bis in den UV Bereich hinein spektroskopisch zu charakterisieren (Schulte *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Diodenarray Detektoren werden Spektren von 200 bis 600 nm innerhalb weniger ms registriert, wodurch die schnelle Reaktion der Kofaktoren verfolgt werden kann.

Das UV/Vis Spektrum von Komplex I in Dodecylmaltosid (Abb. 1-4) wird von dem Absorptionsgipfel des Proteins bei 280 nm dominiert, der vor allem durch die aromatischen Aminosäuren hervorgerufen wird (Whitaker und Granum, 1980). Die breite, spektral nicht aufgelöste Schulter von 300 bis 600 nm wird durch die Absorption der Redoxgruppen hervorgerufen. Diese Absorption wird durch Reduktion des Enzyms gebleicht (Schulte *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2000; Abb. 1-4).

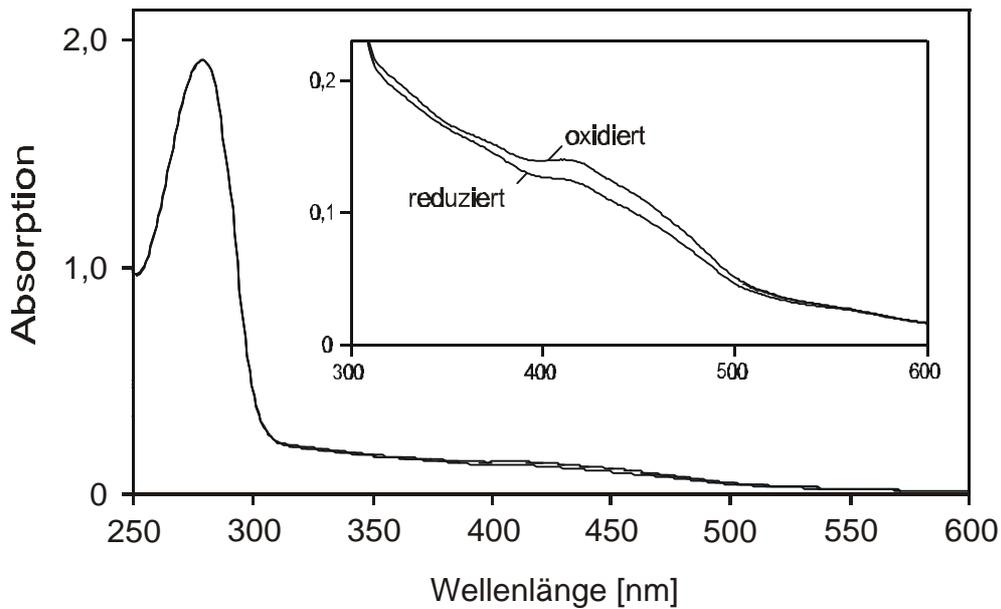


Abbildung 1-4: UV/Vis Spektrum von 2 μM *N. crassa* Komplex I im oxidierten und reduzierten Zustand. Der Einschub zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von 300 bis 600 nm (nach Schulte *et al.*, 1998).

Wird das Spektrum des oxidierten Komplex I von dem des reduzierten Enzyms abgezogen, so erhält man ein Differenzspektrum, in dem sich redoxabhängige Absorptionsänderungen besser darstellen lassen. In Abb. 1-5 ist ein typisches Differenzspektrum des Komplex I aus *N. crassa* mit einer positiven Absorption bei 300 nm und Minima bei 330, 420 und 440 nm gezeigt. Die Absorptionen der einzelnen Redoxgruppen überlagern vollständig.

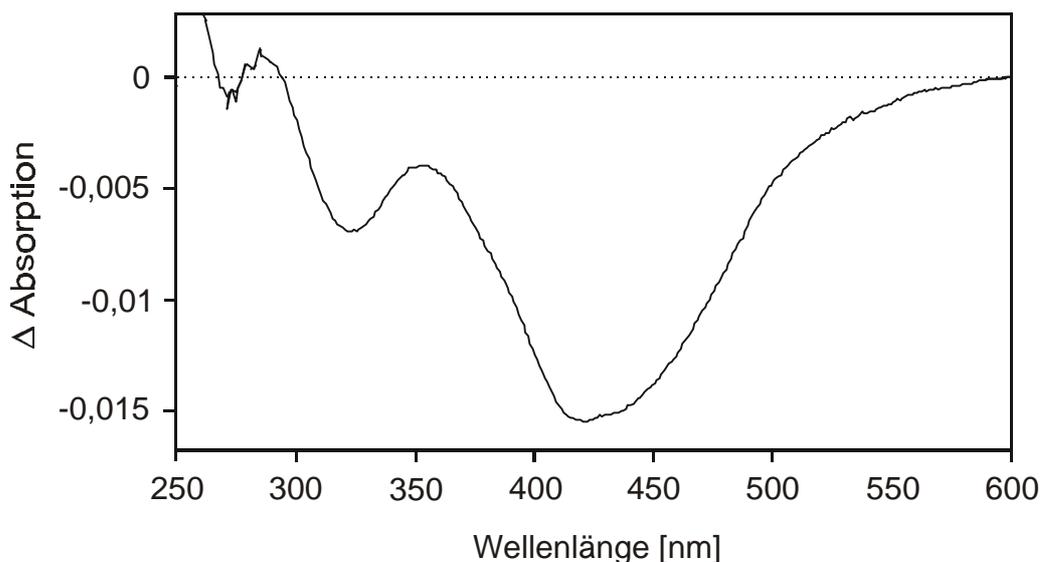


Abbildung 1-5: UV/Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektrum von 1 μM *N. crassa* Komplex I.

Um die Absorptionen der einzelnen Komponenten des Komplex I zu messen, müssen sie kinetisch voneinander getrennt werden. Mit stopped-flow Methoden wurde gezeigt, daß Komplex I durch NADH innerhalb der Totzeit des Gerätes von 3 ms reduziert wird, so daß diese Methode nicht angewendet werden kann (van Belzen und Albracht, 1989). Daher wurde in unserem Institut eine Methode entwickelt, das Enzym unter anaeroben Bedingungen mit etwa 5-fachen molaren Überschuß an NADH zu reduzieren und die durch die Laktat Dehydrogenase (LDH) induzierte Reoxidation zu messen (Rasmussen, 1999). LDH reduziert Pyruvat unter Verbrauch von NADH zu Laktat. In Gegenwart eines großen Überschuß an Pyruvat wird NADH zu NAD^+ oxidiert. NAD^+ reoxidiert Komplex I an der physiologischen NADH Bindestelle. Die Redoxgruppen reoxidieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Nach einer zeitlich nicht auflösbaren Reoxidation des FMN und der isopotentiellen FeS Zentren werden im Verlauf von 100 Sekunden die FeS Zentren N6a und N6b reoxidiert (Rasmussen *et al.*, 2001). Das Differenzspektrum aus dem Spektrum des vollständig reduzierten Komplex I minus dem Spektrum des Komplexes direkt nach Beginn der Reoxidation zeigt die Differenzabsorptionen bei 375 und 455 nm des FMN und die breite Bande um 450 nm der isopotentiellen FeS Zentren. Das Differenzspektrum des Komplex I zu einem späteren Zeitpunkt der Reoxidation minus dem Spektrum des fast vollständig reoxidierten Komplex I zeigt die Differenzabsorptionen bei 330 und 425 nm der FeS Zentren N6a und N6b.

Mit dem oben beschriebenen Versuchsaufbau wurde ein weiterer Chromophor nachgewiesen, dessen Eigenschaften sich von denen der bekannten Redoxgruppen unterscheiden. Durch Zugabe von Pyruvat und LDH wird der Komplex reoxidiert und zwar entsprechend des in der Lösung eingestellten Redoxpotentials des Laktat/Pyruvat Paares. Bei einem eingestellten Potential von etwa -150 mV sind alle bekannten Redoxgruppen des Komplex I oxidiert. Das UV/Vis Differenzspektrum zeigt aber eine breite negative Absorptionsbande bei 425 nm mit einer Schulter bei 350 nm und eine positive Absorption um 300 nm (Abb. 1-6), die entsprechend von einer weiteren, unbekanntem Redoxgruppe stammen müssen. Die chemische Struktur des neuen Chromophors ist unbekannt, so daß er als Gruppe X bezeichnet wurde (Schulte *et al.*, 1998). Da diese Gruppe weder im isolierten peripheren Arm des *N. crassa* Komplexes (Kintscher, 1997) noch im isolierten NADH Dehydrogenase Fragment des *E. coli* Komplex I nachgewiesen werden konnte (Braun *et al.*, 1998),

liegt sie wahrscheinlich im Membranfragment. Der *N. crassa* Komplex I wurde in einer elektrochemischen Zelle titriert und die Änderung der Absorption bei 430 nm gemessen. Anhand der Titrationskurve wurde für die Gruppe X ein Mittenpotential von etwa -120 mV bestimmt und berechnet, daß sie zwei Elektronen überträgt (Abelmann, 1999). Es ist nicht bekannt, ob dieses Potential pH-abhängig ist. Das gemessene Mittenpunktpotential liegt zwischen dem des FeS Zentrums N2 und dem von Ubichinon. Die Existenz einer solchen Gruppe wurde aus thermodynamischen Gründen postuliert (Guénebaut *et al.*, 1998), da sonst die Elektronenübertragung von N2 auf Ubichinon aufgrund der großen Potentialdifferenz irreversibel wäre, Komplex I jedoch reversibel arbeitet (Gutman *et al.*, 1972).

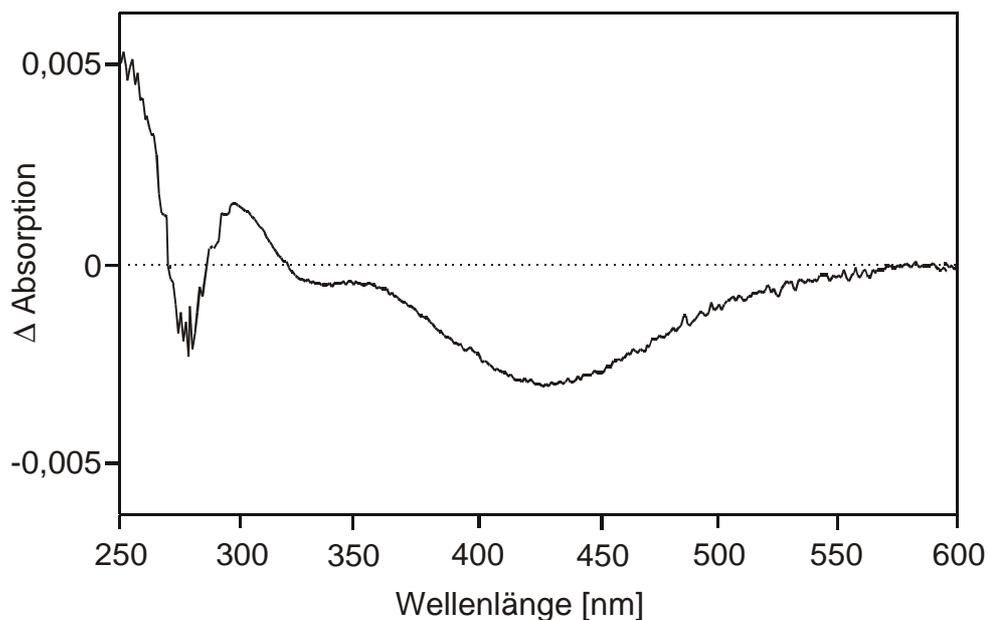


Abbildung 1-6: UV/Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektrum der unbekanntem Redoxgruppe X in 1 μ M *N. crassa* Komplex I.

Anhand FT-IR spektroskopischer Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei der Gruppe X um ein Protein-gebundenes Chinon handelt (Dejonghe *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2000). Aufgrund des UV/Vis Differenzspektrums, des Mittenpotentials und der Anzahl der übertragenen Elektronen wird diskutiert, daß die Gruppe X eine chinoide Struktur hat und Komplex I somit zu der Gruppe von

Chinoproteinen gehören würde (Friedrich, 1998; Schulte *et al.*, 1998 und 1999). Chinoproteine enthalten eine strukturell heterogene Gruppe von Redoxgruppen mit einer ortho-chinoiden Struktur, die durch posttranslationale Modifikation von Aminosäuren entstehen (Klinman und Mu, 1994). Die chinoiden Kofaktoren können sowohl kovalent als auch nicht kovalent mit dem Protein verknüpft sein. Bisher schlugen alle Versuche fehl, die Gruppe X als ortho-Chinon zu identifizieren (Schildwächter, 1996; Abelmann, 1999; Haupt, 1999).

2.4 Thema der Arbeit

Wie oben beschrieben, beträgt die Auflösung des aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen berechneten Modells des *E. coli* Komplex I 35 Å (Guénebaut *et al.*, 1998). Die Einzelpartikelanalyse zeigte eine konformative Beweglichkeit des Komplex I bezüglich des Winkels zwischen peripherem Arm und Membranarm (Guénebaut *et al.*, 1998). Es war nicht bekannt, ob die Konformationsänderung eine Eigenschaft des Proteins oder ein Artefakt ist. In Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Böttcher vom EMBL, Heidelberg, sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ gefärbten Komplex I Einzelpartikeln angefertigt werden und daraus ein Modell mit höherer Auflösung berechnet werden. Dazu sollte die Anzahl der Partikel, die zur Strukturberechnung herangezogen werden, deutlich erhöht werden. Durch verschiedene Negativ-Kontrastierungen der Einzelpartikel sollte untersucht werden, ob die konformative Beweglichkeit eine Eigenschaft des Komplexes ist.

Darüberhinaus sollte versucht werden, die spektroskopisch beschriebene, unbekannt Redoxgruppe X im *E. coli* Komplex I zu lokalisieren. Von dieser Gruppe sind weder ihre chemische Struktur noch ihre thermodynamischen Eigenschaften bekannt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, den *E. coli* Komplex I in stabile Fragmente zu spalten, die isoliert und spektroskopisch und biochemisch charakterisiert werden können. Es sollte ein Fragment hergestellt werden, das möglichst wenige andere Chromophore neben der Gruppe X enthält, um überlagerungsfreie UV/Vis Spektren dieser Gruppe X zu erhalten. Die thermodynamischen Eigenschaften der Gruppe X sollten mit Hilfe von elektrochemisch

induzierten Potentialänderungen mit gekoppelter Vis Spektroskopie bestimmt 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 bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, angezogen. Ein 1.000 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 sowie 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 1.000 l Kultur wurden zwischen 2,5 und 3,0 kg Zellen (Feuchtmasse) erhalten und bei -70 °C gelagert.

3.2 Isolierung des Komplex I

Komplex I wurde aus dem *E. coli* Stamm ANN003/pAR1219 isoliert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C. 100 g tiefgefrorene Zellen wurden in 250 ml 50 mM 2-(N-Morpholin)ethansulfonsäure (MES, Gerbu)/NaOH, pH 6,0 unter Zusatz von 200 µl 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma), einer Spatelspitze Dnase I (Roche) und 0,5 g Lysozym (Fluka) in einem Waring Labormixer mit 16.000 Upm zerkleinert und in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator homogenisiert. Die Zellen wurden mit einer French Press (SLM Aminco) bei 1.100 psi aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch anschließende 30 minütige Zentrifugation bei 36.000 g (Kühlzentrifuge Kontron H-401, Rotor A 8.24, 16.000 Upm) abgetrennt. Die Plasmamembranen wurden durch 1 stündige Zentrifugation bei 250.000 g sedimentiert (Ultrazentrifuge L7-65, Beckmann, Rotor 60 Ti, 50.000 Upm). Das Sediment wurde in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 aufgenommen, auf eine Endkonzentration von 1,4 M Natriumbromid gebracht und erneut wie oben beschrieben für 1 Stunde zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 resuspendiert und erneut wie oben beschrieben für 45 Minuten zentrifugiert. Die so erhaltenen Membranen wurden mit

50 mM MES/NaOH, pH 6,0 und 40 µl 0,1 M PMSF auf 20 ml Gesamtvolumen gebracht und tropfenweise unter Rühren mit 3,53 ml einer 20 %igen (w/v) Dodecylmaltosid-Lösung (Dodecyl-β-D-maltosid, Glycon) versetzt, so daß sich eine Endkonzentration von 3 % Detergenz ergab. Nach Resuspendieren in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator wurde die Suspension 10 Minuten auf Eis inkubiert, mit 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 auf 30 ml aufgefüllt, erneut homogenisiert und anschließend 20 Minuten bei 250.000 g (Ultrazentrifuge L7-65, Beckmann, Rotor 60 Ti, 50.000 Upm) zentrifugiert. Der Extrakt wurde mit dem gleichen Volumen 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 verdünnt und auf eine 40 ml Anionenaustauschchromatographiesäule (Source 15Q, 26 mm x 400 mm; Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen, die zuvor mit 50 mM MES/NaOH pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid äquilibriert worden war. Die gebundenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen 500 ml Gradienten von 50 bis 350 mM NaCl in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 % Dodecylmaltosid und 0,2 mM PMSF bei einer Flußgeschwindigkeit von 4 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurden vereinigt und auf eine Endkonzentration von 9 % Polyethylenglykol (PEG) 4.000 (Fluka) (w/v) gebracht. Das ausgefällte Protein wurde 5 Minuten bei 69.000 g (Kühlzentrifuge Kontron H-401, Rotor A 8.24, 20.000 Upm) zentrifugiert und in 3 ml 50 mM MES/NaOH pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid gelöst. Die Proteinlösung wurde auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte 500 ml Größenausschlußchromatographiesäule (Ultrogel AcA 34, 30 mm x 1000 mm; Serva) aufgetragen. Das Protein wurde mit diesem Puffer bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,32 ml/min eluiert. Die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität und der Cytochromgehalt der Fraktionen wurden bestimmt (Diodenarray Spektrometer, Spectrocord S10 UV-VIS, Zeiss). Fraktionen mit NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität, die nach Abschätzung aus der Absorption bei 412 nm frei von Cytochrom waren, wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Für spektroskopische Untersuchungen wurde der Komplex I nachgereinigt. Die Fraktionen wurden auf eine 10 ml Anionenaustauschchromatographiesäule (Source 15Q, 15 mm x 130 mm; Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen, die mit 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid äquilibriert worden war. Die gebundenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen 100 ml Gradienten

von 50 bis 350 mM NaCl in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 % Dodecylmaltosid bei einer Flußrate von 2 ml/min eluiert. Der Cytochromgehalt der Gipfelfractionen mit NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurde bestimmt. Die cytochromfreien Fraktionen wurden in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen, Millipore) bei 2.300 g ca. 30-fach aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm), mit 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid auf 1,5 ml aufgefüllt und erneut auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Der aufkonzentrierte Komplex I wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

3.3 Präzipitation des Komplex I mit PEG 4.000

Der isolierte Komplex I wurde mit dem gewünschten Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt und durch Ultrafiltration (Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen, Millipore) bei 2.300 g etwa 10-fach aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm). Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Die verwendeten Puffer sind in dem Ergebnisteil angegeben. Die Endkonzentration des Proteins betrug jeweils 2 mg/ml. 20 µl Aliquots wurden durch Zugabe einer 10 bzw. 50 %igen Stammlösung PEG 4.000 in dem jeweiligen Puffer auf die gewünschte Konzentration gebracht. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde das ausgefällte Protein für 5 Minuten bei 12.000 g (Eppendorf Zentrifuge, 14.000 Upm) bei 4 °C abzentrifugiert und die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität des Überstandes gemessen. Um gleichzeitig die NaCl- und die PEG Menge variieren zu können, wurde Komplex I mit einer Konzentration von 2 mg/ml in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,15 % Dodecylmaltosid in einer Rührküvette vorgelegt und gleichmäßig über einen Motor eine NaCl-haltige PEG 4.000 Stammlösung eingerührt. Gleichzeitig wurde die Menge des ausgefällten Proteins anhand der Absorption bei 600 nm, die mit einem Diodenarray Spektrometer mit Lichtleiter-Optik (TIDAS, UVI/1001-1, J&M) gemessen wurde, bestimmt. Die Daten wurden mit dem Programm „Spektrachrom“ ausgewertet.

3.4 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytischen Ultrazentrifugationsläufe wurden von Dr. Luitgard Nagel-Steger vom Institut für Biophysik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einer analytischen Beckmann XLA Ultrazentrifuge durchgeführt. Um Komplex I in den gewünschten Puffer zu überführen, wurde der isolierte Komplex I mit diesem Puffer auf 1,5 ml aufgefüllt und durch Ultrafiltration (Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen, Millipore) bei 2.300 g etwa 10-fach aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm). Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Die jeweiligen Puffer sind im Ergebnisteil angegeben. Für die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurden die Proben mit 5 % (w/v) Saccharose versetzt. 0,6 μ M Aliquots von Komplex I wurden in 12 mm Doppelsektorenzellen mit 35.000 Upm bei 10 °C zentrifugiert. Die Verteilung der Lösungen in der Zelle wurde in Intervallen von 7,5 Minuten mit einer Schrittgröße von 0,001 cm über die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Daten wurden nach der Van Holde-Weischet-Methode ausgewertet (van Holde und Weischet, 1978). Die Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurden bei 10 °C und bei 4.800, 6.000, 6.800 und 7.200 Upm durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 5 mg/ml. Je nach Proteinkonzentration wurde die Verteilung der Proteinlösung in der Zelle bei 280, 300 und 450 nm bestimmt. Die Absorption wurde gegen r^2 aufgetragen, wobei r den Abstand zu dem Boden der Zelle kennzeichnet. Die Kurven wurden einem Modell für zwei nicht-wechselwirkende Komponenten nach dem Marquardt-Levenberg Algorithmus angepaßt. Um die molekulare Masse zu bestimmen, wurden die Werte für das partielle spezifische Volumen \bar{v} des Detergenz-Protein-Komplexes aus den \bar{v} Werten für Dodecylmaltosid (Lustig *et al.*, 2000) und für das Protein aus seiner Sequenz (Durschlag Methode) mit der Gleichung von Cassasa und Eisenberg (Tanford und Reynolds, 1976) berechnet, unter der Annahme, daß 0,35 g Detergenz pro g Protein binden (Musatov *et al.*, 2000).

3.5 Spaltung des Komplex I

Zur Spaltung wurde der aufkonzentrierte Komplex I mit 50 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Roth)/HCl, pH 9,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid auf 1,5 ml aufgefüllt und in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen, Millipore) bei 2.300 g auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm). Dieser Vorgang wurde noch drei Mal wiederholt. Die so erhaltenen Komplex I Fragmente wurden auf einer mit 50 mM TrisCl, pH 9,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid äquilibrierten 108 ml Größenausschlußchromatographiesäule (BioSep-Sec-4.000, 21,5 mm x 33 cm, Phenomenex) bei einer Flußgeschwindigkeit von 2,5 ml/min in demselben Puffer voneinander getrennt. Die Spektren der Proteine wurden kontinuierlich in einer Durchflußküvette (1 cm Schichtdicke) mit einem Diodenarray Spektrometer mit Lichtleiter-Optik (TIDAS, UVI/1001-1, J&M) aufgenommen. Die Fraktionen mit einer Absorption bei 280 nm aber ohne NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurden vereinigt, etwa 100-fach in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen, Millipore) bei 2.300 g aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm) und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.6 Aufarbeitung des Chinon Reduktase Fragmentes

Ein 1 ml Aliquot Chinon Reduktase Fragment (5 mg/ml) wurde bei 4 °C über 40 Stunden gegen 50 mM TrisCl, pH 9,0, 50 mM NaCl, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,1 % Dodecylmaltosid unter mehrmaligem Wechseln des Puffers dialysiert. Der Dialyseschlauch (Roth) wurde vorher 10 Minuten in 1 %iger NaHCO₃- Lösung gekocht und darin anschließend für 40 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Waschen in bidestilliertem Wasser wurde er 10 Minuten in bidestilliertem Wasser gekocht. Nach 40 minütiger Inkubation bei 60 °C in 0,1 % SDS wurde der Schlauch gründlich mit bidestilliertem Wasser gewaschen und bei 4 °C gelagert. Die Ausschlußporengröße betrug 10 kDa.

Das dialysierte Chinon Reduktase Fragment wurde in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen, Millipore) bei 2.300 g etwa 10-fach auf 50 mg/ml aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm) und auf eine mit 50 mM TrisCl, pH 9,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid äquilibrierte 14 ml Größenausschlußchromatographiesäule (BioSep-Sec-4.000, 7,8 mm x 300 mm, Phenomenex) aufgetragen. Das Protein wurde mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min im selben Puffer von der Säule eluiert. Die Spektren wurden kontinuierlich in einer Durchflußküvette (1 cm Schichtdicke) mit einem Diodenarray Spektrometer mit Lichtleiter-Optik (TIDAS, UVI/1001-1, J&M) aufgenommen.

Aliquots des dialysierten und nachgereinigten Chinon Reduktase Fragmentes wurden mit einer 10 %igen (w/v) SDS-Lösung auf eine Endkonzentration von 2 % SDS (w/v) gebracht. Die Probe wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und UV/Vis Spektren aufgenommen (TIDAS, UVI/1001-1, J&M).

3.7 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) 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) ausgewertet. Alle Puffer, die für die UV/Vis Spektroskopie verwendet wurden, wurden durch eine Flachmembran mit 0,22 µm Porengröße (Millipore) filtriert und im Wasserstrahlpumpen-Vakuum entgast.

UV/Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektren wurden in einer Quarzglasküvette der Schichtdicke 1 cm von 700 µl Aliquots Komplex I (1 mg/ml) in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid bzw. Chinon Reduktase Fragment (1 bis 2 mg/ml) in 50 mM TrisCl, pH 9,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid aufgenommen. Die Proben wurden durch Zugabe einiger Körnchen Dithionit unter Rühren reduziert und kontinuierlich die langsame Reoxidation durch Luftsauerstoff bei 315 nm verfolgt (Mayhew und Massey, 1973).

3.8 ESR Spektroskopie

Die ESR Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thorsten Friedrich aufgenommen. Komplex I, das Chinon Reduktase Fragment und das NADH Dehydrogenase Fragment wurden durch Ultrafiltration durch Ultrafree-15 mit Biomax 100-Membranen (Millipore) bei 2.300 g auf etwa 10 mg/ml aufkonzentriert (Tischzentrifuge GS-6R, Beckman, Rotor GH 3.7, 3.000 Upm) und entweder mit einem 100-fachen Überschuß NADH oder einem 1000-fachen Überschuß Dithionit reduziert. Die Proben wurden zunächst in einer 1:5 Isopentan/Methylcyclohexan Kältemischung bei 150 K, dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung bei -70 °C gelagert. Die Proben wurden bei 40 bzw. 13 K mit einem Bruker EMX 6/1 ESR Spektrometer und einem ESR-9 Helium-Kryostaten (Oxford Instruments) gemessen. Die eingestrahlte Mikrowellenfrequenz betrug 9,46 GHz, die Modulationsamplitude 6 G, die Zeitkonstante 0,164 s, die Modulationsfrequenz 100 kHz, die Mikrowellenleistung 2 mW und die Aufnahmegeschwindigkeit 17,9 mT/min.

3.9 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Dr. Bettina Böttcher am EMBL, Heidelberg, aufgenommen und die Strukturen des Komplex I und des Chinon Reduktase Fragments rekonstruiert. Dazu wurden beide Präparationen mit dem jeweiligen Puffer auf eine Endkonzentration von 5 bis 10 µg/ml verdünnt und an einem mit Kohlenstoff überzogenen und elektrostatisch aufgeladenen Gitter adsorbiert. Nach etwa 1 Minute wurde der Flüssigkeitstropfen mit einem Filterpapier (Whatman No. 1) entfernt. Die auf dem Gitter adsorbierten Proteine wurden sechs Mal mit Wasser gewaschen, und die Proben wurden mit 1 % (w/v) Goldthioglukose negativ kontrastiert. Aliquots des Komplex I wurden sechs Mal mit 20 mM NaCl gewaschen und anschließend mit 1 % Goldthioglukose, 20 mM NaCl angefärbt. Nach dem Trocknen wurden die Proben sofort für die Elektronenmikroskopie verwendet. Die Proben wurden mit einem Philips CM 120 Biotwin Elektronenmikroskop (100 kV) mit 52.000-facher Vergrößerung innerhalb weniger Stunden aufgenommen. Die Bilder wurden bei einer Pixelgröße von 21 µm gescannt

(SCAI Scanner, Zeiss), was einer Auflösung der Probe von 0,4 nm entspricht. Durch Analyse von 6.000 bis zu 60.000 Einzelpartikeln wurde die dreidimensionale Struktur der verschiedenen Präparationen mit dem Programmpaket IMAGIC (van Heel, 1979; van Heel und Keegstra, 1981; van Heel *et al.*, 1996) berechnet.

3.10 Elektrochemisch induzierte Redoxtitration des Chinon Reduktase Fragmentes und Vis Spektroskopie

Die elektrochemische Redoxtitration des Chinon Reduktase Fragmentes wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Hellwig vom Institut für Biophysik der Universität Frankfurt/Main durchgeführt. Die elektrochemisch induzierte Potentialtitration des Chinon Reduktase Fragmentes erfolgte in einer speziell für diesen Zweck entwickelten Dünnschichtzelle (Moss *et al.*, 1990). Damit das Protein nicht an der Arbeitselektrode ausfällt, wurde das Goldnetz mit Cysteamin modifiziert (Hellwig *et al.*, 1998). Die in Tab. 3-1 aufgeführten Redoxmediatoren wurden in einer Endkonzentration von je 42 μM eingesetzt (Hellwig, 1998), um die Redoxreaktion zu beschleunigen (Baymann, 1995). 5 bis 6 μl 200 μM Chinon Reduktase Fragment wurden zur Messung verwendet. Zunächst wurde die Stabilität des Chinon Reduktase Fragmentes getestet. Dazu wurden aufeinanderfolgende Potentiale in oxidativer oder reduktiver Richtung eingestellt. Vor der Einstellung intermediärer Redoxzustände wurde zunächst wieder der vollständig reduzierte bzw. oxidierte Zustand eingestellt. Die dabei ermittelte optimierte Vorgehensweise wurde anschließend für die Potentialtitrationen des Chinon Reduktase Fragmentes verwendet: Im Bereich des Mittenpotentials der Gruppe X wurden Potentiale von -400 mV bis 0 mV (gegen NHE) in 50 mV Schritten angelegt. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurde bei dem jeweils angelegten Potential ein Spektrum zwischen 400 und 700 nm aufgenommen.

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

Mediator	$E_{m,7}$ [mV]
Ferrocenyl-trimethylammoniumiodid	645
Ferrocen-1,1'-dicarbonsäure	644
Kaliumhexacyanoferrat (II)	424
Diethyl-3-methyl-paraphenylendiamin	367
Dimethyl-paraphenylendiamin	371
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

Nach Abschluß der Titration wurden aus dem Referenzspektrum, für das das Spektrum bei -400 mV verwendet wurde, und den bei den verschiedenen Potentialen gemessenen Spektren Differenzspektren gebildet.

Die Potentialtitrationen wurden mit dem Computerprogramm E_h -TIT (Baymann *et al.*, 1991; Grzybek *et al.*, 1993) ausgewertet. Die Amplituden der Spektrenschar aus den Potentialtitrationen werden gegen das angelegte Potential aufgetragen. Man erhält eine Schar von Punkten, die durch eine Nernst-Funktion angepaßt wird. Anhand der Nernst-Funktion werden das Mittenpotential und die Zahl der übertragenen Elektronen der bei der Messung beobachteten Redoxgruppen bestimmt.

3.11 Verschiedene analytische Methoden

NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität: Die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität wurde photometrisch bei Raumtemperatur gemessen (Shimadzu UV 120-02 Spektralphotometer). Die zeitliche Extinktionsänderung bei 410 nm nach Zugabe von 2-5 μl Probe zum Testpuffer (50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 mM NADH) wurde verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ beträgt $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Friedrich *et al.*, 1989).

NADH:Ubichinon Reduktaseaktivität: Die NADH:Ubichinon Reduktaseaktivität wurde photometrisch (Sigma ZWSII Biochem, Zwei-Wellenlängen Photometer) bei 340 und 400 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von NADH beträgt $\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Als Puffer wurden entweder 5 mM MES/NaOH, pH 6,0 und 0,1 mM NaCl oder 50 mM MES/NaOH, pH 6,0 und 50 mM NaCl verwendet. Die Konzentrationen von NADH und Decylubichinon wurden von 1 bis 50 μM variiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μg Komplex I gestartet. Die Affinität zu NADH wurde bei 50 μM Decylubichinon gemessen, die Affinität zu Decylubichinon bei 50 μM NADH.

SDS-Gelelektrophorese: Es wurden je 50 μl Probe mit 20 μl Probenpuffer (2 % SDS, 0,5 M Saccharose, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 M Tris, 2,5 mM EDTA, 3,5 mM Dithioerythriol) versetzt, etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert 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 bis 18 Stunden 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 zwei Stunden in 0,1 % Coomassie-Blau R 250, 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure gefärbt und anschließend in 12,5 % Isopropanol und 10 % Essigsäure über mehrere Stunden entfärbt.

Silberfärbung eines SDS-Gels: Zur Silberfärbung wurde das Gel mindestens 1 Stunde in 10 % Essigsäure und 30 % Ethanol fixiert und drei Mal 15 Minuten in 30 % Ethanol gewaschen. Nach einer Minute Inkubation in 0,8 mM Natriumthiosulfat wurde das Gel zwei Mal 30 Sekunden mit Wasser gewaschen und 25 Minuten in einer Lösung aus 12 mM Silbernitrat und 0,03 % Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Gel zwei Mal 20 Sekunden mit Wasser gewaschen und in einer Lösung aus 0,6 M Natriumcarbonat, 16 μ M Natriumthiosulfat und 0,02 % Formaldehyd so lange entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 10 ml konzentrierter Essigsäure gestoppt (Dunbar, 1987).

Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuret-Methode (Beisenherz *et al.*, 1953) oder nach der Lowry-Methode (Lowry *et al.*, 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zur UV/Vis spektroskopischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Spektren an einem Diodenarray Spektrometer (Spectrocord S10 UV-VIS, Zeiss) bei Raumtemperatur mit einer Quarzglasküvette der Schichtdicke 0,2 bzw. 1 cm aufgenommen. Als Referenz diente der jeweilige Puffer, in dem das Protein vorlag. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm aus der Aminosäuresequenz wurden mit Inkrementen für Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Cystein berechnet (Gill und von Hippel, 1989). Die molaren Extinktionskoeffizienten für Komplex I von $\epsilon = 763.520 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und von $\epsilon = 573.250 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für das Chinon Reduktase Fragment wurden verwendet.

Flavinbestimmung: Aliquots einer 11 μ M Proteinlösung wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt und in lichtgeschützten Einmal-Reaktionsgefäßen für 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort für 5 Minuten in Eis abgekühlt und 5 Minuten bei 12.000 g (Eppendorf Zentrifuge, 14.000 Upm) bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei einer Excitationswellenlänge von 449 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm fluorimetrisch vermessen (Koziol, 1971). Für die Eichgerade wurde eine FMN-Stammlösung verwendet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Sulfidbestimmung: Der Sulfidgehalt im Chinon Reduktase Fragment (1 bis 1,6 nM) wurde nach der Guanidin-Methode bestimmt (Beinert, 1983). Die Proben wurden in Abänderung der Vorschrift für 100 Minuten bei 25 °C inkubiert und die Extinktionen bei 750 bzw. 850 nm gemessen. Als Standard diente eine 2 mM Na₂S x 9 H₂O Lösung in 10 mM NaOH. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Eisenbestimmung: Der Eisengehalt im Chinon Reduktase Fragment wurde von Dr. Alexander von Bohlen am ISAS in Dortmund mit Hilfe der totalen Röntgen Fluoreszenz (total X-ray fluorescence , TXRF) bestimmt (Prange, 1989; Klockenkämper und von Bohlen, 1989; Kregsamer, 1991). Die Konzentration des Chinon Reduktase Fragmentes lag zwischen 0,6 und 0,8 µg/ml. Zur Nullwert-Bestimmung wurde ein Aliquot des gleichen Puffers verwendet, in dem das Protein jeweils präpariert wurde. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung des Komplex I

Der Komplex I aus *E. coli* wurde durch Waschen der Cytoplasmamembran mit Natriumbromid, Extraktion der Membranproteine mit Dodecylmaltosid, Anionenaustauschchromatographie an Source 15Q und Größenausschlußchromatographie auf Ultrogel AcA 34 isoliert. Für UV/Vis spektroskopische Untersuchungen wurde der isolierte Komplex I durch eine zweite Anionenaustauschchromatographie an Source 15Q nachgereinigt. Komplex I eluierte von beiden Anionenaustauschchromatographien mit 280 mM NaCl und von der Größenausschlußchromatographie nach 188 ml. Tab. 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)

Reinigungs- schritt	Volumen [ml]	Protein- menge [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	90	5565	11000	1,97	100
gewaschene Membranen	30	1980	6700	3,4	61
Extrakt	58	650	6000	9,2	54
Source 15Q	35	100	1900	19	17
Ultrogel AcA 34	33	18	980	54	9
2. Source 15Q*	10	12	790	66	7

*Nachreinigung für spektroskopische Untersuchungen

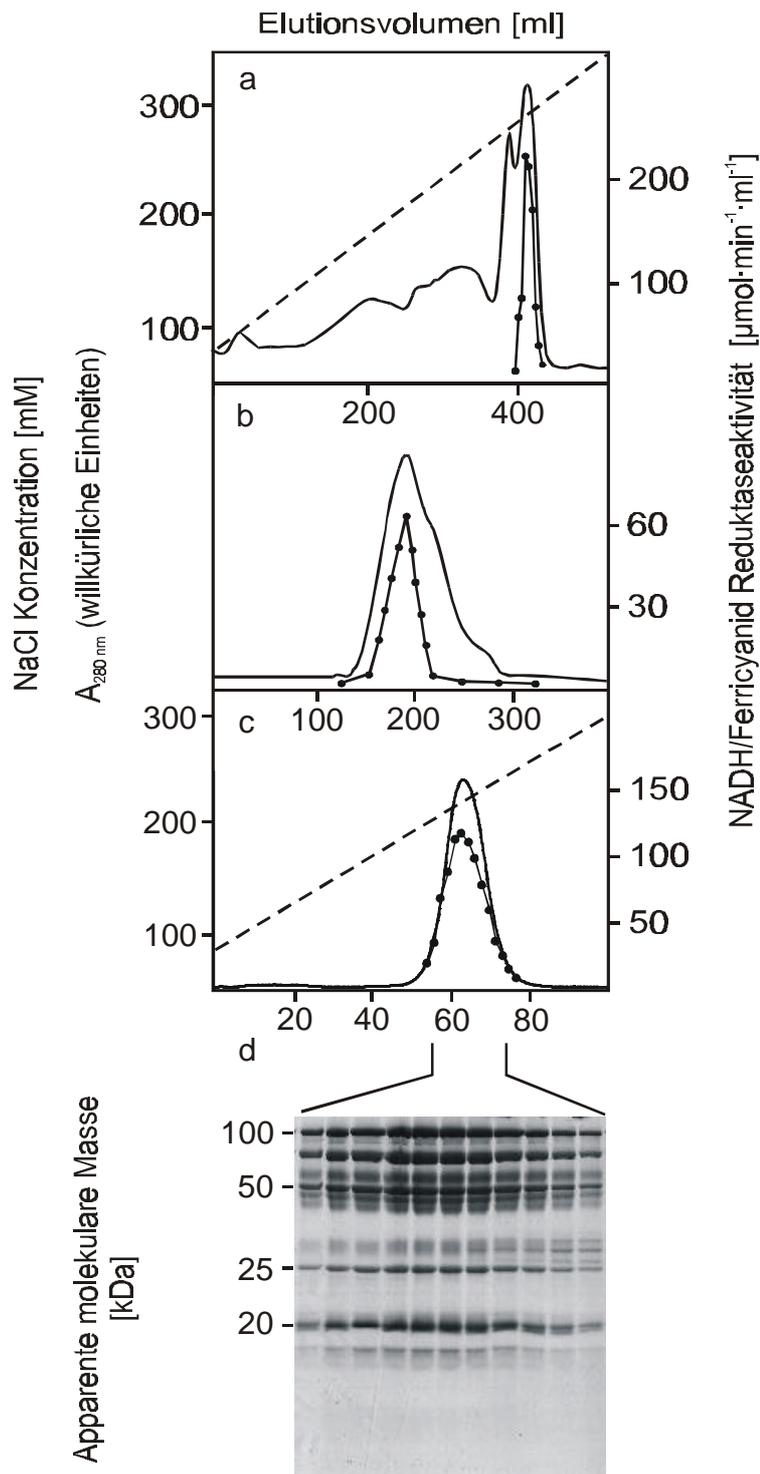


Abbildung 4-1: Reinigung von Komplex I durch erste Anionenaustauschchromatographie (a), Größenausschlußchromatographie (b) und zweite Anionenaustauschchromatographie (c). Die durchgezogene Linie gibt die Extinktion bei 280 nm wieder, die Punktstrich Linie die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität und die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

Der in Dodecylmaltosid isolierte Komplex I sedimentiert bei Zuckergradientenzentrifugation im pH-Bereich zwischen 5,0 und 7,5 bei einer Salzkonzentration von bis zu 1,0 M immer im zweiten Drittel des Gradienten (Daten nicht gezeigt, Spehr *et al.*, 1999). Er eluiert bei analytischer Größenausschlußchromatographie auf BioSep-Sec-4.000 Material (Phenomenex) wie ein Protein mit einer Masse von 720 kDa. Dies stimmt gut mit der aus der Sequenz abgeleiteten Masse von 535 kDa überein, wenn man die Masse des gebundenen Detergenz von etwa 240 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).

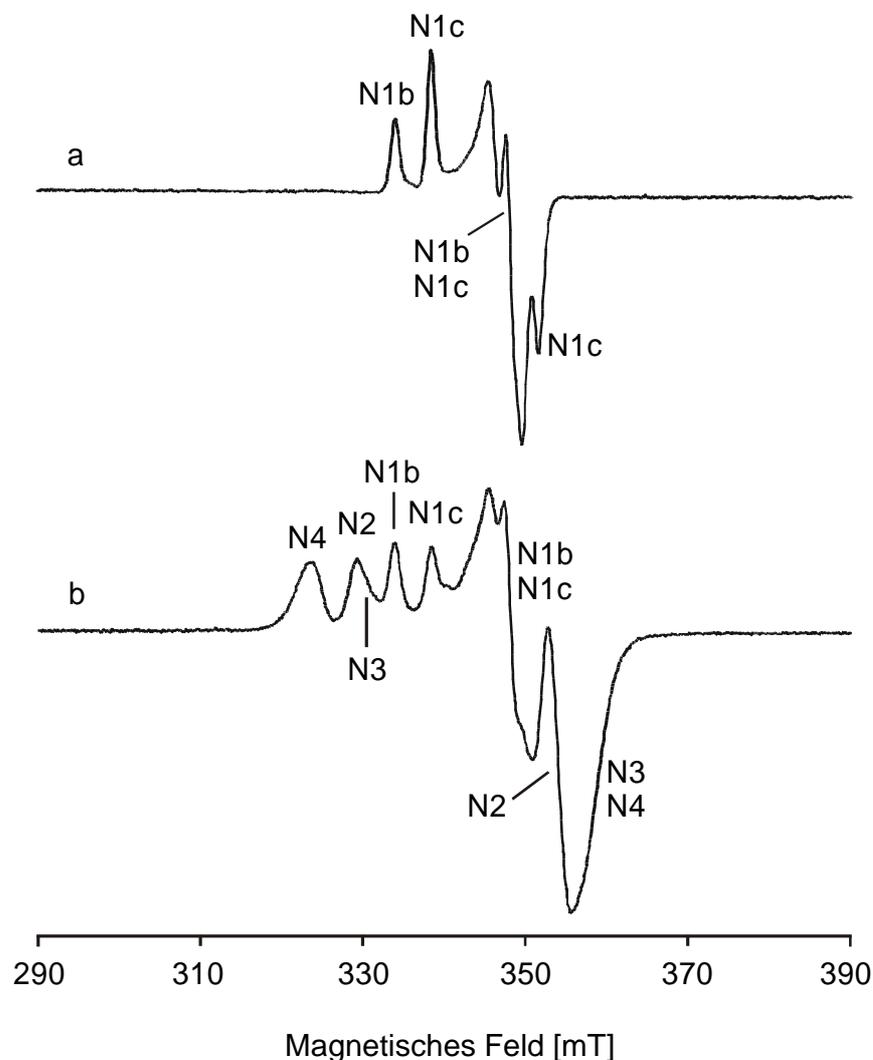


Abbildung 4-2: ESR Spektren von 100 μM *E. coli* Komplex I bei 40 K und 2 mW (a) und 13 K und 5 mW (b).

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 zeigt die breiten, weniger intensiven Absorptionen der Kofaktoren des Enzyms zwischen 300 und 600 nm.

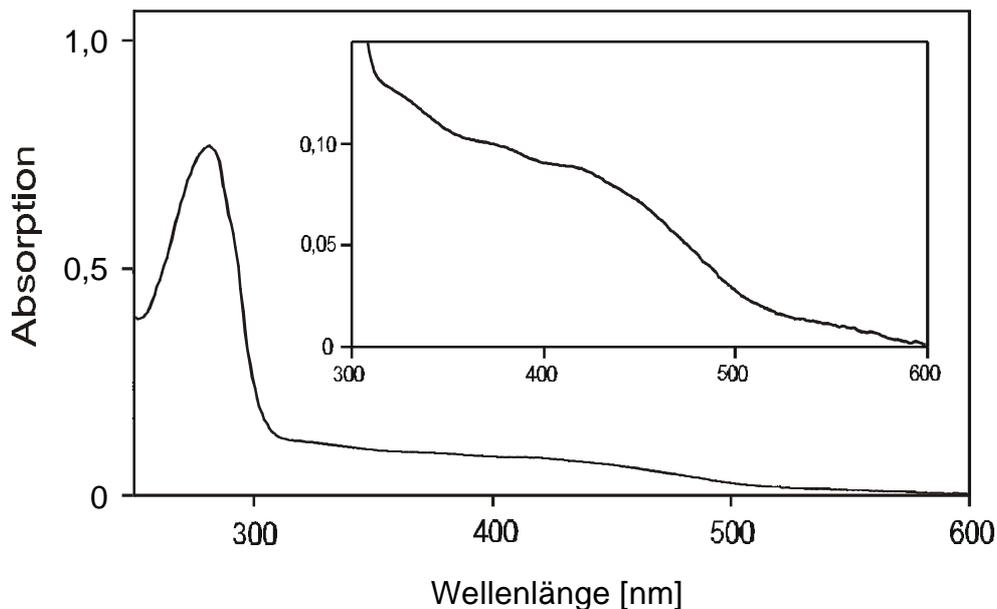


Abbildung 4-3: UV/Vis Absorptionsspektrum von 1 µM Komplex I. Der Einschub zeigt den vergrößerten Bereich von 300 bis 600 nm.

Abb. 4-4 zeigt das UV/Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektrum des isolierten Komplex I. Die Größe der Differenzabsorption hängt von dem Reduktionsgrad des Enzyms ab. Mit einem Überschuß an Natriumdithionit ($E_m = -420$ mV in wässriger Lösung; Dutton, 1978) als Reduktionsmittel ergibt sich eine maximale Differenzabsorption bei 445 nm von $\epsilon = 0,027$ pro µM Komplex I. Das Spektrum ist allerdings im nahen UV Bereich durch die Absorption von Natriumdithionit bei 315 nm gestört (Mayhew und 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 (Scheide, 2000).

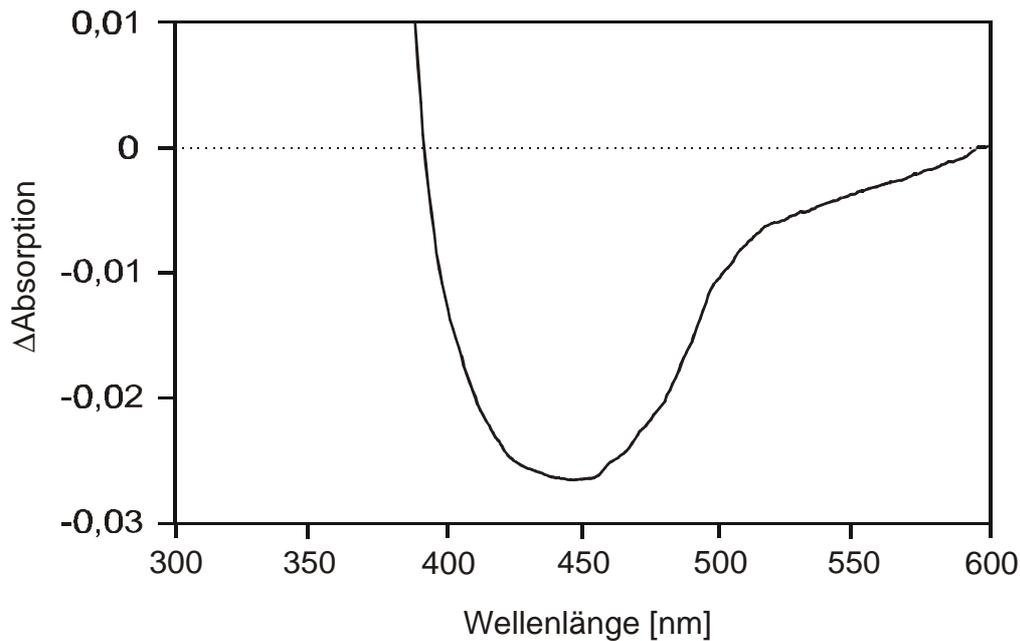


Abbildung 4-4: UV/Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektrum von 1 μ M isoliertem Komplex I mit überschüssigem Natriumdithionit.

4.2. Präzipitation des Komplex I mit PEG 4.000

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Komplex I in verschiedenen Puffern sollten zeigen, ob der Puffer Einfluß auf den Winkel zwischen peripherem Arm und Membranarm hat. Das Protein wurde hierfür mit PEG 4.000 gefällt und in dem gewünschten Puffer aufgenommen. Dabei fiel auf, daß die Löslichkeit des Komplex I dramatisch von der Ionenstärke des Puffers abhing. Zur Bestimmung der Löslichkeit des Komplexes in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers wurden Fällkurven mit PEG 4.000 als Präzipitant aufgenommen. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugation entfernt und die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität des Überstandes gemessen (Abb. 4-5). Komplex I in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid präzipitiert zwischen 8 und 14 % (w/v) PEG 4.000 mit einem Wendepunkt der Titrationskurve bei 9,5 % (w/v) PEG. In 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid präzipitiert Komplex I dagegen zwischen 3,5 und 8 % (w/v) PEG mit einem Wendepunkt bei 5 % (w/v). Bei höheren Salzkonzentrationen steigt der Wendepunkt der Titrationskurve wieder zu höheren PEG Konzentrationen. So präzipitiert Komplex I in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0,

200 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid zwischen 4 und 9 % (w/v) PEG mit einem Wendepunkt bei 6 % (w/v) PEG.

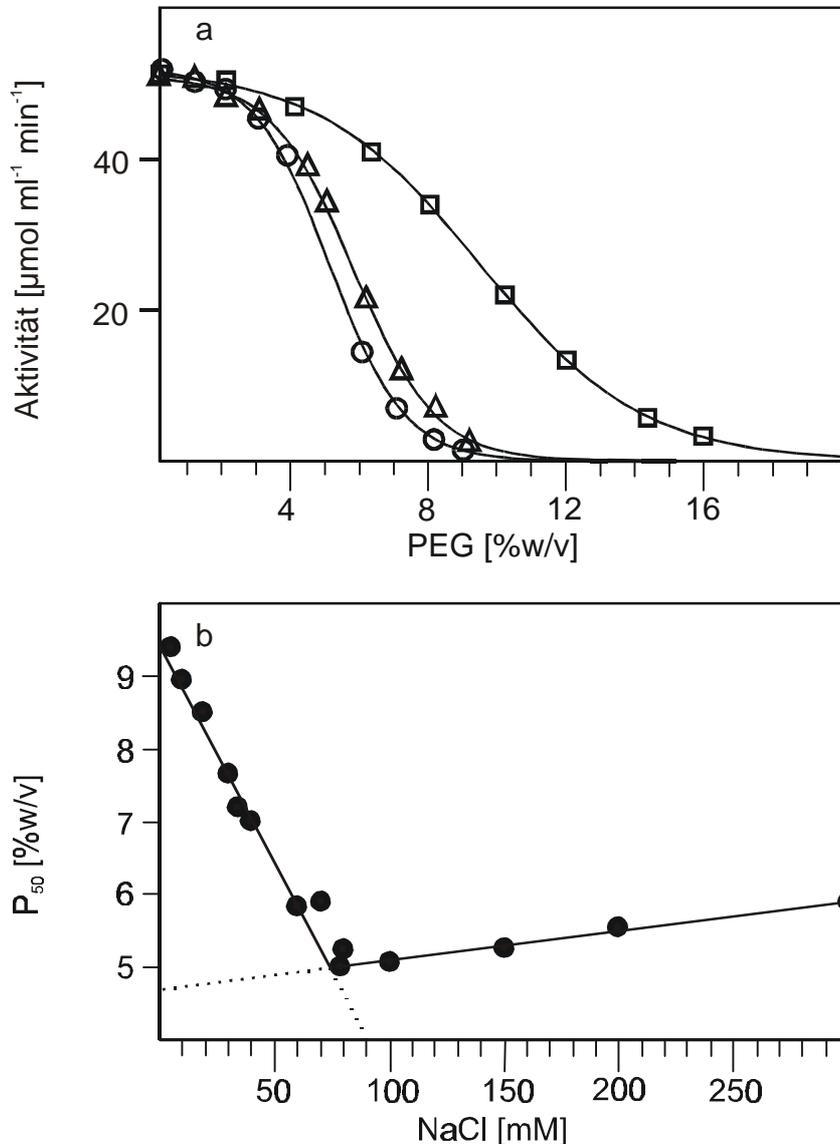


Abbildung 4-5: Präzipitation von Komplex I mit PEG 4.000. (a) Fällkurven von Komplex I in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid (○), in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid (□) bzw. in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid (△). Gezeigt ist die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität des Überstandes nach Zentrifugation des ausgefällten Proteins. (b) Benötigte PEG Menge, um die Hälfte des Komplex I bei verschiedenen Salzkonzentrationen in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,15 % Dodecylmaltosid auszufällen (P_{50}).

Um die PEG 4.000 Konzentrationen zu bestimmen, die nötig sind, um die Hälfte des Komplex I auszufällen (P_{50} in Abb. 4-5), wurde Komplex I in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,15 % Dodecylmaltosid bei verschiedenen Salzkonzentrationen mit PEG titriert (Abb. 4-5b). Aus Praktikabilitätsgründen wurde die Menge des ausgefällten Proteins hierbei nicht durch die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität bestimmt, sondern durch Trübung der Probe bei 600 nm gemessen. Bei dieser Methode wird weniger Protein eingesetzt, und es können mehr Meßreihen pro Zeit aufgenommen werden. Die Löslichkeit von Komplex I nimmt bei Erhöhung der Salzkonzentration zunächst drastisch ab. In Gegenwart von 0,1 mM NaCl werden 9,5 % (w/v) PEG benötigt, um die Hälfte des Komplex I zu fällen, während in Gegenwart von etwa 70 mM NaCl 4,5 % (w/v) PEG benötigt werden. Bei Salzkonzentrationen von über 70 mM NaCl steigt die Löslichkeit von Komplex I langsam wieder an. Der Effekt ist deutlich geringer, in Gegenwart von 70 bis 300 mM NaCl steigt die PEG Konzentration, die benötigt wird, um die Hälfte des Komplex I zu fällen, von 4,5 auf 6,5 % (w/v) PEG. Die zweiphasige Abhängigkeit der Löslichkeit von Komplex I von der Salzkonzentration deutet auf zwei ineinander umwandelbare Zustände des Komplexes hin.

Der isolierte Komplex I wurde mehrfach von einem Puffer niedriger Ionenstärke in einen Puffer höherer Ionenstärke und wieder zurück gebracht. Die danach gemessene Fällkurve ist identisch zu der Fällkurve, die vor den Pufferwechseln erhalten wurde. Dies wurde auch beobachtet, wenn der Komplex von einem Puffer hoher Ionenstärke in einen Puffer niedriger Ionenstärke und wieder zurück gebracht wurde (Daten nicht gezeigt). Der Übergang zwischen den beiden Zuständen des Komplex I ist also vollständig reversibel. Die gleichen Titrationskurven wurden erhalten, wenn anstelle von NaCl KCl, LiCl, MgCl₂, CaCl₂, Li₂SO₄ und NaNO₃ in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,15 % Dodecylmaltosid verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Löslichkeit des Komplexes scheint daher von der Ionenstärke des Puffers abzuhängen und nicht auf der Konzentration eines bestimmten Ions zu beruhen. Die Untereinheitenzusammensetzung, der Kofaktorgehalt und die NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität von Komplex I sind in Puffern niedriger und hoher Ionenstärke identisch. Die beiden Zustände könnten also eine strukturelle Umordnung des Komplexes widerspiegeln.

4.3 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Untersuchung negativ kontrastierter Proben, deren Konformationsänderungen durch die Ionenstärke des umgebenden Mediums hervorgerufen werden, wird dadurch behindert, daß die am häufigsten verwendeten Kontrastmittel Schwermetallsalze sind und die Proben für die Aufnahmen getrocknet werden. Beides führt zu unkontrollierbaren Salzkonzentrationen. Bei Verwendung von Goldthioglucose, einem milden nicht-ionischen Kontrastmittel, wird ein Einfluß des Kontrastmittels auf die Ionenstärke ausgeschlossen. Um Komplex I Proben bei geringer Ionenstärke zu erhalten, wurden die Proben auf dem Gitter für die Elektronenmikroskopie mehrfach mit Wasser gewaschen. Beim Eintrocknen der Probe auf dem Gitter wurde so eine zwar unbekannte, aber geringe Ionenstärke des die Probe umgebenden Puffers sichergestellt. Um eine Komplex I Probe bei hoher Ionenstärke zu erhalten, wurde die Probe auf dem Gitter mehrfach mit 20 mM NaCl gewaschen. Beim Eintrocknen wurde die Ionenstärke des Puffers um mehr als das zehnfache erhöht. Neben diesen beiden Komplex I Proben wurde ein hydrophobes Fragment des Komplex I untersucht, das durch Abspaltung des löslichen NADH Dehydrogenase Fragmentes erhalten wurde. Dieses sogenannte Chinon Reduktase Fragment besteht aus 10 Untereinheiten und wird im Detail in den Kapiteln 4.6 und 4.7 beschrieben.

Der Komplex I bei hoher Ionenstärke und das Chinon Reduktase Fragment zeigen eine monodisperse Verteilung von L-förmigen Partikeln, wie sie schon zuvor beschrieben wurde (Guenébat *et al.*, 1998). Der Komplex I bei niedriger Ionenstärke ist ebenfalls monodispers auf dem elektronenmikroskopischen Gitter verteilt, zeigt aber keine typische L-Form, sondern eine kugelige Sandwich-Form (Abb. 4-6).

Das dreidimensionale Modell des Komplex I bei niedriger Ionenstärke wurde durch Berechnung von 55.450 Einzelteilchen erhalten und hat eine Auflösung von 17 Å. Das Modell besteht aus vier Domänen, die wie ein geschlossenes Hufeisen angeordnet sind (Abb. 4-7a, d, g). Die Domänen sind mit N, C, L und T bezeichnet. Um zu entscheiden, welche dieser Domänen in die Membran eingebettet ist, wurde das Chinon Reduktase Fragment untersucht.

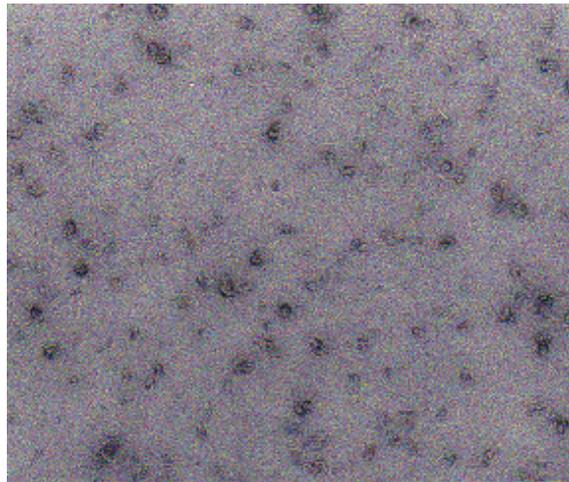


Abbildung 4-6: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Komplex I bei niedriger Ionenstärke. Die Vergrößerung ist 45.000-fach.

Durch Berechnung von 10.860 Einzelteilchen wurde das dreidimensionale Modell des Chinon Reduktase Fragmentes mit einer Auflösung von 19 Å erhalten. Das Fragment setzt sich aus vier Domänen zusammen, von denen drei eine ähnliche Größe haben und wie ein L angeordnet sind (Abb. 4-7b, bezeichnet mit C, L und T). Die mit L bezeichnete Domäne stellt die zentrale Verbindungsdomäne dar, an die Domänen C und T gebunden sind. Die vierte Domäne (Abb. 4-7b, bezeichnet mit N*) ist an die große Domäne C gebunden. Das Modell des Chinon Reduktase Fragmentes wurde per Auge auf das Modell des Komplex I in niedriger Ionenstärke ausgerichtet. Da sich die Über-Alles-Struktur des Gesamtkomplexes und die des Fragmentes unterscheiden (Abb. 4-7), konnten die beiden Modelle nicht vollständig miteinander zur Deckung gebracht werden. Die Domänen C, L und T im Fragment und im Gesamtkomplex haben eine ähnliche Größe und Gestalt (Abb. 4-7) und können zueinander in Deckung gebracht werden. Die mit N* bezeichnete Domäne (Abb. 4-7) ist im Chinon Reduktase Fragment, dem das NADH Dehydrogenase Fragment fehlt, wesentlich kleiner. Die mit N bezeichnete Domäne stellt wahrscheinlich das NADH Dehydrogenase Fragment des Gesamtkomplexes dar. Da das NADH Dehydrogenase Fragment, das verbindende Fragment und der Membranarm eine eindeutige Anordnung zueinander haben, ist mit der Lokalisation des NADH Dehydrogenase Fragmentes auch die Lage der Membran in den Modellen bestimmt.

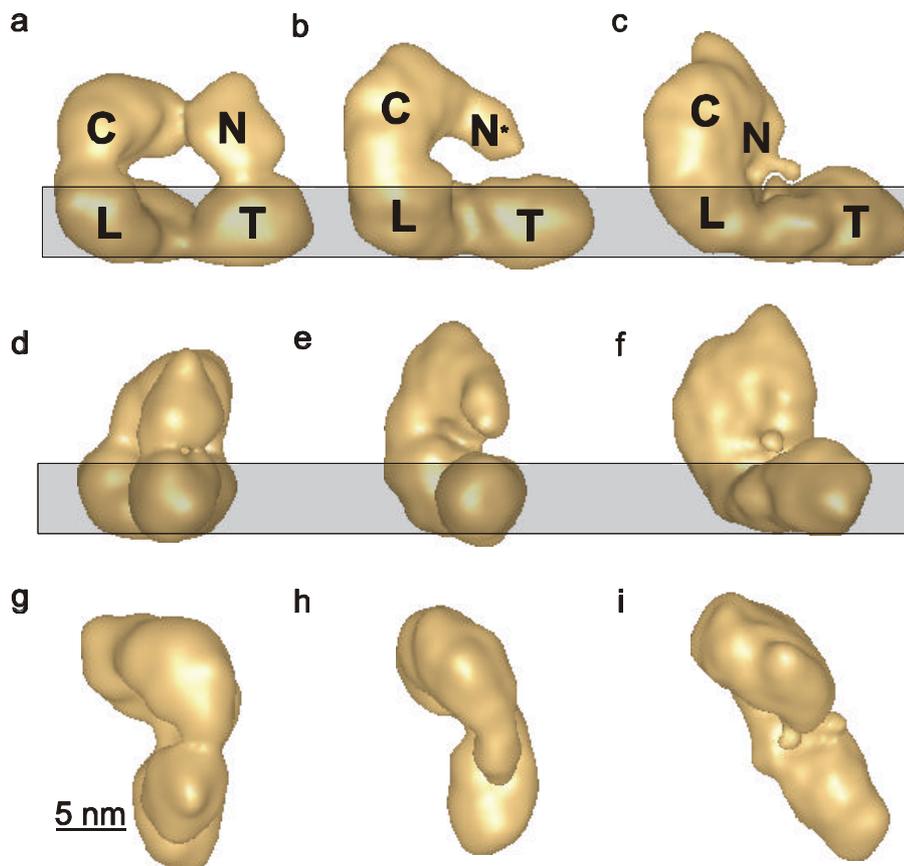


Abbildung 4-7: Dreidimensionale Modelle von Komplex I und dem Chinon Reduktase Fragment. Die erste Spalte zeigt Komplex I bei niedriger Ionenstärke, die zweite das Chinon Reduktase Fragment, und in der dritten Spalte ist Komplex I bei hoher Ionenstärke zu sehen. Die erste und zweite Reihe zeigen die Modelle parallel zu der Membran, die dritte Reihe Ansichten auf die Ebene der Membran. Die Domänen sind mit N, C, L und T bezeichnet (Erläuterungen siehe Text). Die Membran ist durch den grauen Bereich angedeutet, und der Größenmaßstab ist gekennzeichnet.

Für das dreidimensionale Modell des Komplex I bei hoher Ionenstärke wurden 6.000 Teilchen ausgewählt und eine Auflösung von 25 Å erhalten. Der Komplex I bei hoher Ionenstärke hat eine zweiteilige Struktur, in der die beiden Domänen senkrecht zueinander angeordnet sind (Abb. 4-7c, f, i). Es zeigt die bekannte L-förmige Struktur des Komplexes. Allerdings ist die Verbindung zwischen den beiden Domänen deutlich breiter als bisher beschrieben (Guénebaut *et al.*, 1998). Das Modell unterscheidet sich beachtlich von denen des Komplex I bei niedriger Ionenstärke und

des Chinon Reduktase Fragmentes (Abb. 4-7). Die mit T bezeichnete Domäne stimmt in Form und Größe mit der großen membranständigen Domäne des Chinon Reduktase Fragmentes und des Komplex I bei niedriger Ionenstärke überein (Abb. 4-7). Sie ist also Teil des Membranarms. Die andere Domäne hat eine breitere Ausdehnung als irgendeine Domäne im Chinon Reduktase Fragment oder im Komplex I bei niedriger Ionenstärke und kann nicht eindeutig zugeordnet werden. Außerdem ist der Membranarm des Komplex I bei niedriger Ionenstärke und der des Chinon Reduktase Fragmentes im Gegensatz zu dem des Komplex I bei hoher Ionenstärke gekrümmt (Abb. 4-7g, h, i).

Um die drei Modelle miteinander vergleichen zu können, wurden sie auf die niedrigste Auflösung von 25 Å gefiltert und aufeinander ausgerichtet (Abb. 4-7). Alle drei Modelle passen im Bereich der mit T bezeichneten Domäne recht gut zueinander. Durch Vergleich mit dem Modell des Chinon Reduktase Fragmentes wurden der periphere Arm und der Membranarm identifiziert. Im Komplex I bei hoher Ionenstärke scheint das NADH Dehydrogenase Fragment in der großen Domäne verborgen zu sein (Abb. 4-7c). Der Membranarm ist in einem Puffer hoher Ionenstärke gerade (Abb. 4-7i), während er in einem Puffer niedriger Ionenstärke offensichtlich in der Membranebene gebogen ist (Abb. 4-7g). Trotz der signifikanten Unterschiede in der Über-Alles-Struktur der beiden Komplex I Modelle bei unterschiedlichen Ionenstärken, weichen die berechneten Volumina der Modelle nur um weniger als 7 % voneinander ab. Das Volumen des Modells des Chinon Reduktase Fragmentes beträgt 85 % des Durchschnittsvolumens der beiden Komplex I Modelle, was nach Abtrennung des NADH Dehydrogenase Fragmentes zu erwarten ist. Anscheinend ändert der Komplex I in Abhängigkeit von der Ionenstärke die Konformation.

4.4 Analytische Ultrazentrifugation

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die beiden Konformationen des Komplex I, wie sie durch die Elektronenmikroskopie sichtbar wurden, ein Artefakt aufgrund elektrostatischer Effekte auf dem elektronenmikroskopischen Gitter sind, wurde der

Komplex I in detergentzhaltiger Lösung untersucht. Als Methode, die Konformation von Proteinen in Lösung zu bestimmen, wurde die analytische Ultrazentrifugation gewählt (Stafford, 1997). Aliquots von Komplex I bei verschiedenen Ionenstärken wurden bei 35.000 Upm zentrifugiert und die Absorption entlang des Sedimentationsweges bei 280 nm aufgezeichnet. Die scheinbaren Sedimentationsgeschwindigkeiten wurden für den Puffer und die Temperatur korrigiert und der $S_{20,W}$ -Wert, die Svedberg-Konstante eines Partikels bei 20 °C und in Wasser, berechnet.

Die Van Holde-Weischet Analyse der Sedimentationsprofile ergab für die Experimente in 5 mM MES/NaOH pH 6,0, 0,1 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose in drei unabhängigen Versuchen $S_{20,W}$ -Werte zwischen 20 S und 21 S für eine einzelne Komponente (Abb. 4-8). Dieser Sedimentationskoeffizient ist mit dem Molekulargewicht des Komplexes in einer Detergenzmicelle von 750 kDa mit einer abgeflachten Gestalt zu vereinbaren.

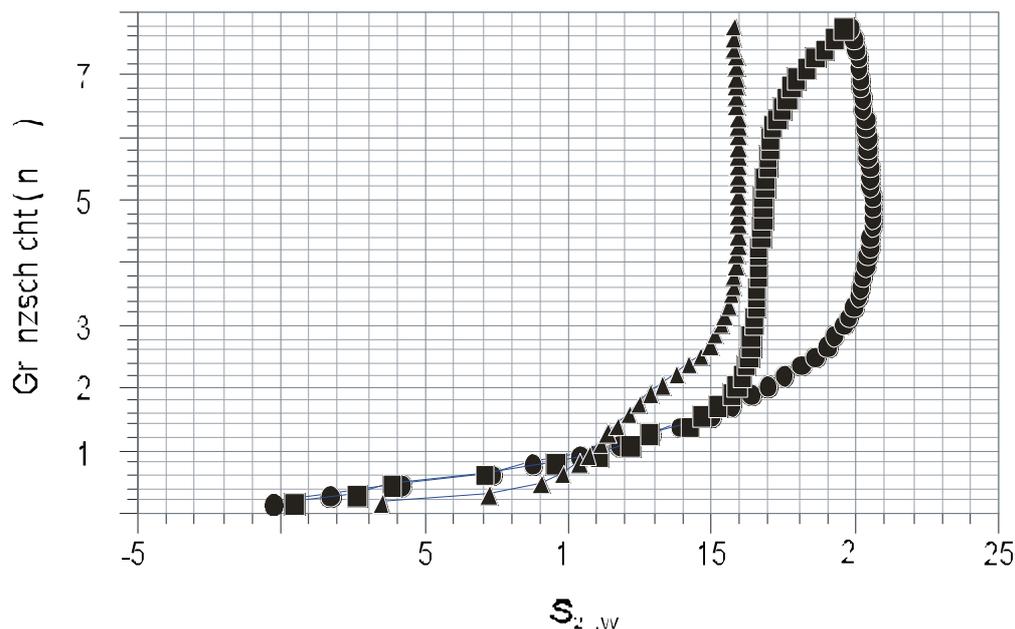


Abbildung 4-8: Hydrodynamische Eigenschaften von Komplex I. G(s)-Verteilungen erhalten nach Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen von Komplex I in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose (\blacktriangle), in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose (\blacksquare) und in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose (\bullet) bei 35.000 Upm und 10°C.

In den Zentrifugationen bei 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose wurde eine vorherrschende Komponente mit einem $S_{20,W}$ -Wert zwischen 16,5 S und 17 S und ein kleiner Anteil einer schneller sedimentierenden Komponente mit bis zu 21 S ermittelt. Die schneller sedimentierende Komponente fehlte in den Zentrifugationsläufen für 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose, in denen die Hauptkomponente einen $S_{20,W}$ -Wert zwischen 14,5 S und 16 S hatte. Die Ergebnisse wurden jeweils in zwei unabhängigen Versuchen bestätigt. Die Abnahme der S-Werte von 21 auf 17 S kann durch einen Wechsel in der Konformation von einem abgeflachten Protein zu einem L-förmigen erklärt werden, wenn man von einem Verhältnis der Reibungskoeffizienten von $f_{\text{abgeflacht}}/f_{\text{L-Form}} = 0,83$ ausgeht, wie es sich für ein Modell aus neun identischen kugelförmigen Untereinheiten berechnen läßt (Abb. 4-9; Bloomfield *et al.*, 1967). Die Grenzschicht enthielt bis zu 20 % einer zusätzlichen Komponente mit etwa 10 S, die wahrscheinlich der Detergenzmicelle entspricht.

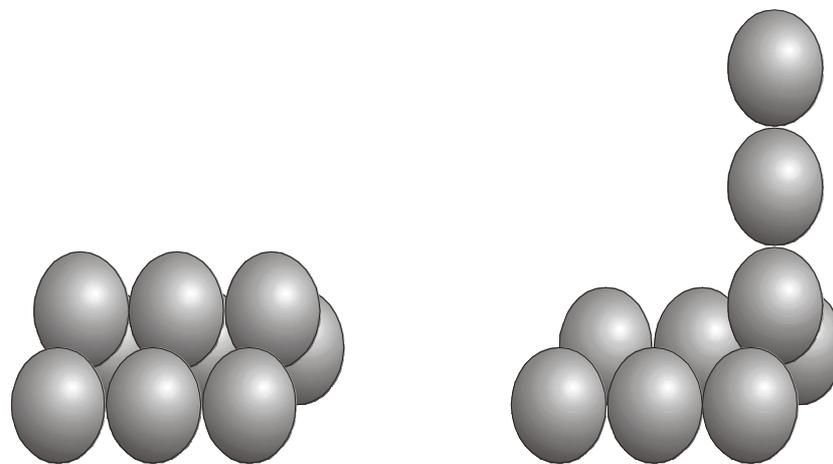


Abbildung 4-9: Modelle zur Berechnung der Konformationen des Komplex I. Das Verhältnis der Reibungskoeffizienten $f_{\text{abgeflacht}}/f_{\text{L-Form}}$ beträgt 0,83.

Um zu zeigen, daß Komplex I bei verschiedenen Ionenstärken des Puffers stets als Monomer vorliegt, wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe zwischen 4.800 und 7.200 Upm durchgeführt. Abb. 4-10 zeigt beispielhaft die Läufe bei 6.800 Upm. Bei verschiedenen Proteinkonzentrationen wurde die molekulare Masse von Komplex I in

5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose und in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose bestimmt. Die Profile der Gleichgewichtsläufe wurden an ein Modell mit zwei nicht-wechselwirkenden Komponenten angepaßt. Die Profile aus den Läufen beider Salzkonzentrationen wurden getrennt voneinander und auch gemeinsam angepaßt. Beide Methoden ergaben dasselbe Molekulargewicht für beide Komponenten.

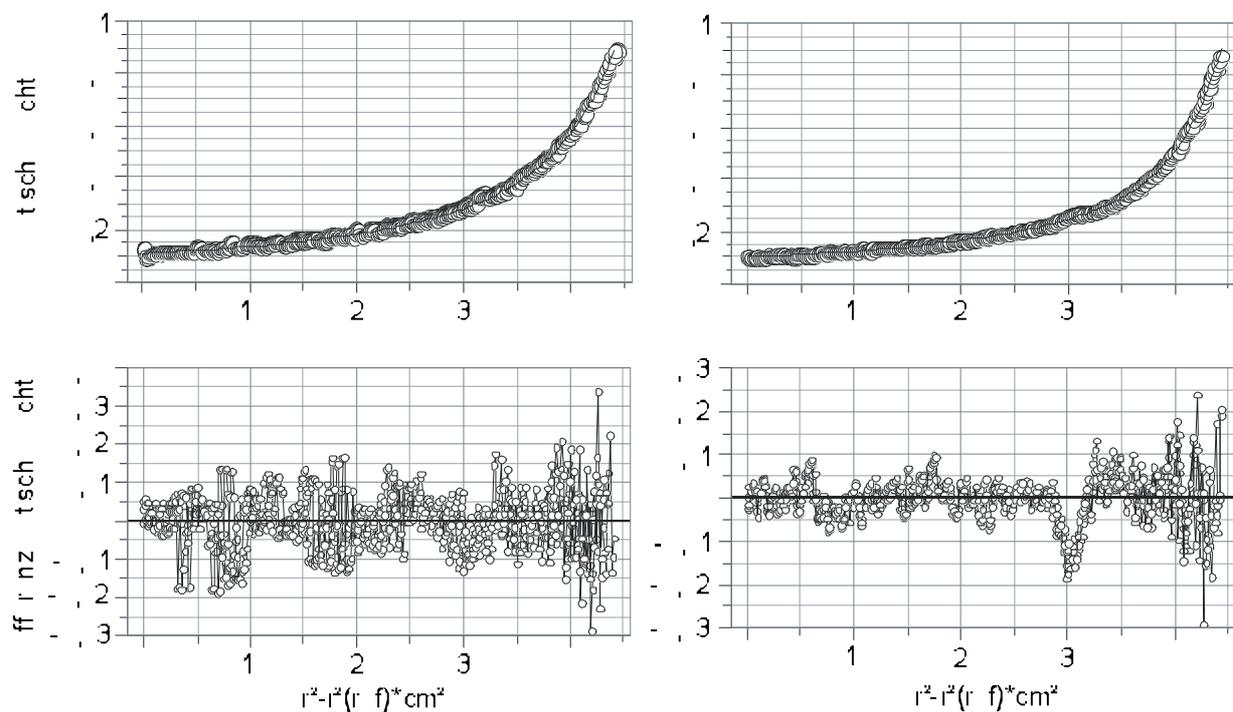


Abbildung 4-10: Profile der Sedimentationsgleichgewichtsläufe. Die Proben wurden bei 6.800 Upm und 10 °C in 20 Stunden zentrifugiert. Der obere Teil zeigt die mit der radialen Position korrelierende gemessene Absorption bei 300 nm. Der untere Teil zeigt die Differenz zwischen den experimentellen und den angepaßten Datenpunkten. (a) Komplex I (1 mg/ml) in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose, (b) Komplex I (1 mg/ml) in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid, 5 % Saccharose.

Eine kleine Komponente mit einem Molekulargewicht von 180 ± 10 kDa und ist zu 5 bis 8 % in der Präparation enthalten. Diese Komponente wurde ebenfalls in den Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen als eine Verunreinigung mit 10 S beobachtet. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um die Detergenzmicelle. Für die größere Komponente ergab sich ein Molekulargewicht von 775 ± 25 kDa. Die Molekulargewichte der beiden Komponenten waren unter verschiedenen experimentellen Bedingungen identisch (Abb. 4-10).

Obwohl bei einer Rotorgeschwindigkeit von 4.800 Upm ein mögliches Komplex I Dimer nachgewiesen werden kann, konnte an die experimentellen Daten keine Komponente mit einem Molekulargewicht höher als 800 kDa angepaßt werden. Die Komponente mit der molekularen Masse von 775 kDa repräsentiert Komplex I in beiden Puffern, was dafür spricht, daß die niedrige Ionenstärke des Puffers nicht zu einer Dimerisierung des Komplex I führt. Dementsprechend hat die Präparation des Komplex I etwa 240 kDa Dodecylmaltosid gebunden hat, wie es für Membranproteine beschrieben ist (Lustig *et al.*, 2000).

4.5 Katalytische Eigenschaften des Komplex I

Um Aufschluß darüber zu gewinnen, ob die Konformation die physiologische Aktivität des Komplex I beeinflusst, wurde die NADH:Ubichinon Reduktaseaktivität gemessen. Es ist bekannt, daß Komplex I von *E. coli* in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid nur eine sehr geringe NADH:Ubichinon Reduktaseaktivität aufweist (Friedrich *et al.*, 1989; Leif *et al.*, 1995; Spehr *et al.*, 1999). Der isolierte Komplex I muß in Phospholipide rekonstituiert werden, um wieder Aktivität zu erlangen. Wie erwartet, zeigt Komplex I in 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl einen geringen Umsatz von 7 s^{-1} (Abb. 4-11a). In 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl katalysiert Komplex I den Elektronentransport von NADH auf Decylubichinon mit einem v_{max} von etwa 40 s^{-1} , die $K_{\text{M}}^{\text{app}}$ Werte für NADH und Decylubichinon liegen etwa bei 5 und 15 μM . Somit besitzt Komplex I in einem Puffer niedriger Ionenstärke eine enzymatische Aktivität mit kinetischen Parametern, die vergleichbar sind mit denen des in Phospholipiden

rekonstituierten Enzyms (Spehr *et al.*, 1999). Der K_i^{app} Wert gegenüber Piericidin A ist abhängig von der Detergenzkonzentration im Puffer und beträgt in detergentenfreiem Meßpuffer $0,4 \mu\text{M}$.

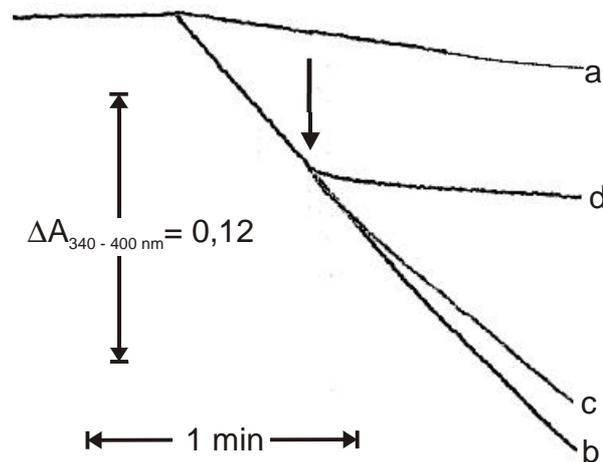


Abbildung 4-11: NADH:Decylubichinon Reduktaseaktivität von Komplex I. Die Reaktion wurde gemessen in: 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl (a) und in 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl (b bis d) und wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Der Pfeil markiert die Zugabe von jeweils $35 \mu\text{l}$ 5 mM MES/NaOH, pH 6,0, 0,1 mM NaCl (c) und $35 \mu\text{l}$ 6 M NaCl (d). Die Kurven c und d sind um den durch die Verdünnung bedingten Versatz korrigiert.

Die NADH:Ubichinon Reduktaseaktivität ist über wenige Minuten linear (Abb. 4-11b). Sie wird durch Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 200 mM vollständig inhibiert (Abb. 4-11d). Die Zugabe desselben Volumens Puffer führt aufgrund der Verdünnung zu einer Abnahme der Aktivität um weniger als 10 % (Abb. 4-11c). Die Zugabe von geringeren Konzentrationen an NaCl resultiert in einer ähnlichen Abnahme der Aktivität, wenn auch erst nach längerer Zeit. Die NADH:Ubichinon Reduktaseaktivität wird ebenfalls vollständig von 200 mM KCl, LiCl, MgCl_2 , CaCl_2 , Li_2SO_4 und NaNO_3 inhibiert (Daten nicht gezeigt).

4.6 Spaltung des isolierten Komplex I und Charakterisierung der Fragmente

Es war bekannt, daß die FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 des *E. coli* Komplex I in der Cytoplasmamembran nicht mehr ESR spektroskopisch nachweisbar sind, wenn die Membranen in einen Puffer von pH 9,0 gebracht werden (T. Ohnishi, pers. Mitteilung). Um festzustellen, ob bei dieser Behandlung der Komplex I in stabile Fragmente gespalten wird, wurde das Enzym in TrisCl pH 9,0 inkubiert und die Lösung anschließend auf eine Größenausschlußchromatographie in 50 mM Tris/HCl, pH 9,0, 50 mM NaCl, 0,1 % Dodecylmaltosid aufgetragen.

Abb. 4-12 zeigt das Elutionsprofil dieser Größenausschlußchromatographie bei 280 nm und den Verlauf der NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität über die Fraktionen. Bei einem Elutionsvolumen von 65 ml eluiert ein Fragment, was nach Eichung der Säule mit Proteinen bekannter Massen, einer Masse von etwa 170 kDa aufweist. Die SDS Gelelektrophorese der entsprechenden Fraktionen zeigt, daß dieses Fragment aus den Untereinheiten NuoE, F und G besteht, die als einheitlicher Gipfel eluieren. Das Fragment besitzt NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität und enthält die ESR spektroskopisch nachweisbaren FeS Zentren N1b, N1c, N3 und N4 (Abb. 4-13). Es handelt sich bei diesem Fragment um das NADH Dehydrogenase Fragment, welches bereits ausführlich beschrieben wurde (Leif *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1998; Bungert *et al.*, 1999).

Bei einem Elutionsvolumen von etwa 57 ml eluiert ein Fragment, das sich aus den Untereinheiten NuoA bis D und H bis N zusammensetzt. Die Fraktionen zeigen keine nachweisbare NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität. Das Fragment eluiert einheitlich wie ein Protein einer Masse von 750 kDa. Die aus der Sequenz abgeleitete Masse dieser Untereinheiten summiert sich zu 365 kDa, was dafür spricht, daß das Fragment als Dimer vorliegt. Dies wird dadurch unterstützt, daß der nicht gespaltene Komplex I in MES Puffer bei pH 6,0 auf der gleichen Säule schon bei etwa 59 ml eluiert. Das durch die Spaltung des Komplex I bei pH 9,0 erhaltene Fragment wird entsprechend seiner vermuteten Funktion als Chinon Reduktase Fragment bezeichnet und in den folgenden Kapiteln eingehend charakterisiert. Komplex I

wurde unter den gewählten Bedingungen vollständig gespalten. Aus 21 mg Komplex I wurden 13 mg Chinon Reduktase Fragment und 8 mg NADH Dehydrogenase Fragment erhalten.

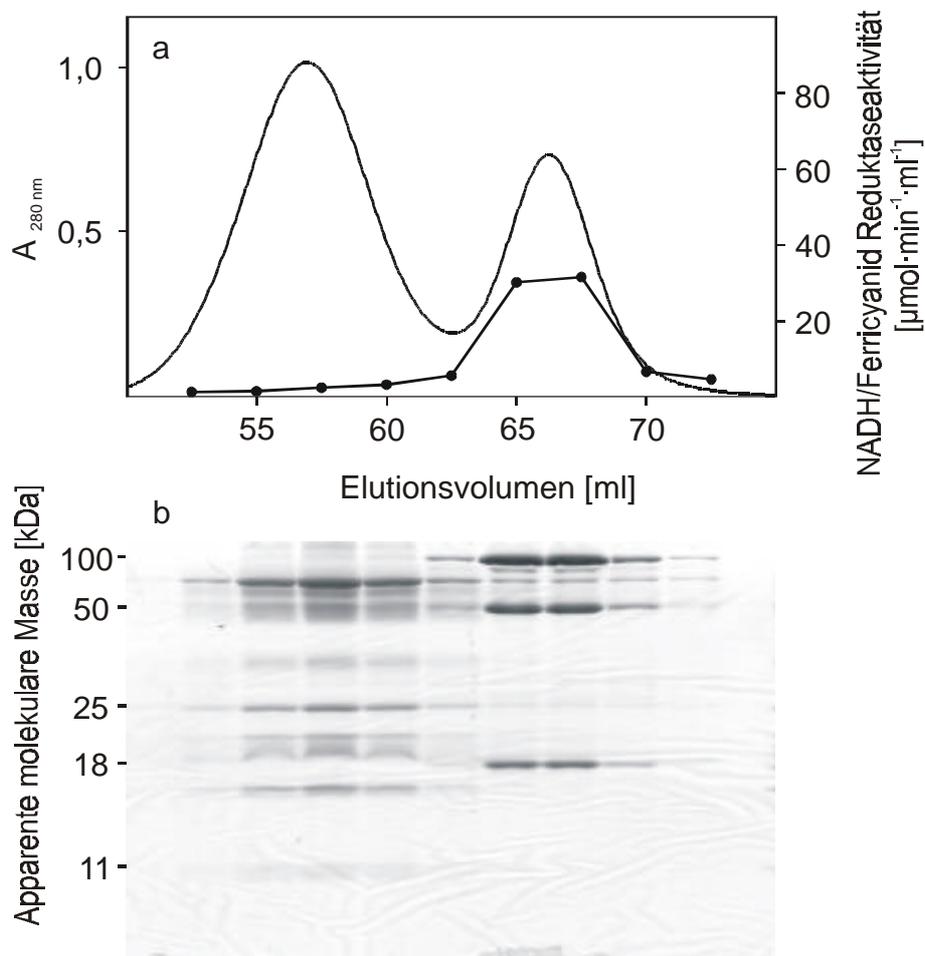


Abbildung 4-12: Spaltung von Komplex I durch Inkubation bei pH 9,0 und Trennung der Fragmente durch Größenausschlußchromatographie. Die durchgezogene Linie zeigt das Elutionsprofil bei 280 nm, die Punktstrich Linie den Verlauf der NADH Ferricyanid Reduktaseaktivität in den einzelnen Fraktionen (a). Die Polypeptidzusammensetzung der Fragmente nach SDS PAGE zeigt (b).

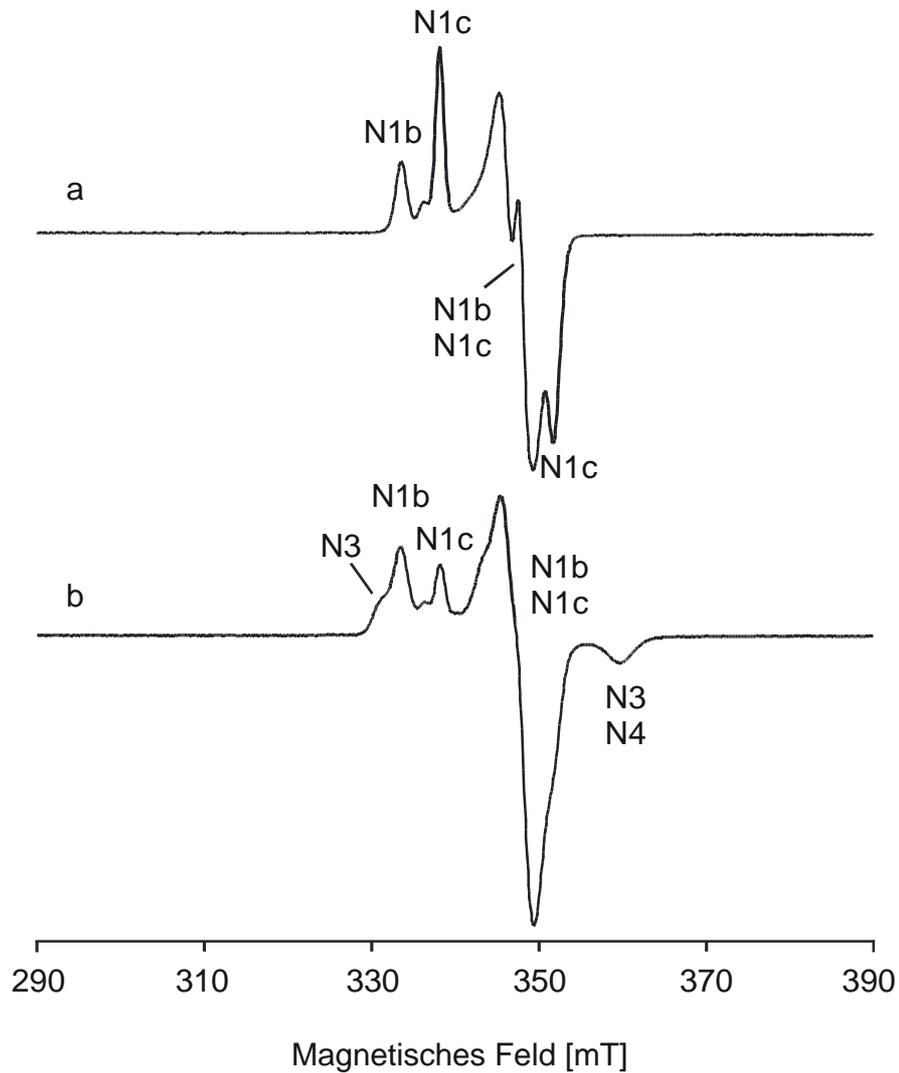


Abbildung 4-13: ESR Spektren des NADH Dehydrogenase Fragmentes nach Spaltung des Komplex I bei pH 9,0. Die Konzentration der Probe beträgt 150 μM , gezeigt sind die Spektren bei 40 K und 2 mW (a) und 13 K und 5 mW (b).

4.7 Die Kofaktoren im Chinon Reduktase Fragment

Im Chinon Reduktase Fragment wurde kein Flavin nachgewiesen, aber Eisen und Sulfid (Tab. 4-2).

Tabelle 4-2: Gehalt der Kofaktoren im Chinon Reduktase Fragment

	mol/mol Chinon Reduktase Fragment	Methode
Flavin	0	Fluorimetrisch (Koziol, 1971)
Fe	10 – 11	TXRF (Kregsamer, 1991)
S	5,5 – 6	Guanidin – Methode (Beinert, 1983)

Im ESR Spektrum des isolierten Chinon Reduktase Fragmentes bei 40 K sind keine Signale zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den Erwartungen, da die Untereinheiten, die die [2Fe2S] Zentren des Komplex I binden, in diesem Fragment nicht mehr vorhanden sind. Im Spektrum, das bei 13 K aufgenommen wurde (Abb. 4-14) sind die Signale des FeS Zentrums N2 zu erkennen ($g_{\parallel} = 2,04$; $g_{\perp} = 1,92$). Sie sind im Vergleich zu denen im Gesamtkomplex geringfügig verschoben ($g_{\parallel} = 2,05$; $g_{\perp} = 1,91$). Die Positionen der Signale von N2 stimmen aber mit denen im isolierten verbindenden Fragment überein ($g_{\parallel} = 2,04$; $g_{\perp} = 1,92$; Leif *et al.*, 1995).

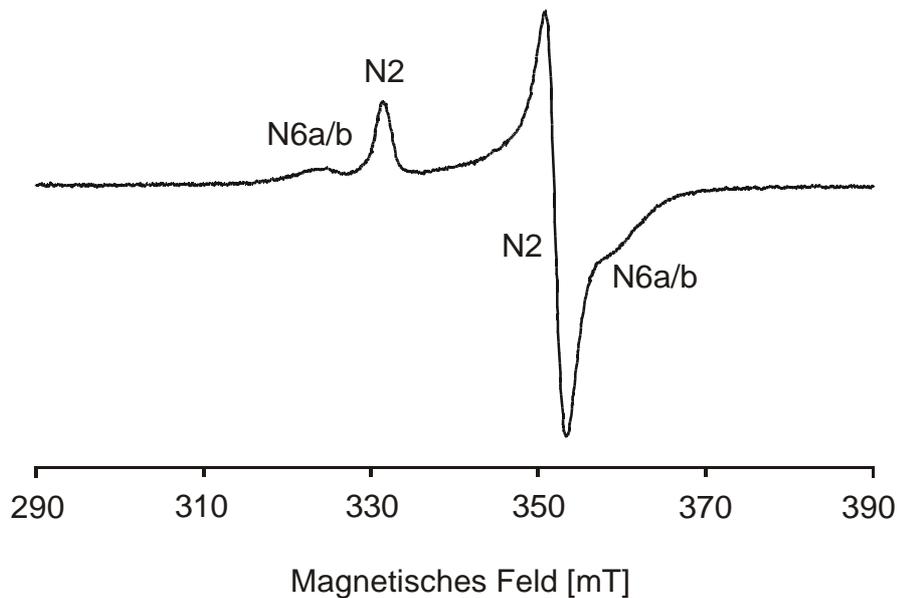


Abbildung 4-14: ESR Spektrum von 80 μM Dithionit-reduziertem Chinon Reduktase Fragment bei 13 K und 5 mW.

Die Quantifizierung des Signals bei $g = 2,05$ über dessen Amplitude zeigt, daß N2 im Vergleich zum Gesamtkomplex nur noch etwa zur Hälfte im Chinon Reduktase Fragment enthalten ist. Ebenfalls zu erkennen ist ein weiteres, schwächeres Signal. Es scheint eine rhombische Symmetrie mit $g_x = 1,88$ und $g_z = 2,086$ zu besitzen. Die g_y -Position ist nicht zu erkennen, da sie von dem g_{\perp} -Signal des Zentrums N2 überlagert ist. Dieses Signal stammt wahrscheinlich von den spin gekoppelten vierkernigen FeS Zentren N6a und N6b, deren Kopplung in dem Fragment teilweise aufgehoben zu sein scheint (Rasmussen *et al.*, 2001). Das Signal ist nicht im Gesamtkomplex nachweisbar und kann deshalb nicht ESR spektroskopisch quantifiziert werden.

Das UV/Vis Absorptionsspektrum des Chinon Reduktase Fragmentes ist in Abb. 4-15 dargestellt. Das Spektrum wird von dem Absorptionsmaximum bei 280 nm dominiert, das von den aromatischen Aminosäuren und den Cysteinen hervorgerufen wird. Neben diesem Maximum enthält das Spektrum Absorptionen im sichtbaren Bereich. Der Einschub zeigt die weniger intensiven Absorptionen im Bereich von 300 bis 600 nm in größerem Maßstab. Diese Absorptionen stammen von den Redoxgruppen

des Chinon Reduktase Fragmentes. Um diese Absorptionen spektral besser aufzulösen, wurden Differenzspektren des Chinon Reduktase Fragmentes aufgenommen.

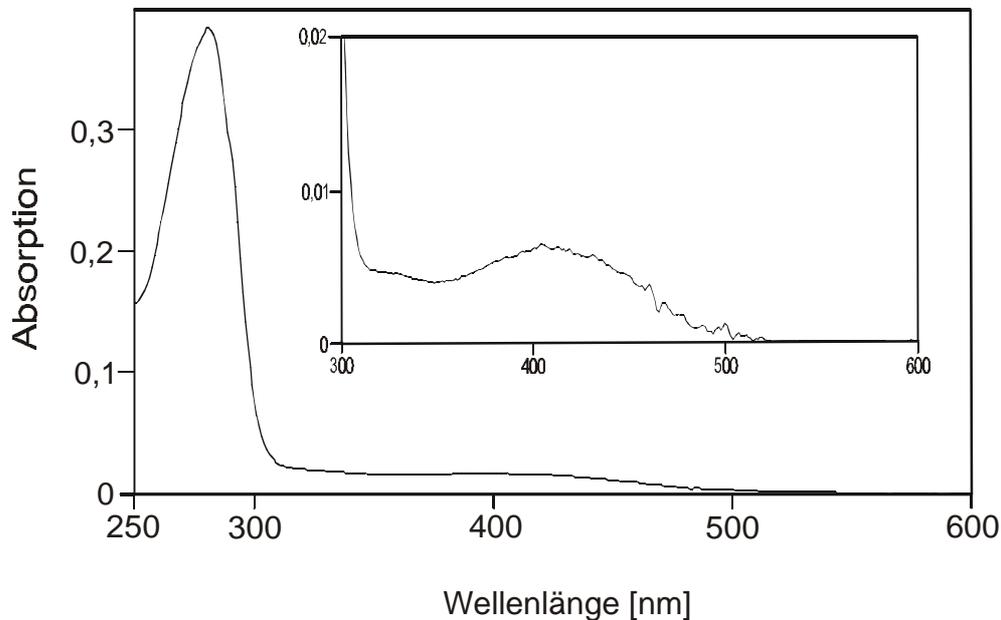


Abbildung 4-15: UV/Vis Absorptionsspektrum von 1 μM Chinon Reduktase Fragment. Der Einschub zeigt den vergrößerten Bereich von 300 bis 600 nm.

Das Chinon Reduktase Fragment kann nur unspezifisch z.B. durch Dithionit reduziert werden, da ihm mit dem NADH Dehydrogenase Fragment das Elektroneneingangsmodul des Komplex I fehlt. Das Dithionit-reduzierte Fragment reoxidiert in Gegenwart von Luftsauerstoff innerhalb von Minuten. Abb. 4-16 zeigt den Verlauf einer solchen Reoxidationskinetik. Die Absorption bei 315 nm beschreibt die aktuelle Konzentration des Dithionits, der Verlauf bei 425 nm gibt den Reduktionsgrad des Fragmentes wieder.

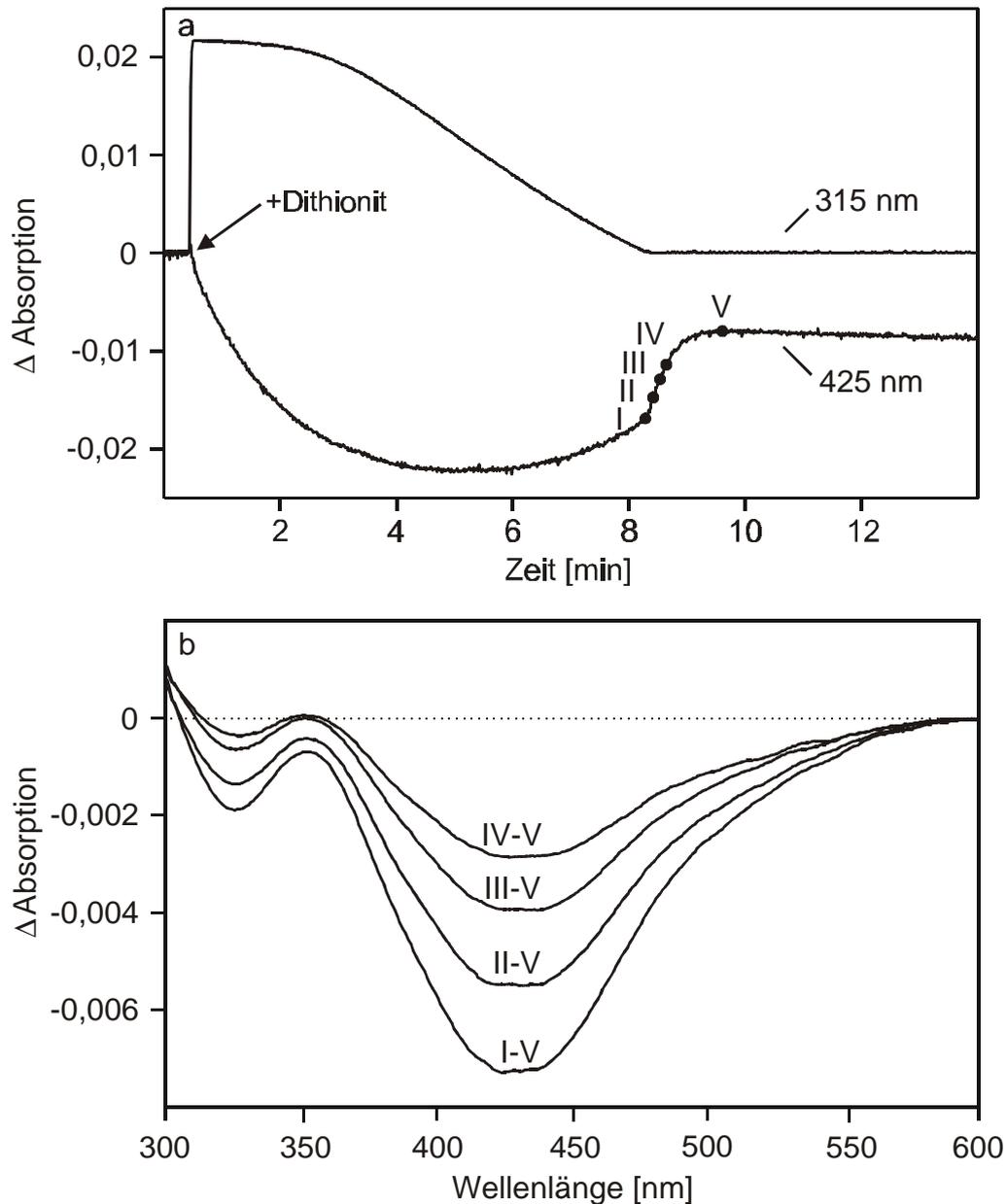


Abbildung 4-16: Reoxidation von Dithionit-reduziertem Chinon Reduktase Fragment (3,5 μ M) durch Luftsauerstoff. (a) Zeitverlauf der Absorption bei 315 (100-fach verkleinert) und 425 nm. (b) Differenzspektren im Verlauf der Reoxidation bezogen auf den Zeitpunkt V.

Die Differenzspektren des partiell reduzierten Fragmentes minus dem fast vollständig reoxidierten Chinon Reduktase Fragment zeigen die typischen Differenzspektren der FeS Zentren N6a und N6b (Rasmussen *et al.*, 2001). Anhand des bekannten Differenzextinktionskoeffizienten dieser Zentren in dem Komplex aus *N. crassa*

wurde der Gehalt dieser Zentren in dem Fragment zu etwa zwei Dritteln des Gehaltes im Gesamtkomplex bestimmt.

Nach vollständiger Reoxidation der FeS Zentren N6a und N6b geht die Absorption des Chinon Reduktase Fragmentes nicht vollständig auf Null zurück (Abb. 4-16). Dies deutet darauf hin, daß die unbekannte Gruppe X in diesem Fragment enthalten sein könnte. Das Differenzspektrum des Chinon Reduktase Fragmentes nach Reoxidation der FeS Zentren N6a und N6b minus dem Spektrum des oxidierten Chinon Reduktase Fragmentes vor Dithionit Zugabe zeigt eine positive Absorption bei 300 nm und eine breite negative Absorption bei 410 nm (Abb. 4-17). Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß diese Absorptionen von den zerfallenen FeS Zentren oder Flavin herrühren.

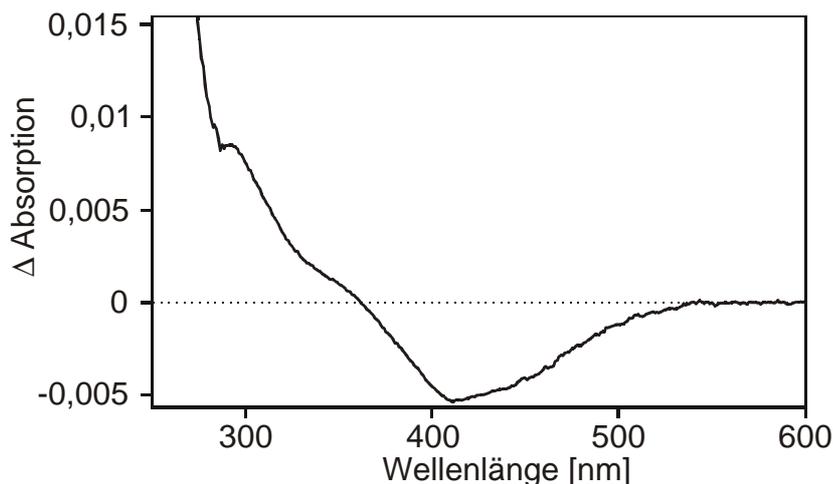


Abbildung 4-17: Differenzspektrum des teilweise reoxidierten Chinon Reduktase Fragmentes (1 μ M) minus dem Spektrum des oxidierten Chinon Reduktase Fragmentes vor Dithionit Zugabe.

Deshalb wurde versucht, die FeS Zentren durch Dialyse des Fragmentes gegen EDTA haltigen Puffer zu entfernen. Um das Protein, das bei der Dialyse möglicherweise aggregiert, abzutrennen, wurde die Probe des Chinon Reduktase Fragmentes nach der Dialyse zentrifugiert und der Überstand über eine Größenausschlußchromatographiesäule pH 9,0 aufgetrennt. Mehr als 90 % des Fragmentes eluierte als einheitliches Teilchen bei dem gleichen Volumen wie vor der

Dialyse und enthielt alle erwarteten Untereinheiten (Daten nicht gezeigt). In Abb. 4-18 ist das ESR Spektrum des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes dargestellt. Die restlichen Signale stammen ausschließlich von dem FeS Zentrum N2. Die Quantifizierung der Signale über die Amplitude ergab, daß der Gehalt von N2 im dialysierten Chinon Reduktase Fragment im Vergleich zu dem Gesamtkomplex weniger als 5 % beträgt. Es sind keine Signale der FeS Zentren N6a und N6b zu erkennen.

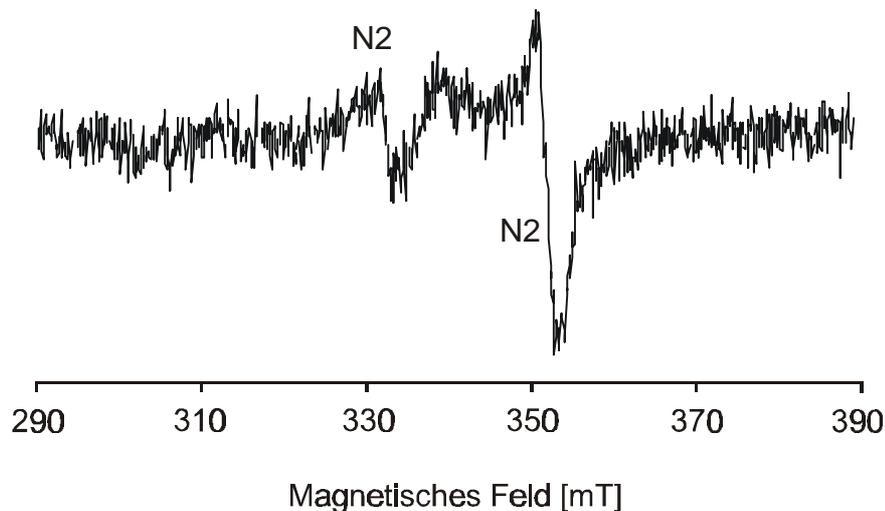


Abbildung 4-18: ESR Spektrum des dialysierten 12 μM Chinon Reduktase Fragmentes bei 13 K und 5 mW.

Das UV/Vis Spektrum des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes zeigt neben der Proteinabsorption bei 280 nm deutliche Gipfel bei 320 und 425 nm. Während die Extinktion bei 425 nm durch die Dialyse nicht beeinflusst wird, erhöht sich die Extinktion bei 320 nm. Dies zeigt, daß das dialysierte Chinon Reduktase Fragment neben den FeS Zentren einen weiteren Chromophor enthält, der im sichtbaren Bereich absorbiert (Abb. 4-19). Die erhöhte Extinktion bei 320 nm ist wahrscheinlich auf eine Eintrübung der Probe während der Messung zurückzuführen. Dies zeigt sich auch an der erhöhten Extinktion bei 250 nm. Anscheinend ist das dialysierte Chinon Reduktase Fragment bei geringen Konzentrationen nicht über einen längeren Zeitraum stabil.

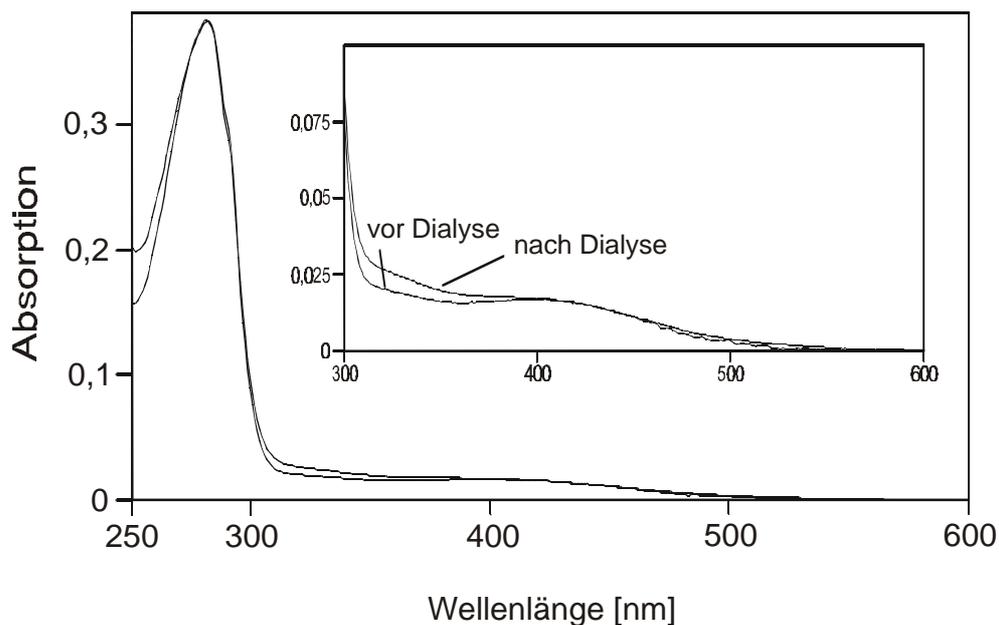


Abbildung 4-19: UV/Vis Absorptionsspektren von 1 μM Chinon Reduktase Fragment vor und nach Dialyse gegen EDTA. Der Einschub zeigt den vergrößerten Bereich von 300 bis 600 nm.

Das dialysierte Chinon Reduktase Fragment wurde mit Dithionit reduziert und durch Luftsauerstoff reoxidiert. Abb. 4-20a zeigt den Verlauf dieser Reoxidationskinetik. Der in dem Fragment vorhandene Chromophor ist redoxaktiv, wie durch den Zeitverlauf bei 425 nm deutlich wird. Das UV/Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektrum nach Reoxidation des Dithionits minus dem Spektrum vor Dithionit Zugabe (Abb. 4-20b) zeigt eine positive Absorption bei 300 nm und eine scharfe negative Absorption um 420 nm mit einer Schulter bei 350 nm. Der Bereich um 280 nm könnte aufgrund der oben beschriebenen Instabilität des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes Ungenauigkeiten bei der Differenzbildung aufweisen. Das typische Differenzspektrum der FeS Zentren N6a und N6b ist nicht mehr nachzuweisen. Diese Zentren sind durch die Dialyse vollständig entfernt worden. Das Spektrum des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes hat große Ähnlichkeit mit dem der Gruppe X im Gesamtkomplex I aus *N. crassa* (Abb. 1-6); es enthält demnach noch die Gruppe X als Chromophor.

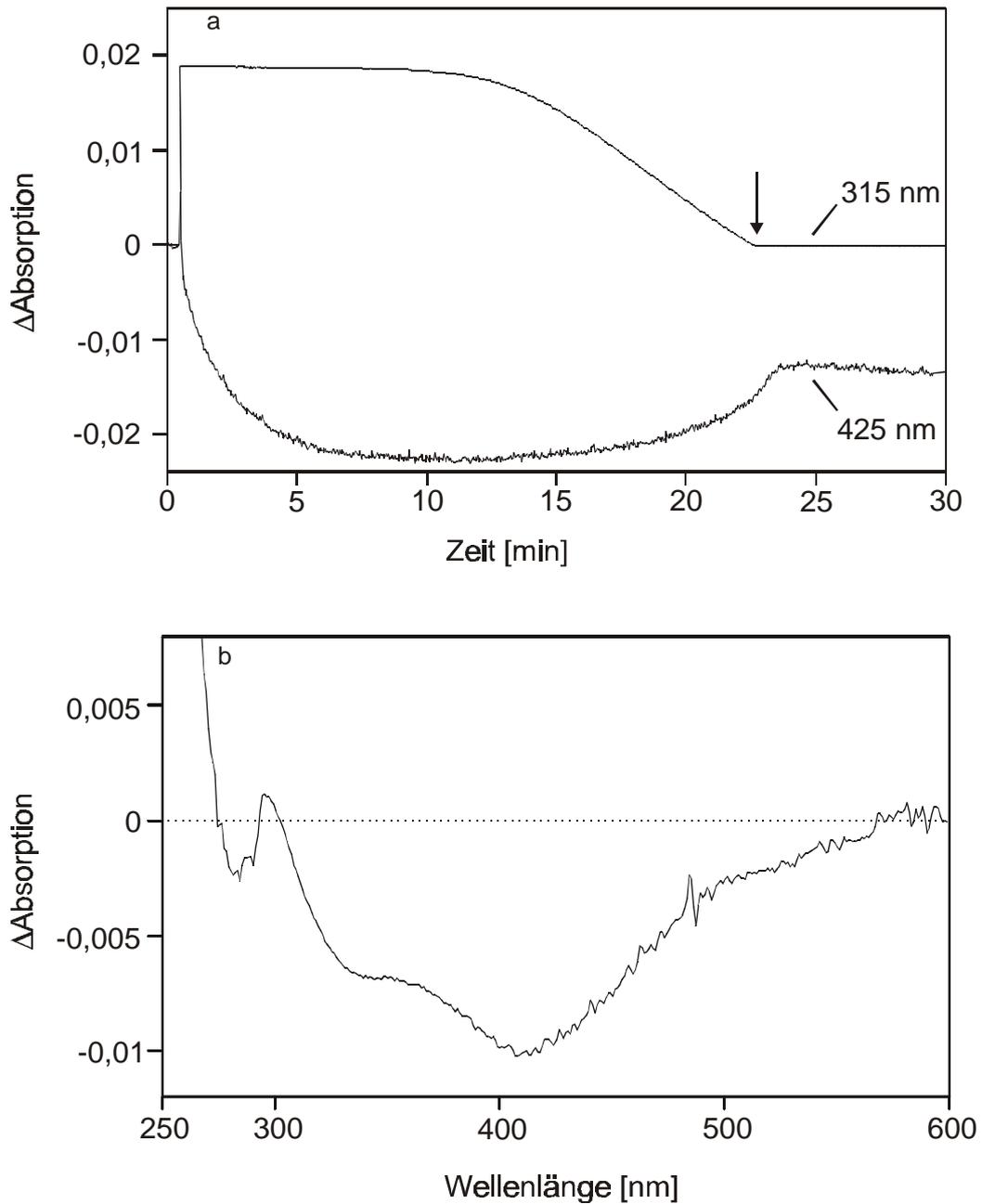


Abbildung 4-20: Reoxidation von 3 μ M Dithionit-reduziertem dialysiertem Chinon Reduktase Fragment durch Luftsauerstoff. (a) Zeitverlauf der Absorptionen bei 315 (100-fach verkleinert) und 425 nm. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem das Spektren für die Berechnung des Differenzspektrums in (b) aufgenommen wurde. (b) Differenzspektrum des teilweise reoxidierten Chinon Reduktase Fragmentes nach 23 Minuten minus dem Spektrum des Chinon Reduktase Fragmentes vor Dithionit Zugabe.

Von dem dialysierten Chinon Reduktase Fragment in einem Tris/HCl Puffer pH 9,0 wurden in einer elektrochemischen Dünnschichtzelle Vis Differenzspektren bei Potentialen von -400 bis 0 mV in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm aufgenommen (Abb. 4-21a). Als Referenz diente das Spektrum von -400 mV. Die Differenzspektren stimmen im vergleichbaren Meßbereich von 400 bis 600 nm mit dem Differenzspektrum der Gruppe X, das nach Reduktion des Chinon Reduktase Fragmentes mit Dithionit erhalten wurde, überein. Aufgrund des geringen Signal/Rausch Verhältnisses war es aber nicht möglich, eine eindeutige Titrationskurve des Chromophors zu erstellen. Je nach spektraler Position, die für die Titrationskurve herangezogen wurde, läßt sich die Kurve auch als Beitrag von zwei unabhängigen Komponenten an zwei theoretische Nernst-Kurven anpassen. Unter Vernachlässigung der Komponente mit dem geringeren Beitrag wurde das Mittenpotential des Chromophors zu etwa -100 ± 30 mV abgeschätzt. Demnach würde der Chromophor eine 2 Elektronenübertragungsreaktion katalysieren. Das gleiche Experiment wurde mit einem Aliquot des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes, das vorher in 50 mM MES/NaOH, pH 6,5 umgepuffert wurde, durchgeführt (Abb. 4-21b). Das Differenzspektrum des Chinon Reduktase Fragmentes bei pH 6,5 unterscheidet sich deutlich von dem Spektrum bei pH 9,0 (Abb. 4-21b). So verschiebt sich die negative Absorption von 447 nm zu 457 nm, und es tritt eine neue positive Absorption bei etwa 608 nm auf. Allerdings sind die Spektren beider Proben aufgrund der für die geringe Schichtdicke zu geringen Proteinkonzentration stark verrauscht, so daß die Lage der Absorptionsbanden nur abgeschätzt werden konnten.

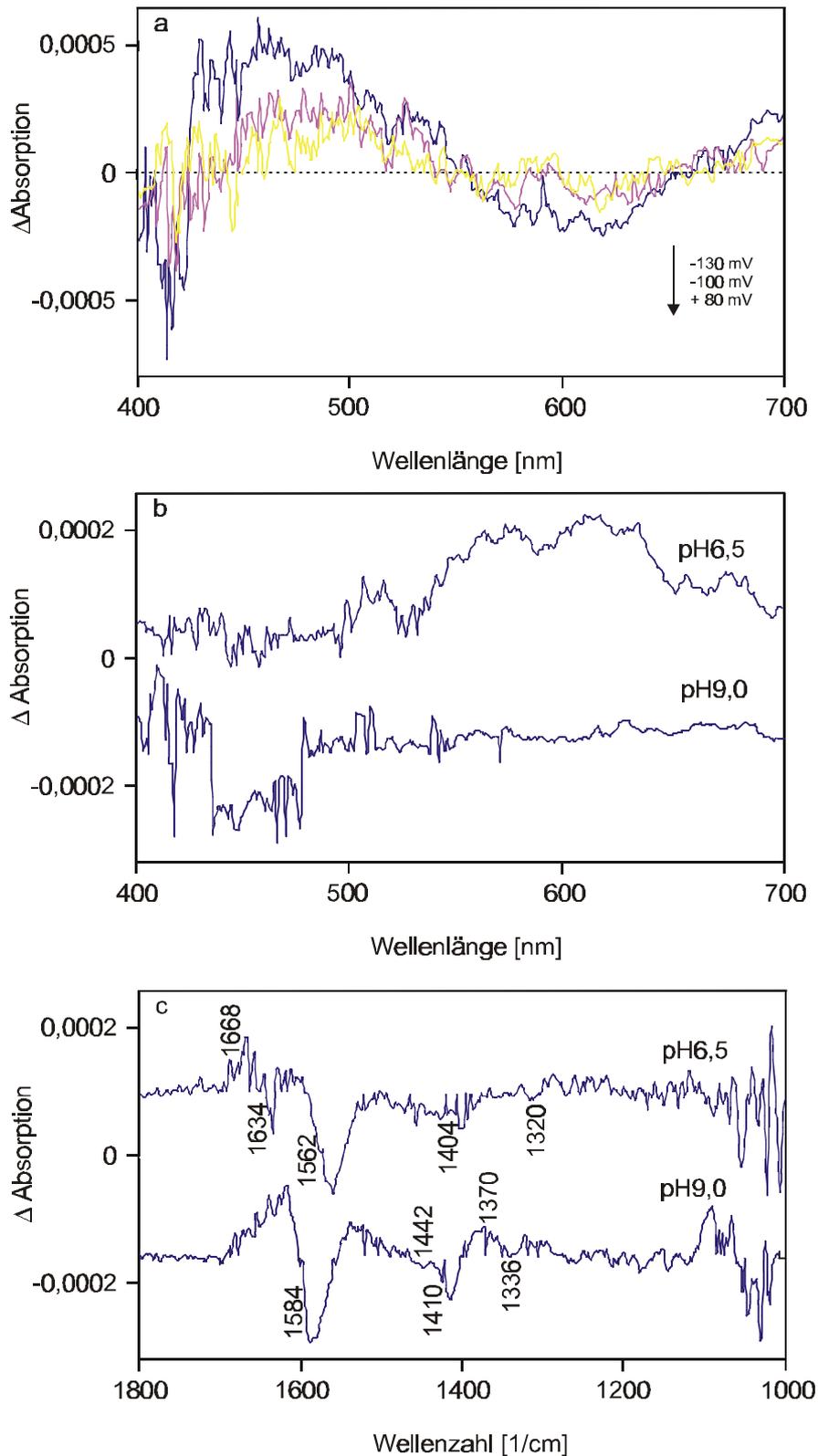


Abbildung 4-21: Elektrochemische Titration von 200 μM dialysiertem Chinon Reduktase Fragment. Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektren in TrisCl pH 9,0 bei den angegebenen Potentialen (a). Vis (reduziert-minus-oxidiert) Differenzspektren (b) und FT-IR (oxidiert-minus-reduziert) Differenzspektren (c) des Chinon Reduktase Fragmentes bei pH 9,0 bzw. pH 6,5 bei einem Potentialschritt von -400 mV nach 0 mV.

Die FT-IR Differenzspektren des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes bei pH 6,5 und pH 9,0 zeigen ebenfalls, daß sich die chemische Struktur des Chromophors durch den Wechsel des pH-Wertes geändert hat (Abb. 4-21c). So sind die Absorptionen der C=C Ringschwingungen und möglicherweise daran gekoppelten CH-Schwingungen bei 1584 und 1410 Wellenzahlen des Chinon Reduktase Fragmentes bei pH 9,0, bei pH 6,5 zu kleineren Wellenzahlen (1562 und 1404) verschoben. Die Banden um 1336 Wellenzahlen könnten von OH-Gruppen stammen und sind im Spektrum des Chinon Reduktase Fragmentes bei pH 6,5 zu 1320 cm^{-1} verschoben. Zusätzlich treten neue Banden bei 1668 und 1634 cm^{-1} auf, bzw. sind die Absorptionen bei 1442 und 1370 Wellenzahlen nicht mehr nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, daß der Chromophor möglicherweise durch den pH-Wechsel mit einer benachbarten Gruppe reagiert hat.

Um zu überprüfen, ob die Gruppe X möglicherweise kovalent an das Chinon Reduktase Fragment gebunden ist, wurde das Fragment mit SDS inkubiert und UV/Vis Spektren der so behandelten Probe aufgenommen. Durch Behandlung mit dem Detergenz SDS wird das Protein entfaltet. Ein kovalent gebundener Kofaktor bleibt nach der Behandlung mit SDS an dem Protein gebunden, während ein über schwache Wechselwirkungen gebundener Kofaktor verloren gehen sollte. Das UV/Vis Absorptionsspektrum des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes zeigt, daß durch die Inkubation mit SDS die breiten Absorptionsbanden um 325 und 410 nm zwar kleiner, aber nicht vollständig gebleicht werden (Abb. 4-22). Der Chromophor in dem mit SDS inkubierten dialysierten Chinon Reduktase Fragment war nicht mehr durch Dithionit reduzierbar (Daten nicht gezeigt).

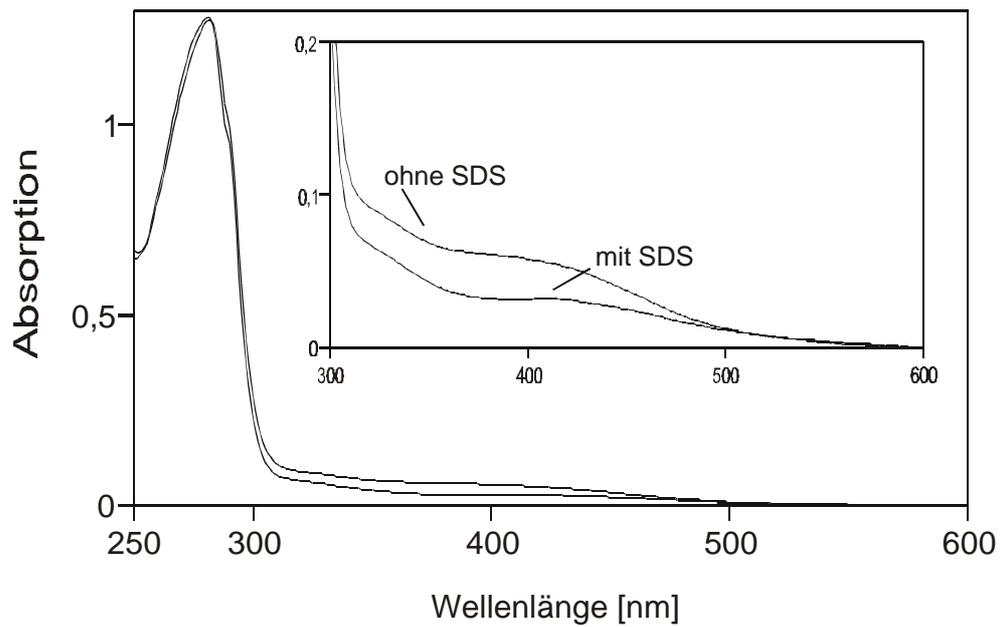


Abbildung 4-22: UV/Vis Absorptionsspektren des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes ($3 \mu\text{M}$) vor und nach Inkubation mit 2 % SDS (w/v). Das Spektrum des Proteins mit SDS wurde gegen die Absorption einer SDS Lösung korrigiert. Der Einschub zeigt den vergrößerten Bereich von 300 bis 600 nm.

5. Diskussion

5.1 Die Konformationen des *E. coli* Komplex I

Der Komplex I überträgt Elektronen vom wasserlöslichen NADH auf das hydrophobe Ubichinon. Dazu benötigt das Enzym einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil. Die senkrechte Anordnung dieser Teile zueinander, die aus der ungewöhnlichen L-Form des Komplexes resultiert, wurde zuerst beim mitochondrialen Komplex I von *N. crassa* beobachtet (Hofhaus *et al.*, 1991). Sie wurde später mit einigen Abweichungen in den Details für den Komplex I von *E. coli*, *B. taurus* und *Y. lipolytica* bestätigt (Guénebaut *et al.*, 1998; Grigorieff, 1998; Djafarzadeh *et al.*, 2000) und ist allgemein akzeptiert (Weiss *et al.*, 1991; Walker, 1992; Friedrich *et al.*, 1995; Brandt, 1997; Grigorieff, 1999; Sazanov und Walker, 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die L-förmige Konformation nur eine von mindestens zwei stabilen Formen des Komplex I ist. In der hier beschriebenen Konformation, der sogenannten Hufeisen-Konformation, sind der periphere Arm und der Membranarm nicht senkrecht zueinander angeordnet, sondern Seite an Seite (Abb. 4-7).

Die bekannte L-förmige Struktur des Komplexes zeigt sich bei hoher Ionenstärke des Puffers. Wie in dem bekannten Modell des *E. coli* Komplex I (Guénebaut *et al.*, 1998) haben beide Arme etwa die gleiche Länge, allerdings ist in dem hier vorgestellten Modell der periphere Arm besonders an der Verbindung zu dem Membranarm deutlich dicker. Dies steht in Übereinstimmung mit den Modellen des mitochondrialen Komplexes. Die Unterschiede zwischen dem alten und dem hier gezeigten L-förmigen Modell kommt möglicherweise dadurch zustande, daß das Protein in Goldthioglukose besser und vollständiger eingebettet ist, was ein geringeres Abflachen der Partikel bedingt.

Um den peripheren Arm und den Membranarm in dem neuen Modell zu lokalisieren, wurde ein Modell des Chinon Reduktase Fragmentes berechnet, dem das NADH Dehydrogenase Fragment fehlt. Da das NADH Dehydrogenase Fragment über das verbindende Fragment mit dem Membranfragment verbunden ist, reichte die Lokalisation des NADH Dehydrogenase Fragmentes aus, um die übrigen Fragmente zu lokalisieren. Eine Voraussetzung für die Zuordnung eines fehlenden Fragmentes

durch Vergleich von Bildern ist, daß sich die räumliche Anordnung des übrigen Modells nicht ändert. Dies war für Komplex I und das Chinon Reduktase Fragment nicht gegeben, wie sich schon alleine durch die unterschiedliche Krümmung des Membranarms in den drei Modellen zeigt (Abb. 4-7). Deshalb wurden die Fragmente aufgrund ihrer Ähnlichkeit einander zugeordnet.

Drei der vier Domänen haben im Komplex I bei niedriger Ionenstärke und im Chinon Reduktase Fragment eine ähnliche Größe, Gestalt und räumliche Anordnung. Die vierte Domäne ist im Fragment sehr viel kleiner als im Gesamtenzym (Abb. 4-7, bezeichnet mit N). Diese Domäne wurde dem NADH Dehydrogenase Fragment zugewiesen. Das amphipatische verbindende Fragment muß an der einen peripheren Domäne gebunden sein (Abb. 4-7, bezeichnet mit C), die mit dem NADH Dehydrogenase Fragment zusammenhängt. Das Membranfragment stimmt mit der anderen peripheren Domäne (Abb. 4-7, bezeichnet mit T) und der Verbindungsregion (Abb. 4-7, bezeichnet mit L) überein. Das konservierte Hydrogenase Modul, das Untereinheiten des verbindenden Fragmentes und des Membranfragmentes enthält, entspricht der verbindenden Region (Abb. 4-7, bezeichnet mit L) und der oberen peripheren Domäne (Abb. 4-7, bezeichnet mit C). Die verbleibende Domäne stellt das Transporter Modul dar. Diese Anordnung ist in Abb. 5-1 zusammengefaßt.

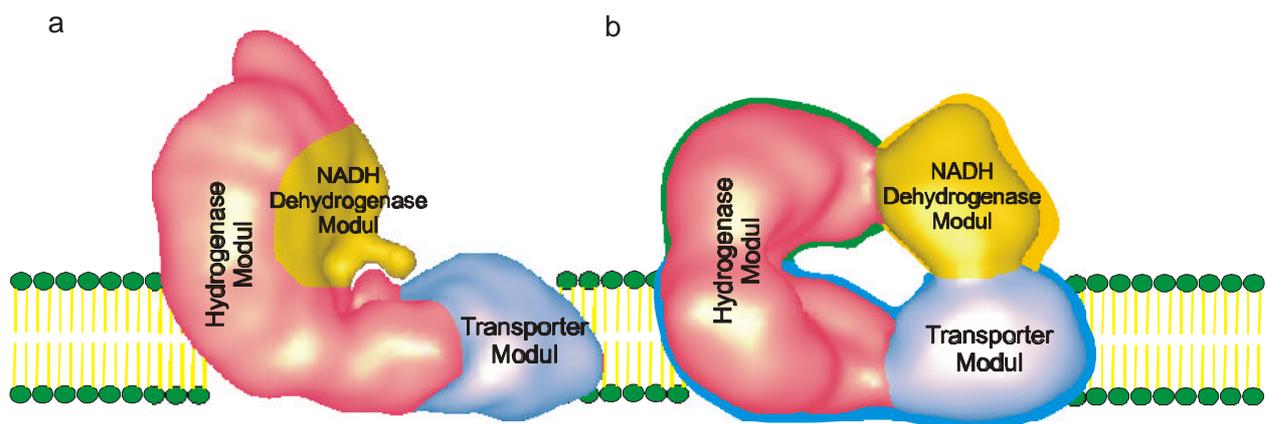


Abbildung 5-1: Modelle der Komplex I Konformationen in einem Puffer hoher (a) und niedriger (b) Ionenstärke.

Zwischen den beiden Modellen von Komplex I bei hoher bzw. niedriger Ionenstärke gab es keine direkt sichtbare Beziehung. Trotzdem weichen die Volumina der berechneten Modelle um weniger als 7 % voneinander ab, was ausschließt, daß die unterschiedlichen Modelle aufgrund eines unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades des Komplexes erhalten wurden. Dies wird durch die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation bestätigt. Die Position des Membranarms wurde aufgrund der Größe und der Gestalt zugeordnet. Der verbleibende Teil zeigte keine Ähnlichkeit zwischen den beiden Modellen. Bei niedriger Ionenstärke war das NADH Dehydrogenase Fragment deutlich von dem verbindenden Fragment zu unterscheiden (Abb. 4-7), während bei hoher Ionenstärke nur eine periphere Domäne zu erkennen war. Es ist daher anzunehmen, daß das NADH Dehydrogenase Fragment bei hoher Ionenstärke teilweise in dem verbindenden Fragment verborgen ist und so als einheitlicher peripherer Arm erscheint. Bei niedriger Ionenstärke dagegen sollte das NADH Dehydrogenase Fragment „ausklappen“ und mit dem Teil des Membranfragmentes in Kontakt kommen, der das Transporter Modul darstellt.

Bislang ist unklar, wie die Konformationsänderung hervorgerufen wird. Eine Arbeitshypothese ist, daß die Hufeisen-Konformation die native Konformation des Komplexes ist (s. unten). Das bei der Isolation des Komplexes benötigte Detergenz könnte mögliche hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem NADH Dehydrogenase Modul und dem Transporter Modul schwächen und zu einer „Öffnung“ der Hufeisenform führen. Oberflächenladungen auf dem peripheren Arm könnten das NADH Dehydrogenase Fragment zwingen, in Kontakt mit dem verbindenden Fragment zu treten, während die Oberflächenladungen des Membranarms durch die Ionenstärke des Puffers kompensiert werden. So würde aus der Hufeisen-Konformation die L-förmige Konformation entstehen. Eine Verringerung der Ionenstärke des Puffers könnte dazu führen, daß die Oberflächenladungen des Membranarms nicht mehr kompensiert werden können und sich das NADH Dehydrogenase Fragment in seine native Position zurücklagern muß. Die unphysiologisch niedrige Ionenstärke würde somit eine unphysiologische Konformation, die durch den Zusatz des Detergenz entstanden ist, korrigieren.

Dieser rein spekulative Mechanismus wird durch zwei Beobachtungen unterstützt. Zum ersten eluiert das Chinon Reduktase Fragment bei 700 mM NaCl von einer Anionenaustauschchromatographie, während der Komplex I bei 280 mM eluiert. Dies zeigt, daß das NADH Dehydrogenase Fragment eine hohe Ladungsdichte auf dem restlichen Komplex I abschirmt. Zum zweiten hängt die Löslichkeit des Komplex I in Gegenwart von PEG 4.000 stark von der Proteinkonzentration ab (Daten nicht gezeigt). Bei höheren Proteinkonzentrationen verschiebt sich der Übergang zwischen beiden Konformationen zu höheren Salzkonzentrationen. Dies zeigt, daß die Ladungsdichte auf der Oberfläche des Komplexes in der gleichen Größenordnung wie die Ionenstärke des Puffers liegt.

Die Fällkurven mit PEG 4.000 und die Daten der analytischen Ultrazentrifugation zeigen, daß nur die beiden beschriebenen Konformationen über einen längeren Zeitraum stabil sind (Abb. 4-5). Es wurden weder Fällkurven mit zusätzlichen Wendepunkten registriert, noch mehr als zwei Fronten in den Experimenten zur Sedimentationsgeschwindigkeit beobachtet. Der Wechsel zwischen den beiden Konformationen war vollständig reversibel und wurde lediglich durch die Ionenstärke des Puffers unabhängig von der chemischen Natur des Salzes induziert. Dies schließt aus, daß die Konformationsänderung auf Fähigkeit des Komplex I beruht, Na⁺ Ionen zu pumpen, wie es für den *E. coli* Komplex vorgeschlagen wurde (Steuber *et al.*, 2000).

In allen drei Modellen ist der Membranarm des Komplexes unterschiedlich stark gekrümmt. Bei hoher Ionenstärke ist der Membranarm ausgestreckt, während er bei niedriger Ionenstärke am stärksten gekrümmt ist. Eine ähnliche Krümmung wird im mitochondrialen Komplex I beobachtet, der in zweidimensionalen Membrankristallen rekonstituiert wurde (Hofhaus *et al.*, 1991; Sazanov und Walker, 2000). In einem Modell, das aus zweidimensionalen Kristallen des *N. crassa* Komplex I erhalten wurde, ist der periphere Arm etwa 90 Å von der Membran erhoben (Leonard *et al.*, 1987), was im Einklang zur Höhe des peripheren Arm in der Hufeisen-Konformation von etwas über 80 Å steht.

Komplex I in detergenzhaltiger Lösung ist in der Hufeisen-Konformation enzymatisch aktiv, während er in der L-Konformation inaktiv ist (Abb. 4-11). Letzteres könnte entweder an einer Unterbrechung im Elektronenweg zwischen dem FeS Zentrum N2 und Ubichinon liegen oder an einer Unzugänglichkeit der Ubichinon Bindestelle. In 50 mM MES/NaOH, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,15 % Dodecylmaltosid werden alle bekannten Kofaktoren des *E. coli* Komplex I durch NADH reduziert (Leif *et al.*, 1995). Dies bedeutet, daß die Elektronen innerhalb des Komplexes bis zu dem vermuteten Elektronenausgang gelangen können. Die hier vorgestellte Konformationsänderung innerhalb des Hydrogenase Moduls, das wahrscheinlich die Ubichinon Bindestelle enthält (Dupuis *et al.*, 2001; Friedrich, 2001), könnte die Fähigkeit zur Ubichinon Bindung beeinflussen.

Bisher konnten im mitochondrialen Komplex I von *N. crassa* keine entsprechenden Konformationsänderungen nachgewiesen werden (K. Leonard, pers. Mitteilung). Dies könnte an den 27 zusätzlichen Untereinheiten liegen, die die Konformation des Komplexes stabilisieren. Allerdings wurde eine aktive und eine inaktive Form des Komplex I in Mitochondrien beschrieben (Vinogradov, 1998; Grivennikova *et al.*, 2001). Der Wechsel zwischen den der aktiven und der inaktiven Form des Komplex I könnte eine Rolle bei seiner Regulation spielen (Kotlyar *et al.*, 1992; Grivennikova *et al.*, 2001). Die molekularen Grundlagen, die die aktive und inaktive Form des mitochondrialen Komplex voneinander unterscheiden, sind nicht verstanden. Ein reversibler Wechsel zwischen der aktiven und der inaktiven Konformation, vergleichbar mit dem in dieser Arbeit für den *E. coli* Komplex I beschriebenen, würde eine vernünftige Erklärung liefern.

Auch aus anderen Experimenten ist bekannt, daß Komplex I verschiedene Konformationen annehmen kann. In den meisten Fällen wird der Wechsel der Konformationen durch die Reduktion mit NADH induziert. Nach der Reduktion sind das Schema der tryptischen Spaltung von Komplex I Untereinheiten (Yamaguchi *et al.*, 1998), das Crosslink-Muster unter Verwendung bifunktionaler Reagenzien (Belogradov und Hatefi, 1994) und das Labelling Muster mit Photoaffinitätsinhibitoren (Gondal und Anderson, 1985) verändert. Vor kurzem wurden durch FT-IR Spektroskopie große Strukturänderungen in der oxidierten und in der reduzierten Form des Komplexes nachgewiesen (Hellwig *et al.*, 2000). Es ist unklar, ob diese

Konformationsänderungen mit den hier beschriebenen in Zusammenhang stehen. Falls ja, würde dies bedeuten, daß die Konformationsänderung für den Mechanismus von Komplex I von Bedeutung ist.

5.2 Die unbekannte Redoxgruppe im Chinon Reduktase Fragment des Komplex I

In dieser Arbeit wurde der Komplex I durch Inkubation bei pH 9,0 in das Chinon Reduktase Fragment und das NADH Dehydrogenase Fragment gespalten und die beiden Fragmente durch Größenausschlußchromatographie voneinander getrennt (Abb. 4-12). Das Chinon Reduktase Fragment setzt sich aus den Untereinheiten NuoA bis D und H bis N zusammen und enthält die FeS Zentren N2, N6a und N6b (Abb. 4-12, 4-14). Bezogen auf den Gesamtkomplex I ist N2 nur noch zu etwa 50 % und die Zentren N6a und N6b zu 65 % im Chinon Reduktase Fragment enthalten. Nach Dialyse gegen EDTA wurde das Chinon Reduktase Fragment durch Größenausschlußchromatographie von Aggregaten abgetrennt und spektroskopisch charakterisiert. Die FeS Zentren N6a und N6b waren spektroskopisch nicht mehr nachweisbar und der Gehalt des FeS Zentrums N2 auf unter 5 % gesunken (Abb. 4-18). Die Absorptionen des so behandelten Chinon Reduktase Fragmentes im sichtbaren Bereich stammen daher von einem bislang unbekanntem Chromophor, bei dem es sich wahrscheinlich um die bereits im *N. crassa* Komplex I beschriebene Gruppe X handelt (Schulte *et al.*, 1998; Abb. 1-6). Das UV/Vis Dithionit-reduzierte minus Luft-oxidierte Differenzspektrum des Chinon Reduktase Fragmentes (Abb. 4-20b) entspricht in etwa dem der Gruppe X, wie es im *E. coli* Gesamtkomplex I nachgewiesen wurde (Abb. 5-2; Scheide, 2000).

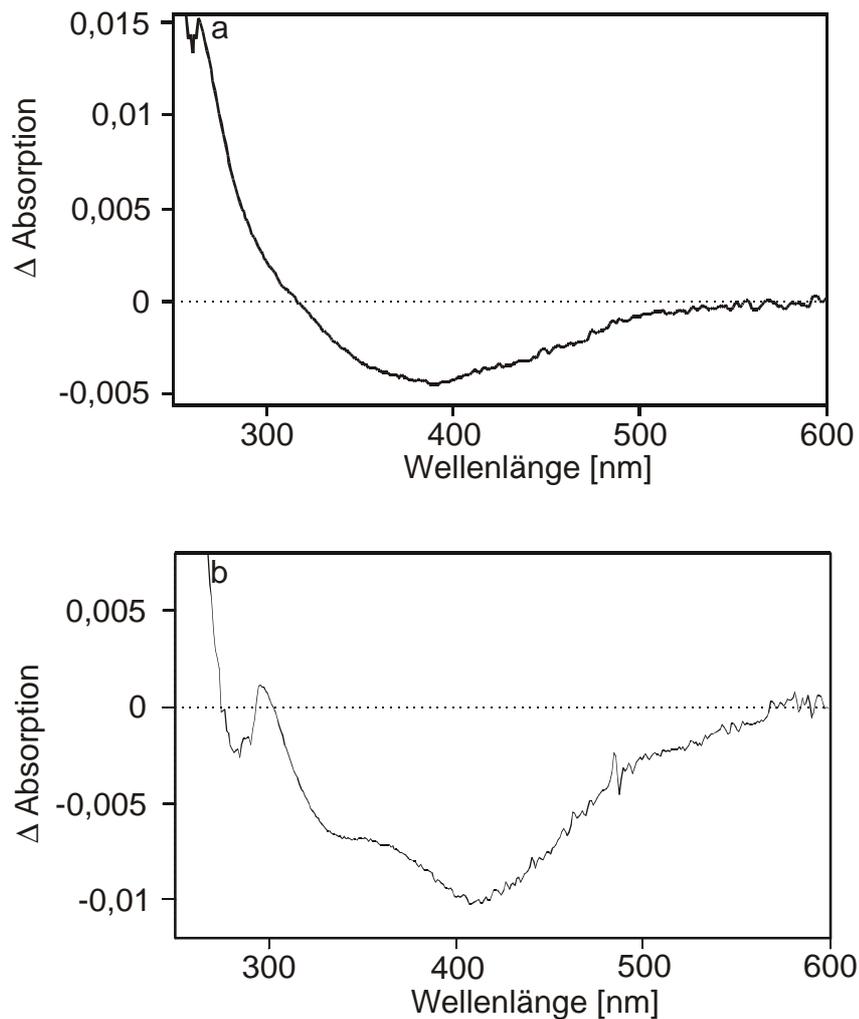


Abbildung 5-2: UV/Vis Differenzspektrum der Redoxgruppe X in $2,6 \mu\text{M}$ *E. coli* Komplex I (nach Scheide, 2000) (a) und im $3 \mu\text{M}$ dialysierten Chinon Reduktase Fragment (b).

Durch elektrochemisch induzierte Redoxtitration des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes wurde versucht, das Mittenpunktpotential der Gruppe X zu bestimmen. Dies war aufgrund des geringen Signal/Rausch Verhältnisses nicht möglich, das Mittenpotential konnte nur zu $-100 \pm 30 \text{ mV}$ abgeschätzt werden. Es war nicht möglich, eine Änderung des abgeschätzten Mittenpotentials bei Änderung des pH-Wertes zu messen. Der Chromophor scheint bei Wechsel des pH von 9,0 auf 6,5 mit seiner Umgebung zu reagieren. So unterscheiden sich sowohl die Vis- als auch die IR-Differenzspektren des Chinon Reduktase Fragmentes bei pH 9,0 und 6,5 (Abb. 4-21). Im Amid I Bereich um 1650 cm^{-1} sind im IR-Differenzspektrum dagegen nur wenige, schwache Banden zu sehen. Dies zeigt, daß das Protein bei beiden

pH-Werten nicht etwa aufgrund der Redoxreaktion denaturiert. Die Potentialkurven des Chinon Reduktase Fragmentes konnten auch als Summe der Titrationskurven zweier Komponenten angepaßt werden, was dafür spricht, daß ein Teil des Chinon Reduktase Fragmentes reagiert haben könnte. Da sowohl die Struktur des Chromophors als auch seine Umgebung völlig unbekannt sind, kann keine Aussage über die mögliche chemische Reaktion gemacht werden.

Es ist unbekannt, ob die Gruppe X kovalent an das Protein gebunden ist. Das UV/Vis Absolutspektrum des dialysierten Chinon Reduktase Fragmentes zeigt das UV/Vis Spektrum dieser Gruppe. Sie ist auch nach Dialyse nicht zu entfernen. Durch Inkubation mit dem Detergenz SDS wurde die Absorption der Gruppe X gebleicht, ohne daß sich dabei die Form des Spektrums der Gruppe X änderte (Abb. 4-22). Durch die Entfaltung des Proteins durch SDS kann es zu Absorptionsänderungen kommen, weil Aminosäuren, die Wechselwirkungen mit der Gruppe X eingehen, sich nicht mehr in der Nähe der Bindestelle aufhalten. Da die Form des Spektrums durch SDS Zugabe nicht wesentlich verändert wird, könnte die Gruppe X kovalent an das Enzym gebunden sein. Für diese Gruppe X wird eine chinoide Struktur diskutiert (Schulte *et al.*, 1998 und 1999). Nach Behandlung des Chinon Reduktase Fragmentes mit SDS ist sie nicht mehr redoxaktiv. Dies würde bedeuten, daß durch die SDS Behandlung die chinoide Struktur verloren gegangen ist, z.B. durch eine chemische Reaktion. Eine endgültige Klärung der Frage, ob die Gruppe X kovalent oder koordinativ am Protein gebunden ist, bleibt anhand dieser Daten unbeantwortet. Es ist bisher weder im *E. coli* noch im *N. crassa* Komplex I gelungen, die Gruppe X mit polaren und unpolaren Lösungsmitteln zu extrahieren (Schildwächter, 1996; Haupt, 1999), was ebenfalls für eine kovalente Bindung spricht. Die Spaltung des Chinon Reduktase Fragmentes in weitere Fragmente durch z.B. Salzbehandlung würde eine weitergehende Zuordnung der Gruppe X zu einer Untereinheit ermöglichen. Die Sequenzierung der entsprechenden Untereinheit könnte dann den Nachweis für die Modifikation einer Aminosäure erbringen.

6. Literatur

Abelmann, A. (1999) Charakterisierung einer neuen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

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 bc-1 Komplex des Purpurbakteriums *Rhodobacter capsulatus*: Infrarotspektroskopische und elektrochemische Untersuchungen. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.

Beinert, H. (1983) Semi-micro Methods for Analysis of Labile Sulfide and of Labile Sulfide plus Sulfane Sulfur in Unusually Stable Iron-Sulfur Proteins. *Anal. Biochem.* **131**, 373-378.

Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G. (1953) Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555-557.

Belogradov, G. und Hatefi, Y. (1994) Catalytic sector of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): subunit stoichiometry and substrate-induced conformation changes. *Biochemistry* **33**, 4571-4576.

Bloomfield, V., Dalton, W.O. und Van Holde, K.E. (1967) Frictional coefficients of multisubunit structures. I. Theory. *Biopolymers* **5**, 135-143.

Böttcher, B., Scheide, D., Hesterberg, M., Nagel-Steger, L. und Friedrich, T. (2002) A Novel, Enzymatically Active Conformation of the *Escherichia coli* NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *J. Biol. Chem.*, im Druck.

Bogachev, A.V., Murtazina, R.A. und Skulachev, V.P. (1996) H⁺/e⁻ stoichiometry for NADH dehydrogenase I and dimethyl sulfoxid reductase in anaerobically grown *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **178** (21), 6233-6237.

Brandt, U. (1997) Proton-translocating 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.

Bungert, S. (1999) Isolierung und Charakterisierung des NADH-Dehydrogenase Fragmentes der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und des Ferritins aus *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

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.

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.

Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, 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.

Duderstadt, R.E., Brereton, P.S., Adams, M.W.W. und Johnson M.K. (1999) A pure $S = 3/2 [Fe_4S_4]^+$ cluster in the A33Y variant of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin. *FEBS Lett.*, **454**, 21-26.

Dunbar, B. S. (1987) Two Dimensional Gel Electrophoresis and Immunological Techniques. Plenum Press, New York.

Dupuis, A., Prieur, I. und Lunardi, J. (2001) Toward a Characterization of the Connecting Module of Complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 159-168.

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.

Fearnley, I.M., Carroll, J., Shannon, R.J., Runswick, M.J., Walker, J.E. und Hirst, J. (2001) GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* **276** (42), 38345-38348.

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., 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. 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.

Friedrich, T. (2001) Complex I: A chimaera of redox and conformation driven proton-pump? *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 169-177.

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** (2), 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.

Gondal, J.A. und Anderson, W.M. (1985) The molecular morphology of bovine heart mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. Native disulfide-linked subunits and rotenone-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **260**, 12690-12694.

Grigorieff, N. (1998) Three-dimensional Structure of Bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) at 22 Å in Ice. *J. Mol. Biol.* **277**, 1033-1046.

Grigorieff, N. (1999) Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 476-483.

Grivennikova, V.G., Kapustin, A.N. und Vinogradov, A.D. (2001) Catalytic activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in intact mitochondria. Evidence for the slow active/inactive transition. *J. Biol. Chem.* **276**, 9038-44.

Grzybek, S., Baymann, F., Müller, K.-H., Mäntele, W. (1993) Me_n-Fit: A computer program for the analysis of redox titrations, *in* Fifth international conference on the spectroscopy of biological molecules (Theophanides, T., Anastassopoulou, J., Fotopoulos, N. Eds.) pp 25-26, Kluwer academic publishers, Dordrecht.

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.

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., Luwig, 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.

Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A. und Harris, D.L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30** (14), 3576-3582.

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.

Johnson, M.K. (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 173-181.

Kintscher, L. (1997) UV-VIS und ESR-spektroskopische Untersuchungen der Reoxidationskinetiken der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Neurospora crassa*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Klinman, J.P. und Mu, D. (1994) Quinoenzymes in Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 299-344.

Klockenkämper, R. und von Bohlen, A. (1989) Determination of the critical thickness and the sensitivity for thin-film analysis by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta* **44**, 461-469.

Kotlyar, A.B., Sled', V.D. und Vinogradov, A.D. (1992) Effect of Ca²⁺ ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1098**, 144-150.

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.

Kregsamer, P. (1991) Fundamentals of total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim. Acta* **46**, 1333-1340.

Krishnamoorthy, G. und Hinkle, P.C. (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **263**, 17566-17575.

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.

Lustig, A., Engel, A., Tsiotis, G., Landau, E.M. und Baschong, W. (2000) Molecular weight determination of membrane proteins by sedimentation equilibrium at the sucrose or Nycodenz-adjusted density of the hydrated detergent micelle. *Biochim. Biophys. Acta* **1464**, 199-206.

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.

Moss, D.A., Nabedryk, E., Breton, J. und Mäntele, W. (1990) Redox-linked conformational changes detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the method with cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* **187**, 565-572.

Musatov, A., Ortega-Lopez, J. und Robinson, N.C. (2000) Detergent-Solubilized Bovine Cytochrome c Oxidase: Dimerization Depends on the Amphiphilic Environment. *Biochemistry* **39**, 12296-13004.

Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur-clusters / semiquinone in Complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 186-206.

Ohnishi, T., Magnitsky, S., Touloukhanova, L., Yano, T., Yagi, T., Burbaev, D.S., Vinogradov, A.D. und Sled', V.D. (1999) EPR studies of the possible binding sites of the cluster N2, semiquinones, and specific inhibitors of the NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 586-591.

Prange, A. (1989) Total reflection X-ray spectrometry: method and applications. *Spectrochim. Acta* **44**, 437-452.

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. (2001) Identification of Two Tetranuclear FeS Clusters on the Ferredoxin-Type Subunit of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry*, **40**, 6124-6131.

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.

Scheide, D. (2000) Über den Mechanismus der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

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

Schulte, U. und Weiss, H. (1997) Structure, function and biogenesis of respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). In "Frontiers of cellular bioenergetics. Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology" (Papa, S., Guerrieri, F., Tager, J.M., Eds.) Plenum Press, London.

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.

Schultz, B.E. und Chan, S.I. (2001) Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 23-65.

Sled', V.D., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., Meinhardt, S.W., Fukumori, Y., Calhoun, M.W., Gennis, R.B. und Ohnishi, T. (1993) Bacterial NADH-Ubiquinone Oxidoreductases: Iron-Sulfur Clusters and Related Problems. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 347-356.

Sled', V.D., Rudnitzky, N.I., Hatefi, Y. und Ohnishi, T. (1994) Thermodynamic Analysis of Flavin in Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry* **33**, 10069-10075.

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.

Stafford, W.F. (1997) Sedimentation velocity spins a new weave for an old fabric. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 14-24.

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.

Tanford, C. und Reynolds, J.A. (1976) Determination of molecular weight of the protein moiety in protein-detergent complexes without direct knowledge of detergent binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4467-4470.

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 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.

van Holde, K.E. und Weischet, W.O. (1978) Boundary Analysis of Sedimentation-Velocity Experiments with Monodisperse and Paucidisperse Solutes. *Biopolymers* **17**, 1387-1403.

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.

Vinogradov, A.D. (1998) Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 169-85.

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. 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.

Yagi, T., Yano, T., DiBernado, S. und Matsuno-Yagi, A. (1998) Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 112-125.

Yamaguchi, M., Belogradov, G.I. und Hatefi, Y. (1998) Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Effect of substrates on the fragmentation of subunits by trypsin. *J. Biol. Chem.* **273**, 8094-8098.

Danksagung

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

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Weiss für die Duldung des letzten „Colis“ in seinem Institut.

Bei Prof. Dr. Friedrich bedanke ich mich für die interessante Fragestellung, seine Geduld bei der Beantwortung konfuser Fragen und seine Betreuung im längsten Teil meiner Doktorarbeit.

Frau Dr. Böttcher, Frau Dr. Hellwig und Frau Dr. Nagel-Steger danke ich für die produktive Zusammenarbeit.

ALLEN jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes danke ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, diverse Kaffeestunden und den seltenen Genuß von alkoholischen Getränken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Dierk Scheide, der mich mit seiner Engelsgeduld in die Geheimnisse der Proteinchemie eingeführt hat und aus manchen Krisen befreit hat. Außerdem danke ich Dr. Jörg Hennemann, daß er mich ein ums andere Mal wieder „ins Leben zurückgeholt“ hat – sowohl fachlich als auch menschlich gesehen. Andreas Drexler danke ich für seine tatkräftige Unterstützung bei so manchem schwachen Moment und sein Lachen, daß mich selber immer wieder zum lachen gebracht hat. Würde ich Nadine Hoffmann für wirklich alles danken, was sie gerade in den letzten Monaten für mich getan hat, würde diese Arbeit doch noch an die 100 Seiten Grenze kommen.

Lieben Dank auch an Dr. Lars Kintscher, Dr. Anke Abelmann und Dr. Alexander Maassen, die mir immer wieder gesagt haben, es sei alles nicht so schlimm – es stimmt!

Meinen Freundinnen Stefanie Beuter, Simone Degler, Dr. Stefanie Bungert, Mareike Uhlmann, Stephani Voß, Sonja Eßer, Sölen Türkyilmaz und Ying Li-Sommer danke ich vor allem für ihre seelische Unterstützung in ebenfalls vorhandenen Tiefen während meiner Promotion.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir in jeder Hinsicht den Rücken freigehalten haben und ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

