

**Aufreinigungsverfahren für den
Membranarm von Komplex I aus
*Neurospora***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Sven Karschnia
aus Kehl

Düsseldorf 2005

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

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiss
2. Referent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
2.1	Das System der oxidative Phosphorylierung	2
2.2	Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I)	4
2.3	Spaltungsprodukte von Komplex I	8
2.4	Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit	9
2.5	Detergenzien in der Proteinaufreinigung	11
2.6	Thema der Arbeit	13
3.	Material & Methoden	15
3.1	Anzucht von <i>Neurospora crassa</i>	15
3.2	Präparation der Mitochondrienmembranen aus <i>N. crassa</i>	15
3.3	Standardaufreinigung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	16
3.4	Darstellung von Hydroxylapatit	18
3.5	Alternative Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	18
3.6	Verkürzung des alternativen Aufreinigungsverfahrens	20
3.7	Verschiedene analytische Methoden	21
4.	Ergebnisse	23
4.1	Standardaufreinigung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	23
4.2	Alternative Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	28
4.2.1	Strategien zu alternativen Aufreinigungsverfahren des Membranarms von Komplex I	28
4.2.2	Charakterisierung der Bindung von Komplex I an Hydroxylapatit	29
4.2.3	Präparativer Einsatz der alternativen Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	33

4.3	Vergleich der Standard- und der alternativen Aufreinigung des Membranarms von Komplex I	41
4.4	Verkürzung des alternativen Aufreinigungsverfahrens	43
5.	Diskussion	49
5.1	Strukturaufklärung von Komplex I in Verbindung mit Komplex I Erkrankungen	49
5.2	Das alternative Aufreinigungsverfahren des Membranarms von Komplex I	50
5.3	Verkürzung des alternativen Aufreinigungsverfahrens	51
6.	Literatur	53

1. Zusammenfassung

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, koppelt den Elektronentransfer von NADH auf Ubichinon mit der Translokation von vier Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Somit trägt er wesentlich zum Aufbau des elektrochemischen Membranpotentials bei, das zur Synthese von ATP oder für aktive Transportprozesse über die Membran genutzt wird. Der Komplex I besitzt ein Molekulargewicht von ca. 1 MDa und besteht aus bis zu 44 Untereinheiten. Er kann unterteilt werden in einen peripheren und einen membranintegralen Arm. Alle bisher bekannten Redoxgruppen befinden sich im peripheren Arm. Somit sind sowohl der Elektronentransport durch den membranintegralen Teil sowie der Mechanismus der Protonentranslokation unverstanden.

Die Kristallisation als Voraussetzung für eine Röntgenstrukturanalyse des Komplex I ist aufgrund der gegenseitigen Beweglichkeit von peripherem Arm und Membranarm wenig erfolgsversprechend. Aus diesem Grund wird in diesem Institut der Komplex I aus dem Hyphenpilz *Neurospora crassa* durch das chaotrope Salz Kaliumrhodanid zerlegt und durch Zuckergradientenzentrifugation und Größenausschlußchromatographie der Membranarm aufgereinigt. Jedoch konnte der so gewonnene Membranarm bisher nicht reproduzierbar kristallisiert werden.

In dieser Arbeit wurde nach einer alternativen Aufreinigungsmethode für den Membranarm des Komplex I aus *N. crassa* gesucht. Durch Einführung eines Hydroxylapatit-Batch-Verfahrens wurde aus einer Mitochondriensuspension eine Proteinlösung hergestellt, aus der über Ionenaustausch- und Größenausschlußchromatographische Schritte der Membranarm in guter Ausbeute und Reinheit isoliert wurde. Auch wurde versucht, die Aufreinigung zu verkürzen, indem der Membranarm ohne vorherige Isolierung des Gesamtkomplexes direkt aus Mitochondrien gewonnen wurde.

2. Einleitung

2.1 Das System der oxidativen Phosphorylierung

Heterotrophe Organismen erlangen den größten Teil ihrer Energie durch das System der oxidativen Phosphorylierung, das in Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran gelegen ist (Abb. 1). Dieses besteht aus den protonenpumpenden, transmembranen Komplexen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Ubichinol: Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochrom c Oxidase (Komplex IV), die den exergonen Elektronentransport von NADH auf molekularen Sauerstoff mit der endergonen Translokation von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum koppeln (Hatefi, 1985), und der F_0F_1 ATPase (Komplex V), die den so erzeugte Protonengradient zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat nutzt (Mitchel, 1961; Abrahams et Al., 1994)

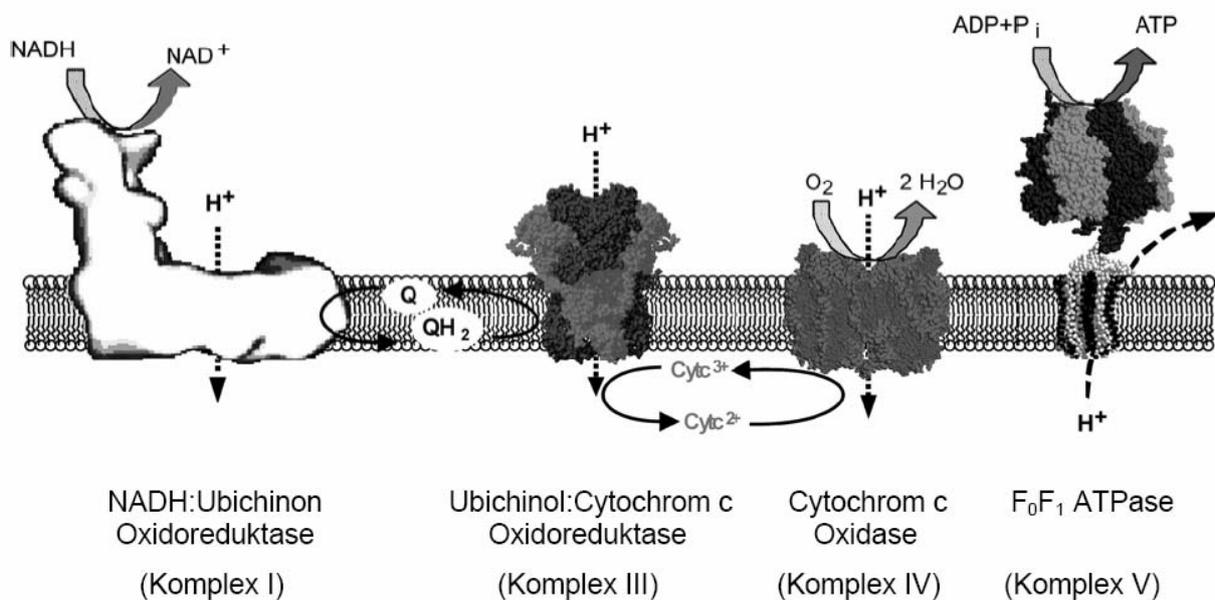


Abbildung 1: Das mitochondriale System der oxidativen Phosphorylierung. Die Komplexe III, IV und V sind als Kugelmodelle ihrer Kristallstrukturen dargestellt. Die gezeigte Struktur von Komplex I basiert auf einer elektronenmikroskopischen Rekonstruktion. Die Membran ist durch ein graues Band angedeutet. Q steht für Ubichinon, QH_2 für Ubichinol und Cyt c für Cytochrom c.

Alle vier Enzymkomplexe sind in Eukaryonten dualen genetischen Ursprungs. Der Großteil ihrer Untereinheiten ist kernkodiert, wird an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert und posttranslational in die Mitochondrien transportiert. Jedoch werden die membranintegralen Untereinheiten der Komplexe mitochondrial kodiert und an mitochondrialen Ribosomen translatiert (Attardi und Schatz, 1988; Chomyn und Attardi, 1992).

Die Strukturen der beiden Atmungskettenkomplexen III und IV und der F_0F_1 ATPase wurden durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse atomar aufgelöst (Yu et al., 1996; Tsukihara et al., 1996; Abrahams et al., 1994; Meier et al., 2005). Die so gewonnenen Strukturdaten machten eine detaillierte Beschreibung von Elektronentransport und Protonentranslokation möglich. Komplex I konnte noch keiner Kristallstrukturanalyse unterzogen werden. Dreidimensionale Strukturdaten dieses Atmungskettenkomplexes basieren ausschließlich auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen, deren Auflösung bisher 20 Å nicht unterschreiten (Guénebaut et al., 1998).

Neben den drei energiekonservierenden Atmungskettenkomplexen besitzen die Mitochondrien von Pilzen und Pflanzen noch alternative nicht protonenpumpende Atmungskettenenzyme. Hierbei handelt es sich um zwei bis drei, bezogen auf die NADH-Bindestelle exogene bzw. endogene, alternative NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreduktasen und eine alternative Ubichinol Oxidase (Schwitzguébel, 1982; Douce, 1989; de Vries, 1988; Marres *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996; Luttkik *et al.*, 1998; Small, 1998). Diese Enzyme zeigen eine geringere Affinität zu NADH, NADPH bzw. Ubichinol als die protonenpumpenden Enzymkomplexe. Aus diesem Grund werden die alternativen Enzyme als Überlaufventile für überschüssige Reduktionsäquivalente angesehen (Siedow, 1990).

2.2 Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I)

Der größte der Atmungskettenkomplexe, die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, die auch als Komplex I bezeichnet wird, katalysiert die Oxidation von NADH und die Übertragung von zwei Elektronen auf Ubichinon. Daran gekoppelt ist eine Translokation von vier Protonen über die Membran nach folgender Gleichung:



In dieser Gleichung steht Q für Ubichinon, QH₂ steht für Ubichinol und die Indizes I für die negativ geladene Innenseite der Membran und A für die positiv geladene Außenseite der Membran.

Nahe verwandte Formen des Komplex I kommen sowohl in der Cytoplasmamembran von Prokaryoten als auch in der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryoten vor. Pro- und eukaryotische Formen des Komplex I Komplexes enthalten im Wesentlichen die gleichen prosthetischen Gruppen (Guénebaut et al., 1998). Der bakterielle Komplex besteht jedoch aus nur 14 Untereinheiten und stellt eine Minimalform dar. Seine Molmasse ist mit 550 kDa nur etwa halb so groß wie die des mitochondrialen Komplexes (Weidner et al., 1993; Leif et al., 1993). Der mitochondriale Komplex besitzt neben den homologen bakteriellen Komplex I Untereinheiten noch bis zu 32 sog. akzessorische Untereinheiten (Weiss et al., 1991; Walker, 1992; Videira und Duarte, 2001; Carroll et al., 2003). Die Funktion der meisten zusätzlichen Untereinheiten dürfte die elektrische Isolierung und strukturelle Stabilisierung des Komplexes sein. Zwei akzessorischen Untereinheiten wird eine Beteiligung an Biosynthesewegen zugesprochen. Eine 9,6 kDa Untereinheit des peripheren Arms des eukaryotischen Komplex I ist homolog zu einem prokaryotischen Acyl Carrier Protein. Die Inaktivierung des Gens der ACP-Untereinheit führt zu einer Mutante, die den Komplex I nicht vollständig assemblieren kann (Schneider et al., 1995). Weder der periphere noch der Membranarm wird in dieser Mutante gänzlich gebildet. Weiterhin zeigt eine periphere 40 kDa Untereinheit Sequenzähnlichkeit zu NAD(P)H-abhängigen Reduktasen/Isomerasen (Fearnley und Walker, 1992). Die Deletionsmutante, in der das Gen der 40 kDa Untereinheit ausgeschaltet wurde,

bildet einen bis auf diese Untereinheit vollständigen Komplex I, jedoch scheint der Elektronentransfer durch den Membranarm des Komplex I unterbrochen zu sein (Schulte et al., 1999). Alle im Folgenden angegebenen Untereinheitenbezeichnungen beziehen sich auf die Molmassen der in *N. crassa* vorkommenden Komplex I Untereinheiten.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Präparationen des Komplex I aus *N. crassa* und *E. coli* zeigen eine L-förmige Struktur (Abb. 2), mit zwei etwa 25 nm langen Armen, die senkrecht aufeinander stehen (Hofhaus et al., 1991; Guénebaut et al., 1998). Ein Arm ist in die Membran eingebettet und der andere ragt in das Cytoplasma bzw. in die mitochondriale Matrix. Die membranintegralen Untereinheiten des eukaryotischen Komplex I sind dualgenetischen Ursprungs. Sieben Untereinheiten sind homolog zu den Membranarmuntereinheiten des bakteriellen Komplexes. Sie werden von den Genen ND1 bis ND6 und ND4L auf der mitochondrialen DNA kodiert und in den Mitochondrien synthetisiert. Alle anderen Untereinheiten des eukaryotischen Membranarms von Komplex I sowie alle Untereinheiten des peripheren Arms werden kernkodiert und aus dem Cytoplasma posttranslational importiert. Der Winkel zwischen den beiden Armen des Komplexes ist variable. Der *E. coli* Komplex zeigt bei niedrigen Salzkonzentrationen eine hufeisenförmige Struktur (Böttcher et al., 2002).

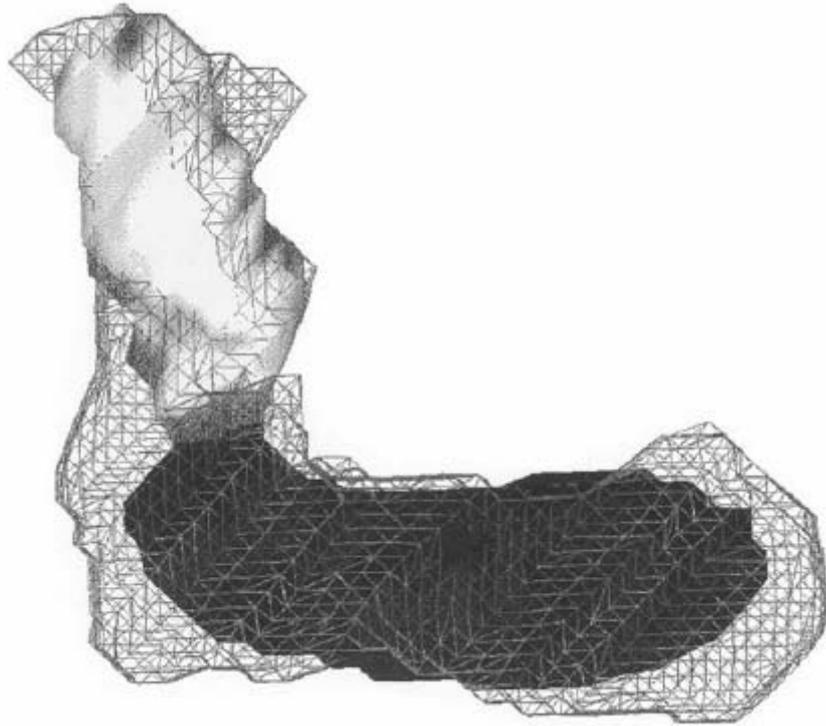


Abbildung 2: Überlagerung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Komplex I aus *E. coli* (ausgefüllt) und *N. crassa* (Gittermodell). Der Membranarm ist schwarz und der periphere Arm grau dargestellt (nach Guénebaut et al., 1998).

Die NADH Bindestelle sowie alle bisher bekannten Redoxgruppen des Komplex I sind auf Untereinheiten des peripheren Arms lokalisiert. Hierzu zählen ein Flavinmononukleotid (FMN) und bis zu acht Eisenschwefelzentren. Die NADH- und FMN Bindestelle wird der 51 kDa Untereinheit zugeordnet. Weiterhin wurde in dieser Untereinheit das tetranukleäre Eisenschwefelzentrum N-3 nachgewiesen (Fecke et al., 1994). Die tetranukleären Eisenschwefel Cluster N-6a und N-6b werden der Untereinheit 21.3c kDa zugeordnet (Rasmussen et al., 2001). Das tetranukleäre N-2 Cluster wurde lange an der Grenze zwischen peripherem- und Membranarm vermutet, doch auch dieses Redoxgruppe befindet sich auf der 19,3 kDa Untereinheit und somit auf dem peripheren Arm (Duarte et al., 2002). Das binukleäre Eisenschwefelzentrum N-1 und das tetranukleäre Cluster N-4 werden auf der 24 kDa bzw. der 78 kDa Untereinheit vermutet (Wang et al., 1991). Die Cluster N-1, N-2, N-3 und N-4 wurden ESR-spektroskopisch in *N. crassa* nachgewiesen. Die Cluster N-6a

und N-6b wurden bisher nur durch UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert. In *Bos taurus* wurde ein weiteres binukleäres Eisenschwefelzentrum N-1a und in *Yarrowia lipolytica* ein weiteres tetranukleäres Zentrum N-5 ESR-spektroskopisch nachgewiesen (Djafarzadeh et al., 2000). Abbildung 3 zeigt die aufgeführten Redoxgruppen entsprechend ihrem Potential geordnet und zeigt somit den derzeit allgemein angenommenen Elektronenweg. Hierbei werden die Elektronen zunächst von NADH (Mittenpotential $E_{m,7} = -320$ mV) auf das FMN (Mittenpotential $E_{m,7} = -319$ mV) übertragen. Die Elektronen des so reduzierten FMNH₂ werden zunächst auf die Eisenschwefelzentren N-1, N-3 und N-4 (Mittenpotential $E_{m,7} = -300$ bis -270 mV) und dann auf die Zentren N-6a und N-6b (Mittenpotential $E_{m,7} = -270$ mV) übertragen. Von dort werden sie dann zum FeS-Zentrum N-2 mit dem höchsten Mittenpotential ($E_{m,7} = -160$ mV, Ingledew und Ohnishi, 1980) weitergegeben und letztendlich auf Ubichinon (Mittenpotential $E_{m,7} = +60$ mV) übertragen.

Der Elektronentransport und die Protonentranslokation durch den Membranarm sind unverstanden. Dem Membranarm konnte noch keine Funktion zugeordnet werden. Es wurden zwei Klassen von Hemmstoffen der Ubichinonreduktion nachgewiesen (Friedrich et al., 1994). Die große Potentialdifferenz zwischen dem Eisenschwefelzentrum N-2 und dem Ubichinon ist der Grund für eine weitere im Membranarm postulierte Redoxgruppe. Eine Umkehr des Elektronenflusses würde eine solche Potentialdifferenz nicht ermöglichen. UV/VIS und FT-IR spektroskopische Untersuchungen des Komplex I aus *N. crassa* und *E. coli* zeigen Hinweise auf eine chinoide Redoxgruppe mit einem Mittenpotential von -80 mV (Schulte et al., 1998; Abelmann 2000; Friedrich et al., 2000). Weiterhin zeigen Resonanz-Raman spektroskopische Untersuchungen an Komplex I aus *N. crassa* aus unserem Institut signifikante Übereinstimmungen sowohl mit Topachinon (TPQ) einer ortho-chinoiden Verbindung die z.B. als Redoxgruppe in Cu²⁺-abhängigen Amin-Oxidasen vorkommt, als auch mit 2-hydroxy-5-tert-butyl-1,4-benzo-quinone (tBuQOH) einer synthetisierten Modellverbindung des TPQ. Diese Redoxgruppe wird aufgrund konservierter Tyrosine auf den Untereinheiten ND1, ND2 oder ND4 vermutet (unveröffentlicht).

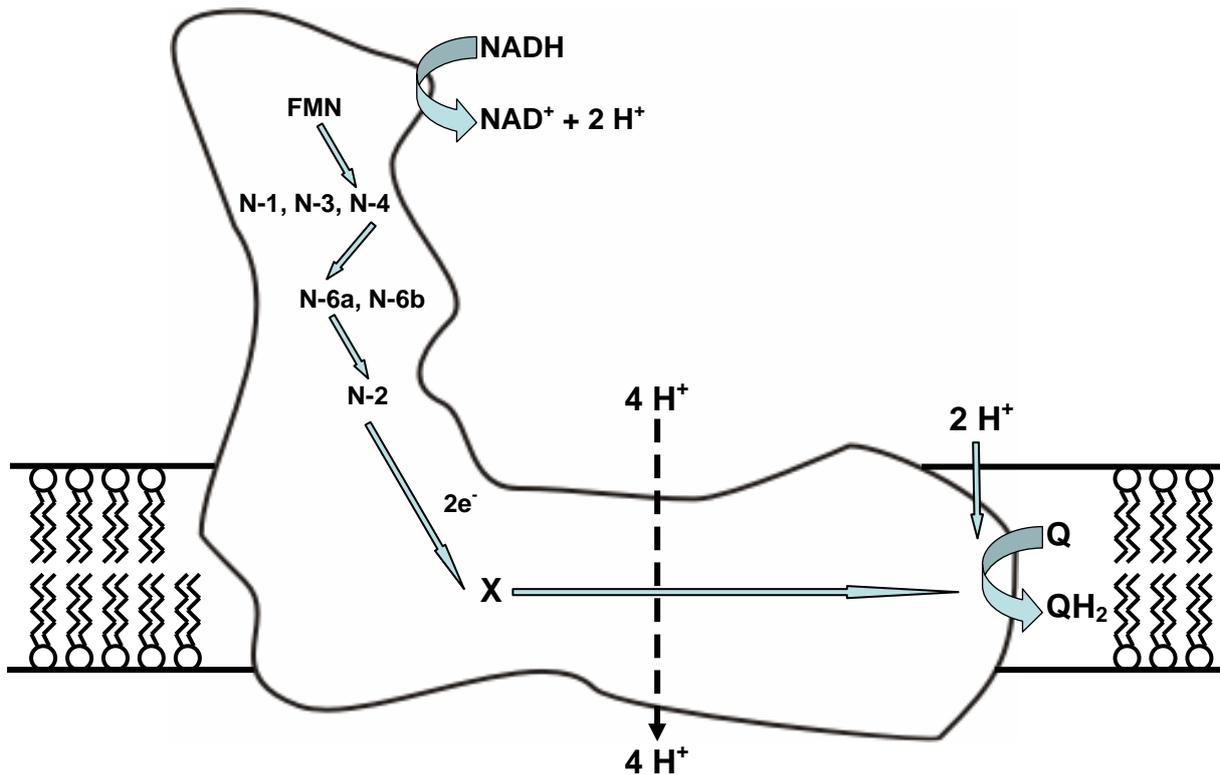


Abbildung 3: Modell der Redoxgruppenanordnung entsprechend ihres Redoxpotentials in einem Umriß des Komplex I aus *N. crassa*. Die Pfeile zeigen den postulierten Elektronenweg. Die gestrichelte Linie deutet die Protonentranslokation über den Membranarm und das X eine vermutete ortho-chinoide Redoxgruppe an.

2.3 Spaltungsprodukte von Komplex I

Prinzipiell existieren zwei Wege um definierte Bruchstücke von Komplex I zu erhalten. Zum einen wird durch Ausschalten von Genen in die Assemblierung eingegriffen und somit Assemblierungsintermediate angereichert, die isolierbar sind (Nehls et al., 1992; Schulte, 1995). Zum anderen werden durch Zugabe von spaltenden Agenzien Bruchstücke erzeugt, die getrennt isoliert und charakterisiert werden können. Auf den ersten Weg wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen, da er für diese Arbeit nicht von Bedeutung ist.

Die chemische Spaltung von Komplex I wird in erster Linie durch Zugabe von chaotropen Agenzien erreicht. Chaotrope Agenzien setzen die Ordnung des Wassers herab und verringern die thermodynamische Barriere eines hydrophoben Bereiches sich dem Wasser zuzuwenden. Somit werden die hydrophobe Wechselwirkungen und die Stabilität von Membranen und biologischen Makromolekülen verringert (Hatefi, 1974).

Der Komplex I aus *B. taurus* läßt sich durch Zugabe des chaotropen Perchlorat in ein hydrophobes und zwei wasserlösliche Fragmente spalten (Hatefi, 1985; Ragan, 1987). In einem der wasserlöslichen Fragmente wurde die NADH-Bindestelle und das FMN identifiziert (Ragan, 1982). Der Komplex I aus *N. crassa* kann durch Zugabe des chaotropen Salzes Kaliumrhodanid (KSCN) in einen definierten Membranarm und Bruchstücke des peripheren Arms zerlegt werden (Drexler, 2002). Mit dem Detergenz N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO) und β -Mercaptoethanol läßt sich der Rinderherz-Komplex I in ein wasserlösliches Fragment mit dem FMN und allen ESR-spektroskopisch nachweisbaren Eisenschwefelzentren und ein hydrophobes Fragment spalten (Finel, 1992). Versetzt man das wasserlösliche Fragment mit Kaliumphosphat und dem Detergenz Laurylsarcosin, werden weitere Untereinheiten abgespalten (Finel, 1994). Durch Erhöhung des pH-Wertes auf 9 spaltet sich der Komplex I aus *E. coli* in ein wasserlösliches NADH-Dehydrogenase Fragment aus drei Untereinheiten und ein hydrophobes Ubichinon-Reduktase Fragment aus neun Untereinheiten. Das wasserlösliche Fragment trägt die NADH-Bindestelle, das FMN und die FeS-Zentren N-1, N-3 und N-4. Das hydrophobe Fragment trägt die FeS-Zentren N-6a, N-6b, N-2 und die Ubichinon-Bindestelle (Böttcher et al., 2002, Hesterberg, 2002).

2.4 Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Durch die Beladung der modernen HPLC-Materialien mit Proteinrohextrakten werden erstere oft so stark mit denaturierten Proteinen belegt, daß sie eine geringe Kapazität haben und nur sehr schwer regenerierbar werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu beheben besteht darin, Materialien zu verwenden, die leicht herzustellen sind und

sich somit für einen einmaligen Einsatz anbieten. Hydroxylapatit ist ein solches Material.

Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, ist eine modifizierte Form des Calciumphosphats und hat sich als anorganische Matrix zur Proteinaufreinigung bewährt. Substanzen mit geringem Molekulargewicht wie Aminosäuren, kurze Peptide, Lipide und Farbstoffe werden nicht adsorbiert (Tiselius et al., 1956). Proteine hingegen adsorbieren an die nicht-poröse Kristalloberfläche. Unterschiedliche Effekte bestimmen die Adsorption und Desorption und unterscheiden so die Hydroxylapatit-Chromatographie von anderen Trennmethode mit einem einzelnen reversiblen Schritt wie die Ionenaustausch-Chromatographie. Hydroxylapatit bindet Protein über zwei verschiedene Mechanismen (Bernardi, 1971). Basische Proteine binden mit ihren Aminogruppen über unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen an die negativen Phosphatgruppen des kristallinen Materials. Saure Proteine bilden mit ihren Carboxylgruppen Komplexe mit dem Ca^{2+} des Minerals. Die Elution von basischen Proteinen erfolgt durch Zugabe von CaCl_2 oder MgCl_2 . Dies führt zu einer Neutralisierung der negativen Oberflächenladung der Matrix und zur Desorption der Proteine. Bei sauren Proteinen hingegen führen die zweiwertigen Kationen zu einer vermehrten Komplexierung und somit zu einer verstärkten Bindung der Proteine an Hydroxylapatit bis zu einem irreversiblen Grad. Saure Proteine werden durch Zugabe von Phosphat eluiert. Hierbei verdrängt das Phosphat die Carboxylgruppen des Proteins vom Calcium des Minerals (Gorbunoff, 1984). Kristallines Hydroxylapatit ist instabil und zerfällt. Aufgrund der nicht-porösen Struktur der Hydroxylapatit Kristalle ist die Kapazität beschränkt. Abbildung 4 zeigt die unterschiedlichen Wechselwirkungen der Proteinseitenketten mit Hydroxylapatit.

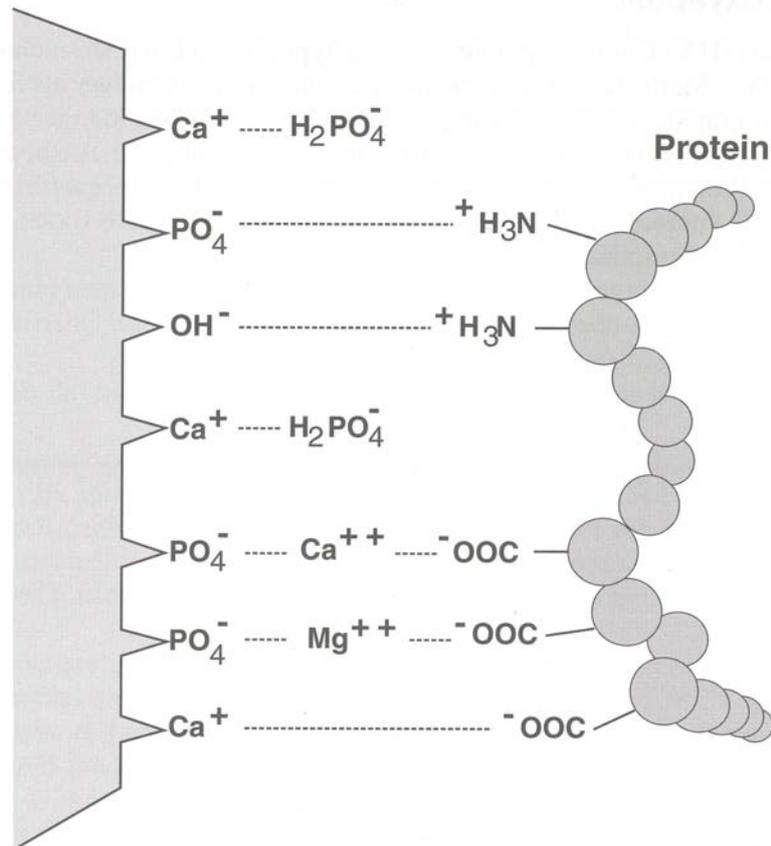


Abbildung 4: Molekulare Wechselwirkungen zwischen Hydroxylapatit und Protein (nach Gorbunoff et al., 1984).

2.5 Detergenzien in der Proteinaufreinigung

Detergenzien spielen eine wichtige Rolle bei der Aufreinigung von Membranproteinen. Verschiedene Isolationsschritte stellen für die erfolgreiche Aufreinigung eines Membranproteins unterschiedliche Anforderungen an das Detergenz. Somit werden für eine mehrstufige Aufreinigung oft Detergenzwechsel nötig.

Detergenzien werden auch als Tenside, Seifen oder als oberflächenaktive Substanzen bezeichnet. Der Begriff Seife wird allerdings üblicherweise nur für die Alkalisalze langkettiger Fettsäuren verwendet. Detergenzien sind amphiphile Moleküle (Tanford, 1980) aus einem polaren, in manchen Fällen auch ionischen, hydrophilen Teil und einem unpolaren hydrophoben Teil. Den hydrophilen Teil der

Detergenzien bilden ionisierte Gruppen (SDS oder Cholat), Zucker (Octylglucosid oder Digitonin), Hydroxylgruppen (Cholat oder Deoxycholat) oder Polyethylenoxide (Triton-X-100 oder Lubrol). Der hydrophobe Teil besteht aus aliphatischen Ketten (Octylglucosid), Phenylderivaten (Triton-X-100) oder Steroidgerüsten (Cholat). Diese „duale Natur“ ermöglicht es Membranproteine durch Detergenzien in wässriger Umgebungen zu lösen. Hierbei ersetzt der hydrophobe Teil des Detergenz die natürliche Lipidumgebung des Membranproteins und der hydrophile Teil sorgt für die Löslichkeit in einem wässrigen Medium. Eine wichtige Eigenschaft von Detergenzien ist die Bildung von geordneten Aggregaten in Wasser, die als Micellen bezeichnet werden. Hierbei lagern sich die einzelnen Moleküle sphärisch aneinander, so daß alle hydrophilen Gruppen nach außen ragen und die hydrophoben Gruppen nach innen gerichtet sind. Die Größe und Form der Micellen ist charakteristisch für jedes Detergenz und ist abhängig von der Anzahl der Monomere (Aggregationszahl), Temperatur, Konzentration des Detergenz, pH und der Salzkonzentration. Die hydrophoben Bereiche der Membranproteine werden in diese Micellen eingelagert. Somit wird erreicht, daß Membranproteine auch außerhalb einer biologischen Membran in den meisten Fällen ihre biologische Aktivität behalten können.

Ein weiteres Charakteristikum für Detergenzien ist ihre kritische micellare Konzentration (cmc) und kann definiert werden als die geringste Konzentration, bei der in Lösung noch Micellen gebildet werden. Unterhalb dieser Konzentration liegt das Detergenz ausschließlich in monomerer Form vor. Bei ionischen Detergenzien nimmt die cmc bei höherer Ionenstärke ab und ist relativ temperaturunabhängig. Bei nicht-ionischen Detergenzien hingegen ist die cmc relativ unabhängig von der Ionenstärke, nimmt allerdings mit steigender Temperatur deutlich zu. Weitere cmc beeinflussende Parameter sind der pH-Wert und die Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln. Detergenzien können weiterhin durch die Parameter Wolkenpunkt, kritische micellare Temperatur (cmt), Krafft-Punkt und das hydrophile/lipophile Gleichgewicht charakterisiert werden. Der Wolkenpunkt gibt die Temperatur an, bei der das Detergenz in Lösung ausfällt. Micellenbildung findet nur oberhalb der cmt statt. Wird diese Temperatur unterschritten fällt das Detergenz in Lösung kristallin zu einer trüben Suspension aus. Die Temperatur, bei der die drei Phasen kristallin, micellar und monomer im Gleichgewicht stehen wird als Krafft-Punkt bezeichnet.

Abbildung 5 zeigt die Beziehung zwischen den einzelnen Phasen in Abhängigkeit von der Temperatur und der Detergenzkonzentration. Das hydrophile/lipophile Gleichgewicht (HLB) gibt den hydrophilen Charakter eines Detergenz an. Je größer die HLB desto hydrophiler das Detergenz (Helenius, 1975).

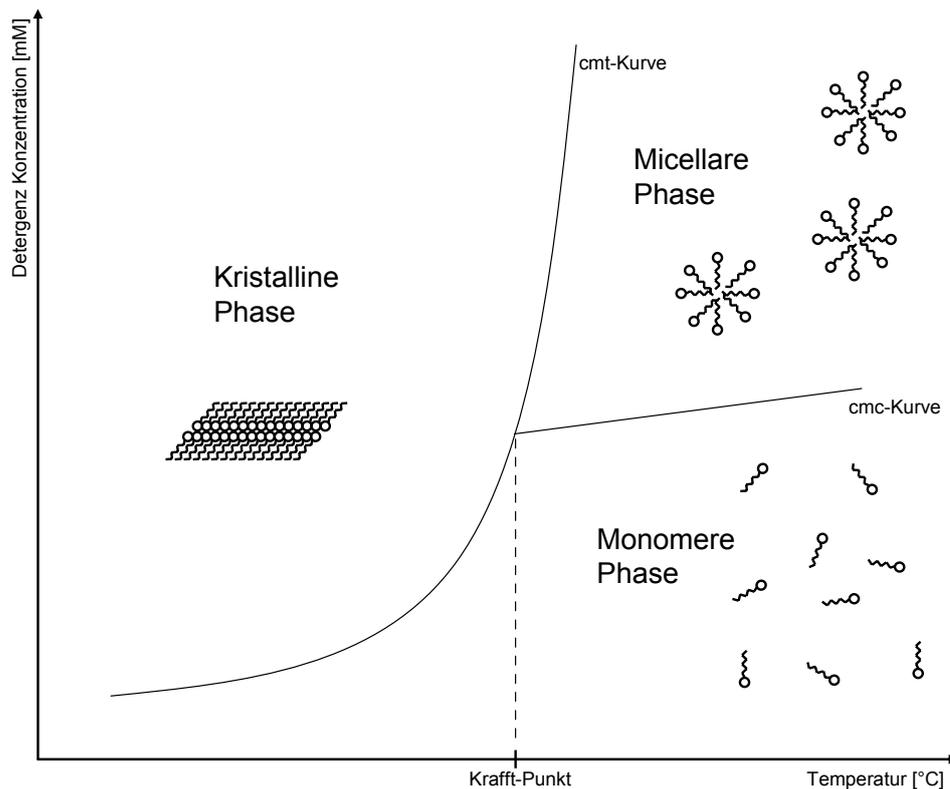


Abbildung 5: Abhängigkeit der kritischen micellaren Temperatur (cmt) und der kritischen micellaren Konzentration (cmc) von der Detergenzkonzentration und der Temperatur.

2.6 Thema der Arbeit

Der Komplex I ist der letzte Enzymkomplex des Systems der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, von dem noch keine atomar aufgelöste Kristallstruktur vorliegt. Es herrscht allgemeiner Konsens darüber, daß die noch unverstandene Protonentranslokation über die innere Mitochondrienmembran und der Elektronentransport durch den Membranarm nur über die Röntgenstrukturanalyse

mechanistisch gelöst werden kann. Diese setzt jedoch zwingend einen Kristall voraus. Die Kristallisation des Membranarms aus *N. crassa* von Komplex I gelang bisher nicht reproduzierbar. Die Kristallisation des Gesamtkomplexes ist aufgrund der Beweglichkeit zwischen Membranarm und peripheren Arm wenig erfolgsversprechend.

Die Kristallisation von Membranproteinen stellt ein komplexeres Unterfangen dar als die von wasserlöslichen Proteinen. Der Protein-Protein Kontakt, der für die Kristallisation erforderlich ist, ist bei Membranproteinen nur über die hydrophilen Bereiche möglich, da die hydrophoben Regionen des Proteins mit Detergenzien abgedeckt sind. Das verwendete Detergenz muß in die Lücke „passen“, die sich ergibt, wenn sich Proteine in einem Gitter anordnen. Da die Größe des Raumes erst nach der Lösung der Struktur des Proteins bekannt ist, erfolgt die Wahl des Detergenz nach Versuch und Irrtum. Jedoch sind Detergenzien die raumgreifende Micellen bilden aus diesem Grund eher wenig geeignet.

Diese Arbeit verfolgt den Gedanken, daß eine erfolgreiche Kristallisation durch die Veränderung der Präparationsmethode erreicht werden kann. Nur ein konformativ einheitliches Protein läßt auf eine erfolgreiche Kristallisation hoffen. Ziel war es somit, eine alternative Aufreinigung des Membranarms des Komplex I zu entwickeln. Im Hinblick auf anschließende Kristallisationsexperimente wird das Protein in großen Mengen und hoher Reinheit benötigt. Weiterhin sollte die alternative Aufreinigungsmethode ohne zeitaufwendige und apparativ anspruchsvolle Ultrazentrifugationsschritte erfolgen.

3. Material und Methoden

3.1 Anzucht von *Neurospora crassa*

Zur Gewinnung von Makrokonidien wurden 300 ml Erlenmeyerkolben mit Vogelsmedium aus 3 g/l Natriumcitrat, 0,1 g/l CaCl_2 ; 2 H_2O , 5 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l NH_4NO_3 , 0,2 g/l MgSO_4 ; 7 H_2O , 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin, 20 g/l Saccharose und 0,1 ml/l Spurenelementlösung aus 50 g/l Zitronensäure; H_2O , 50 g/l ZnSO_4 ; 7 H_2O , 2,5 g/l CuSO_4 ; 5 H_2O , 0,5 g/l MnSO_4 ; H_2O , 10 g/l $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$; 6 H_2O , 0,5 g/l Na_2MO_4 ; 2 H_2O , 0,5 g/l H_3BO_4 und 0,2 % Agar mit Makrokonidien angeimpft (Vogel, 1956; Davis und de Serres, 1970). Die Kulturen wurden die ersten 2 Tage im Dunkeln, danach im Licht bei 26 – 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Anzucht der Hyphen erfolgte in mit Preßluft belüfteten 8 l Batchkulturen mit Vogelsmedium (Weiss et al., 1970; Davies und de Serres, 1970). Nach 24 – 26 Stunden Wachstum bei 26 – 28 °C wurde das Mycel über einen 40 cm Büchnertrichter abfiltriert. Die abfiltrierten Hyphen wurden in Aluminiumfolie bei –70 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.2 Präparation der Mitochondrienmembranen aus *N. crassa*

Die Präparation der Mitochondrienmembranen wurde bei 4 °C durchgeführt. 800 g tiefgefrorene *N. crassa* Hyphen wurden mechanisch mit einem Hammer zerkleinert. Die grob zerkleinerten Hyphen wurden mit 5 l Isolationsmedium (50 mM TrisCl pH 7,5 und 15% Saccharose) in einem Küchenmixer (Fa. Rotor AG, Modell G 800) homogenisiert und in einer Korund-Mühle zum Aufschluß der Zellen gemahlen. Pro Liter aufgeschlossenem Rohextrakt wurde 1 ml Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung (PMSF; 0,1 M in Isopropanol) zur Hemmung von Proteasen zugegeben. Durch 10 min Zentrifugation bei 6.000 g (4.500 rpm, 4 °C, Rotor H6000A/HBB6,

Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Fa. Du Pont Sorvall) wurden Zellkerne und Hyphenwände abgetrennt. Der Überstand wurde 105 min bei 11.000 g (8.500 rpm, 4 °C, Rotor SLC-6000, Kühlzentrifuge Evolution RC, Fa. Kendro Sorvall), zur Sedimentierung der Mitochondrien zentrifugiert. Die Mitochondriensuspension wurde auf ein Volumen von 300 ml mit 0,3 M Tris-NaCl-Puffer pH 8,0 (0,3 M NaCl und 50 mM TrisCl pH 8.0) gebracht und mit einem Teflon-in-Glas-Homogenisator suspendiert. Die Mitochondrien wurden in einer French Press (Fa. SLM, Aminco) bei 1.100 psi aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Mitochondrien wurden mit einer anschließenden 20 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) sedimentiert. Die sich im Überstand befindenden Mitochondrienmembranen wurden durch eine 120 min Ultrazentrifugation bei 175.000 g (50.000 rpm, Rotor 60 Ti, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) abzentrifugiert und (30 - 40 g Feuchtmasse) bei -70 °C aufbewahrt.

3.3 Standardaufreinigung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Alle Schritten wurden bei 4 °C durchgeführt. 15 g Mitochondrienmembranen wurden zur Solubilisierung der Membranproteine mit 30 ml 7,5 % [w/v] β -D-Octylglucopyranosid (Fa. Biomol) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 versetzt und in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator homogenisiert. Durch 30 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) wurde nicht solubiliertes Protein abgetrennt. Der Überstand wurde in 5 ml Portionen auf 6 Zuckergradienten aus 15 – 35 % Saccharose, 0,7 - 0,05 % β -D-Dodecylmaltosid (Fa. Biomol) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgetragen und 22 h bei 150.000 g (30.000 rpm, Rotor 630 Ti Fa. Sorvall, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Die Zuckergradienten wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min durch eine Durchflußküvette ausgepumpt und in 2 ml Portionen fraktioniert. Mit einem Diodenarray Photometer mit Lichtleiteroptik (Fa. J&M Analysetechnik, Aalen) wurden kontinuierlich UV-Vis-Spektren von 250 bis 600 nm mit einer Integrationszeit von 70 ms und einem Scanintervall von 2 s aufgenommen. Die Komplex I haltigen Fraktionen wurden mittels der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität ermittelt und die Gipfelfraktionen vereinigt. Die vereinigten

Fraktionen wurden mittels einer Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 4,6 cm, Vol.= 400 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf 18 ml eingengt. Zur Verringerung der Zuckerkonzentration wurden 18 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 0,05 % Dodecylmaltosid zugegeben und wieder auf 18 ml konzentriert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Die eingengten Komplex I Fraktionen wurden mit festem Kaliumrhodanid (KSCN) auf 0,5 M gebracht und auf 6 Gradienten aus 10 – 30 % Saccharose in 0,05 % Dodecylmaltosid, 50 mM Tris/Cl pH 8,0 und 0,5 M KSCN, gegeben. Die Gradienten wurden 21 h bei 150.000 g (30.000 rpm, Rotor 630 Ti Fa. Sorvall, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min werden sie durch eine Durchflußküvette ausgepumpt und in 1 ml Proben fraktioniert. Mit einem Diodenarray-Spektrometer mit Lichtleiteroptik (Fa. J&M Analysetechnik, Aalen) wurden kontinuierlich Spektren von 250 bis 600 nm mit einer Integrationszeit von 70 ms und einem Scan-Intervall von 2 s aufgenommen. Anhand der Absorption bei 280 nm wurden die Gipfelfraktionen größer der halbmaximalen Absorption des Membranarms bestimmt und vereinigt.

Die vereinigten Fraktionen wurden durch Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d=6,2 cm, Vol.=200 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf ein Endvolumen von 2-3 ml eingengt. Das Konzentrat wurden auf eine Sephacryl Säule S300 (d= 1,6 cm, h= 60 cm, 120 ml Säulenvolumen) gelfiltrierte, die vorher mit 120 ml Tris/Cl pH 8,0, 0,5 M NaCl und 0,05 % Dodecylmaltosid äquibriert wurde. Die Elution erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,1 ml/min. Das Eluat wurde kontinuierlich mit einem Diodenarray-Spektrometer wie oben spektroskopisch untersucht und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und bei -70 °C aufbewahrt. Die Reinheit des Proteins wurde bei allen Arbeitsschritten durch SDS-PAGE überprüft.

3.4 Darstellung von Hydroxylapatit

Jeweils 3 L 0,5 M Na_2HPO_4 und 0,5 M CaCl_2 wurden innerhalb von 4 Stunden über eine Peristaltikpumpe in ein 10 L Glaskolben (Schott Duran) unter langsamem Rühren zusammengetropft. Die ausgefallenen Kristalle wurden hydrostatisch sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Niederschlag mit viermal 2 L Wasser gewaschen und jeweils der Überstand verworfen. Anschließend wurde der Glaskolben auf 6 L mit Wasser aufgefüllt und 150 ml 40 % (w/v) NaOH zugegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren 1 Stunde gekocht. Nach sedimentieren und abdekantieren des Überstandes wurde wie oben der Niederschlag gewaschen und anschließend mit 3 L 10 mM Na_xPO_4 Puffer pH 7.0 versetzt und bis kurz vor dem Siedepunkt erhitzt. Anschließend wurde zweimal zum Niederschlag jeweils 3 L 10 mM Na_xPO_4 Puffer pH 7.0 zugeben und 5 bzw. 15 min gekocht. Abschließend wurden zweimal jeweils 3 L 1 mM Na_xPO_4 Puffer pH 7.0 zum Niederschlag gegeben und jeweils 15 min gekocht. Der Überstand wurde nach hydrostatischer Sedimentierung des Hydroxylapatits bis auf das gleiche Volumen des Niederschlages abdekantiert und beides bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

3.5 Alternative Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Alle Schritten wurden bei 4 °C durchgeführt. 50 ml Mitochondriensuspension aus 400 g Hyphen (Feuchtmasse) wurde wie unter 3.3 beschrieben isoliert und zur weiteren Aufreinigung eingesetzt. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde die Mitochondriensuspension mit 50 ml 7,5 % [w/v] β -D-Octylglucopyranosid (Fa. Biomol) in 30 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 versetzt und in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator homogenisiert. Durch 30 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) wurde nicht solubiliertes Protein abgetrennt. Der Überstand wurde zu 125 ml hydrostatisch sedimentiertem Hydroxylapatite in einem Batch-Ansatz 30 min eingerührt. Nicht gebundene Bestandteile wurde durch 2 min Zentrifugation bei 1200 g (2000 rpm, 4 °C, Rotor H6000A/HBB6, Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Fa. Du Pont Sorvall) und dekantieren des Überstandes in einem ersten Schritt entfernt.

Durch dreimaligem waschen in jeweils 400 ml 30 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % Triton X-100, wurden nicht gebundenen Bestandteile abschließend entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in drei Schritten durch Zugabe von 0,3 M und zweimal 0,2 M Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % Triton X-100. Nach jedem Schritt wurde 2 min bei 1200 g (2000 rpm, 4 °C, Rotor H6000A/HBB6, Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Fa. Du Pont Sorvall) zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die vereinigten Überstände wurden zur Entfernung von Hydroxylapatit-Schwebepartikeln und aggregiertem Protein 20 Minuten bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 4,6 cm, Vol.= 400 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf ca. 10 ml eingengt. Das Konzentrat wurden durch eine Sephacryl Säule S300 (d= 2,6 cm, h= 64 cm, 340 ml Säulenvolumen) gefiltriert, die vorher mit 340 ml 50 mM Tris/Cl pH 8,0 und 0,1 % Triton X-100 äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,3 ml/min. Das Eluat wurde in 10 Minuten Intervallen fraktioniert. Bei dieser und den folgenden Chromatographieschritten wurde mit einem Diodenarray-Spektrometer mit Durchflußzelle und Lichtleiteroptik (Fa. J&M Analysetechnik, Aalen) kontinuierlich Spektren von 250 bis 600 nm aufgenommen. Anhand der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität wurden die Gipelfractionen größer der halbmaximalen Aktivität des Komplex I bestimmt und vereinigt. Diese wurden auf eine 20 ml Source 15Q-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Säule war mit 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 0,1 % Triton X-100 und 50 mM NaCl ein Säulenvolumen bei 2 ml/min equilibriert worden. Nicht gebundene Bestandteile wurden durch spülen mit fünf Säulenvolumen unter Äquilibrierungsbedingungen entfernt. Zum Tauschen des Detergenz wurde die Säule mit 20 ml 2 % n-Decyl-β-D-Maltopyranoside, 50 mM Tris/Cl pH 8,0 und 50 mM NaCl mit 1,5 ml/min gespült. Der Austausch wurde 30 min bei 0,01 ml/min durchgeführt. Die Elution erfolgte in einem linearen Salzgradienten von 50-500 mM NaCl mit 0,2 % n-Decyl-β-D-Maltopyranoside und 50 mM Tris/Cl pH 8,0 mit 1,5 ml/min. Das Eluat wurde in 1,5 ml Portionen fraktioniert. Die Komplex I haltigen Fraktionen wurden durch die Bestimmung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität ermittelt und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden mittels einer Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 2,5 cm, Vol.= 10 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf ca. 2 ml eingengt. Das Konzentrat wurde auf

0,7 M mit festem KSCN eingestellt und durch eine Sephacryl Säule S300 (d= 1,6 cm, h= 60 cm, 120 ml Säulenvolumen) gelfiltrierte, die vorher mit 120 ml 50 mM Tris/Cl pH 8,0; 0,7 M KSCN und 0,2 % n-Decyl- β -D-Maltopyranoside äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,1 ml/min. Das Eluat wurde in 10 Minuten Intervallen fraktioniert. Anhand der Absorption bei 280 nm wurden die Membranarmfraktionen bestimmt und mit der halbmaximalen Absorption vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch eine Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 2,5 cm, Vol.= 10 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf ca. 1 ml eingengt und durch eine Sephacryl Säule S300 (d= 1,0 cm, h= 51 cm, 40 ml Säulenvolumen) gelfiltrierte, die vorher mit 40 ml 50 mM Tris/Cl pH 8,0; 100 mM tri-Natriumcitrat und 0,2 % n-Decyl- β -D-Maltopyranoside äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,1 ml/min. Das Eluat wurde in 5 Minuten Intervallen fraktioniert. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Reinheit des Proteins wurde bei allen Arbeitsschritten durch SDS-PAGE überprüft.

3.6 Verkürzung des alternativen Aufreinigungsverfahrens

Alle Schritte wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. 50 ml Mitochondriensuspension aus 400 g Hyphen (Feuchtmasse) wurden wie unter 3.3 beschrieben isoliert und zur Solubilisierung der membranintegralen Proteine eingesetzt. Hierzu wurde die Mitochondriensuspension mit 100 ml 5 % [w/v] Triton X-100, 60 mM Na_xPO_4 Puffer pH 7.0 und 0,7 M KSCN versetzt und in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator homogenisiert. Durch 30 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) wurde nicht solubiliertes Protein abgetrennt und der Überstand wie unter 3.5 beschrieben im Hydroxylapatit-Batch eingesetzt. Die vereinigten Eluate des Hydroxylapatit-Batch wurden mittels einer Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 4,6 cm, Vol.= 400 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf ca. 10 ml eingengt. Das Konzentrat wurde durch eine Sephacryl Säule S300 (d= 2,6 cm, h= 64 cm, 340 ml Säulenvolumen) gelfiltrierte, die vorher mit 340 ml 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 0,1 % Triton X-100 und 100 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Elution, Fraktionierung und Aufnahme der Spektren

erfolgte wie unter 3.5 beschrieben. Die Identifizierung des Membranarms erfolgte über Westernblot und Immundetektion der 21,3 kDa und 20,9 kDa Untereinheit wie unter 3.7 beschrieben. Die Fraktionen mit halbmaximaler Absorption bei 280 nm des ersten Proteingipfels wurden vereinigt und zur Reduzierung der Ionenstärke mit gleichem Volumen 0,1 % Triton X-100 und 50 mM Tris/Cl pH 8,0 Puffer versetzt und auf eine 20 ml Source 15Q-Säule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Die Säule war mit 50 mM Tris/Cl pH 8,0, 0,1 % Triton X-100 und 50 mM NaCl ein Säulenvolumen bei 2 ml/min equilibriert worden. Nicht gebundene Bestandteile wurden durch Spülen mit fünf Säulenvolumen unter Äquilibrierungsbedingungen entfernt. Die Elution erfolgte in einem linearen Salzgradienten von 50 – 500 mM NaCl mit 0,1 % Triton X-100 und 50 mM Tris/Cl pH 8,0 mit 1,5 ml/min. Das Eluat wurde in 1,5 ml Portionen fraktioniert. Die Reinheit des Proteins wurde bei allen Arbeitsschritten durch SDS-PAGE überprüft.

3.7 Verschiedene analytische Methoden

Bestimmung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität

Die enzymatische Aktivität des Komplex I wurde photometrisch bei Raumtemperatur mit der NADH/Ferricyanid-Methode bestimmt. 2 µl Probe wurde in 1 ml einer Lösung aus 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 0,1 % Triton-X-100, 50 mM NaCl, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und 0,1 mM NADH eingerührt und die folgende Extinktionsänderung bei 410 nm bestimmt. Die Messung erfolgte an einem Helios ThermoSpectronic UV/Vis-Spektralphotometer. Der molare Extinktionskoeffizient von Kaliumhexacyanoferrat(III) beträgt $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Friedrich et al., 1989).

Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration 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.

Die UV/Vis spektroskopische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte an einem Diodenarray Spektrometer (J&M Tidas, Analysetechnik Aalen) in einer

Quarzrührküvette mit einer Schichtdicke 0,05 bzw. 0,1 cm. Als Referenz wurden der jeweiligen Puffer verwendet, in dem das Protein gelöst vorlag. Als apparenter molarer Extinktionskoeffizient von Komplex I bei 280 nm wurde $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (Amling, 1996). Unter der vereinfachten Annahme das der Membranarm der halben molaren Masse des Komplex I entspricht, wurde für den Membranarm $\epsilon = 0,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

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/Acetat pH 8,8; 2,5 mM EDTA und 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/Acetat pH 8,3 und 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.

Western-Blot-Analyse:

10 - 100 μg Protein wurden durch SDS-Page aufgetrennt und in einer Tank-Blot-Apparatur in Blotpuffer auf Cellulosenitratmembranen (Schleicher & Schuell) bei 4 °C und 1 mA/cm^2 für 1 – 3 h transferiert (Towbin et al., 1979). Die Membran wurde anschließend 1 h in PBS mit 3 % (w/v) Magermilchpulver und dann 5 min mit PBST gewaschen. Die Membran wurde 2 – 4 h mit den polyklonalen Antikörpern gegen einzelne Untereinheiten des Komplex I in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBST gewaschen und dann mit 1:3000 verdünnter Antikörper-gekoppelter Meerrettichperoxidase (Bio-Rad) 1 h geschüttelt. Nach Waschen mit PBS und 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4 wurde die Membran mit 0,05 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin, 0,03 % (w/v) NiSO_4 , 0,03 % (w/v) CoSO_4 und 0,1 % (v/v) H_2O_2 gefärbt (De Blas et al., 1983).

4. Ergebnisse

4.1 Standardaufreinigung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Die Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus Mitochondrienmembranen von *N. crassa* nach der Standardmethode erfolgte durch folgende Schritte: Solubilisierung der membranintegralen Proteine durch n-Octyl- β -D-glucopyranosid, Zuckergradienten-Zentrifugation, Spaltung des Komplex I durch Kalium-Rhodanid (KSCN) mit anschließender Zuckergradienten-Zentrifugation und Größenausschlußchromatographie. Der Aufreinigungserfolg der einzelnen Reinigungsschritte wurde durch SDS-PAGE überprüft.

Das Detergenz n-Octyl- β -D-glucopyranosid besitzt eine sehr hohe kritische micellare Konzentration (cmc) von 20-25 mM und ist somit recht aggressiv. Dies führt dazu, daß während der Solubilisierung insbesondere die großen Enzymkomplexe der inneren Mitochondrienmembran zerlegt und teilweise denaturiert werden mit Ausnahme des Komplex I, der auch in Anwesenheit von n-Octyl- β -D-glucopyranosid stabil bleibt und trotz seiner Größe von nahezu 1 MDa diesen Solubilisierungsvorgang übersteht. Somit erfolgt bereits in diesem Schritt eine Voraufreinigung für die anschließende Trennung der Proteine nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit in der Zuckergradienten-Zentrifugation. Abbildung 6 zeigt das Sedimentationsprofil des Zuckergradienten. Komplex I sedimentiert unter den gewählten Bedingungen ungefähr bis in die Hälfte des Gradienten. Die Gipffraktionen von Komplex I wurden mit Hilfe der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt.

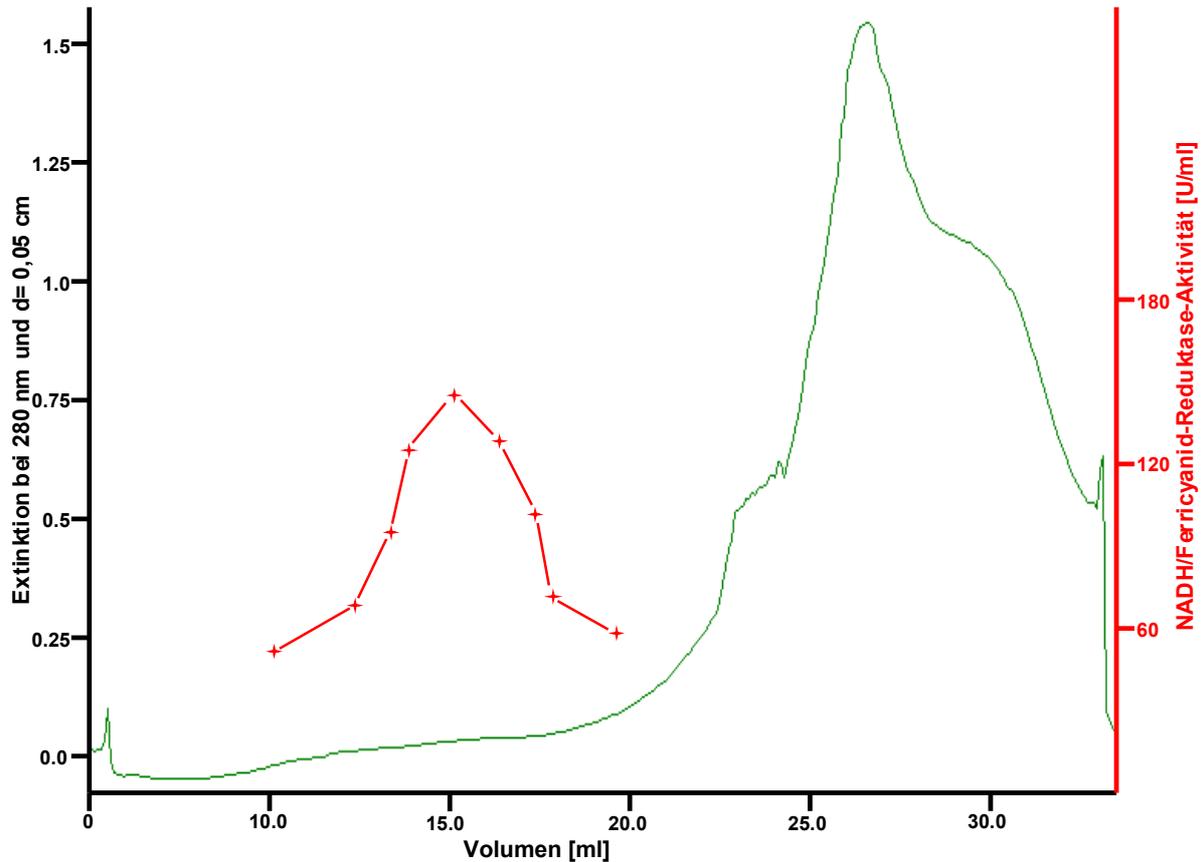


Abbildung 6: Zuckergradienten-Zentrifugation der mit Octylglucosid solubilierten Mitochondrienmembranen. 0 ml entspricht dem unteren Ende des Zuckergradienten, 36 ml dem oberen. Die NADH/Ferricyanid-Reduktase-Aktivität (+—+) zeigt die Lage des Komplex I im Gradienten. Die Extinktion bei 280 nm (—), die in einer Durchflußküvette bestimmt wurde, zeigt die Verteilung des Proteins.

Die Fraktionen mit der höchsten NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Nach Auswaschen des Zuckers durch Ultrafiltration wurde zur Probe Kalium-Rhodanid gegeben. Dies führt zu einer Spaltung des Komplex I in Membranarm und Bruchstücke des peripheren Arms. Durch die folgende Zuckergradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von KSCN wurde der Membranarm von den anderen Bruchstücken abgetrennt. Abbildung 7 zeigt das Sedimentationsprofil. Der Membranarm des Komplex I sedimentiert unter

den gegebenen Bedingungen ungefähr bis zur Hälfte des Gradienten, während die Bruchstücke des peripheren Arms aufgrund ihrer geringeren Masse langsamer durch den Gradienten sedimentieren.

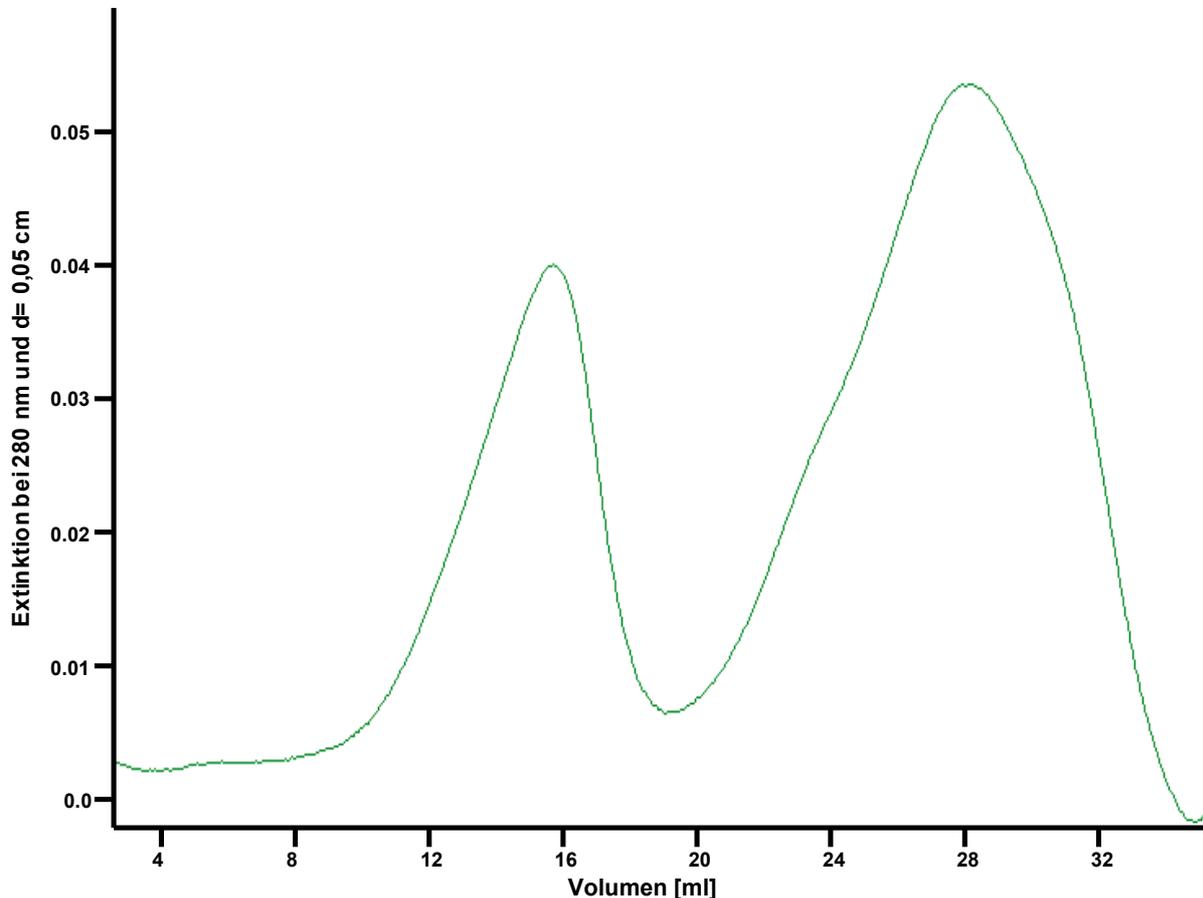


Abbildung 7: Zuckergradienten-Zentrifugation des mit KSCN behandelten Komplex I. 0 ml entspricht dem unteren Ende des Zuckergradienten, 32 ml dem oberen. Der Membranarm befindet sich zwischen 12 ml und 16 ml. Die Extinktion bei 280 nm (—), die in einer Durchflußküvette bestimmt wurde, zeigt die Verteilung des Proteins.

Die Fraktionen des Membranarms wurden durch Ultrafiltration eingengt und durch anschließende Größenausschlußchromatographie einem Puffer- und Detergenzwechsel unterzogen. Abbildung 8 zeigt das Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie.

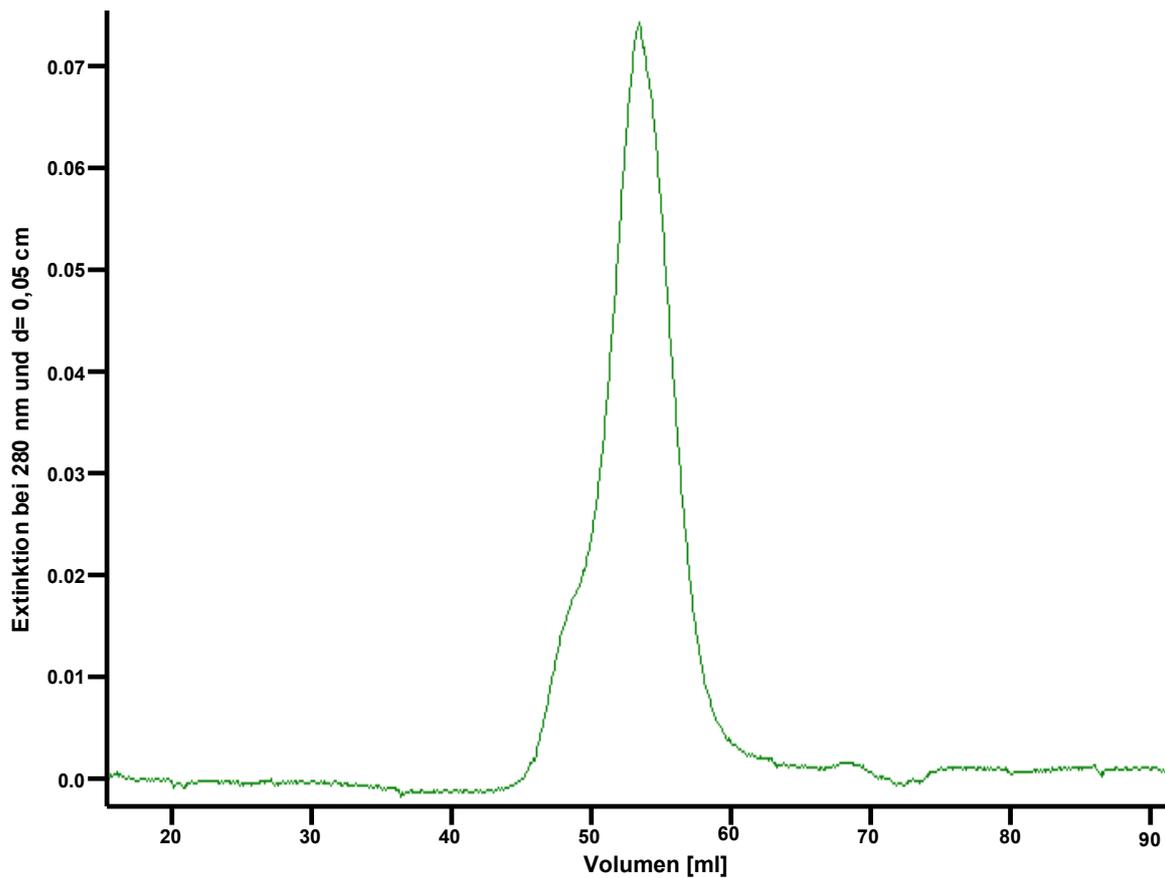


Abbildung 8: Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie des Membranarms. Die Extinktion bei 280 nm (—) wurde in einer Durchflußküvette bestimmt. Das Säulenvolumen betrug 120 ml.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Ausbeute und Reinheit der einzelnen Reinigungsschritte der Standardpräparation. Ausgegangen wurde von 800 g *N. crassa* Hyphen bzw. 15 g Mitochondrienmembranen (Feuchtmasse).

Tabelle 1: Standardpräparation des Membranarms von Komplex I

Präparation	Volumen Protein		Aktivität			
	[ml]	[mg]	gesamt [U]	volumen spezifisch [U/ml]	spezifisch [U/mg]	Ausbeute [%]
Octylglucosid Extraktion	36	n.d	7200	200,0	n.d	100
1. Zuckergradienten-Zentrifugation	50	80	5000	100,0	125	69
2. Zuckergradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von KSCN	20	20	n.d	n.d	n.d	35
Größenausschlußchromatographie	15	10	n.d	n.d	n.d	18

Die Ausbeute wurde in den ersten beiden Schritten auf die Gesamtaktivität und ab dem dritten Schritt wegen fehlender NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität des Membranarms auf die Proteinmenge bezogen. Die Proteinzusammensetzung der unterschiedlichen Aufreinigungsschritte wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit bestimmt (Abbildung 9).

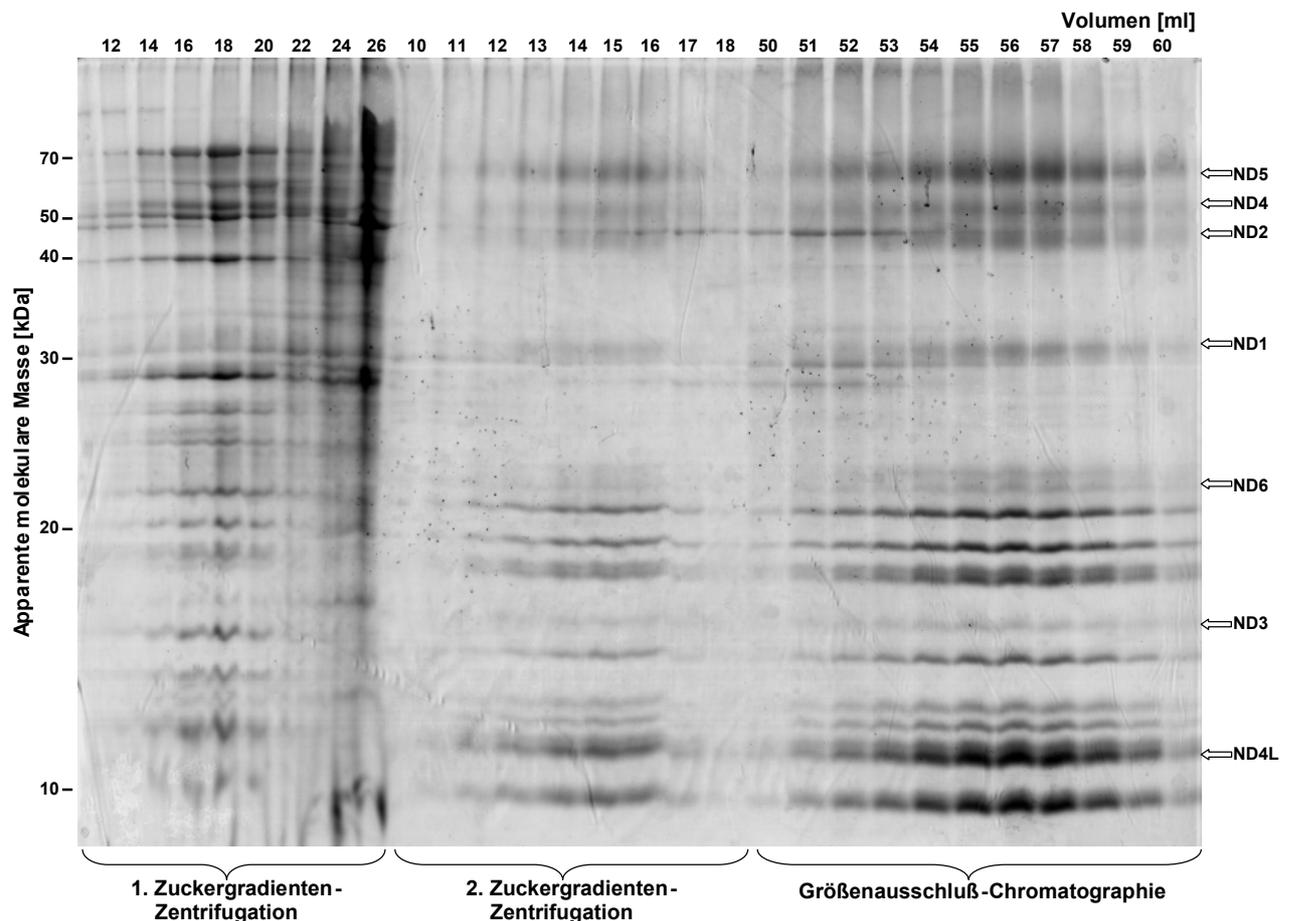


Abbildung 9: SDS-PAGE der Fraktionen nach der 1. Zuckergradienten-Zentrifugation, der 2. Zuckergradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von KSCN und der Größenausschlußchromatographie. Gezeigt ist die Proteinzusammensetzung der Gipfel-fractionen der verschiedenen Aufreinigungsschritte. Am linken Rand befindet sich eine logarithmische Skala der Masseneinheit in kDa. Am rechten Rand sind die mitochondrial kodierten Untereinheiten nach ihren Genen ND1-ND6 und ND4L gekennzeichnet. Am oberen Rand sind die Fraktionen anhand der Volumina der Sedimentations- bzw. Elutionsprofile gekennzeichnet.

Bereits nach der 1. Zuckergradienten-Zentrifugation läßt sich das typische Polypeptidmuster des Komplex I erkennen. In den Gipelfractionen der 2. Zuckergradienten-Zentrifugation zeigt sich bis auf wenige Verunreinigungen das Polypeptidmuster des Membranarms von Komplex I, das durch die mitochondrialen Untereinheiten des Komplex I dominiert wird (Sackmann, 1991). Die Gipelfractionen der Größenausschlußchromatographie zeigen auf der SDS-PAGE den etwa 95 % reinen Membranarm des Komplex I.

4.2 Alternative Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Mit der oben beschriebenen Präparation des Membranarms blieben Kristallisationsexperimente über einen längeren Zeitraum auch bei gleichen Kristallisationsbedingungen nicht reproduzierbar, was vermuten ließ, daß der Membranarm in unterschiedlichen Konformationen gewonnen wurde. Ziel einer alternativen Aufreinigung war somit die Reindarstellung des Membranarms über schonendere Verfahren. Daneben sollten die in der Standardaufreinigung dominierenden Ultrazentrifugationsschritte ersetzt werden.

4.2.1 Strategien zu alternativen Aufreinigungsverfahren des Membranarms von Komplex I

Im Besonderen die durch die 1. Zuckergradientenzentrifugationen geleistete Trennung von Lipiden und Proteinen stellte sich als besonders schwierig heraus. Herkömmliche Materialien zur Ionenaustauschchromatographie zeigten zu geringe Durchflußgeschwindigkeiten und Bindungskapazität. Die erste Aufarbeitung eines Rohextraktes stellt im Allgemeinen eine große Hürde innerhalb einer Proteinaufreinigung dar. Es wurde somit nach einem proteinbindenden Material gesucht, das leicht herzustellen ist und somit nach der Behandlung mit dem Rohextrakt verworfen werden kann. Dieses Problem wurde letztendlich durch den Einsatz von Hydroxylapatit, an das Komplex I erfolgreich in einem Batch-Verfahren gebunden werden konnte, gelöst.

4.2.2 Charakterisierung der Bindung von Komplex I an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ist eine modifizierte Form des kristallinen Calciumphosphates. Es adsorbiert keine Lipide und macht es so zu einem nützlichen chromatographischen Medium für die Proteinaufreinigung (Tiselius, 1956). Zwei verschiedene Adsorbierstellen für Proteine wurden beschrieben. Zum einen das Calcium, das mit den sauren Seitenketten der Aminosäuren eines Proteins wechselwirkt und zum anderen das Phosphat, welches basische Seitenketten bindet (Bernardi, 1973). Weiterhin läßt es sich mit geringem Aufwand und Kosten in größeren Mengen aus Calciumchlorid und di-Natriumhydrogenphosphat synthetisieren.

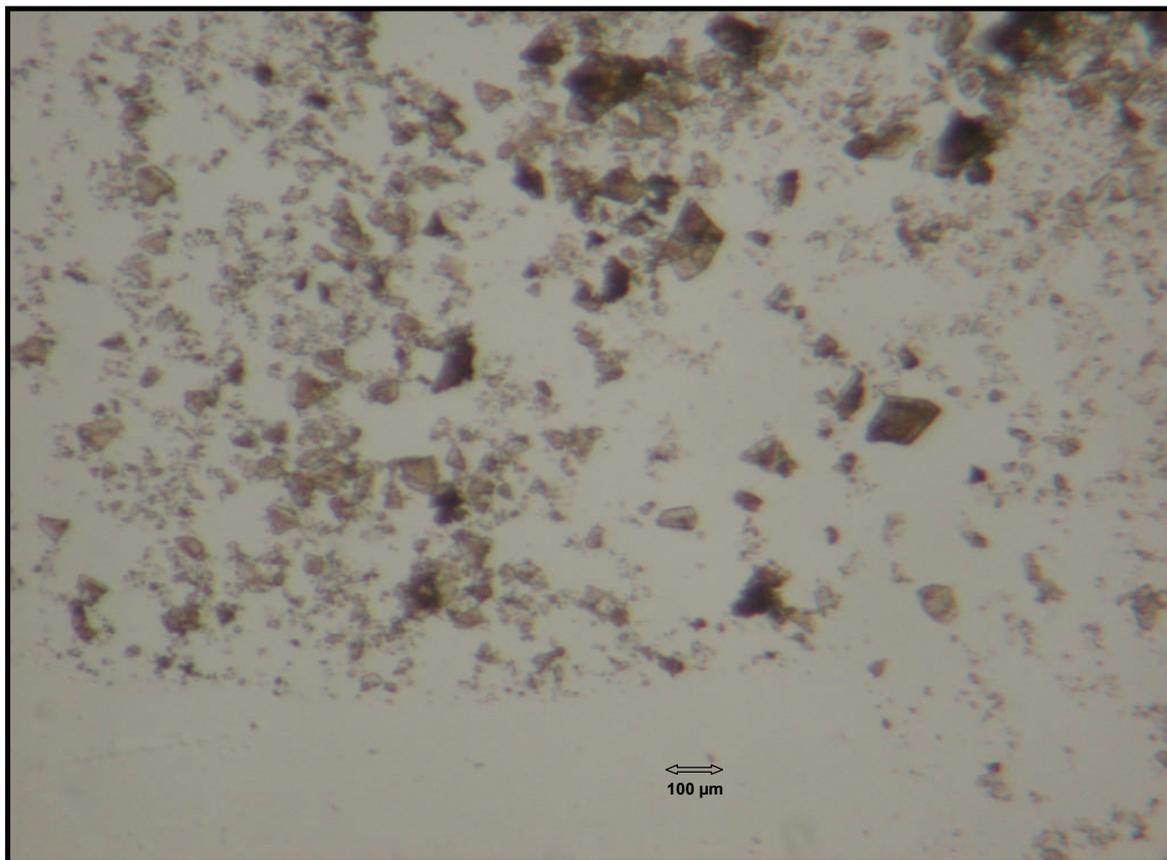


Abbildung 10: Hydroxylapatit Kristalle mit einer Kantenlänge von bis zu 100 µm. Die Synthese erfolgte nach der Tiselius Methode, bei der über mehrere Schritte durch Kochen von Na_2HPO_4 und CaCl_2 in NaOH Kristalle ausfallen an denen Proteine gebunden werden können.

Zur Charakterisierung der Bindung von Komplex I an Hydroxylapatit wurde das Verhältnis von gebundenem Komplex I zur eingesetzten Menge an solubilisiertem Mitochondrienprotein bei konstanter Hydroxylapatitmenge und die optimale Phosphatkonzentration zur möglichst selektiven Bindung und Elution von Komplex I bestimmt. Abbildung 11 zeigt die durch NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmte Menge an Komplex I im Überstand nach Bindung und nach Elution in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Mitochondrienprotein bei konstanter Menge an Hydroxylapatit. Die Bindung erfolgte bei 30 mM Phosphat und die Elution durch 0,25 M Natriumphosphat jeweils pH 7.0. In Batch-Ansätzen wurden zu jeweils 0,3 ml Hydroxylapatit 0,25 – 12,5 mg solubilierte Mitochondrienproteine zugegeben und die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität im Überstand nach Bindung bzw. Elution bestimmt.

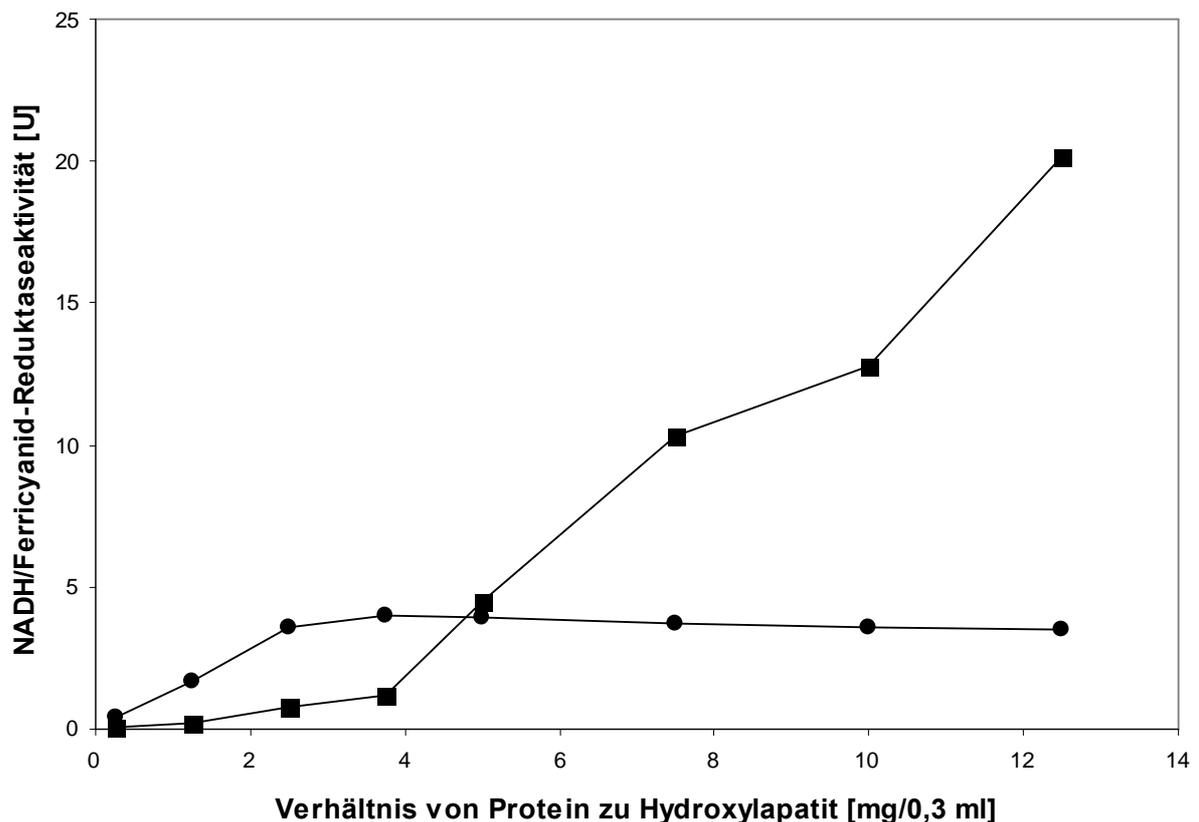


Abbildung 11: Bindung von Komplex I an Hydroxylapatit. Gezeigt ist die durch NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität ermittelte Menge an Komplex I im Überstand nach Bindung (■—■) bei 30 mM Natriumphosphat pH 7.0 und nach Elution (·—·) mit 250 mM Natriumphosphat.

Hierbei zeigte sich, daß der Anteil von Komplex I, der bei einer Konzentration von 30 mM Phosphat an Hydroxylapatit gebunden wird, ab einem Verhältnis von 2,5 mg solubiliertes Mitochondrienprotein zu 100 µl hydrostatisch sedimentiertem Hydroxylapatit nicht mehr weiter gesteigert werden kann.

Im nächsten Schritt wurde die für die möglichst selektive Bindung von Komplex I optimale Konzentration an Phosphat gesucht, d.h. die Phosphatkonzentration bei der Komplex I gerade noch gebunden wird. Vorgegangen wurde wie oben in Batch-Ansätzen. 2,5 mg solubiliertes Mitochondrienprotein wurde mit 0,3 ml Hydroxylapatit vermischt. Die Phosphatkonzentration wurde dabei von 10 bis 50 mM variiert. Bestimmt wurde nicht gebundene NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität im Überstand und die gebundene Aktivität im Eluat bei 250 mM Natriumphosphat.

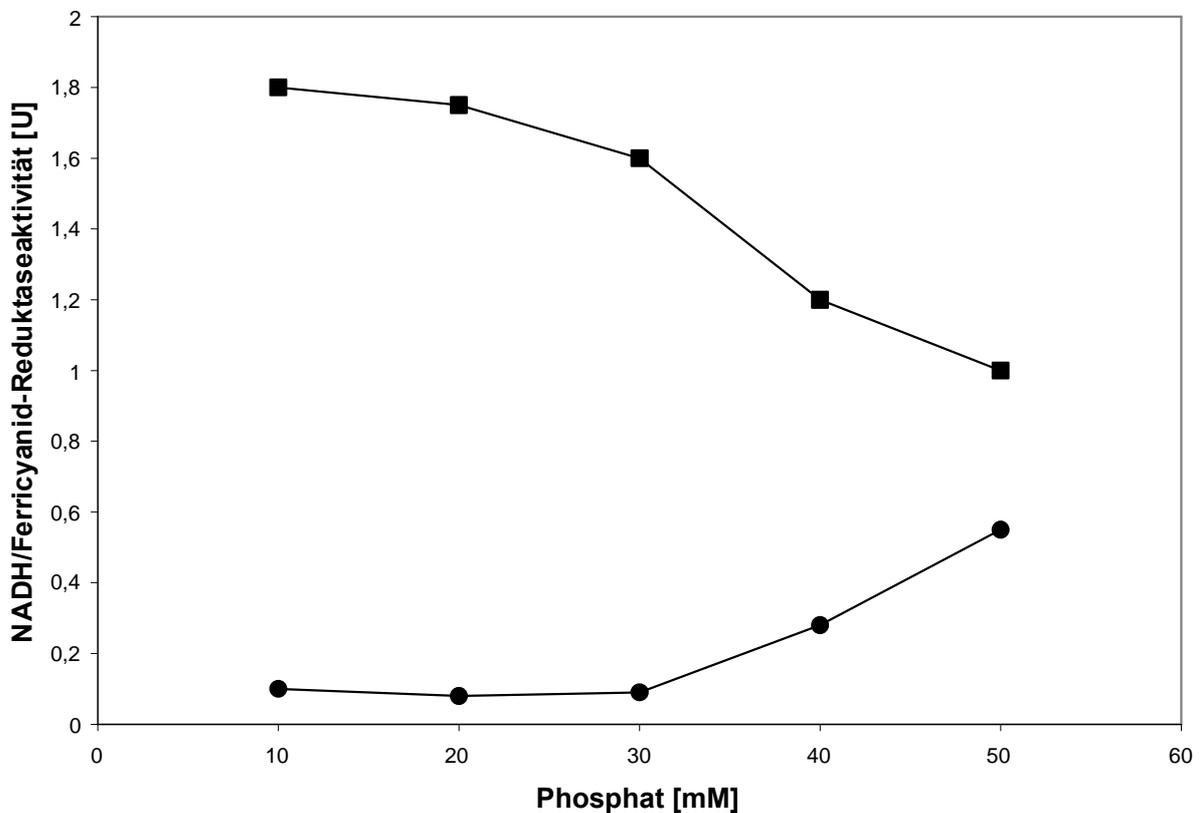


Abbildung 12: Abhängigkeit der Komplex I-Bindungskapazität von Hydroxylapatit von der Phosphatkonzentration. Gezeigt ist der Anteil von Komplex I im Überstand nach Bindung bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen (●—●) und nach Elution bei 250 mM Phosphat (■—■). Die Komplex I Bestimmung erfolgte über die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität.

Bei einem Verhältnis von 2,5 mg solubiliertem Mitochondrienprotein pro 100 μ l hydrostatisch sedimentiertem Hydroxylapatit ist der gebundene Anteil von Komplex I bis zu einer Phosphatkonzentration von 30 mM konstant. Bei erhöhter Phosphatkonzentration steigt der Anteil des nicht gebundenen Komplex I an.

Im nächsten Schritt wurde die für die möglichst selektive Elution von Komplex I optimale Phosphatkonzentration gesucht. Vorgegangen wurde wie oben beschrieben und ein Verhältnis von Mitochondrienprotein zu Hydroxylapatit von 2,5 mg pro 100 μ l und eine Phosphatbindungskonzentration von 30 mM eingestellt. Gesucht wurde nach der Phosphatkonzentration bei der Anteil von Komplex I im Eluat nicht weiter gesteigert werden kann (Abbildung 13).

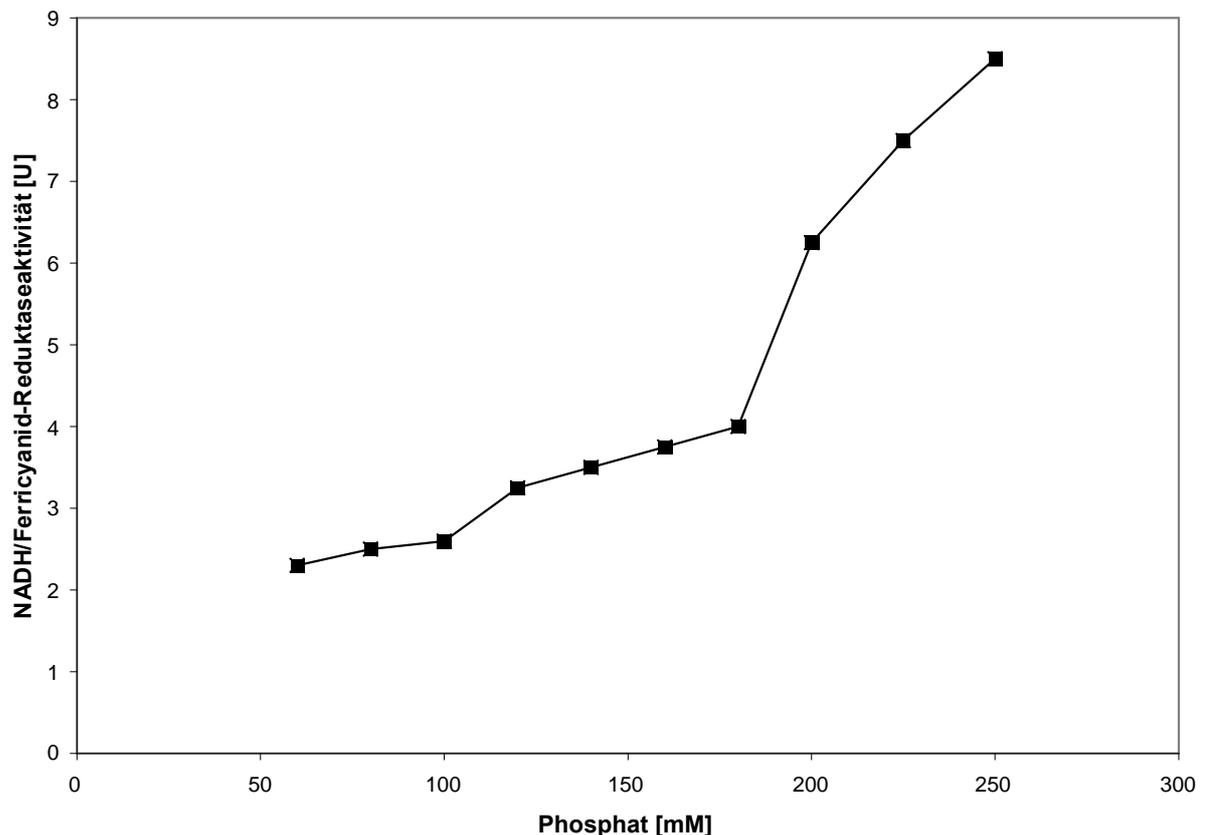


Abbildung 13: Abhängigkeit der Komplex I-Desorption von der Phosphat-elutionskonzentration. Gezeigt ist die durch NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmte Menge an Komplex I bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen während der Elution (■—■).

Eine Erhöhung der Phosphatkonzentration steigert die Menge an Komplex I im Eluat. Ab 250 mM Phosphat kommt es bei 4°C zum Ausfallen von Phosphat, so daß der Anteil von Komplex I im Eluat nicht weiter gesteigert werden kann.

4.2.3 Präparativer Einsatz der alternativen Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Die Aufreinigung des Membranarms von Komplex I aus Mitochondrien von *N. crassa* nach der alternativen Methode erfolgte aus Mitochondrien durch folgende Schritte: Solubilisierung der Mitochondrien durch n-Octyl- β -D-glucoopyranosid, Batch-Verfahren mit Hydroxylapatit, Größenausschlußchromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Spaltung des Komplex I durch Größenausschlußchromatographie in Anwesenheit von Kalium-Rhodanid und abschließender Größenausschlußchromatographie.

Wie in der Standardmethode wurde n-Octyl- β -D-glucoopyranosid für die Solubilisierung der Mitochondrien verwendet, da es sich wie bereits oben beschrieben als sehr vorteilhaft für die Isolierung des Komplex I herausgestellt hat. Jedoch erfolgt die Solubilisierung direkt aus *N. crassa* Mitochondrien und nicht über den Umweg der Isolierung der Mitochondrienmembranen. Nach Abzentrifugieren nicht solubilisierter Bestandteile wurden die Proteine im Batch-Verfahren bei 30 mM Phosphat an Hydroxylapatit gebunden. Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Octylglucosid durch Triton X-100 getauscht. Durch dreimaliges waschen mit Triton X-100 in Phosphatpuffer pH 7.0 wurden Lipide und Proteine mit schwächerer Wechselwirkung zu Hydroxylapatit entfernt. Die Elution von Komplex I erfolgte bei 250 mM Phosphat in drei Schritten. Abbildung 14 zeigt in der oberen Reihe die drei Wasch- und in der unteren Reihe die drei Elutionsschritte.

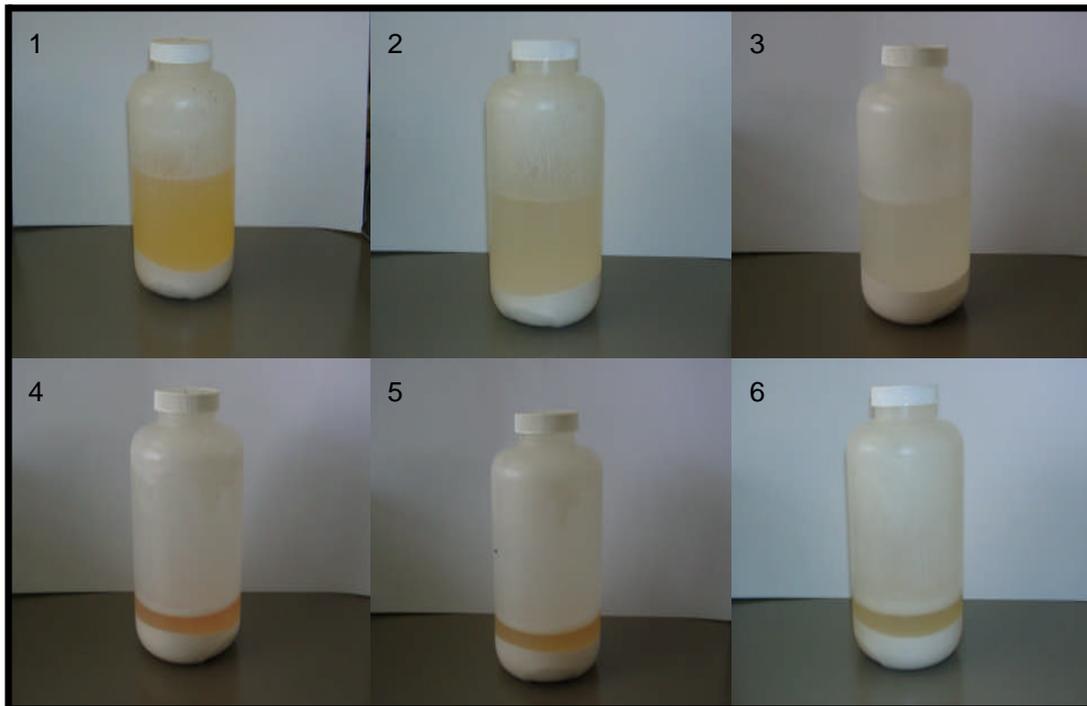


Abbildung 14: Bindung und Elution von Komplex I an Hydroxylapatit im Batch-Verfahren. 50 ml Mitochondriensuspension aus 400g Hyphen (Feuchtmasse) wurden mit Octylglucosid Solubilisiert und in Anwesenheit von 30 mM Phosphat mit 125 ml hydrostatisch sedimentiertem Hydroxylapatit verrührt. Nach 30 min Bindungszeit wurde der Überstand nach Zentrifugation verworfen und nach dreimaligem Waschen unter Bindungsbedingungen und Zentrifugation wurde die Überstände ebenfalls verworfen (1-3). Zur Elution der gebundenen Proteine wurde in drei Schritten 0,3 bzw. zweimal 0,2 M Phosphat zugegeben gemischt und die Überstände (4-6) nach Zentrifugation vereinigt.

Das Eluat aus den drei Schritten mit einem Gesamtvolumen von 180 ml wurde vereinigt und Hydroxylapatitpartikel sowie aggregiertes Protein durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde durch Ultrafiltration eingeeengt und zur weiteren Aufreinigung auf eine Sephacryl S300 Größenausschlußchromatographiesäule gegeben. Abbildung 15 zeigt das Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie.

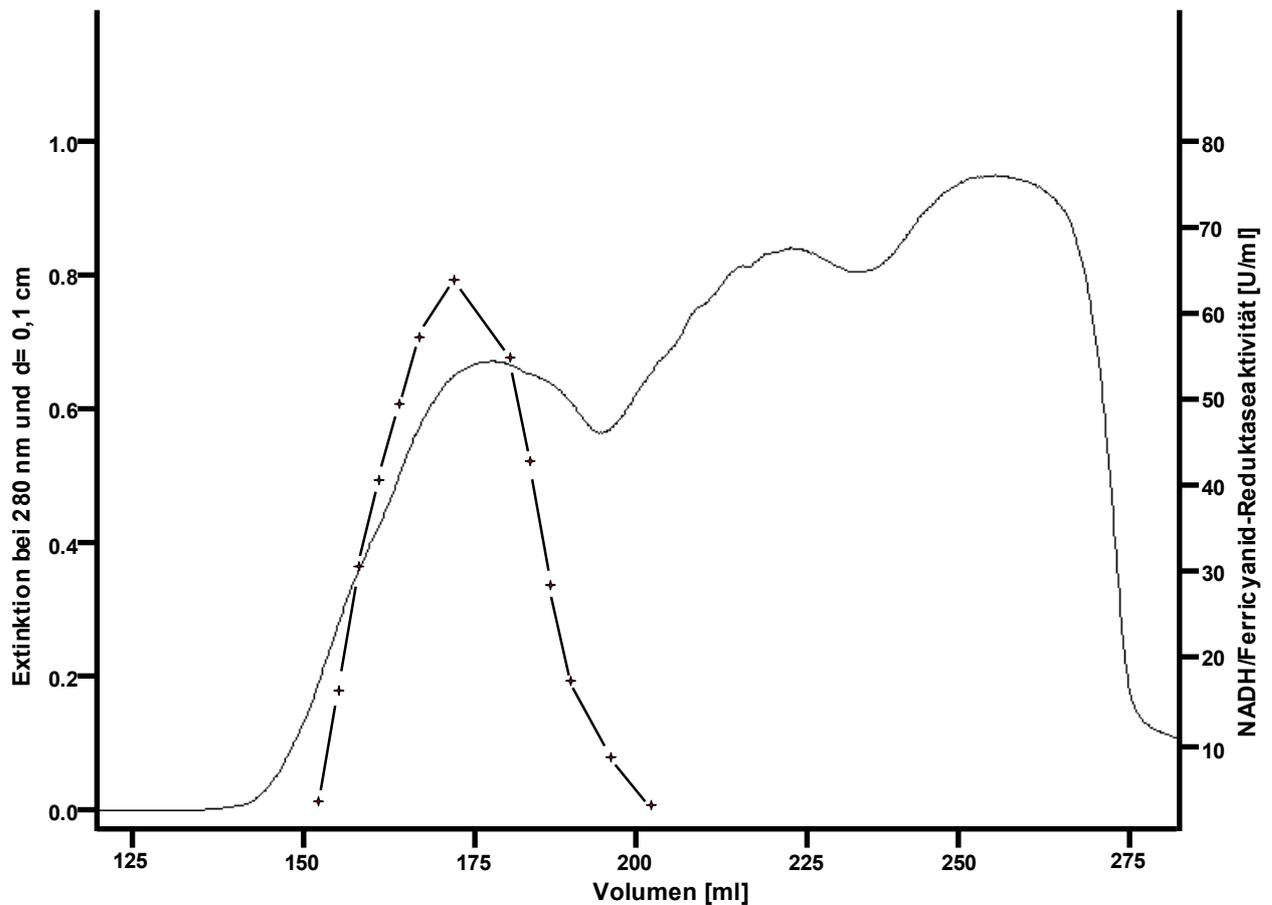


Abbildung 15: Größenausschlußchromatographie des Komplex I. Das Säulenvolumen betrug 340 ml. Aufgetragen wurden 10 ml. Die Extinktion bei 280 nm (—) wurde in einer Durchflußküvette bestimmt. Die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität (+ — +) zeigt die Lage des Komplex I im Elutionsprofil.

Die Komplex I haltigen Fraktionen wurden vereinigt und zur weiteren Aufreinigung und Wechsel des Detergenz zu n-Decyl- β -D-Maltopyranoside auf eine Source 15Q Ionenaustauschchromatographiesäule gegeben. Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen erfolgten die Bindung und der Detergenzwechsel in Anwesenheit von 50 mM NaCl. Zum Austauschen des Detergenz wurde die Säule nach der Bindung von Komplex I mit 2% Decylmaltoside gespült. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 50 mM – 500 mM NaCl in Anwesenheit von Decylmaltosid. Abbildung 16 zeigt das Elutionsprofil des Ionenaustauschers und das Polypeptidmuster der Komplex I haltigen Fraktionen, sowie die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität des Komplex I.

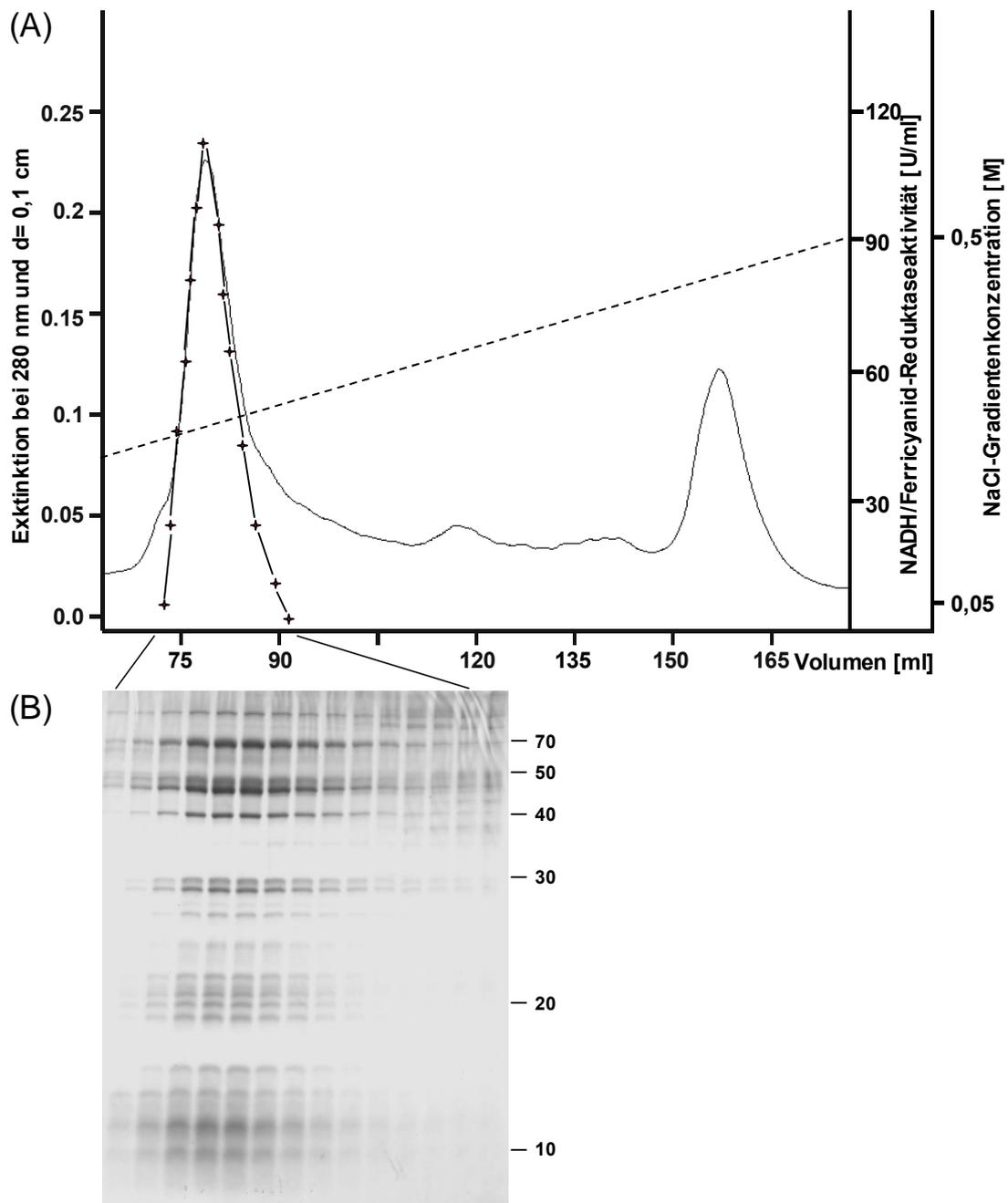


Abbildung 16: Source Q15 Ionenaustauschchromatographie von Komplex I. (A) Elutionsprofil der Extinktion bei 280 nm (—), der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität (+—+) und der NaCl Konzentration (----). (B) SDS-PAGE der Komplex I haltigen Fraktionen. Die Zahlen geben die apparenten Molmassen einiger Untereinheiten des Komplex I in kDa wieder.

Die Komplex I haltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels Druckfiltration eingengt. Der durch Rhodanidzugabe freigesetzte Membranarm des Komplex I wurde durch Größenausschlußchromatographie in Anwesenheit von KSCN im Puffer aufgereinigt. Abbildung 17 zeigt das Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie und das Polypeptidmuster der membranarmhaltigen Fraktionen.

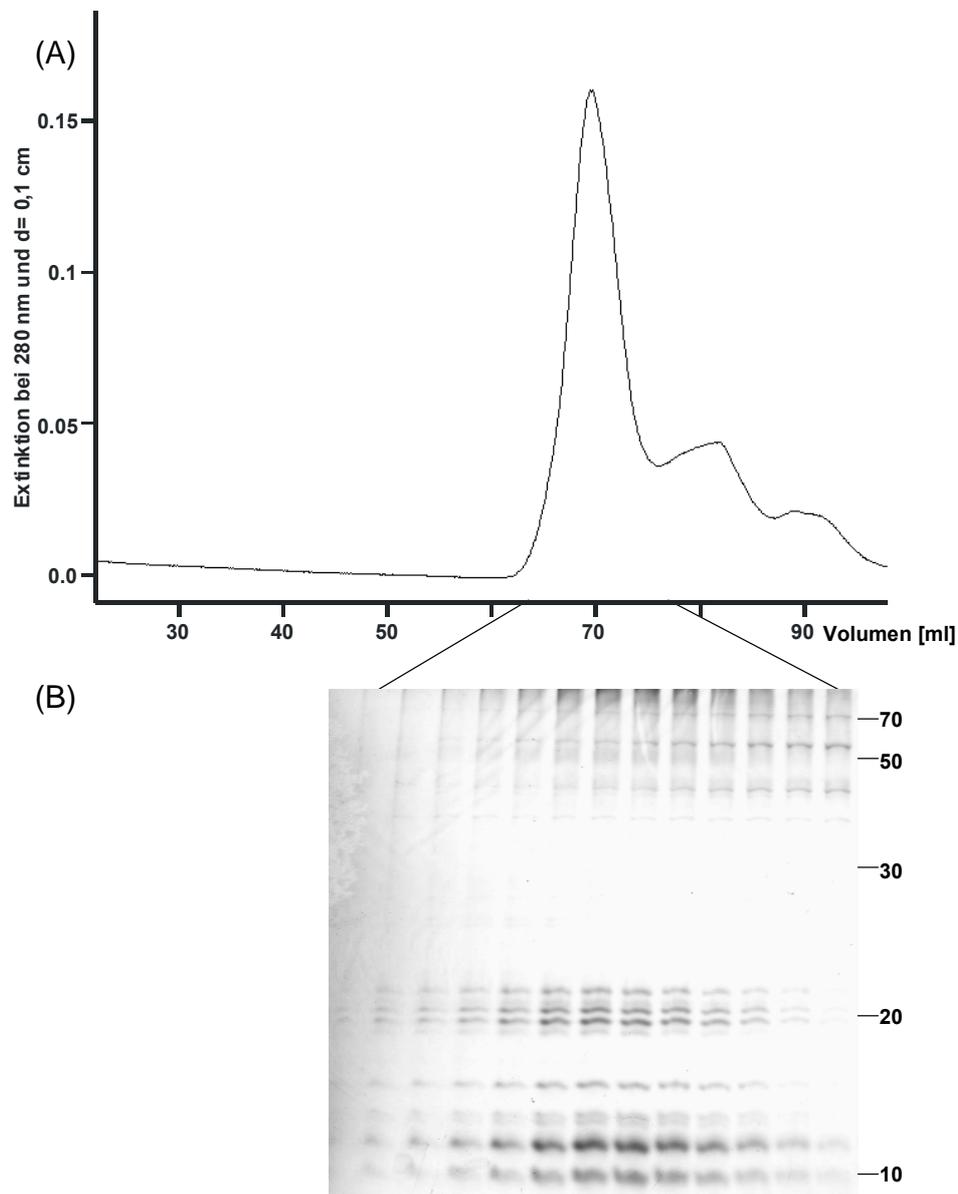


Abbildung 17: Größenausschlußchromatographie des Membranarms von Komplex I in Anwesenheit von Kaliumrhodanid. (A) Elutionsprofil der Extinktion bei 280 nm (—). (B) SDS-PAGE der membranarmhaltigen Fraktionen. Die Zahlen geben die apparenten Molmassen in kDa wieder.

Als abschließenden Reinigungsschritt wurden die membranarmhaltigen Fraktionen mittels Ultrafiltration eingengt und durch Größenausschlußchromatographie aufgereinigt. Der Membranarm aggregiert im Gegensatz zum Komplex I unterhalb einer gewissen Ionenstärke. Durch die Verwendung von 100 mM Tri-Natriumcitrat in diesem Reinigungsschritt wurde dies verhindert. Abbildung 18 zeigt das Elutionsprofil und die Polypeptidzusammensetzung der Größenausschlußchromatographie.

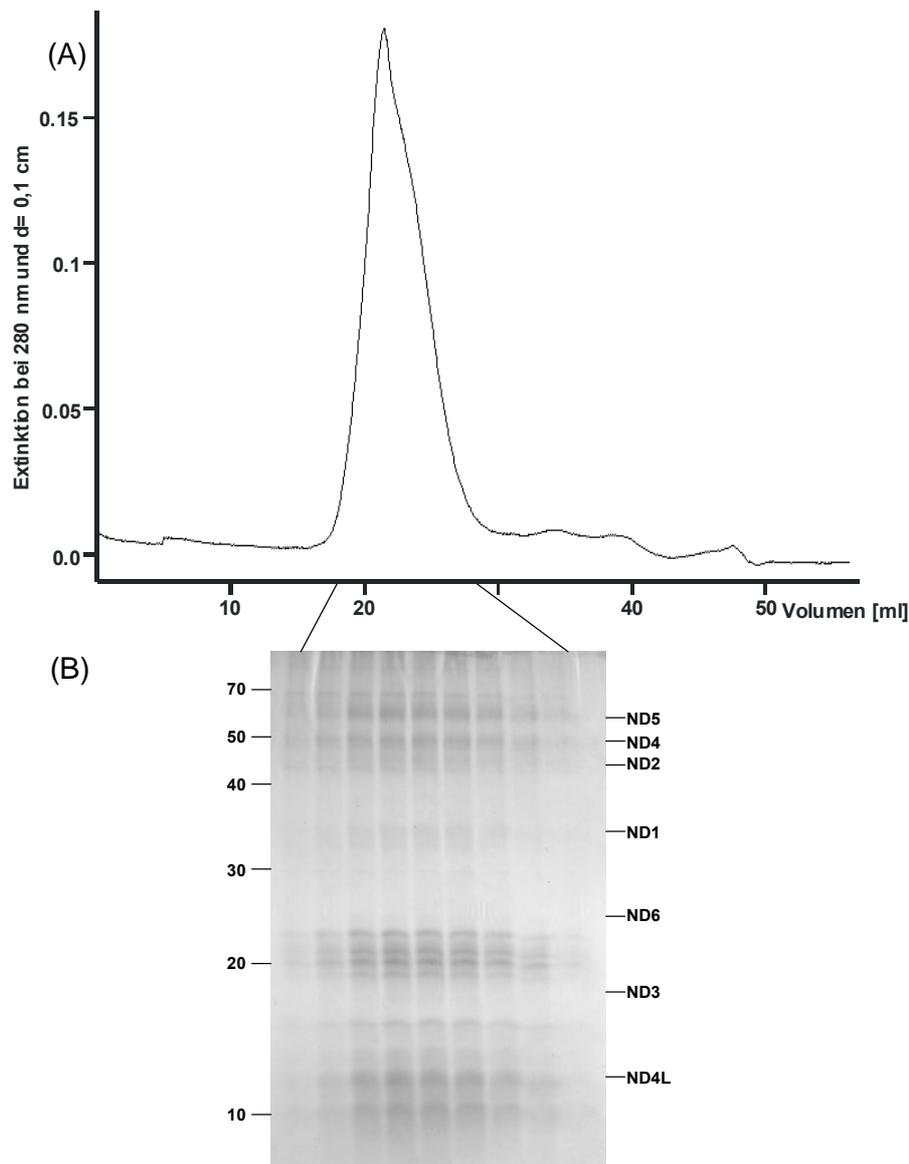


Abbildung 18: Größenausschlußchromatographie des Membranarms von Komplex I. (A) Elutionsprofil der Extinktion bei 280 nm (—). (B) SDS-PAGE des letzten Aufreinigungsschrittes. Die Zahlen links geben die apparenten Molmassen in kDa wieder und rechts die Positionen der mitochondrial kodierten Untereinheiten im Gel.

Das Polypeptidmuster des dargestellten Membranarms zeigt nur noch wenige Verunreinigungen ausschließlich im hochmolekularen Bereich von 40 – 70 kDa. Diese Verunreinigungen stellen Minoritätsproteine da und liegen an der Nachweisgrenze des mit Coomassie-Blau gefärbten Gels, so daß eine hohe Reinheit des präparierten Membranarms vorliegt.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ausbeute und Reinheit der einzelnen Reinigungsschritte. Ausgegangen wurde von 400 g *N. crassa* Hyphen (Feuchtmasse).

Tabelle 2: Alternative Aufreinigung des Membranarms von Komplex I

Präparation	Volumen Protein		Aktivität			Ausbeute [%]
	[ml]	[mg]	gesamt [U]	volumen [U/ml]	spezifisch [U/mg]	
Mitochondrienextraktion	60	1275	3585	59,8	2,8	100
Hydroxylapatite Batch	193	250	2385	12,2	9,5	67
Gelfiltration	33	106	1237	37,5	11,7	35
Ionenaustauschchromatographie	12	22	612	51,0	27,8	17
Größenausschlußchromatographie in Anwesenheit von KSCN	7	3,4	n.d.	n.d.	n.d.	5,3
Größenausschlußchromatographie	5	2,7	n.d.	n.d.	n.d.	4,2

Die Ausbeute wurde in den ersten vier Schritten auf die Gesamtaktivität und ab dem fünften Schritt wegen fehlender NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität des Membranarms auf die Proteinmenge bezogen. Um die Abnahme der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität über die verschiedenen Aufreinigungsschritte hinweg eindeutig einem Verlust an Komplex I zuzuordnen, wurde ein Elektrobplot mit anschließender Immundetektion der 20,9 und 21,3 kDa Untereinheit des Membranarms durchgeführt. Hierbei wurde von jedem Reinigungsschritt die gleiche Aktivitätsmenge eingesetzt. Bei den Reinigungsschritten des Membranarms, der keine NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität zeigt, wurde die gleiche auf den reinen Komplex I bezogene Proteinmenge des vorherigen Reinigungsschrittes eingesetzt. Abbildung 19 zeigt den Westernblot gegen die 20,9 und 21,3 kDa Untereinheit des Membranarms. Die im wesentlichen gleich intensiv angefärbten Banden der beiden

Untereinheiten über die Aufreinigungsschritte hinweg zeigen, daß die Verringerung der Aktivität mit dem Verlust an Komplex I korreliert.

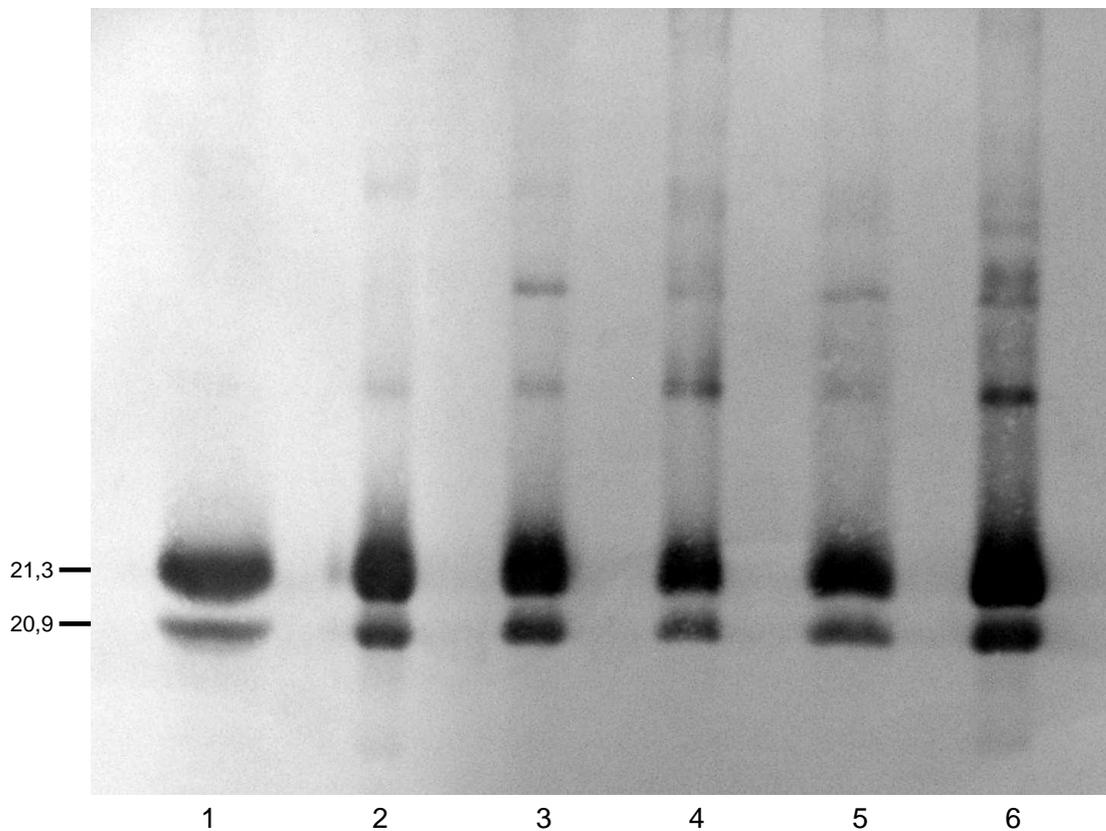


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse der einzelnen Schritte der alternativen Aufreinigung. Die Immundetektion erfolgte gegen die 21,3 und 20,9 kDa Untereinheit des Membranarms. Die Spuren 1-5 sind die Schritte: Hydroxylapatit Batch, Größenausschlußchromatographie, Ionenaustauschchromatographie, Größenausschlußchromatographie in Anwesenheit von KSCN und Größenausschlußchromatographie. Spur 6 zeigt als Kontrolle den Membranarm aus der Standardaufreinigung.

4.3 Vergleich der Standard- mit der alternativen Aufreinigung des Membranarms von Komplex I

Zum Vergleich der beiden Aufreinigungsmethoden sind die Parameter Dauer der Präparation, Ausbeute und Reinheit entscheidend. Die konformative Einheitlichkeit kann nur über erfolgreiche Kristallisationsexperimente verifiziert werden. Die Dauer der Präparation des Membranarms liegt im Fall der Standardpräparation bei vier und bei der alternativen Aufreinigung bei drei Tagen. Die Standardpräparation zeigt jedoch eine bessere Ausbeute als die alternative Aufreinigung. Sie liefert pro 800 g Hyphen Feuchtmasse ca. 10 mg Membranarm, die alternative Aufreinigung dagegen nur 5 mg. In Abbildung 20 ist die Polypeptidzusammensetzung des letzten Aufreinigungsschrittes beider Präparation gegenübergestellt. Beide Präparationen liefern einen sehr reinen Membranarm des Komplex I. Die alternative Aufreinigung zeigt einige wenige Verunreinigungen im hochmolekularen Bereich, die in der Standardaufreinigung schwächer auf der SDS-PAGE zu sehen sind.

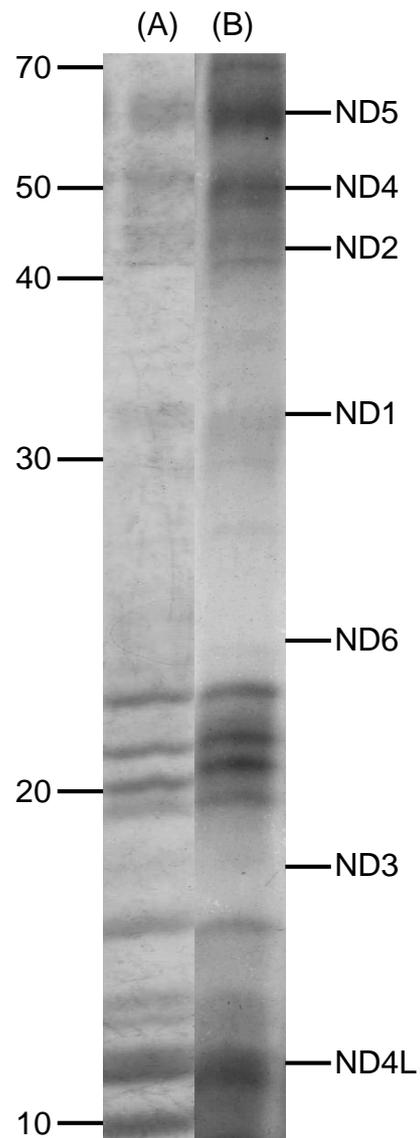


Abbildung 20: SDS-PAGE der Standard- und der alternativen Aufreinigung. Gezeigt ist die Polypeptidzusammensetzung des jeweils letzten Reinigungsschrittes der (A) Standardaufreinigung und (B) der alternativen Aufreinigung. Die Zahlen links geben die apparenten Molmassen in kDa wieder und die Zahlen rechts zeigen die Positionen der mitochondrial kodierten Untereinheiten ND1-ND6 sowie ND4L.

4.4 Verkürzung des alternativen Aufreinigungsverfahrens

Das alternative Aufreinigungsverfahren erstreckt sich über einen Zeitraum von drei Tagen und fünf Reinigungsschritten. Um die Zahl der Reinigungsschritte zu reduzieren wurde in einem weiteren Ansatz schon bei der Solubilisierung der Mitochondrien das chaotrope Kalium-Rhodanid zugegeben. Durch anschließende Hydroxylapatit-Batch, Größenausschlußchromatographie und Ionenaustauschchromatographie wurde die Isolierung des Membranarms ohne vorherige Isolierung des Gesamtkomplexes versucht. Wegen fehlender enzymatischer Aktivität wurde der Erfolg der Aufreinigungserfolg der einzelnen Reinigungsschritte direkt durch SDS-PAGE überprüft. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Die Solubilisierung erfolgte durch Triton X-100 in 60 mM Phosphat und 0,7 M KSCN. Der Hydroxylapatit-Batch erfolgt bei einer Bindekonzentration von 60 mM Phosphat. Nach Abzentrifugation von Hydroxylapatitpartikeln und aggregiertem Protein wurde das Eluat des Hydroxylapatit-Batch vereinigt, durch Ultrafiltration eingeeengt und zur weiteren Aufreinigung auf eine Sephacryl S300 Größenausschlußchromatographiesäule in Anwesenheit von 100 mM NaCl und 0,1 % Triton X-100 gegeben. Es wurde Natriumchlorid anstatt Tri-Natriumcitrat im Hinblick auf den nächsten Reinigungsschritt, der Ionenaustauschchromatographie, gewählt. Da der Membranarm des Komplex I keine NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität besitzt, erfolgte die Identifizierung im Elutionsprofi durch Westernblot-Analyse über Immundetektion der 21,3 kDa und 20,9 kDa Untereinheit des Membranarms von Komplex I. Abbildung 21 und 22 zeigt das Ergebnis des Hydroxylapatit-Batch und der anschließenden Größenausschlußchromatographie.

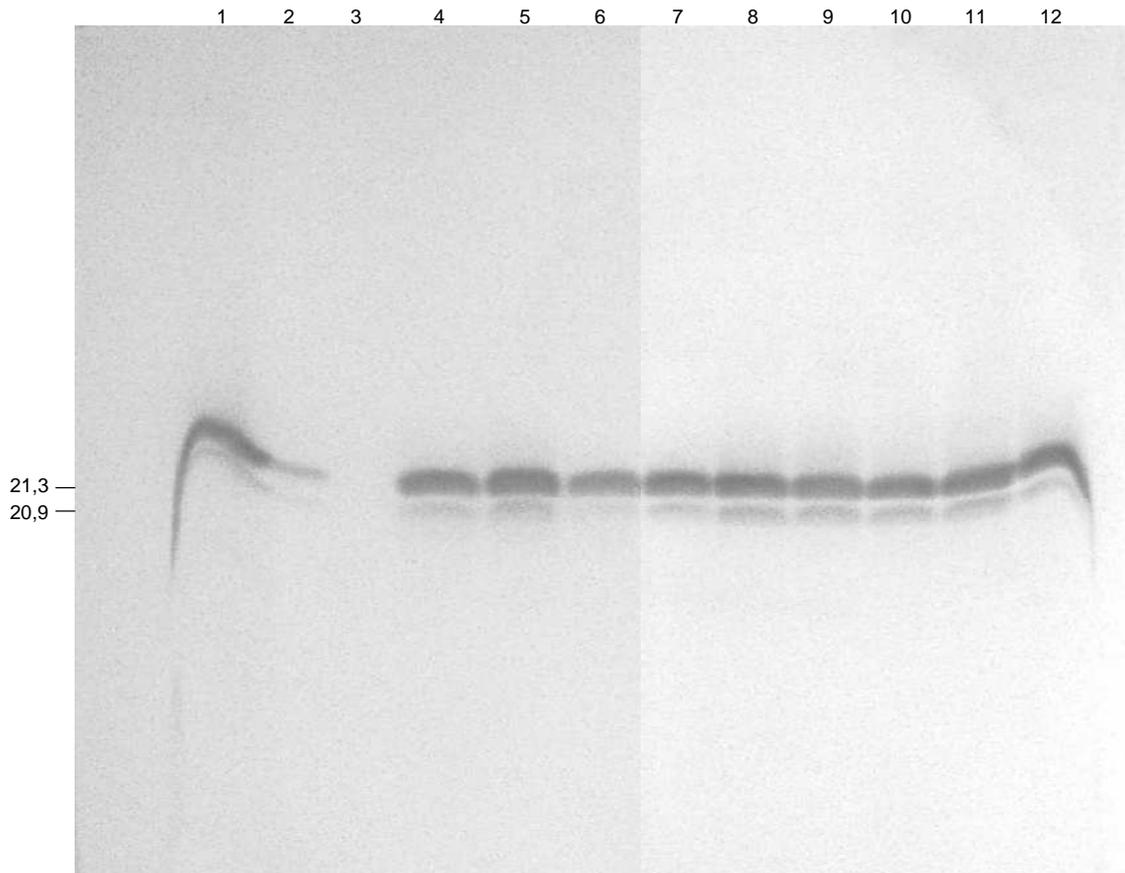


Abbildung 21: Identifizierung des Membranarms über Westernblot der 21,3 und 20,9 kDa Untereinheiten. Die Spuren 1-3 zeigen die Waschschriffe des Hydroxylapatit-Batch, die Spuren 4-6 die Elution des Hydroxylapatit-Batch, die Spuren 7-12 zeigen die Fraktionen der Größenausschlußchromatographie von 145-150 ml in 1 ml Schritten.

Der Nachweis der 21,3 und 20,9 kDa Untereinheit im Westernblot zeigt, daß der Membranarm in der Größenausschlußchromatographie im ersten Proteingipfel eluiert. Das Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie ist in Abbildung 22 dargestellt.

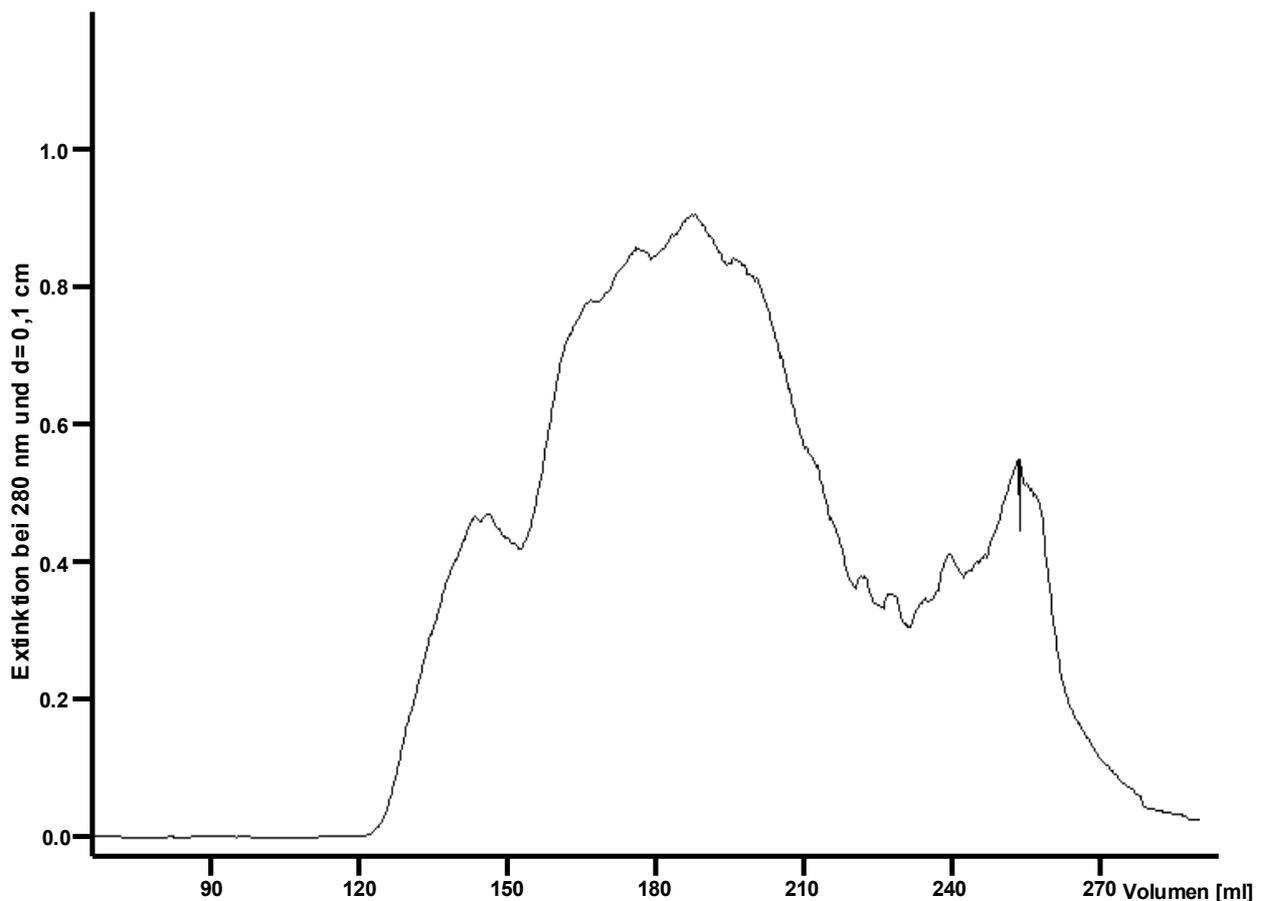


Abbildung 22: Größenausschlußchromatographie des Membranarms. Das Säulenvolumen betrug 340 ml. Aufgetragen wurden 10 ml. Gezeigt ist das Elutionsprofil der Extinktion bei 280 nm.

Anhand des Westernblot wurden die Fraktionen des ersten Proteingipfels von 130 – 160 ml vereinigt. Wegen der hohen Ionenstärke wurde, vor dem Auftragen der vereinigten Fraktionen auf eine Source Q15 Ionenaustauschchromatographiesäule, die Probe mit dem gleichen Volumen 0,1 % Triton X-100 Puffer verdünnt. Abbildung 23 zeigt das Elutionsprofil des Anionenaustauschers.

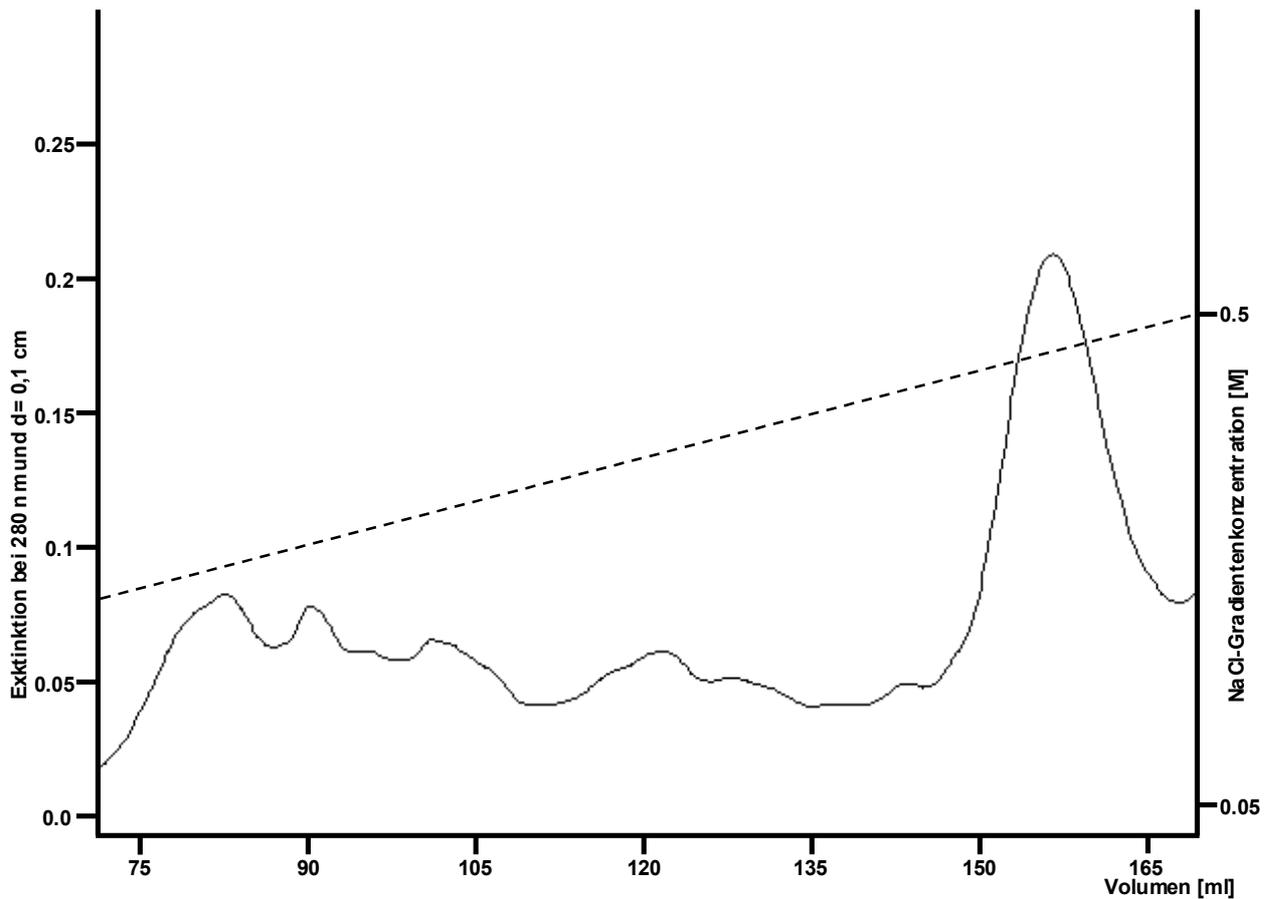


Abbildung 23: Source Q15 Ionenaustauschchromatographie des Membranarms von Komplex I. Gezeigt ist das Elutionsprofil der Extinktion bei 280 nm (—) und der NaCl Konzentration (----).

Der Reinigungserfolg der verkürzten alternativen Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Abbildung 24 zeigt die Peptidzusammensetzung der einzelnen Reinigungsschritte. Zur Identifizierung des Membranarms wurde ein Standard aus der alternativen Aufreinigung verwendet.

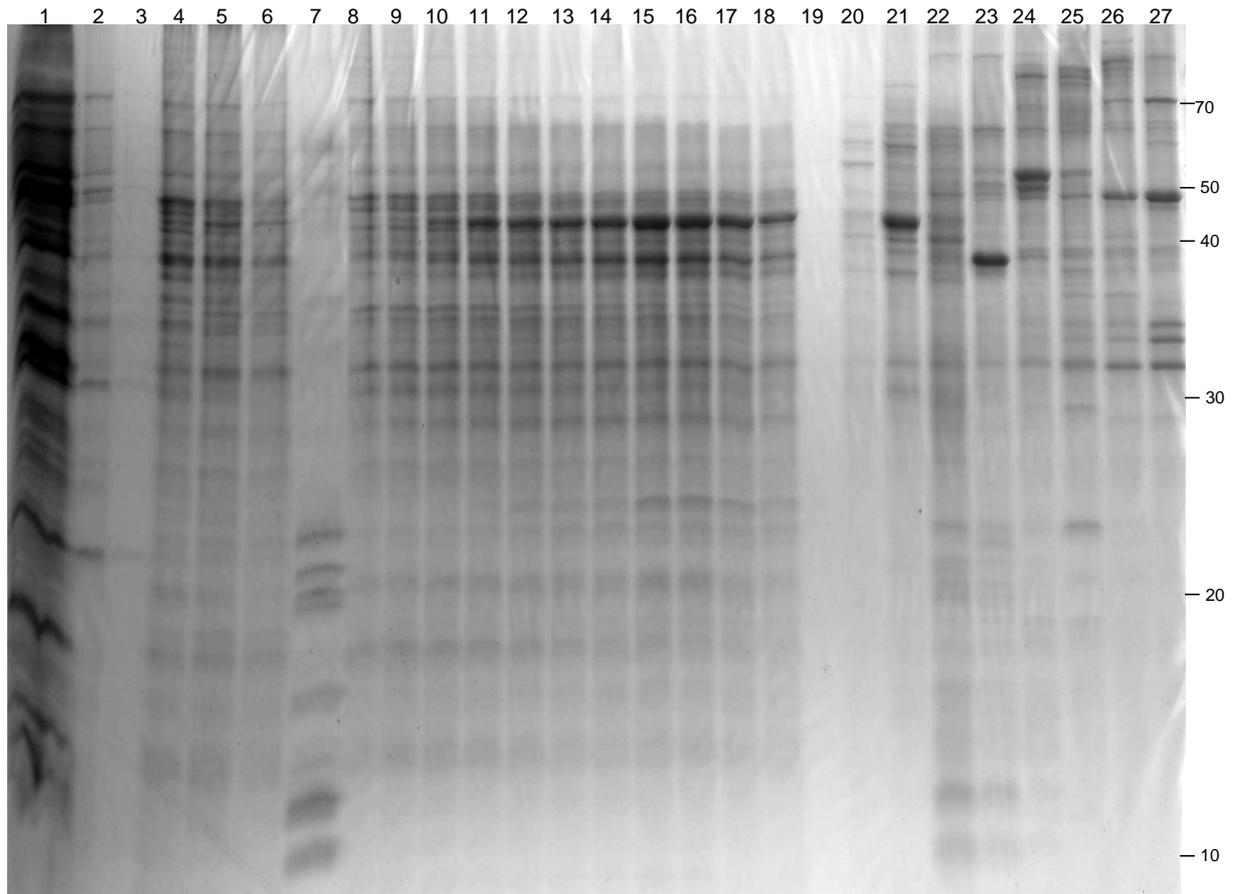


Abbildung 24: SDS-PAGE der verkürzten Aufreinigung des Membranarms von Komplex I. Gezeigt ist die Polypeptidzusammensetzung der einzelnen Reinigungsschritte. Die Spuren 1-3 zeigen die Waschschriffe des Hydroxylapatit-Batch, die Spuren 4-6 die Elutionsschritte des Hydroxylapatit-Batch, die Spur 7 einen Membranarm-Standard der alternativen Aufreinigung, die Spuren 8-18 die Fraktionen der Größenausschlußchromatographie von 135-165 ml in 3 ml Schritten, die Spuren 19-27 die Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie von 68-92 ml in 3 ml Schritten. Die Zahlen rechts geben die apparenten Molmassen in kDa an.

Auf der SDS-PAGE ist der Membranarm weder in den Hydroxylapatitfraktionen noch in denen der Größenausschlußchromatographie zu erkennen. Der Membranarm läßt sich im Vergleich mit dem Standard in der Spur 7, erst im dritten und letzten Reinigungsschritt identifizieren. Das typische Polypeptidmuster des Membranarms

ist mit einer geringen Reinheit, in den Spuren 22 und 23, entsprechend dem Elutionsvolumen bei 77 bis 80 ml, zu erkennen. In den vorherigen Reinigungsschritten stellt der Membranarm ein Minoritäts-Protein dar und lässt sich auf der SDS-PAGE durch Coomassie-Blau-Färbung nicht nachweisen.

5. Diskussion

5.1 Strukturaufklärung von Komplex I in Verbindung mit Komplex I Erkrankungen

Komplex I ist der einzige Enzymkomplex der oxidativen Phosphorylierung, dessen Struktur noch nicht atomar aufgelöst vorliegt. Einzig die Röntgenstrukturanalyse der Kristallstrukturen macht die Strukturaufklärung solcher komplexen Enzyme möglich. Dies konnte an den anderen an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzyme, der Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III, Yu et al., 1996), der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV, Tsukihara et al., 1996), der F₁ – Teil der ATPase (Abrahams et al., 1994) und neuerdings auch an dem membranständigen F₀ – Teil der ATPase, gezeigt werden (Meier et al., 2005). Eine Kristallstruktur des Komplex I würde die vorgeschlagenen Modelle des Elektronentransportes durch den peripheren Arm strukturell überprüfbar machen, den unverstandenen Elektronentransport und die Protonentranslokation durch den Membranarm klären, sowie möglicherweise einen Ansatz für medizinische Therapien bei Stoffwechselkrankheiten, die auf Komplex I Defekten beruhen geben (Singer und Ramsay, 1992). Defekte in der oxidativen Phosphorylierung zählen zu den am häufigsten beobachteten vererbbaaren Stoffwechselkrankheiten. Sie treten mit einer Häufigkeit von 1:10000 Lebendgeburten auf (Uusima et al., 2000; Darin et al., 2001; Skladal et al., 2003). Darunter ist die Komplex I Defizienz die häufigste (Budde et al., 2000). Mutationen in mitochondrial kodierten Genen haben oft schwerwiegende funktionelle Folgen, betreffen aber aufgrund der Heteroplasmie nicht alle Mitochondrien. Somit hängt die schwere der Krankheit mit dem Grad der mutierten mitochondrialen DNA ab. Vor allem auf aeroben Stoffwechsel angewiesene Gewebe z.B. Muskelgewebe aber auch Nervenzellen sind am intensivsten betroffen. Folgen sind mitochondriale Myopathien, Cardiomyopathien, Encephalopathien und Atrophien der Augen (Kleist-Retzow et al., 2003).

5.2 Das alternative Aufreinigungsverfahren des Membranarms von Komplex I

Wie bereits erwähnt konnte Komplex I noch nicht erfolgreich kristallisiert werden. Die Beweglichkeit von peripherem Arm und Membranarm zueinander lassen vermutlich eine Kristallisation des gesamten Komplexes nicht zu (Böttcher et al., 2002). Durch das chaotropen Salz Kalium-Rhodanid kann der Komplex I aus *N. crassa* in Bruchstücke des peripheren Arm und in den intakten Membranarm zerlegt werden. Der durch die Standardaufreinigung erhaltene Membranarm konnte zeitweise Kristallisiert werden (Drexler, 2002), jedoch waren diese Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu klein und nur schlecht reproduzierbar. Es muß davon ausgegangen werden, daß die Präparation einen konformativ nicht einheitlichen Membranarm hervorbringt. Es wurde somit nach einer alternativen Präparationsmethode gesucht, die den Membranarm in ausreichender Ausbeute in homogener Form zugänglich macht.

Durch die in dieser Arbeit beschriebene Aufreinigungsmethode können 3 mg Membranarm aus 400 g Hyphenfeuchtmasse in drei Tagen in guter Reinheit dargestellt werden. Hierbei wird durch Solubilisierung der Mitochondrien mit dem Detergenz Octylglucosid bereits eine Vorreinigung erzielt, da vor allem große Enzymkomplexe durch das Detergenz, das in hohem Anteil monomer vorliegt, zerlegt werden, während Komplex I dieser Behandlung standhält. Durch den Einsatz von Hydroxylapatit, an das Komplex I aus diesem Mitochondriensolubilisat gebunden werden kann, wird aus dem Rohextrakt in kurzer Zeit eine weitgehend lipidfreie Proteinlösung erhalten, die sich chromatographisch leicht weiterreinigen läßt. In der bisher durchgeführten Standardpräparation ist für diesen Schritt eine aufwendige Ultrazentrifugation erforderlich. Lipide sorgen bei Säulenchromatographien oft für Verstopfung und Kanalbildung, die einen gleichmäßigen Lauf verhindern.

Nach der darauf folgenden Ionenaustauschchromatographie liegt der Komplex I in nahezu reiner Form vor. Durch Kalium-Rhodanid, Größenausschlußchromatographie in Anwesenheit von KSCN und abschließender Größenausschlußchromatographie

wurde der Membranarm in einer hohen Reinheit aufgereinigt und in den für die Kristallisation benötigten Puffer überführt.

Die alternative Aufreinigungsmethode ist geprägt von mehreren Detergenzwechsel. Die Solubilisierung durch Octylglucosid ist oben beschrieben. Der Hydroxylapatit-Batch und die anschließenden Größenausschlußchromatographie wurde in Triton X-100 durchgeführt. Da Triton X-100 aufgrund seiner hydrophilen Polyoxyethylen-Einheit zu große Micellen bildet und somit wahrscheinlich nicht in die Zwischenräume, eines dreidimensionalen Proteingitters, paßt. Somit wurde zu Decylmaltosid gewechselt, einem Detergenz mit einem kleineren Kohlenhydratrest als hydrophile Komponente. Dieser erfolgte während der Komplex I an einen Ionenaustauscher gebunden vorliegt. Eine hohe Detergenzkonzentration sorgt dafür, daß ein Abreißen der Micelle während des Tauschvorgangs unterbunden wird.

Die alternative Aufreinigung des Membranarms erfolgt in einem kürzeren Zeitraum als die Standardaufreinigung, beinhaltet jedoch mehr Aufreinigungsschritte. Es läßt sich nicht vorhersagen welcher Parameter für eine konformativ einheitliche Präparation entscheidend ist. Dies kann nur durch eine erfolgreiche Kristallisation beantwortet werden. Jedoch läßt sich prinzipiell vermuten daß eine Minimierung von zeitlichem Aufwand und Anzahl der Reinigungsschritte, sich positiv auswirken sollte.

5.3 Verkürzung des alternativen Aufreinigungsverfahrens

Zur Reduzierung der Reinigungsschritte der alternativen Aufreinigung wurde bereits während des ersten Solubilisierungsvorganges Kalium-Rhodanid zugegeben und somit Komplex I und viele andere Enzymkomplexe zerlegt, und versucht den Membranarm über anschließende Hydroxylapatit, Größenausschlußchromatographie und Ionenaustauschchromatographie zu reinigen. Die Bindungseigenschaften des Membranarms an Hydroxylapatit unterschieden sich jedoch von denen des Gesamtkomplexes. Es wurden verschiedene Bindungskonzentrationen an Phosphat getestet. Es hat sich eine Konzentration um 60 mM als Kompromiß, zwischen einer

niedrigeren Konzentration bei der die Konkurrenz zwischen den Proteinen zu groß wird, und einer höheren Konzentration bei der der Membranarm nicht mehr so gut binden kann, herausgestellt. Es mußte somit eine höhere Konzentration an Phosphat eingestellt werden als beim Gesamtkomplex, weil zu viele Proteine mit ähnlicher Bindungsstärke zu Hydroxylapatit durch die Solubilisierung in Anwesenheit von Kalium-Rhodanid, entstehen. Im Falle des Gesamtkomplexes scheint aufgrund der Größe des Proteins die Konkurrenz zu anderen Proteinen deutlich geringer zu sein. Somit kann mehr Komplex I, bereits bei geringerer Phosphatkonzentration, gebunden werden. Weiterhin zeigte sich, daß die frühe Spaltung durch Rhodanid zu viele Proteine mit ähnlicher Größe hervorbringt, und somit die Größenausschlußchromatographie den Membranarm nicht soweit vorreinigen kann, daß er nach der Ionenaustauschchromatographie rein vorliegt. Die SDS-PAGE zeigt deutlich, daß der Reinheitsgrad entschieden geringer ist als bei der Standardaufreinigung. Es kann somit der Aufreinigungseffekt des Membranarms, der auf der Isolierung des großen Gesamtkomplexes beruht, nicht kompensiert werden. Die Reinheit erweist sich als so gering, daß diese Möglichkeit der verkürzten Membranarmisolierung nicht weiter verfolgt wurde.

6. Literatur

- Abelmann, A. (2000) Charakterisierung einer neuen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Abrahams, J.P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628
- Amling, N. (1996) UV/VIS-spektroskopischer Nachweis einer unbekanntenen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Attardi, G., Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria, *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333
- Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G. (1953) Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555-557
- Bernardi, G. (1971) Chromatography on Hydroxylapatite. In *Methods in Enzymology*, **XXII**, p. 325, Academic Press, New York.
- Bernardi, G. (1973) Chromatography on Hydroxylapatite. In *Methods in Enzymology*, **XXVII**, p. 471, Academic Press, New York.
- De Blas, A. L. und Cherwinski, H. M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **133**, 214-219

- 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.* **277**, 17970-17977
- Budde, S. M. S., van den Heuvel, L. P. W. J., Janssen, A. J., Smeets, R. J. O., Buskens, C. A. F., DeMeirleir, L., Van Coster, R., Baethmann, M., Voit, T., Trijbels, J. M. F., Smeitink, J. A. M. (2000) Combined Enzymatic Complex I and III Deficiency Associated with Mutations in the Nuclear Encoded NDUFS4 Gene. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **275**, 63-68
- Carrol, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Runswick, M. J., Shannon, R. J., Hirst, J., and Walker, J. E. (2005) The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 693-699
- Chomyn, A. und Attardi, G. (1992) Recent advances on mitochondrial biogenesis. In: L Ernster (ed.) *Mechanisms in Biogenetics*. Amsterdam: Elsevier Science Publ., 483-509
- Davis, R. H. and de Serres, F. J. (1970) Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **17A**, 79-143
- Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Lindahl, M., Radermacher, M., 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
- Douce, R., Neuburger, M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 371-414

- Drexler, A. (2002) Der Membranarm des Atmungskettenkomplex I von *Neurospora crassa*: Versuche zur Kristallisation und Isolation mit Hilfe von Peptid-Tags. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Darin, N., Oldfors, A., Moslemi, A. R., Holme, E., Tulinius, M. (2001) The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.*, **49**: 377-83
- Duarte, M., Pópulo, H., Videira, A., Friedrich, T., Schulte, U. (2002) Disruption of iron-sulphur cluster N2 from NADH:ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **364**, 833–839
- Fearnley, I.M. and Walker, J.E. (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex-I and their relationships with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 105-134
- Fecke, W. (1994) Inaktivierung von Genen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*: Isolierung und Charakterisierung des teilassemblierten Enzymkomplexes. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Finel, M., Skehel, S. P., Albracht, S. P. J., Fearnley, I. M., Walker, J. E. (1992) Resolution of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase from bovine heart mitochondria in 2 subcomplexes, one which contains the redox centers of the enzyme. *Biochemistry* **31**, 11425-11434
- Finel, M., Majander, A. S., Tyynelä, J., De Jong, A. M. P., Albracht, S. P. J., Wikström, M. (1994) Isolation and characterisation of subcomplexes of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Eur. J. Biochem.* **226**, 237-242

- Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B., Weiss, H. (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 173-180
- Friedrich, T., van Heek P., Leif H., Ohnishi T., Forche E., Kunze B., Jansen R., Trowitzsch-Kienast W., Höfle G., Reichenbach H., Weiss H. (1994) Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Eur. J. Biochem.* **219**, 691-698
- Friedrich, T., Brors B., Hellwig P., Kintscher L., Rasmussen T., Scheide D., Schulte U., Mäntele W., Weiss H. (2000) Characterization of two novel redoxgroups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 305-309
- Gorbunoff, M. (1984) The interaction of proteins with hydroxyapatite; I. role of protein charge and structure. *Anal. Biochem.* **136**, 425-432
- Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., Friedrich, T. (1998) Consistent Structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone Oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105-112
- Haiker, H. (1988). Niedrig aufgelöste dreidimensionale Struktur und Primärstruktur mitochondrial kodierter Untereinheiten der NADH-Ubichinon Reduktase aus *N. crassa*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hatefi, Y., Hanstein, W. G. (1974) Destabilization of Membranes with Chaotropic Ions. *General Methodology* **77**, 771-783
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial elektron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1025-1069

- Helenius, A., Simons, K. (1975) Solubilisation of membranes by detergents. *BBA* **415**, 29-79
- Hesterberg, M., (2002) Charakterisierung einer unbekanntenen Redoxgruppe sowie der Konformation der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Escherichia coli*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hofhaus, G., Weiss, H., Leonard, K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH-dehydrogenase (Complex I). *J. Mol. Biol.* **221**, 1027-1043
- Ingledeu, J. W., Onishi, T. (1980) An analysis of some Thermodynamic properties of Iron-Sulfur centres in site I of mitochondria. *Biochem. J.* **186**, 111-117
- Kleist-Retzow, J. C., Schauseil-Zipf, U., Michalk, D. V., Kunz, W. S. (2003). Mitochondrial Diseases – an expanding spectrum of disorders an affect genes. Special Review Series – Biogenesis and Physiological Adaptation of Mitochondria. *Experimental Physiology*, **88.1**, 155-166
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- Leif, H., Weidner, U., Berger, A., Spehr, V., Braun, M., van Heek, P., Friedrich, T., Ohnishi, T., Weiss, H. (1993) *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 998-1001
- Li, Q., Ritzel, R. G., McLean, L. L. T., McIntosh, L., Ko, T., Bertrand, H., Nargang, F. E. (1996) Cloning and Analysis of the Alternative Oxidase Gene of *Neurospora crassa*. *Genetics* **142**, 129-140
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275

- Luttik, M. A., Overkamp, K. M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P. Pronk, J. T. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* **273**, 24529-24534
- Marres, C. A., de Vries, S., Grivell, L. A. (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenon-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 857-862
- Meier, T., Polzer, P., Diedrichs, K., Welte, Wolfram, Dimroth, P. (2005) Structure of the Rotor Ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilobacter tartaricus*. *Science* **308**, 659-662
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148
- Nehls, U., Friedrich, T., Schmiede, A., Ohnishi, T., Weiß, H. (1992) Characterisation of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora crassa* mitochondria by gene disruption. *J. Mol. Biol.* **227**, 1032-1042
- Ragan, C. I., Galante, Y. M., Hatefi, Y., Ohnishi, T. (1982) Resolution of mitochondrial NADH dehydrogenase and isolation of two iron-sulfur proteins. *Biochemistry* **21**, 590-594
- Ragan, C. I., Hatefi, Y. (1987) Isolation of the iron-sulfur-containing polypeptides of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Meth. Enzymol.* **126**, 360-369
- Rasmussen, T., Scheide, D., Brors, B., Kinscher, L., Weiss, H., Friedrich, T. (2001) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferridoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* **40**, 6124-6131

- Sackmann, U. (1991). Untersuchungen zur Primärstruktur und Funktion mitochondrialer und kernkodierter Untereinheiten der NADH:Ubichinon Reduktase aus *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schneider, R., Massow, M., Lisowsky, T., Weiss, H. (1995) Different respiratory defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein. *Curr. Genet.* **29**, 10-17
- Schulte, U., Weiss, H. (1995) Generation and Characterisation of NADH:ubiquinone oxidoreductase Mutants in *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **260A**, 3-14
- Schulte, U., Abelmann, A., Amling, N., Brors, B., Friedrich, T., Kintscher, L., Rasmussen, T., 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., Brors, B., Rasmussen, T., Friedrich, T., 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 I. *J. Mol. Biol.* **292**, 569-580
- Schwitzguébel, J. P., Palmer, J. M. (1982) Properties of mitochondria as a function of the growthstage of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* **149**, 612-619
- Siedow, J. N. (1990) Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis. In Zeltich, I. (Ed.) *Plant biology* **10**, Wiley-Liss, New York.
- Singer, T. P., Ramsay, R. R. (1992) NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*, Ed.: L. Ernster, **6**, 145-162.

- Skladal, D., Halliday, J., Thorburn, D. (2003) Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*, **126**: 1905-12
- Small, W. C., McAllister-Henn, L. (1998) Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**, 4051-4055
- Tanford, C (1980) The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes (2nd ed.). New York, Wiley
- Tiselius, A., Hjertén, S., Levin, Ö. (1956). Protein Chromatography on Calcium Phosphate Columns. *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 132
- Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4353
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**, 1069-1074
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R, and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-Subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-44
- Uusimaa, J., Remes, A. M., Rantala, H., Vainionpää, L., Herva, R., Vuopala, K., Nuutinen, M., Majamma, K., Hassinen, I. E. (2000) Childhood encephalopathies and myopathies: A prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics*, **105**: 598-603

- Videira, A. and Duarte, M. (2001) On Complex I and other NADH:ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 197-203
- Vogel, H.J. (1956) A convenient growth media of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Genet. Bull.* **13**, 42-47
- de Vries, S. Grivell, L. A. (1988) Purification and characterisation of a rotenoneinsensitiv NADH-Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **40**, 377-384
- Walker, J. E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly Rev. Biophys.* **25**, 253-324
- Wang, D. C., Meinhardt, S. W., Sackmann, U., Weiss, H., Ohnishi, T, (1991) The iron-sulfur clusters in the two related forms of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **197**, 257-264
- 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., von Jagow, G., Klingenberg, M., Bücher, T. (1970) Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria: preparation with a grind-mill. *Eur. J. Biochem.* **14**, 75-82
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., Preis, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576
- Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Yu, L., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J. (1996) Crystallisation and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrom bc1 complex. *Biochim Biophys. Acta* **1275**, 47-53

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 interessante Fragestellung, die Betreuung meiner Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Dr. Ulrich Schulte bedanke ich mich für die Beiträge zu meiner Arbeit und für die unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Institutsmitgliedern bedanke ich mich für eine wirklich gute Arbeitsatmosphäre. Bei Thorsten Borgs bedanke ich mich für die schöne Zeit im Labor und beim täglichen K(r)ampf, Seite an Seite, mit so mancher verflixten Proteinpräparation. Bei Martina Wesemann bedanke ich mich für so viele verschiedene Sachen, daß sie an dieser Stelle nicht hinpassen. Bei Katharina Lecher bedanke ich mich dafür, daß sie sich stets für mich eingesetzt hat und so an mich geglaubt hat.

Ein besonderer Dank gilt Daniel Casper und Frank Fischer für eine grandiose Freundschaft, die über so manche schwere Zeit hinweggeholfen hat.

Meinen Eltern kann ich nicht oft genug dafür danken, daß sie alles Menschenmögliche getan haben, daß diese Zeilen an dieser Stelle stehen können.

Bei meiner Freundin Katja meinen Kindern Dean-Calvin, Stella-Maria und Aimée-Sophie bedanke ich mich für den großen Rückhalt und dafür, daß sie da sind und mein Leben schöner machen.

