

**Isolierung und Charakterisierung der
Atmungsketten-Superkomplexe
aus *Paracoccus denitrificans***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Anke Stroh

aus Offenbach

Frankfurt am Main 2004

(DF1)

vom Fachbereich Biochemie, Pharmazie, Lebensmittelchemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan : Prof. Schwalbe

Gutachter: Prof. Ludwig
 Prof. Schägger

Datum der Disputation:

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Stroh A., Anderka O., Pfeiffer K., Yagi T., Finel M., Ludwig B., Schägger H. (2004)
Assembly of Respiratory Complexes I, III, and IV into NADH Oxidase Supercomplex
Stabilizes Complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.*; **279** (6): 5000-5007.
Epub 2003 Nov 10.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2000 bis April 2004 am Institut für Biochemie I - Molekulare Bioenergetik - am Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. Hermann Schägger durchgeführt.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Hermann Schägger für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Förderung meiner Dissertation und die Vielzahl an anregenden Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig möchte ich für die Übernahme der hervorragenden, externen Betreuung danken, die es mir ermöglichte, diese Arbeit am Klinikum durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Brandt gilt mein Dank für die hervorragenden experimentellen Bedingungen bei der Durchführung dieser Arbeit und eine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein weiterer Dank gilt :

Herrn Dr. Volker Zickermann, der immer hilfsbereit war und stets mit mir wissenschaftliche Fragestellung diskutierte, sowie für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Stefan Dröse für die Einführung in die Bestimmung von Ubichinon und Herrn Dr. Klaus Zwicker für die Aufnahme von EPR-Spektren.

Frau Kathy Pfeiffer für die ausgezeichnete technische Unterstützung, wie auch Frau Andrea Duchêne für die Durchführung zahlreicher Experimente.

Herrn Franz- Josef Streb für die Präparation des Hydroxylapatits.

Herrn Oliver Anderka für viele wertvolle Tipps und Diskussionen.

Allen Laborkollegen besonders meinen Mitdoktoranden Andrea Eschemann, Aurelio Garofano und Ljuban Grigic für die stete Unterstützung sowie die freundliche und lockere Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Michael Rademacher und Frau Dr. Teresa Ruiz für elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

Meiner Schwester danke ich für viele aufmunternde Gespräche.

Nicht zuletzt danke ich Markus von Renthe-Fink für seine Geduld und den Beistand in schwierigen Situationen, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Membranproteine: Bestandteile biologischer Membranen.....	1
1.2	Mitochondriale und bakterielle Atmungsketten.....	2
1.3	Komplex I aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	5
1.4	Komplex III aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	8
1.5	Terminale Oxidasen aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	11
1.6	Mitochondriale und bakterielle Superkomplexe	14
1.7	Ziel der Arbeit.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Inhibitoren	19
2.1.3	Detergenzien	20
2.1.4	Antibiotika	20
2.1.5	Verwendete Medien.....	20
2.1.5.1	Methylamin Medium.....	20
2.1.5.2	Succinat-Medium	20
2.1.5.3	LB-Medium Agarplatten	21
2.1.6	Sonstige Lösungen und Puffer	21
2.1.7	Verwendete Stämme	23
2.1.7.1	Erläuterungen zu den Mutantenstämmen (Tabelle 2-1).....	23
2.1.8	Geräte	24
2.2	Methoden	26

2.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>Paracoccus denitrificans</i> Wildtyp und Mutantenstämmen	26
2.2.2	Präparation von Cytoplasma-Membranen aus <i>P. denitrificans</i>.....	26
2.2.2.1	Analytischer Maßstab.....	26
2.2.2.2	Präparativer Maßstab.....	27
2.2.3	Bestimmung des Proteingehalts	27
2.2.4	Chromatographiemethoden	27
2.2.4.1	Darstellung von Hydroxylapatit.....	27
2.2.4.2	Hydroxylapatit-Chromatographie	27
2.2.4.3	Gelfiltration	28
2.2.4.4	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatographie: IMAC (Pharmacia Biotech).....	28
2.2.5	Bestimmung der Cytochromgehalte.....	28
2.2.5.1	Redoxspektren in wässriger Lösung	28
2.2.5.2	Redoxspektren in Pyridin.....	29
2.2.6	Native Gelelektrophorese	30
2.2.6.1	Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	30
2.2.6.2	Farblos-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (CN-PAGE)	31
2.2.7	Denaturierende Gelelektrophorese.....	31
2.2.7.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.2.7.2	2D-Gelelektrophorese	31
2.2.8	Elektroelution (nativ).....	31
2.2.9	Nachweis von Proteinen durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau....	31
2.2.10	Silberfärbung.....	32
2.2.11	Western Blot / Chemilumineszenz	32
2.2.12	Expression von F_V-Fragmenten	33
2.2.13	Immunologischer Nachweis von Proteinen über Strep-Tag.....	33

2.2.14	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	33
2.2.15	Messung enzymatischer Aktivitäten.....	34
2.2.15.1	NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I	34
2.2.15.2	NADH:HAR Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I.....	34
2.2.15.3	Succinat:Dichloroindophenol Reduktase Aktivität des Komplex II	34
2.2.15.4	Ubichinol:Cytochrom <i>c</i> Reduktase Aktivität des Komplex III.....	35
2.2.15.5	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Aktivität des Komplex IV	35
2.2.15.6	Gekoppelte Ubichinol Oxidase Aktivität der Komplexe III und IV	35
2.2.15.7	Gekoppelte NADH Cytochrom <i>c</i> Reduktase Aktivität der Komplexe I und III.....	35
2.2.15.8	Gekoppelte NADH Oxidase Aktivität der Komplexe I, III und IV	36
2.2.16	Darstellung von Decylubihydrochinon.....	36
2.2.17	Bestimmung von gebundenem Phospholipid.....	36
2.2.18	Qualitative und quantitative Bestimmung von Ubichinon.....	36
2.2.19	Bestimmung von freiem Flavin	36
2.2.20	Aufnahme von EPR-Spektren.....	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Isolierung und Charakterisierung der Atmungsketten-Superkomplexe aus <i>Paracoccus denitrificans</i>.....	38
3.1.1	Identifizierung von Superkomplexen aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	38
3.1.2	Detergenz-Sensitivität der Komplexe I, II, III und IV aus Wildtyp Membranen.....	44
3.1.3	Chromatographische Reinigung des NADH Oxidase Superkomplexes....	46
3.1.4	Charakterisierung der Superkomplexe aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	48
3.1.4.1	Analyse der Eluate nach Hydroxylapatitchromatographie und Gelfiltration durch BN-Gelelektrophorese.....	48
3.1.4.2	Immunologische Identifizierung von Untereinheiten der Superkomplexe	51

3.1.4.3	Enzymatische Aktivitäten des NADH Oxidase Superkomplexes.....	54
3.1.4.4	Reinheitsgrad des isolierten Superkomplexes.....	58
3.1.4.5	Stöchiometrie der zum Superkomplex assemblierten Komplexe	59
3.1.4.6	Phospholipid- und Ubichinongehalt in Membranen und NADH-Oxidase-Superkomplex.....	60
3.1.5	Die Assemblierung zu einem NADH Oxidase Superkomplex stabilisiert Komplex I.....	60
3.1.5.1	Vergleich der katalytischen Aktivitäten von <i>Paracoccus denitrificans</i> Wildtyp und Mutanten in Digitonin-gelösten Membranen	61
3.1.5.2	Identifizierung von Atmungskettenkomplexen und Untereinheiten in <i>Paracoccus denitrificans</i> Wildtyp und Mutantenstämmen	63
4	DISKUSSION.....	65
4.1	Identifizierung von Superkomplexen aus <i>Paracoccus denitrificans</i> .	65
4.2	Detergenz-Sensitivität der Komplexe I, II, III und IV	67
4.3	Enzymatische Charakterisierung des NADH Oxidase Superkomplexes	68
4.4	Die Assemblierung zu einem NADH Oxidase Superkomplex stabilisiert Komplex I	70
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
5.1	Isolierung von Atmungsketten-Superkomplexen aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	73
5.2	Charakterisierung der Superkomplexe aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	73
5.3	Ausblick	75
5.3.1	Strukturaufklärung des NADH Oxidase Superkomplexes	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	76

7	ANHANG.....	88
7.1	Abkürzungen.....	88
7.2	Abbildungsverzeichnis	91
7.3	Tabellenverzeichnis	93
7.4	Kenndaten der Inhibitoren	94
7.5	Kenndaten der Detergenzien	96

1 Einleitung

1.1 Membranproteine: Bestandteile biologischer Membranen

Eine Zelle ist durch eine sie umhüllende Plasmamembran begrenzt. Zusätzlich dazu sind bei eukaryotischen Zellen interne Membranen vorhanden, die Zellorganellen wie Mitochondrien, den Zellkern, Chloroplasten, das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat umgeben. Diese Kompartimentierung von biologischen Funktionseinheiten ist neben der Funktion als hochselektive Permeabilitätsschranke eine der Hauptaufgaben von biologischen Membranen. Biologische Membranen bestehen aus einer proteinhaltigen Lipid-Doppelschicht, deren Zusammensetzung von der Herkunft und Funktion der Membran abhängt. Diverse biochemische Vorgänge laufen an oder in membranösen Gerüststrukturen ab, wie z.B. die oxidative Phosphorylierung (Stryer, 1990).

Die Assemblierung von biologischen Membranen basiert auf der Fähigkeit von Lipiden Micellen und Doppelschichten auszubilden. Als Grundbausteine fungieren Lipide wie Phosphatidylcholin („Lecithin“), Diphosphatidylglycerin („Cardiolipin“), Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin. Es sind amphiphile Moleküle (polare Moleküle) mit einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne (ähnlich wie Seifen und Detergenzien), die sich in wässrigem Milieu zu einer in sich geschlossenen Doppelschicht („Bilayer“) zusammenlagern. Die Fluidität biologischer Membranen ist eine ihrer wichtigsten physiologischen Eigenschaften. Sie erlaubt den eingebetteten Proteinen - den integralen Membranproteinen - die Wechselwirkung mit anderen Komponenten. Ein Modell für die Organisation biologischer Membranen wurde 1972 von Singer und Nicolson in Form des „fluid mosaic“-Modells entworfen. Neben integralen Membranproteinen, die fest durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran verbunden sind und in die Lipid-Doppelschicht eintauchen bzw. sie durchdringen (Transmembranproteine), gibt es auch periphere Membranproteine, die an Membranoberflächen oder an integrale Membranproteine gebunden sind (Voet, 1994).

Diverse Membranproteine fungieren als Rezeptoren, Signalübertragungs-, Zellerkennungs- oder Adhäsionsmoleküle, sind katalytisch wirksam und sorgen als aktive oder passive Transportsysteme für einen geregelten Material- und Informationsfluss über die Membran (Campbell *et al.*, 2003). Dies begründet ihre Bedeutung z.B. in der Medizin, da ca. die Hälfte aller heute zugelassenen Medikamente an Membranproteinen wirkt (Drews, 2000).

1.2 Mitochondriale und bakterielle Atmungsketten

Der mitochondriale Elektronentransport und die daran gekoppelte oxidative Phosphorylierung sind fundamentale Prozesse für die Lebensfähigkeit höherer Tiere und Pflanzen (Eukaryoten). Der grundlegende Atmungsprozess erfolgt dabei an Membranproteinen in den Mitochondrien. Dabei werden ausgehend von den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH₂, die bei der Substratoxidation der Glykolyse, des Citratcyclus und der Fettsäureoxidation entstehen, Elektronen an Multienzymkomplexe der Atmungskette und zuletzt an den terminalen Akzeptor Sauerstoff weitergeleitet.

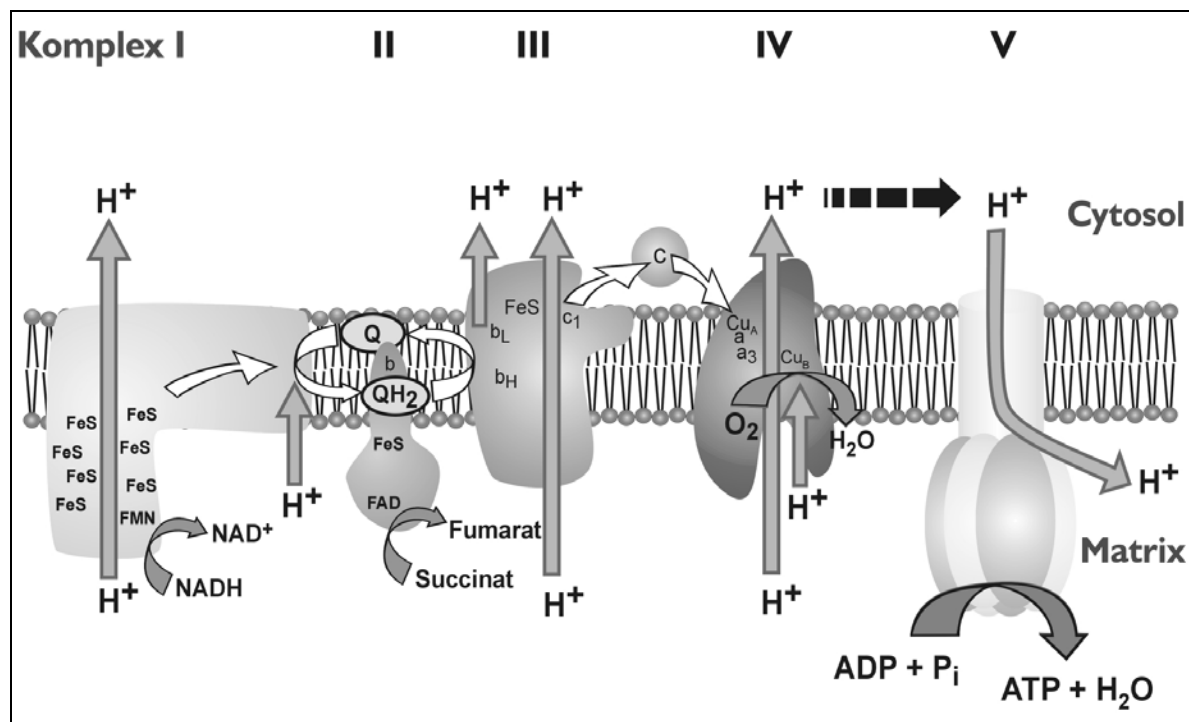


Abb. 1-1 Die mitochondriale Atmungskette

NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III), Cytochrom c Oxidase (Komplex IV), F₁F₀-ATP Synthase (Komplex V), FeS (Eisen-Schwefel Zentrum), Q, (Ubichinon Pool), c_x: Cytochrom a, a₃, c₁, c und b, FMN (Flavinmononukleotid), FAD (Flavinadenindinukleotid), Cu_{A/B} (Kupferzentrum A/B)

Diese vier Multienzymkomplexe (s. Abb. 1-1) befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran höherer Eukaryoten wie z.B. den von Säugetieren. Gemeinsam errichten die Atmungskettenkomplexe NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) ein elektrochemisches Potenzial über die Mitochondrienmembran. Die F₁F₀-ATP Synthase (Komplex V) nutzt diesen

elektrochemischen Protonengradient zur Synthese von ATP (Hatefi, 1985). Diese an den Elektronentransport gekoppelte ATP-Synthese wird, wie 1961 von Mitchell postuliert, als chemiosmotische Theorie bezeichnet.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen bakteriellen und mitochondrialen OXPHOS Systemen besteht in der Untereinheitenzusammensetzung der Einzelkomplexe. Bakterielle Komplexe enthalten normalerweise eine deutlich niedrigere Anzahl an Untereinheiten, z.B. 14, 3 und 4 Untereinheiten enthalten die Komplexe I, III und IV in *Paracoccus denitrificans* (Xu *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1986; Kurowski *et al.*, 1987; Raitio *et al.*, 1987), im Vergleich zu 46, 11 und 13 Untereinheiten in den korrespondierenden Rinder-Komplexen (Carroll *et al.*, 2003; Schägger *et al.*, 1995b; Kadenbach *et al.*, 1983; Yoshikawa *et al.*, 1998). Außerdem ist die molekulare Masse des Rinder-Komplex I mit ca. 1 MDa ebenfalls deutlich größer, als die des Komplex I aus in *P. denitrificans* mit 550 kDa (Yagi *et al.*, 1998). Trotz des Unterschiedes in der Untereinheiten-Zusammensetzung ist die Funktion der entsprechenden Enzyme gleich.

Diese Reduktion auf die zentralen Proteine wie auch die starke Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Nährstoffbedingungen und die Ähnlichkeit zur mitochondrialen Atmungskette machen *P. denitrificans* so interessant für die Bioenergetik. Bakterielle Enzyme sind ein vereinfachtes Modellsystem der mitochondrialen Elektronentransportkette, an dem die Struktur und Funktion der Enzyme leichter untersucht werden können, wie auch genetische Manipulationen leichter möglich sind.

Paracoccus denitrificans ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, coccoidförmiges Bodenbakterium (Beijerinck *et al.*, 1910). Phylogenetisch lässt sich *P. denitrificans* gemäß seiner 16 sRNA der α_3 -Gruppe der Proteobakterien zuordnen (Woese, 1987). Als Konsequenz der sich immer wieder verändernden Umweltbedingungen stellt *P. denitrificans* im Vergleich zu höheren Eukaryoten einen extrem anpassungsfähigen Organismus dar, der befähigt ist, eine Vielzahl an Substraten zu verwerten (Richardson, 2000; Stouthammer *et al.*, 1980, 1992). Stoffwechselwege und die Zusammensetzung der Atmungskette werden den vorherrschenden Bedingungen angepasst. Neben der Fähigkeit aerob heterotroph zu wachsen ist *P. denitrificans* auch in der Lage anaerob mit alternativen terminalen Elektronen-Akzeptoren wie z.B. Nitrat, chemolithoautotroph mit CO₂ als Kohlenstoffquelle und Wasserstoff als Energiequelle oder methylotroph mit z.B. Methylamin zu wachsen (Baker *et al.*, 1998).

Alle bakteriellen Atmungskettenkomplexe sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert, wo sie nur einen kleinen Anteil der gesamten Membranproteine ausmachen. *P. denitrificans* nutzt die Elektronentransportkette mit den Enzym-Komplexen I-IV und die ATP Synthase zum

aeroben Wachstum. Die katalytischen Untereinheiten dieser Proteine zeigen erhebliche Sequenzübereinstimmungen mit ihren eukaryotischen Gegenstücken.

In Zusammenhang mit der Endosymbiontentheorie (Margulis, 1970), werden Proteobakterien wie *Paracoccus denitrificans* als mögliche Vorläufer der heutigen Mitochondrien betrachtet (John *et al.*, 1975). Man bezeichnet sie deshalb auch als „free living mitochondrium“.

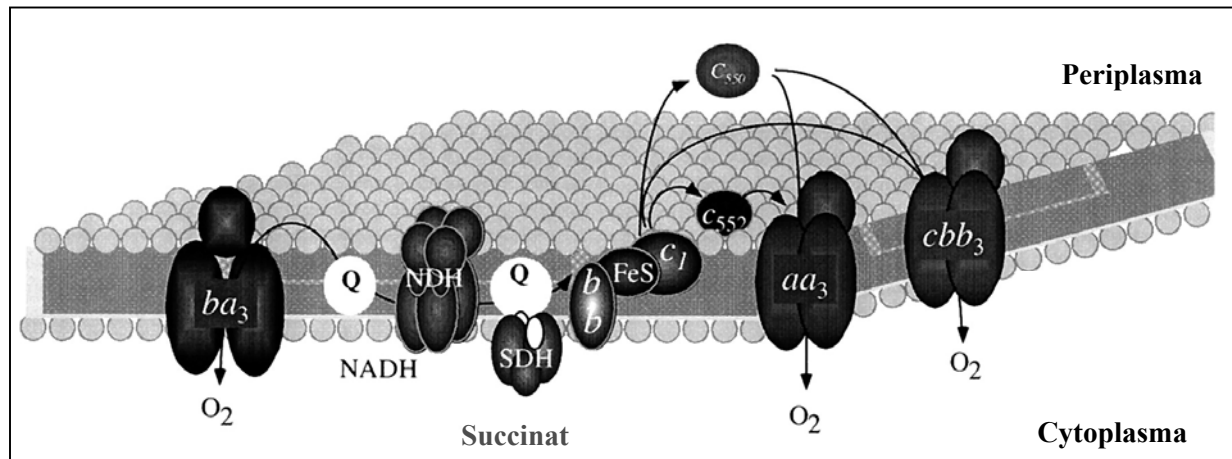


Abb. 1-2 Verzweigter Elektronentransportweg von *Paracoccus denitrificans* (Baker *et al.*, 1998)

FeS, Eisen-Schwefel Zentrum; *NDH*, *NADH:Ubichinon Oxidoreduktase*;

SDH, *Succinat Dehydrogenase*; *Q*, *Ubichinon Pool*, terminale Oxidasen: *aa₃*, *ba₃*, *cbb₃*,

c_x: *Cytochrom c₁*, *c₅₅₂* und *c₅₅₀*, *b*: *Cytochrom b*

Zusätzlich zu den „regulären“ Atmungskettenenzymen, zu denen komplementäre Formen auch in Mitochondrien existieren, besitzt *Paracoccus denitrificans* eine Anzahl an alternativen Oxidasen (*ba₃*-Oxidase und *cbb₃*-Cytochrom Oxidase), was zu einer Verzweigung der Atmungskette, genannt „branching points“, führt (s. Abb. 1-2). Diese Eigenschaft erlaubt *P. denitrificans* das Wachstum unter stark variierenden Sauerstoffkonzentrationen. Die Verzweigung der aeroben Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* findet zum Einen am Ubihydrochinon (QH₂) statt, wo Elektronen zur *ba₃* Chinol-Oxidase oder zum *bc₁* Komplex fließen können und zum Zweiten auf der Stufe des Cytochrom *c*. Dabei fließen Elektronen vom *bc₁* Komplex über Cytochrom *c₅₅₀*, das frei in der Membran vorliegt, oder über Cytochrom *c₅₅₂*, das über einen N-terminalen Anker mit der Membran verbunden ist, zur *aa₃*- oder *cbb₃*-Cytochrom *c* Oxidase (Turba *et al.*, 1995). Zusätzlich zu diesen beiden Cytochromen besitzt *P. denitrificans* weitere lösliche und membranintegrierte *c*-Typ Cytochrome (Harms *et al.*, 1991).

1.3 Komplex I aus *Paracoccus denitrificans*

Die Protonen pumpende NADH:Chinon Oxidoreduktase von Bakterien und Mitochondrien ist der Eintrittspunkt von Elektronen in die Atmungskette und katalysiert den redoxgekoppelten transmembranen Transport von H^+ - oder Na^+ -Ionen. Das Enzym ist das größte Atmungskettenenzym mit einer molekularen Masse von 527 kDa in *Paracoccus denitrificans* (Yano *et al.*, 2003).

NADH:Chinon Oxidoreduktasen bakterieller Atmungsketten lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Es sind H^+ -translozierende NADH:Chinon Oxidoreduktasen, auch NDH-1 oder bakterieller Komplex I genannt, Na^+ -translozierende NADH:Chinon Oxidoreduktasen, auch Na^+ -NDH oder Na^+ -NQR genannt, und NADH-Chinon Oxidoreduktasen, denen die Energiekopplungsstelle fehlt, genannt NDH-2 (Yagi *et al.*, 1998). Die NDH-2 besteht aus einem einzigen Polypeptid mit einem nicht kovalent gebundenen FAD als Kofaktor (Jaworowski *et al.*, 1981). Im Gegensatz dazu repräsentiert die NDH-1 einen Multi-Enzym-Komplex, der als Protonenpumpe fungiert und einen elektrochemischen Gradient über der Cytoplasmamembran aufbaut.

Unter aeroben Bedingungen exprimiert *P. denitrificans* einen „mitochondrialen Typ“ der Atmungskette, der die Protonen translozierende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH-1, EC 1.6.99.5) beinhaltet (Yagi, 1993). Funktionell vollzieht die NDH-1 einen gekoppelten Elektronentransfer von NADH zum Ubichinon, während Protonen über die innere Mitochondrienmembran bzw. Cytoplasmamembran transloziert werden, jedoch ist der genaue Mechanismus dieser Reaktion nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung.

Das NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Holoenzym von *P. denitrificans* besteht aus 14 Untereinheiten, einem nicht-kovalent gebundenen FMN und acht Eisen-Schwefel-Clustern, wovon sechs EPR detektierbar sind, als prosthetische Gruppen. Diese Eisen-Schwefel-Zentren unterteilen sich in zwei Gruppen: zwei binukleare (N1a und N1b) und vier tetranukleare Cluster (N2, N3, N4, N5) (Di Bernardo *et al.*, 2001; Yagi, 1993, Meinhardt *et al.*, 1987, Yano *et al.*, 2003). Die Existenz von Cluster N5 in *Paracoccus denitrificans* ist umstritten, wohingegen N5 in Rinderherz Komplex I eindeutig nachweisbar ist. Zusätzlich dazu besitzen bestimmte Bakterien wie *E.coli* noch einen tetranuklearen Cluster N1c. Die beiden verbleibenden tetranuklearen Cluster, genannt N6a und b (Rasmussen *et al.*, 2001), sind nicht EPR detektierbar (Yagi *et al.*, 2003).

Das Gencluster, das die NDH-1 aus *P. denitrificans* codiert, besteht aus 14 Strukturgenen und 6 URF's. Die Strukturgene codieren die Untereinheiten NQO1-NQO14. In Tabelle 1-1 sind die Untereinheiten des Komplex I, sowie ihre reaktiven Zentren im Vergleich zu den korrespondierenden mitochondrialen Gegenstücken zusammengestellt. Alle 14 Untereinheiten aus *P. denitrificans* weisen Homologien zum Rinder-Komplex I auf.

Vergleicht man das Modell der NDH-1 mit seinem mitochondrialen Gegenstück, so lassen sich beide Enzyme in zwei Domänen, die in einer L-förmigen Struktur angeordnet sind, unterteilen (Abb. 1-3). Für verschiedene Organismen konnte diese L-Form elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (*Y. lipolytica*: Djafarzadeh *et al.*, 2000; *N. crassa*: Guenebaut *et al.*, 1997; *E. coli*: Guenebaut *et al.*, 1998; *Bos taurus*: Grigorieff, 1998).

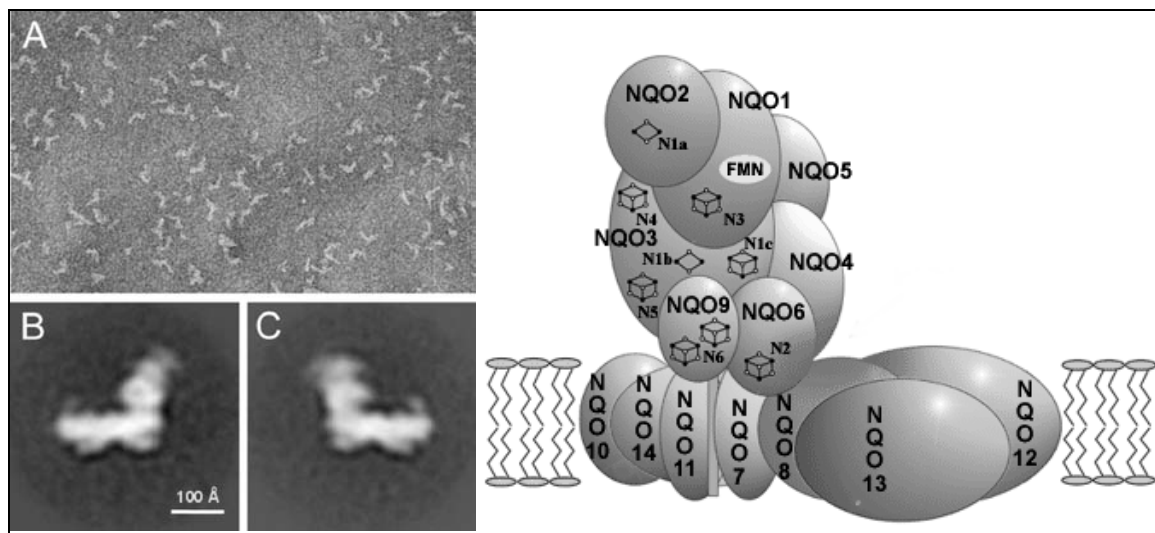


Abb. 1-3 Mitochondrialer und bakterieller Komplex I

Links: Elektronenmikroskopie des Komplex I von *Y. lipolytica*. Mikroskopische Aufnahme einer Einzelpartikel-Analyse im „negativ stain“, links und rechtsseitige Ansicht des Komplex I (Zickermann *et al.*, 2003)

Rechts: Modell der Untereinheiten-Anordnung der NDH-1 in *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 2003)

Komplex I besteht aus einem hydrophilen peripheren Segment, das ins bakterielle Cytosol bzw. die mitochondriale Matrix ragt, und einem hydrophoben Membransegment (Hatefi, 1985). Der periphere Teil liegt komplett außerhalb der Membran der NDH-1 und wird von den Untereinheiten NQO1-6 und NQO9 gebildet. Die Untereinheiten NQO6 und NQO9 dienen vermutlich als Verbindung zwischen dem peripheren Arm und dem Membranarm (Di Bernardo *et al.*, 2000; Yagi *et al.*, 2003).

Alle Redox-Kofaktoren der NDH-1 befinden sich im peripheren Arm des Enzyms (Yano *et al.*, 1996). Das membrangebundene Segment der *P. denitrificans* NDH-1 besteht aus den Untereinheiten NQO7, NQO8 und NQO10-14, die äquivalent zu den mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I sind. Dieses Segment ist vermutlich an der Chinonbindung beteiligt (Di Bernardo *et al.*, 2000).

Eine weitere Konformation der NDH-1 in *E.coli*, genannt „horse shoe“, wurde ebenfalls unter nicht-ionischen Bedingungen beobachtet (Böttcher *et al.*, 2002). Diese alternative Form konnte aber unter den gleichen Bedingungen im selben Organismus nicht reproduziert werden (Sazanov *et al.* 2003). Somit bleibt diese Struktur nach wie vor fraglich.

Mehr als 60 verschiedene Hemmstofffamilien für Komplex I sowohl synthetischen als auch natürlichen Ursprungs sind bekannt. Die meisten Komplex I Inhibitoren sind hydrophob oder amphipatisch, woraus man schloss, das sie als Ubichinon-Analoge wirken. Durch kinetische Studien lassen sich die Inhibitoren in drei Gruppen unterteilen:

- Klasse I/ A-Typ :Piericidin A und DQA
- Klasse II/ B-Typ : Rotenon
- Klasse III / C-Typ : Capsaicin

Alle drei Klassen von Komplex I Inhibitoren wurden in Experimenten verglichen und es wurde festgestellt, dass sie alle einen Anteil an der gleichen Bindungsdomäne von Komplex I besitzen, der sich teilweise überschneidet (Brandt *et al.*, 2003).

Tabelle 1-1 Untereinheiten des Komplex I

Fraktion	Rind	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Kofaktoren	Fe-S Zentren	Literatur
FP	51k	NQO1	FMN [4Fe-4S]	N3	Yano <i>et al.</i> , 1996
	24k	NQO2	[2Fe-2S]	N1a	Yano <i>et al.</i> , 1994
	9k	-			
IP	75k	NQO3	[2Fe-2S] [4Fe-4S] [4Fe-4S] [4Fe-4S]	N1b N4 N5 N1c*	Yano <i>et al.</i> , 1995
	49k	NQO4			Takano <i>et al.</i> , 1996
	30k	NQO5			
	23k (TYKY)	NQO9	2[4Fe-4S]	N6a + N6b	Rasmussen <i>et al.</i> , 2001
	20k (PSST)	NQO6	[4Fe-4S]	N2	Yano <i>et al.</i> , 2003
	18k	-			
	15k	-			
	13k (A)	-			
	13k (B)	-			
HP	ND1	NQO8			Yagi, 1993
	ND2	NQO14			
	ND3	NQO7			Di Bernardo <i>et al.</i> , 2000
	ND4	NQO13			Yagi, 1993
	ND4L	NQO11			
	ND5	NQO12			
	ND6	NQO10			Kao <i>et al.</i> , 2003
	+ 24 weitere UE				

(FP: Flavoprotein-Anteil, IP: Eisen-Schwefel-Anteil und HP: Hydrophober Proteinanteil des Komplex I/ * : nur in *E.coli* und *T. thermophilus* nachgewiesen).

1.4 Komplex III aus *Paracoccus denitrificans*

Cytochrom bc_1 Komplexe repräsentieren eine phylogenetisch mannigfaltige Gruppe von elektronentransferierenden, integralen Membranproteinen (Berry *et al.*, 2000). Vertreter sind mitochondriale und bakterielle bc_1 Komplexe, sowie der b_6f Komplex aus Chloroplasten und Cyanobakterien. Diese Komplexe koppeln den Elektronentransfer eines in der Membran befindlichen Ubichinols auf ein c -Typ Cytochrom mit einer Protonentranslokation über die Membran, so dass die freie Enthalpie des Redoxprozesses in Form eines elektrochemischen

Protonengradienten gespeichert wird. Der Cytochrom bc_1 Komplex (Ubichinol: Cytochrom c Oxidoreduktase, Komplex III, E.C. 1.10.2.2) ist in der bakteriellen Cytoplasmamembran lokalisiert.

Der bc_1 Komplex besteht aus drei grundlegenden katalytischen Untereinheiten (Yang *et al.*, 1986) mit charakteristischen prosthetischen Gruppen, dem Cytochrom b mit zwei b-Typ Hämen (Cytochrom b_L und b_H), dem Cytochrom c_1 mit einem kovalent gebundenem c-Typ Häm und dem Rieske Eisen-Schwefel Protein (ISP) mit einem [2Fe-2S] Cluster der ein ungewöhnlich hohes Redox-Mittelpunktpotential aufweist (Ritter *et al.*, 2003). Die Gene dieser Untereinheiten sind in einem Operon angeordnet (Kurowski *et al.*, 1987)

Die molekulare Masse des Komplex III aus *Paracoccus denitrificans* liegt bei ca. 117 kDa (Kurowski *et al.*, 1987). Kristallstrukturen von mitochondrialem Rinder- (Iwata *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 1995), Hefe- (Hunte *et al.*, 2000) und Hühner- bc_1 Komplex (Berry *et al.*, 1999) mit bis zu acht zusätzlichen Untereinheiten, konnten bereits gezeigt werden. Diese Strukturen zeigen, dass der Komplex III in seiner funktionellen Form ein Dimer ist. Auch für das Enzym aus *P. denitrificans* konnte dies belegt werden (Mayer *et al.*, 2002). Der Cytochrom bc_1 Komplex aus *Paracoccus denitrificans* enthält aber neben den drei katalytischen Untereinheiten keine weiteren Polypeptide.

Der bakterielle wie auch der mitochondriale bc_1 Komplex arbeiten nach dem gleichen katalytischen Mechanismus (s. Abb. 1-4), dem sogenannten Q-Zyklus (Mitchell, 1976; Trumpower, 1991; Brandt *et al.*, 1994). Der Cytochrom bc_1 Komplex besitzt zwei verschiedene Ubichinon-Reaktionszentren, das dem elektropositiven Raum zugewandte Q_o bzw. P-Zentrum und das elektronegative der Matrix zugewandte Q_i - bzw. N-Zentrum. Während des Q-Zyklus kommt die Protonentranslokation durch Chinon-Redox-Reaktionen an diesen zwei verschiedenen Bindestellen (Q_o und Q_i) zustande. Protonen werden am Q_i - Zentrum aufgenommen und am Q_o -Zentrum entlassen. Die Q_o Stelle konnte nahe Häm b_L und dem [2Fe-2S] Cluster lokalisiert werden, während Q_i nahe Häm b_H auf der anderen Seite der Membran lokalisiert ist.

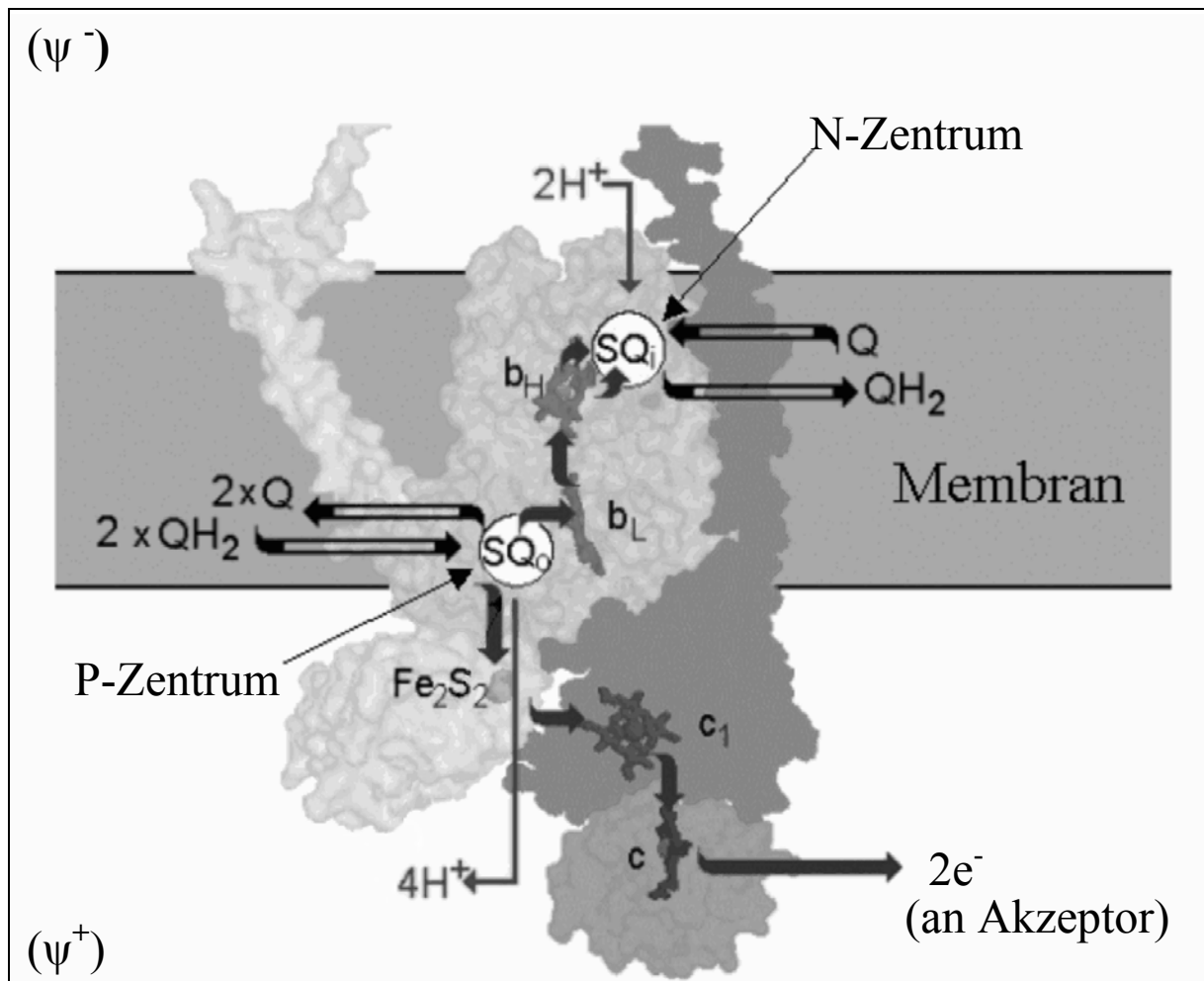


Abb. 1-4 Q-Zyklus nach Berry (http://www.life.uiuc.edu/crofts/bc-complex_site/index.html)

SQ_o: dem elektropositiven Raum zugewandtes Q_o bzw. P-Zentrum, SQ_i: dem elektronegativen Raum zugewandtes Q_i bzw. N-Zentrum; Fe₂S₂ (Eisen-Schwefel Zentrum), Q, (Ubichinon), QH₂, (Ubihydrochinon), c_x: Cytochrom c₁ und c, b_L: Häm b_L, b_H: Häm b_H

Der Q-Zyklus beinhaltet zwei identische Halbreaktionen, die zur Oxidation von zwei Ubihydrochinon-Molekülen an der Q_o Stelle führen. Pro Oxidationsschritt werden zwei Elektronen entlassen, die getrennte Wege voneinander einschlagen, was als „bifurcated reaction“ - „verzweigte Reaktion“ - bezeichnet wird. Dabei wird ein Elektron über Reaktionszentren mit relativ hohem Mittelpunktspotential transferiert und das zweite über Kofaktoren mit niedrigerem Potential. Im „Hochpotentialweg“ wird das Elektron über ISP und Cytochrom c₁ auf das zu reduzierende Cytochrom c übertragen. Im anderen Fall wird das Elektron zur Q_i Position über Häm b_L und Häm b_H transferiert, wo ein Chinon reduziert wird. An der Q_i Position wird das gebundene Chinon zu einem stabilen Semichinon-Zwischenprodukt, und nach einem zweiten Durchgang zu Ubihydrochinon reduziert. Die zwei hierfür benötigten Protonen werden von der negativen Seite aufgenommen. Das

Ubihydrochinon am Q_i Zentrum verlässt danach die Bindestelle. Bei der Ubihydrochinon Oxidation am Q_o Zentrum werden vier Protonen in den positiven Raum entlassen, was zu einem elektrochemischen Protonengradienten beiträgt, der zur Bildung von ATP verwendet wird (Hunte *et al.*, 2003).

Um den Mechanismus des Q-Zyklus zu untersuchen, werden Inhibitoren verwendet, die den Elektronen Transfer im bc_1 Komplex blockieren. Diese binden spezifisch an eines der Reaktionszentren. Am P-Zentrum binden z.B. Stigmatellin und Hydroxychinone (Analoge zu Ubichinon) und blockieren die Oxidation des Ubihydrochinons, wie auch die Reduktion der Hochpotentialredoxzentren des bc_1 Komplex. Inhibitoren, die am N-Zentrum wirken, wie z.B. Antimycin A, blockieren die Reduktion des Ubichinons durch Cytochrom *b* (Gutierrez-Cirlos *et al.*, 2002). Nach wie vor lässt der Mechanismus auf molekularer Ebene noch viele Fragen offen.

1.5 Terminale Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans*

Die Cytochrom *c* Oxidase (Ferrocytochrom *c*: Sauerstoff Oxidoreduktase; EC 1.9.3.1) ist das terminale Enzym der Atmungskette, und ist in der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryoten bzw. in der Cytoplasmamembran von Bakterien lokalisiert. Dieses Enzym katalysiert den Transfer von Elektronen von reduziertem Cytochrom *c* zu Sauerstoff, der dabei zu Wasser umgesetzt wird. Dabei pumpt das Enzym Protonen über die Membran (Ludwig *et al.*, 1980). Ihrem Mechanismus (s. Abb. 1-5) nach ist die Cytochrom *c* Oxidase eine redoxgekoppelte Protonenpumpe (Ostermeier *et al.*, 1996). Dabei stellt sich die Frage, wie die exergone Sauerstoff-Reduktion mit der endergonen Protonentranslokation gekoppelt ist. Auf Basis der Proteinstrukturaufklärung wurden zwei mögliche Protonentunnel postuliert, der K- und der D-Tunnel (Iwata, 1998a; Michel, 1999).

Paracoccus denitrificans besitzt drei terminale Oxidasen, die alle neben ihrer Funktion als Elektronenüberträger auch für den Aufbau des Protonengradienten über die Cytoplasmamembran verantwortlich sind (Saraste *et al.*, 1991). Es sind die aa_3 Cytochrom *c* Oxidase, die cbb_3 Cytochrom Oxidase, und die ba_3 Chinol-Oxidase (Otten *et al.*, 2001), die zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen gehören. Die aa_3 -Oxidase wird unter normalem Sauerstoffpartialdruck exprimiert und gehört wie die cbb_3 -Oxidase zur Klasse der Cytochrom *c* Oxidasen. Die cbb_3 -Oxidase wird unter sauerstofflimitierten Bedingungen exprimiert. Die Expression der ba_3 Oxidase wird durch Nitrat und Nitrit im Medium unter anaeroben Bedingungen reguliert, in erster Linie jedoch führt die Anwesenheit dieser regulatorisch

wirkenden Komponenten zu erhöhten Expressionsraten unter aeroben Bedingungen (Zickermann *et al.*, 1997). Für meine Arbeit war unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur die aa_3 Cytochrom *c* Oxidase von Relevanz, da die Anwesenheit aller anderen terminalen Oxidasen durch enzymatische und elektrophoretische Analysen ausgeschlossen werden konnte.

Zur Produktion von ATP durch die ATP-Synthase wird ein elektrochemischer Gradient, der über die Cytoplasma-Membran errichtet wird, benötigt. Die Anzahl an Protonen pro Elektron, die dabei über die Membran transloziert werden, ist hierbei abhängig vom eingeschlagenen Weg der Elektronen. Die Oxidation des Q-Pools über die Cytochrom aa_3 Oxidase resultiert in der höchsten Anzahl Protonen / Elektronen ($6H^+ / 2e^-$), was somit auch zur höchsten Ausbeute an ATP führt. Die Oxidation des Q-Pools über die Cytochrom ba_3 Oxidase resultiert nur in einem Verhältnis von $4H^+ / 2e^-$. Die dritte terminale cbb_3 -Oxidase akzeptiert Elektronen des bc_1 Komplex und kann somit ebenfalls bis zu $6H^+ / 2e^-$ translozieren (Otten *et al.*, 1999).

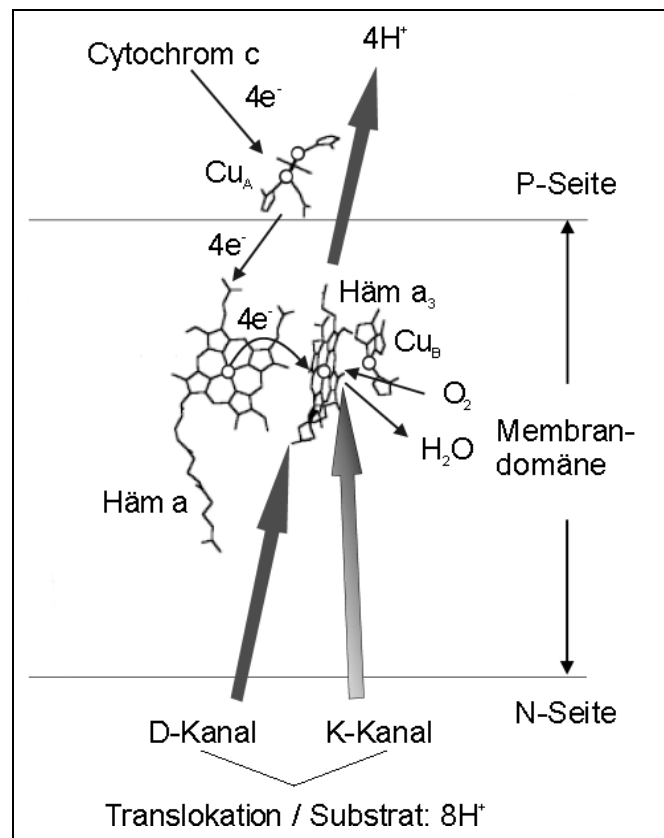


Abb. 1-5 Reaktionsmechanismus der Cytochrom *c* Oxidase

N-Seite: elektronegativer Raum, *P*-Seite: elektropositiver Raum, $Cu_{A/B}$ (Kupferzentrum A/B)

Die aa_3 Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* besitzt vier Untereinheiten, von denen die drei größten homolog zu den mitochondrial codierten Untereinheiten sind. Die

Funktion der vierten Untereinheit ist nicht bekannt (Witt *et al.*, 1997). Die Kristallstruktur der aa_3 Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* ist bekannt (Iwata *et al.*, 1995).

Die Untereinheiten I und II bilden die Kern-Struktur des Komplex IV. Der Vergleich aller Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* zeigt in Untereinheit I und II viele Sequenz-Identitäten. Untereinheit I ist für sowohl die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser, als auch für den redoxgekoppelten Protonentransport verantwortlich. Sie beinhaltet zwei Häm a, genannt Häm a und Häm a_3 , sowie ein Kupfer-Zentrum: Cu_B . Das binukleare Zentrum der terminalen Oxidase wird aus dem fünffach koordinierten high-spin Häm a_3 und Cu_B gebildet und ist das katalytische Zentrum der Sauerstoffreduktion. Molekularer Sauerstoff bindet am Häm a_3 - Cu_B -Zentrum. Das in der gleichen Untereinheit befindliche low-spin Häm a ist sechsfach koordiniert, mit zwei Histidin-Resten als axialen Fe-Liganden (Ostermeier *et al.*, 1996).

Untereinheit II der Cytochrom *c* Oxidase trägt im Vergleich zu Chinol-Oxidasen ein weiteres Metallzentrum. Im Falle der aa_3 Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* handelt es sich um ein binukleäres Cu_A Zentrum, das Elektronen von Cytochrom *c* erhält, auf Häm a transferiert und an das binukleäre Zentrum Häm a_3 - Cu_B von Untereinheit I vermittelt. In Untereinheit II liegt die Bindungsstelle für Cytochrom *c* (Drosou *et al.* 2002). Die Interaktion von Cytochrom *c* mit Untereinheit II wird sowohl durch elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt (Witt *et al.*, 1997; Drosou *et al.*, 2002; Maneg *et al.*, 2003). Während der Sauerstoffreduktion werden 4 Protonen von der Matrixseite auf Sauerstoff transferiert und zusätzliche 4 Protonen werden unter Verwendung der frei gewordenen Energie über die Membran entlassen.

Die genaue Funktion der Untereinheit III, die in allen mitochondrialen und den meisten bakteriellen terminalen Oxidasen vorhanden ist, ist unbekannt. Die Bindung von Untereinheit III an Untereinheit I ist schwach, sodass Untereinheit III und IV vom Kern-Komplex mit Hilfe von Detergenz entfernt werden können (Riistama *et al.*, 1996).

Die Untereinheit IV ist die kleinste Untereinheit der Cytochrom Oxidase. Ihre Funktion ist unbekannt. Obwohl diese Untereinheit so klein ist, steht sie in Kontakt mit allen anderen Untereinheiten der Cytochrom Oxidase. In der *E. coli* Chinol-Oxidase, die die Untereinheit IV an der gleichen Stelle hat wie *Paracoccus denitrificans*, ist Untereinheit IV vermutlich für die Stabilität des Cu_B Zentrums in Untereinheit I wichtig (Saiki, *et al.*, 1997). In mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidasen sind bis zu 10 weitere kleine Untereinheiten vorhanden (Kadenbach *et al.*, 1987; Iwata *et al.*, 1995).

Gehehmt wird Komplex IV durch Cyanid, das sich an das binukleare Zentrum der Oxidase bindet und dadurch die Bindung von Sauerstoff verhindert. Weitere Hemmstoffe sind Azid und Kohlenmonoxid.

1.6 Mitochondriale und bakterielle Superkomplexe

Zwei Modelle sind für die strukturelle Organisation der Atmungskettenkomplexe denkbar: Das Modell einer zufälligen Anordnung freibeweglicher Einzelkomplexe und das Modell der Superkomplexassemblierung durch stabile Assoziationen zwischen den Protein-Komplexen.

Die ersten Isolierungen oxidativer Phosphoylierungskomplexe liegen ca. 40 Jahre zurück (Übersicht in Hatefi, 1985). Damals wurden Einzelkomplexe präpariert, die als individuelle Komplexe funktionell aktiv waren (Hatefi *et al.*, 1962). Das bis dahin bevorzugte „solid state“ Modell, in dem alle Atmungskettenkomplexe eine funktionelle Einheit bildeten (Chance *et al.*, 1955), wurde danach stufenweise durch das „liquid state“ Modell der strukturellen Organisation der Atmungskette ersetzt. Diesem Modell liegt zugrunde, dass alle Komplexe sich frei durch laterale Diffusion und unabhängig voneinander bewegen können und der Elektronentransfer an Diffusions-kontrollierte Kollisionen der Komponenten gekoppelt ist (Gupte *et al.*, 1984, 1988, 1988a, Hackenbrock *et al.*, 1986).

Dennoch wurde das „solid state“ Modell nie ganz aufgegeben, nachdem neue Protokolle zur Reinigung von zwei oder mehr miteinander assemblierten Atmungskettenkomplexen führten. Es gab erste Hinweise auf permanente Interaktionen von Atmungskettenenzymen, z.B. die Präparation einer stöchiometrischen Assoziation des Komplex I mit Komplex III (Fowler und Richardson, 1963; Ragan und Heron, 1978), die Isolierung eines NADH Cytochrom *c* Reduktase Komplexes (Komplex I-III, Hatefi und Rieske, 1967), die Isolierung eines Succinat Cytochrom *c* Reduktase Komplexes aus Rinder-Mitochondrien (Komplex II-III, Tisdale, 1967), die Präparation einer „repeating unit of electron transfer“ (Blair, 1967), die alle Atmungskettenenzyme beinhaltet, Interaktionen des Komplex II mit Komplex III in Hefe (Bruel *et al.*, 1996), sowie kinetische Analysen unter der Verwendung von Inhibitortitrationen, woraus sich schließen ließ, dass Cytochrom *c* und Chinol nicht frei in der Membran diffundieren (Boumans *et al.*, 1998).

Durch den Nachweis von zu Superkomplexen assoziierten Atmungskettenenzymen konnte in bakteriellen Atmungsketten von *Paracoccus denitrificans* (Berry *et al.*, 1985), dem thermophilen Bakterium PS3 (Sone *et al.*, 1987), dem thermoacidophilen *Sulfolobus* sp.

Stamm 7 (Iwasaki *et al.*, 1995a; Iwasaki *et al.*, 1995b, Komorowski *et al.*, 2002) dem *Corynebacterium glutamicum* (Niebisch *et al.*, 2003) und in mitochondrialen Atmungsketten von Rinderherz und *Saccharomyces cerevisiae* (Schägger *et al.*, 2000; Cruciat, *et al.*, 2000) gezeigt werden, dass Atmungskettenkomplexe nicht zufällig in der inneren Mitochondrienmembran bzw. der Cytoplasmamembran verteilt sind, sondern zu supramolekularen Strukturen assemblieren.

Obwohl stabile Interaktionen zwischen den bakteriellen Atmungskettenenzymen Komplex III und IV in Form von Chinol-Oxidase bereits im Gram-negativen Bakterium *Paracoccus denitrificans* (Berry *et al.*, 1985) und Gram-positiven Bakterien wie dem *Corynebacterium glutamicum* (Niebisch *et al.*, 2003), sowie dem thermophilen Bakterium PS3 gezeigt werden konnten, konnte eine Beteiligung von Komplex I in Superkomplexen nicht beobachtet werden. Dies ist möglicherweise die Folge einer ausgeprägten Detergenz-Sensitivität von Komplex I in einer Vielzahl an Bakterien. Bisher konnte Komplex I nur aus vier Bakterien isoliert werden: *Escherichia coli* (Leif *et al.*, 1995); *Rhodothermus marinus* (Fernandes *et al.*, 2002); *Klebsiella pneumoniae* (Gemperli *et al.*, 2002); *Aquifex aeolicus* (Peng *et al.*, 2003).

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deren Atmungskette die Komplexe II, III und IV enthält und die im Gegensatz zu den meisten Eukaryoten keinen Komplex I, sondern drei alternative NADH Dehydrogenasen besitzt, konnten drei mitochondriale Superkomplexe durch Solubilisierung mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 und BN-Gelelektrophorese identifiziert werden (Arnold *et al.*, 1998, 1999), und zwei Superkomplexe bestehend aus dimerem Komplex III plus eine und zwei Kopien Komplex IV (III₂IV₁₋₂). Ihre Bildung und Stabilität ist abhängig von den Anzuchtbedingungen (Schägger *et al.*, 2000) und vom Cardiolipingehalt in der inneren Mitochondrienmembran (Schägger, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Die Superkomplexe auch durch Gelfiltration präpariert und durch Co-Immunopräzipitation verifiziert (Cruciat *et al.*, 2000). Der Vergleich der Ubichinol-Oxidase Aktivitäten in Anwesenheit des milden Detergenz Digitonin und des dissoziierenden Detergenz Dodecylmaltosid zeigte auch enzymatisch die Assoziation des Komplex III und IV. Eine Beteiligung des Komplex II am Superkomplex konnte nicht beobachtet werden.

In Säugetiermitochondrien aus Rinderherz wurden ebenfalls verschiedene Superkomplexe nach Solubilisierung mit Detergenz und anschließender BN-Gelelektrophorese identifiziert. Nach Auflösung mit Digitonin wurden folgende Superkomplexe identifiziert: dimerer Komplex III plus monomerer Komplex I (III₂I₁) und Superkomplexe bestehend aus dimerem Komplex III, monomerem Komplex I und ein bis vier Kopien Komplex IV (III₂I₁IV₁₋₄).

Unter der Solubilisierung mit Triton X-100 konnte ein Superkomplex bestehend aus monomerem Komplex I, dimerem Komplex III und null bis vier Kopien Komplex IV ($\text{III}_2\text{I}_1\text{IV}_{0-4}$) detektiert werden. Bei Auflösung mit Dodecylmaltosid konnte dimerer Komplex IV (IV_2) und Komplexe bestehend aus I_1IV_1 und $\text{III}_2\text{IV}_{1-2}$ identifiziert werden, was ein Indikator für direkte Interaktionen von Komplex I-IV und Komplex III-IV ist. Anzeichen für eine Verknüpfung der Atmungskettenkomplexe I, III und IV konnte somit aus dem Vergleich der Solubilisierungsbedingungen geschlossen werden. Assoziationen von Komplex II und V mit anderen Atmungskettenenzymen konnten nicht nachgewiesen werden (Schägger *et al.*, 2000; Schägger 2001a, 2002).

Für Superkomplexe wurde in diesem Zusammenhang ein Modell postuliert, das man als „Respirasom“ bezeichnet. Ein Respirasom ist die funktionelle und strukturelle Einheit aus einzelnen mitochondrialen oder bakteriellen Atmungskettenenzymen, die in der Anwesenheit von Cytochrom *c* und Ubichinon autonom Atmung betreiben können.

Untersuchungen an mitochondrialen Atmungskettenkomplexen aus *Arabidopsis* identifizierten in der blau-nativen Gelelektrophorese und anschließender 2D-SDS Gelelektrophorese pflanzliche Superkomplexe. Unter Solubilisierungsbedingungen mit Digitonin konnten Superkomplexe bestehend aus Komplex I und III im Verhältnis III_2I und III_4I_2 (Eubel *et al.*, 2003) detektiert werden.

Abschließend muss die Frage gestellt werden: Was ist die Funktion von Superkomplexen? Zu diesem Thema wurden bereits viele Vorteile dieser Multienzymkomplexe vorgeschlagen.

- Stabilisierung von Einzelkomplexen
- Schutz vor reaktiven Reaktionszwischenprodukten
- Vermittlung von intramolekularen Gruppentransferreaktionen
- „Substrate channelling“
- Erhöhung der katalytischen Aktivität durch Reduktion der Diffusionsstrecken und Diffusionszeiten („Catalytic enhancement“)

(Eubel *et al.*, 2003; Fersht, 1999; Schägger *et al.*, 2000; Schägger, 2001; Genova *et al.*, 2003)

Der Schutz gegen reaktive Zwischenprodukte wie z.B. Ubisemichinon ist essentiell, da es bei einer Reaktion mit Sauerstoff sonst zur Bildung von Superoxidradikalen (Kotlyar *et al.*, 1990) kommen kann, die zu mitochondrialen Fehlfunktionen (Robinson, 1998) führen.

„Substrate Channelling“ (Schägger *et al.*, 2000; Schägger, 2001, Genova *et al.*, 2003) leitet Intermediate direkt zu spezifischen Enzymen. Ein Hauptvorteil des „Substrate channellings“ ist, dass Substratmoleküle (z.B. Chinol, Cytochrom *c*) örtlich gebunden sind, so dass die Reaktion unabhängig von der Menge an Molekülen in einem Substrat-Pool ist. Dies macht Redoxreaktionen unabhängiger vom Mittelpunktspotential, der zur Reaktion notwendigen Substrate und erlaubt den Elektronenfluss bei geringerer Substratreduktion (Schägger, 2002). Die Abwesenheit eines Cytochrom *c* Pools in Hefe spricht ebenfalls für „Substrate channelling“ (Boumans *et al.*, 1998). In *P. denitrificans* und dem thermophilen Bakterium PS3 scheint es auch extreme Formen von „Substrate channelling“ zu geben, da Cytochrom *c* während der Präparation eines $bc_1 + c-aa_3$ Superkomplexes nicht entfernt wurde (Berry *et al.*, 1985; Sone *et al.*, 1987).

1.7 Ziel der Arbeit

Paracoccus denitrificans ist ein etablierter Modellorganismus, in dem die Enzyme der Atmungskette in ihrer minimalen, für die Funktion notwendigen Untereinheiten-zusammensetzung studiert werden können.

Ziel dieser Arbeit war es, die Komplexe I, II, III und IV der bakteriellen Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* zu untersuchen und festzustellen, ob diese Superkomplexe ausbilden, wie es in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und der mitochondrialen Atmungskette aus Rind der Fall ist (Schägger *et al.*, 2000; Cruciat *et al.*, 2000).

Dazu musste ein Reinigungsprotokoll erstellt werden, das es erlaubt, potentielle Superkomplexe aus *Paracoccus denitrificans* Membranen unter möglichst schonenden Bedingungen mit hoher Ausbeute zu isolieren. Herauszufinden war, ob es in *Paracoccus denitrificans* Superkomplexe gibt, die möglicherweise ein komplettes „Respirasom“, bestehend aus Komplex I, II, III und IV, enthalten. Die Stabilisierung durch einen Superkomplex könnte darüber hinaus die erstmalige Aufreinigung des ansonsten instabilen Komplex I von *Paracoccus denitrificans* erlauben, wenn auch im Verband mit anderen Komplexen.

Für die Solubilisierung sollten verschiedene Detergenzien wie Triton X-100, Dodecylmaltosid und Digitonin getestet werden. Im Anschluss an die Solubilisierung sollte eine chromatographische Aufreinigung folgen. Zur elektrophoretischen Charakterisierung dienten BN- und CN-Gelelektrophoresen, gefolgt von einer denaturierenden 2D-Gelelektrophorese, wie auch Blotting und immunologische Antikörper-Detektionen.

Des weiteren sollten die „isolierten Superkomplexe“ bezüglich ihrer Funktion, Stabilität, enzymatischen Aktivität, Sensitivität gegenüber Inhibitoren und Stöchiometrie zueinander charakterisiert werden. Außerdem sollte der Ubichinon- und Gesamtlipidgehalt bestimmt werden. Um die Funktion der einzelnen Komplexe im Superkomplex zu analysieren, sollten Deletionsmutanten (s. 2.1.7, Tabelle 2-1) der Einzelkomponenten verwendet werden. Mit der Analyse der Mutanten wurde das Ziel verfolgt zu erfahren, in wieweit Komplex I die in einem Superkomplex verbliebenen Komplexe, wie auch Cytochrom *c*₅₅₂ benötigt, um enzymatisch und elektrophoretisch stabil zu bleiben. Ebenso sollte untersucht werden, in welchen Fällen die Bildung eines Subkomplexes bzw. der komplette Zerfall der Komplexe durch den Mangel einer Komponente hervorgerufen wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe bezogen:

Aceton; Acrylamid; Agar; Agarose (Biorad Laboratories GmbH, München); Aktivkohle; Aminocaprinsäure; Ammoniumchlorid; Avidin (Fluka, München); Bisacrylamid; Bleiborat; Calciumchlorid; Chloroform; Coomassie Blau G-250; Pferdeherz Cytochrom *c* (Sigma, Deisenhofen); Di-Natriumhydrogenphosphat; Di-Kaliumhydrogenphosphat; d-NADH; EDTA; Eisenchlorid (III); Entwickler- und Fixierlösung für Röntgenfilme; Essigsäure; Ethanol (J.T. Baker, Deventer (Holland)); FMN; Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz; Glasperlen (0,25 - 0,50 mm); Glutaraldehyd; Glycerin; Hefeextrakt; Imidazol (Fluka, München); IPTG (BioTech & Trade Service GmbH, St. Leon-Rot); KCl; Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumperchlorat; KOH; Kupfersulfat; Lysozym; Magnesiumsulfat; Manganchlorid; Methanol; β -Mercaptoethanol; Mops; Natriumacetat; Natriumazid; Natriumcitrat; NaCl; NADH; NaOH; Natriummolybdat-Dihydrat; NiSO₄; Natriumdihydrogenphosphat; Ni-NTA Fast Flow Sepharose (Pharmacia, Freiburg); Pefabloc SC (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg); Perchlorsäure; Pyridin; Rifampicin (Fluka, Steinheim); Rinderserumalbumin (Behringwerke AG, Marburg); Röntgenfilme X-OMAT AR und BioMaxMR (Kodak); Salzsäure; SDS; Succinat; Sucrose; TEMED; Tricin; Trypton (Gibco BRL Life Technologies); Tris (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen); Wasserstoffperoxid; Zinkchlorid.

2.1.2 Inhibitoren

Die Kenndaten folgender Inhibitoren sind im Anhang unter 7.4 aufgelistet:

DQA (Aventis Crop Science, Biochemical Research, Frankfurt am Main)

Antimycin (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)

Kaliumcyanid (Merck, Darmstadt)

TTFA (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)

2.1.3 Detergenzien

Die Kenndaten folgender Detergenzien sind im Anhang unter 7.5 aufgelistet:

Triton X-100 (Serva, Heidelberg)

Dodecyl- β -D-maltosid (Biomol, Hamburg)

Digitonin (Sigma, Deisenhofen)

2.1.4 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung in:	Endkonzentration im Medium:
Rifampicin (Rif)	15 mg / ml in Methanol	60 μ g / ml
Ampicillin (Amp)	100 mg / ml in H ₂ O	50 μ g / ml
Streptomycin (Strep)	25 mg / ml in H ₂ O	60 μ g / ml

Alle Antibiotika wurden zu den autoklavierten Medien steril zugegeben.

2.1.5 Verwendete Medien

2.1.5.1 Methylamin Medium

nach van Spanning *et al.*, 1990; Medium für den *Paracoccus denitrificans* Wildtyp

2.1.5.2 Succinat-Medium

Medium für *Paracoccus denitrificans* Wildtyp und Mutantenstämme (Ludwig 1986):

50 mM K₂HPO₄, 10 mM NH₄Cl, 1 mM MgSO₄ × 7 H₂O, 1 mM Citrat, 40 mM Succinat, 0,2 ml Spurenelementelösung pro Liter Medium. Der pH Wert wurde mit KOH-Plätzchen auf 6,2 eingestellt.

Spurenelementelösung (Angaben pro Liter halbkonzentrierter Salzsäure):

15 g CaCl₂ × 2 H₂O, 24,5 g FeCl₃ × 6 H₂O, 10 g MnCl₂ × 4 H₂O, 3,4 g ZnCl₂, 1,25 g CuSO₄ × 5 H₂O, 0,6 g H₃BO₃, 2,4 g Na₂MoO₄ × 2 H₂O.

Um das im EPR störende Mangan-Signal zu vermeiden, wurde im Regelfall eine Spurenelementlösung ohne Mn verwendet und das Medium mit einer separat angesetzten Stammlösung auf 0,5 μ M Mn eingestellt.

2.1.5.3 LB-Medium Agarplatten

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, pH 7,5, 1,5 % (w / v) Agar Agar (Sambrook *et al.*, 1989).

Für *E.coli* Agarplatten wurde dem Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C 100 µg / ml Ampicillin und 50 µg / ml Streptomycin zugesetzt. Zum Medium für *P. denitrificans* Platten wurden 60 µg / ml Rifampicin zugegeben.

2.1.6 Sonstige Lösungen und Puffer

- Solubilisierungspuffer zur Totalextraktion der *Paracoccus denitrificans* Membranen:
(3 fach konzentriert)
150 mM NaCl
150 mM Imidazol / HCl pH 7
2 mM Aminocaprinsäure
1 mM EDTA

- Puffer für SDS-Gelelektrophorese:
3 × SDS Gelpuffer 0,3 % SDS, 3 M Tris, 1 M HCl, pH 8,5
3 × I-Puffer 150 mM Tris, 12 % SDS, 30 % Glycin, 0,03 % ServaBlue G,
6 % Mercaptoethanol (frisch zugeben)
Anodenpuffer 100 mM Tris / HCl pH 8,9
Kathodenpuffer 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % SDS
Fixieren 50 % Methanol, 10 % Essigsäure
Färben / Entfärben 10 % Essigsäure (0,025 % ServaBlue G)

- Puffer für native Gelelektrophorese

Anodenpuffer	25 mM Imidazol, pH 7 (mit HCl)
Kathodenpuffer	50 mM Tricin / 7,5 mM Imidazol (pH ~ 7 nicht korrigiert) / 0,02 % Serva Blau G (wird bei CNP weggelassen)
Gelpuffer (3 x)	1,5 M Aminocapronsäure; 75 mM Imidazol / HCl pH 7

- Acrylamid / Bisacrylamid Mischung (49,5 % T, 3 % C)

48 g	Acrylamid	
1,5 g	Bisacrylamid	ad 100ml

- Puffer für Western Blot

Anodenpuffer	300 mM Tris, 100 mM Tricin, pH 8,7 - 8,8
Kathodenpuffer	300 mM Aminocapronsäure, 30 mM Tris, pH 8,6 - 8,7
Färben	25 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,02 % ServaBlue G
Entfärben	25 % Methanol, 10 % Essigsäure
PBS-Puffer:	80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 100 mM NaCl, pH 7,5

→ Zugabe von 0,5 % Tween 20 (blocken) oder 0,1 % Tween 20 (waschen)

ECL 1	100 mM Tris / HCl pH 8,5, 2,5 mM Luminol (in DMSO), 0,4 mM Coumarin (in DMSO)
ECL 2	100 mM Tris / HCl pH 8,5, 0,02 % H_2O_2

2.1.7 Verwendete Stämme

Tabelle 2-1 Verwendete *Paracoccus denitrificans* Stämme

Stamm	Stammcharakterisierung / Genotyp	Herkunft / Referenz
Pd1222	DSM413; Rif ^r Spec ^r ; <i>enhanced conjugation frequencies</i> , m ⁻	de Vries <i>et al.</i> , 1989
MK6	Pd1222; $\Delta fbc::Km^r$	Marcus Korn, <i>diploma thesis</i> 1994, Schröter <i>et al.</i> , 1998
MR31	Pd1222; $\Delta actaDI::Km$; $\Delta actaDII::Tc^r$	Raitio und Wikström, 1994
AT110	Pd1235; <i>cycM::Km^r</i>	Turba, <i>PhD thesis</i> (1993), Turba <i>et al.</i> , 1995
Pd12-184 / Pd92-223	Pd9220; $\Delta nqo8-nqo9::ndh-Km$	Finel, <i>unpublished results</i> / Finel, 1996
MR31 pKH48	s. MR 31, pKH48	Oliver Anderka (2003)
Pd12-184 pOR772	s. Pd12-184, pOR772	Oliver Anderka (2003)
Pd12-184 pKH48	s. Pd12-184, pKH48	Oliver Anderka (2003)

2.1.7.1 Erläuterungen zu den Mutantenstämmen (Tabelle 2-1)

➤ Komplex I Deletionsmutante: ΔKI

Die H⁺-translozierende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH-1) ist ein obligatorisches Enzym für *Paracoccus denitrificans*, und die Disruption seiner Gene ist für den Organismus letal. Um dieses Problem zu umgehen und NQO8 und NQO9 trotzdem zu deletieren war es nötig, eine wesentliche Funktion des Enzyms, die NADH-Oxidation, durch ein alternatives Enzym zu ersetzen. Dies geschah durch die Einführung des *ndh* Genes aus *E. coli*, welches die alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH-2) codiert. Diese NDH-2 ist einfacher in ihrem Aufbau. Sie ist in vielen Bakterien und Pilzen vorhanden, jedoch nicht in *Paracoccus denitrificans*. Im Gegensatz zur NDH-1 transloziert sie keine Protonen über die Membran. Dies, und die Eigenschaft von *Paracoccus denitrificans* keine Photosynthese zu betreiben und nicht zu fermentieren, macht die NDH-1 zu einem obligaten Enzym in diesem

Bakterium. Die Unterscheidung der beiden Enzyme erfolgt durch Verwendung der Substrate dNADH und NADH. Die NDH-2 kann dNADH nicht oxidieren.

➤ Komplex III Deletionsmutante: Δ KIII

Der Cytochrom bc_1 Komplex von *P. denitrificans* wurde als komplettes Operon deletiert und gegen eine Kanamycin Resistenz ersetzt. Komplex III ist für die Lebensfähigkeit von Bakterien nicht essentiell, was man am Beispiel von *E. coli* sehen kann. *E. coli* besitzt keinen Komplex III.

➤ Komplex IV Deletionsmutante: Δ KIV

Die Cytochrom *c* Oxidase in *Paracoccus denitrificans* besteht aus vier Untereinheiten. Untereinheit I wird von zwei Genen codiert, die an unterschiedlichen Stellen des Genoms lokalisiert sind und jeweils separat exprimiert werden können, um im Falle einer Mutation einen Defekt ausgleichen zu können. Das Gen *ctaDI* codiert für Untereinheit 1- α und *ctaDII* codiert für Untereinheit 1- β , die in erster Linie exprimiert wird (Raitio *et al.*, 1990). Um aber jegliche Komplementation auszuschließen, wurden in der verwendeten Mutante beide Genloci deletiert.

➤ Cytochrom c_{552} Insertionsmutante: Δc_{552}

Cytochrom c_{552} ist ein membrangebundenes Protein, das den Elektronentransport zwischen Komplex III und IV vermittelt. Die Deletion von Cytochrom c_{552} sollte somit den Elektronentransport in *P. denitrificans* supprimieren. Die Mutante wurde durch eine Insertion einer Kanamycin-Kassette in das Cytochrom c_{552} Gen erzeugt.

Tabelle 2-2 Verwendete *E.coli* Stämme

Stamm	Stammcharakterisierung / Genotyp	Herkunft / Referenz
K12 JM83	Ara, Δ (lac-proAB), rpsL, ϕ 80lacZ Δ M15, pASK68 Derivat	Yanish-Peron <i>et al.</i> , 1985, Kleymann <i>et al.</i> , 1995

2.1.8 Geräte

Zentrifugen:

Biofuge A, Heraeus Holding GmbH (Hanau)

Biofuge 17RS, Heraeus Holding GmbH (Hanau)

Cryofuge 8500i, Kendro

Ultrazentrifugen L7-65 und L8-70M, Beckman Instruments GmbH (München)

Rotoren:

Ti 45, Ti 50.1, Ti 70.1, Beckman Instruments GmbH (München)

Photometer:

UV 1620 Zweiwellenlängen / Doppelstrahlphotometer, Shimadzu (Düsseldorf)

UV 300 Zweiwellenlängen / Doppelstrahlphotometer, Shimadzu (Düsseldorf)

U-3210 Doppelstrahl Spektralphotometer, Hitachi (Düsseldorf)

Spectramax Plus Mikrotiterplatten Spektralphotometer, Molecular Devices (Sunnyville, USA)

Fluorolog 212 Spektralfluorimeter (mit einem IBM-AT kompatiblen Arbeitsplatz-computer), SPEX (Grasbrunn)

Beschallungsgerät:

B 250 Sonifier / Cell Disruptor (Danbury, UK)

Autoklav:

Systec 5075 ELC Autoklav (Wettenberg)

Fraktionssammler :

Pharmacia Biotech Super Frac

EPR-Spektrometer:

ESP 300 E, Bruker (Rheinstetten) mit Continuous flow cryostat ESR 900, Tubney Woods Abingdon (Oxon, UK) und Kühlung mit flüssigem Helium, Messer-Griesheim (Griesheim)

EPR-Röhrchen:

Quarzglas Nr.: 707-SQ-250M (Länge: 250 mm, Durchmesser: 4 mm), Spintec (Remshalden)

Sonstige Geräte:

TSKgel G 4000 SW Säule (21,5 mm × 600 mm)

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht und Lagerung von *Paracoccus denitrificans* Wildtyp und Mutantenstämmen

P. denitrificans wurde bei 32°C auf Rundschüttlern kultiviert. Das Ausgangsmaterial für Superkomplexpräparationen wurde in 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikane mit 2 l Succinat-Medium bei einer Umdrehung von 135 rpm auf einem Infors Unitron AJ260 Schüttler kultiviert. Die Zellen wurden bei einer optischen Dichte von 1,5 – 2 OD rasch abgekühlt, in einer Heraeus Cryofuge 8500i Zentrifuge sedimentiert, in 100 mM KPi Puffer, pH 8 resuspendiert und bei –80°C eingefroren.

Alle Kulturen wurden unter der Kontrolle von Antibiotika angezogen. Kulturen von *P. denitrificans* auf Agarplatten wurden bei 32°C angezogen und bei Raumtemperatur gelagert. Gefrierkulturen wurden in LB Medium mit 40 % (v / v) Glycerin angelegt und bei –80°C gelagert.

2.2.2 Präparation von Cytoplasma-Membranen aus *P. denitrificans*

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Arbeiten und Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt.

2.2.2.1 Analytischer Maßstab

20 ml geerntete und bei –80°C gelagerte Zellen (25 - 30 mg / ml) aus einer Anzucht in Succinat Medium wurden zentrifugiert (4500 rpm, 15 Minuten) und das Sediment ad 20 ml mit 50 mM KPi-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7 resuspendiert. Es folgte eine Lysozymbehandlung durch Zugabe von 400 µl Lysozym (10 mg / ml) und 800 µl Pefabloc SC (100 mM) mit einer Inkubation für 30 Minuten bei 4°C. Die viskose Lösung wurde bei –80°C eingefroren, wieder aufgetaut und anschließend unter Rühren auf 40 ml aufgefüllt. Nach dem osmotischen Schock folgte eine Behandlung mit Ultraschall (Branson Sonifier 250; Stufe 4 / 40 % / 5 - 10 Minuten / 0°C). Die Membranen wurden durch eine Sedimentation in der Ultrazentrifuge gewonnen (35.000 rpm, 1 h). Das Sediment wurde in 2 - 3 ml 20 mM KPi, 1 mM EDTA, pH 8 aufgenommen.

2.2.2.2 Präparativer Maßstab

Für den Aufschluss größerer Zellmengen wurde eine Manton-Gaulin Presse (Firma APV Schröder, Lübeck) eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurde die Bakteriensuspension unter Druck gesetzt und durch ein enges Ventil entspannt.

Die Zellen wurden nach der Ernte 1 : 1 (v / v) in 100 mM KPi, 1 mM EDTA pH 8 aufgenommen und direkt vor dem Aufschluss auf 100 µM Pefabloc SC eingestellt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte unter Eis / Methanol Kühlung bei 400 bar für 2 × 5 - 10 Minuten, entsprechend mindestens drei Umläufen (Förderleistung ca. 1 l / min). Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 8500 rpm zentrifugiert. Das so entstandene Membranpellet wurde von den darunter liegenden Zelltrümmern abgenommen und in 20 mM KPi, 1 mM EDTA pH 8 ad 400 ml resuspendiert und anschließend mit dem Messer-Homogenisator homogenisiert. Zuletzt folgte eine Ultrazentrifugation bei 4000 rpm für 1 Stunde. Das Pellet wurde erneut in 20 mM KPi, 1 mM EDTA pH 8 ad 400 ml resuspendiert. Die Ausbeute lag bei 8 - 10 g Membranen mit einer Proteinkonzentration von 25 - 30 mg / ml.

2.2.3 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry *et al.*, 1951 mit der Modifikation von Helenius und Simons, 1972 durchgeführt. Als Proteinstandard für die Eichreihe diente Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,1 bis 2,0 mg / ml.

2.2.4 Chromatographiemethoden

2.2.4.1 Darstellung von Hydroxylapatit

Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$) wurde im Arbeitskreis selbst hergestellt nach der von Schägger (1994) modifizierten Vorschrift von Tiselius *et al.*, (1956) und Bernardi (1973, 1971).

2.2.4.2 Hydroxylapatit-Chromatographie

Die Hydroxylapatit-Chromatographie ist für Proteinreinigungen von Membranproteinen sowohl im großen als auch kleinen Maßstab geeignet. Proteine interagieren mit Hydroxylapatit auf zwei unterschiedliche Weisen. Die negativen Ladungen eines Proteins interagieren vorzugsweise mit der Ca^{2+} -Oberfläche des Hydroxylapatits, während die positiven Ladungen an die Phosphatgruppen binden. Am besten eignen sich saure Proteine zur Reinigung, die fest an die Calcium-Oberfläche binden. Sowohl die Phosphatkonzentration als

auch die Ionenstärke beeinflussen die Bindung und Elution der Proteine. Phosphat wird vorzugsweise zur Elution von sauren Proteinen verwendet und hohe Ionenstärke zur Elution von basischen Proteinen.

2.2.4.3 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration oder Größenausschluss-Chromatographie werden Partikel mit definierter Porengröße als Gelmatrix verwendet. Die Porenweite bestimmt den Bereich der optimalen Trennung. Große Moleküle werden dabei an den Partikeln durch den Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet und kleine Moleküle diffundieren durch die Poren der Matrix in die Partikel. Daraus resultierend werden große Moleküle schneller durch die Gelfiltrationssäule transportiert als kleine. Als Gelfiltrationsmaterialien werden Partikel aus hydrophilen Polymeren eingesetzt, die inert, druckstabil, ungeladen und von gleicher Größe sind. Die für die Superkomplexpräparation verwendete Säule (300 ml) enthielt Sepharose CL 6B (Pharmacia Biotech, Freiburg / Matrix: Agarose / Fraktionierungsbereich 10-4000 kDa).

2.2.4.4 Immobilized Metal Ion Affinity Chromatographie: IMAC (Pharmacia Biotech)

Dieses Verfahren nutzt die Affinität von Histidin zu Chelat-Komplex-bildenden Metall-Ionen (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) zur Reinigung von Proteinen, die mit einem Histidin-Tag markiert wurden. Dazu wird an das Säulenmaterial „Chelating Sepharose Fast Flow“ ein Metall-Ion immobilisiert, was dazu führt, dass selektiv Proteine, die ein Histidintag tragen, verzögert werden. Außerdem haben im Protein befindlichen Cystein- und Tryptophanreste einen Einfluss. Jedoch ist ihre Bindung viel schwächer als die der Histidinreste zum Metall-Ion. Die Stärke der Bindung ist durch den pH des Puffers und die ausgewählten Metallionen bedingt.

Zur Beladung des Säulenmaterials wurden 3 SV 0,1 M NiSO_4 verwendet. Anschließend wurde die Säule mit 6 SV H_2O gespült und mit 4 SV 100 mM NaCl, 50 mM NaPi, 0,05 % Digitonin pH 7 äquilibriert. Um die optimalen Wasch- und Elutionsbedingungen zu testen, wurden Imidazolkonzentrationen von 0 - 500 mM getestet. Alle anderen Parameter wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5 Bestimmung der Cytochromgehalte

2.2.5.1 Redoxspektren in wässriger Lösung

Bei Proteinen mit Hämgruppen findet man unterschiedliche Spektren für den reduzierten und oxidierten Zustand. Aus diesen Spektren wird ein Differenzspektrum gebildet (nach Schägger *et al.*, 2001).

Die Bestimmung der Cytochromgehalte erfolgte durch die Aufnahme von Differenzspektren mit einem Shimadzu UV-300 Doppelstrahl-Spektralphotometer.

Die Probe wurden in Puffer C (4 % Triton X-100, 20 mM K-Mops, 300 mM Sucrose, 1,2 M NaCl pH 7,2) + Puffer D (0,5 % Triton X-100, 50 mM NaPi, 250 mM NaCl pH 7,2) im Verhältnis 1 : 1 verdünnt, mit Natriumdithionit reduziert und die Referenz mit Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert.

Zur Berechnung wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

Cytochrom *b*: $\epsilon_{560-574\text{nm}} = 28,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Brandt, 1989)

Cytochrom *c* bzw. *c*₁: $\epsilon_{540-550\text{nm}} = 19,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Chance, 1957)

Cytochrom *c* Oxidase: $\epsilon_{605-630\text{nm}} = 23,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Ludwig und Schatz, 1980)

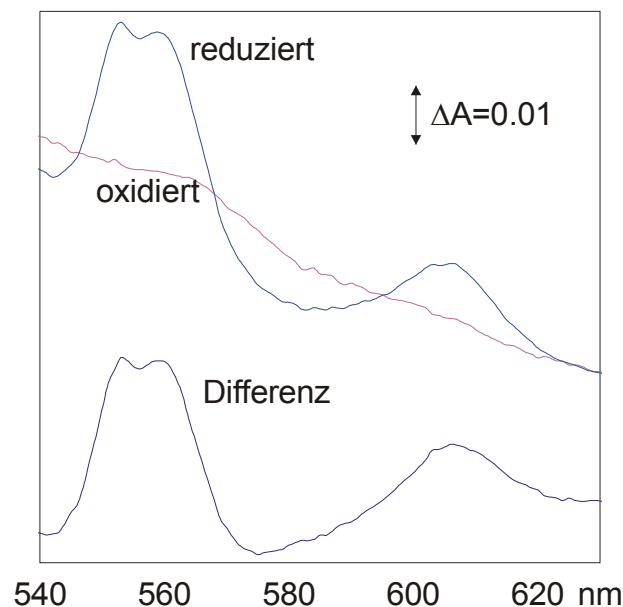


Abb. 2-1 Reduziertes, oxidiertes und Differenzspektrum von *Paracoccus denitrificans* Wildtyp Membranen

2.2.5.2 Redoxspektren in Pyridin

Eine Methode, um Hämkomponenten ohne ihre Proteinumgebung durch die Bildung von Hämochromen zu quantifizieren, ist die Aufnahme eines Redoxspektrums in Pyridin. Dabei bildet sich ein Komplex aus einem Ferroporphyrin (Häm) und einer nitrogenen Base (Pyridin: C₅H₅N). Das Pyridin besetzt dabei nach Extraktion des Hämes aus dem Protein die fünfte und sechste Koordinationsstelle.

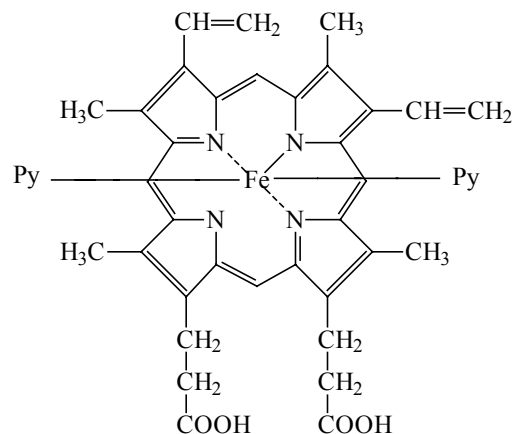


Abb. 2-2 Beispiel: Komplexbildung von Pyridin und einem Cytochrom vom Typ b

Die Methode wurde verwendet, um die überlappenden Spektren von Häm b und c quantitativ analysieren zu können. Die Versuche wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Rieske, 1967 durchgeführt. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden verwendet (nach Berry *et al.*, 1987):

$$\text{Häm a: } \epsilon_{588-620\text{nm}} = 21,01 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Häm b: } \epsilon_{540-560\text{nm}} = 28,32 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Häm c: } \epsilon_{535-550\text{nm}} = 21,84 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

2.2.6 Native Gelelektrophorese

2.2.6.1 Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die Blau-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (nach Schagger & von Jagow 1991 / 1994) wurde zur Auftrennung der Komponenten der bakteriellen Atmungskette in Membranen aus *P. denitrificans* eingesetzt, sowie zur Identifizierung von Superkomplexen. Solubilisierte Membranen bzw. isolierte Komplexe wurden auf ein 3,5 % / 3,5 % → 13 % Acrylamid-Gradientengel aufgetragen. Bei dieser Methode wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine von der Bindung des negativ geladenen Farbstoffs Coomassie-Blau beeinflusst. Alle Proteine, die diesen Farbstoff binden wandern bei einem pH von 7,5 zur Anode. Die Zuordnung der Komplexe erfolgte zunächst durch Vergleich mit den bekannten, aus Rinderherzmitochondrien gelösten Komplexen.

2.2.6.2 Farblös-Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (CN-PAGE)

Die CN-Page (nach Schägger *et al.* 1994) ähnelt der BN-Page; auf den Zusatz von Coomassie-Farbstoff wird jedoch verzichtet, um das Protein noch schonender im Gel zu trennen. Hier wird die elektrophoretische Mobilität allein von der Protein-eigenen Ladung beeinflusst, so dass nur Membran-Proteine und wasserlösliche Proteine mit einem niedrigen Isoelektrischen Punkt ($pI < 5$), zur Anode wandern können. Der Farbstoff Ponceau-Rot wird zur Probe gegeben, um die Lauffront im Gel zu markieren.

Im Anschluss an BN-PAGE oder CN-PAGE kann eine denaturierende Gelelektrophorese in der zweiten Dimension die Untereinheiten-Zusammensetzung der vorher getrennten Proteine klären.

2.2.7 Denaturierende Gelelektrophorese

2.2.7.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Tricin SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde zur Überprüfung der Untereinheiten-Zusammensetzung und der Reinheit der Proteinkomplexe durchgeführt (Schägger *et al.*, 1994; Schägger und von Jagow, 1987).

2.2.7.2 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese basiert auf dem Prinzip der unter 2.2.7.1 beschriebenen Tricin SDS-PAGE. Sie geht von Gel-Streifen nach der ersten, nativen Proteintrennung über BN- oder CN-PAGE aus (Schägger *et al.*, 1994; Schägger und von Jagow, 1987).

2.2.8 Elektroelution (nativ)

Die native Extraktion von Superkomplexen aus BN-Gelen wurde bei 4°C mit einem Elektroelutor / Konzentrator durchgeführt (Schägger *et al.*, 1991). Die Extrakte dienen als Ausgangsmaterial zur Elektronenmikroskopie.

2.2.9 Nachweis von Proteinen durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau

Nach der Auftrennung der Proteine in 1D oder 2D SDS-Gelen ist es notwendig, die Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen. Die Proteine im Gel wurden für 30 Minuten fixiert (50 % Methanol / 10 % Essigsäure), und ebenfalls für 30 Minuten in Färbelösung (0,025 % Serva Blau G / 10 % Essigsäure in aqua bidest.) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit 10 % Essigsäure für mindestens 30 Minuten.

Die Empfindlichkeit dieser Färbung ist mäßig (200 - 400 ng Protein pro Bande). Zum Nachweis niedriger Proteinkonzentrationen empfiehlt sich die Silberfärbung. Diese Färbung hat eine höhere Empfindlichkeit (5 - 30 ng pro Bande).

2.2.10 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag. Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit. Sie färbt jedoch auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide.

Die Silberfärbung von Proteinen nach Polyacrylamid Gelelektrophoresen erfolgte nach Heukeshoven und Dernick (1985). Das Gel wurde für mindestens 2 Stunden oder über Nacht in einer Lösung aus 0,5 M Na-Acetat, 30 % (v / v) Ethanol, 0,125 % Glutaraldehyd (25 %) und 0,2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ inkubiert. Danach wurden die Gele dreimal für 5 Minuten in Aqua bidest. gewaschen und die Färbelösung (0,1 % Silbernitrat, 0,2 % Formaldehyd (37 %)) zugegeben. Die Färbung erfolgte für 30 bis 60 Minuten, worauf die Gele < 15 Sekunden mit Aqua bidest. gewaschen wurden. Die gefärbten Proteinbanden wurden maximal 4 Minuten in 2,5 % Na_2CO_3 und 0,1 % Formaldehyd (37 %) entwickelt. Um eine Überfärbung zu vermeiden, wurde die Färbereaktion mit 1,5 % $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ für 15 Minuten abgestoppt. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele gescannt.

2.2.11 Western Blot / Chemilumineszenz

Zur Detektion von Untereinheiten der Komplexe wurde neben diversen Färbemethoden auch immunologische Nachweise verwendet. Dazu wurden 2D-Gele (BN / SDS) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (ImmobilonTM-P, Millipore) transferiert. Die enhanced chemiluminescence (ECL) Reagentien der Firma Amersham, Braunschweig wurden zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen verwendet. Nach dem Proteintransfer erfolgte eine Entfärbung mit Methanol für 3 Minuten. Die Blockade der unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran wurde mit Blockpuffer (PBS-Puffer mit 0,5 % Tween) für 30 Minuten durchgeführt. Anschließend folgten drei Waschschriffe (1 × 15 Minuten und 2 × 5 Minuten mit PBS mit 0,1 % Tween). Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte über Nacht bei RT. Am nächsten Tag wurde die Membran 1 × 15 Minuten und 2 × 5 Minuten mit PBS mit 0,1 % Tween gewaschen. Als zweiter Antikörper wurden Anti-Maus-IgG (1 : 15000 in Waschpuffer, 1 Stunde bei Raumtemperatur, Taumler) eingesetzt, die mit einer

Peroxidase konjugiert waren. Nach wiederholtem Waschen (1×15 Minuten und 2×5 Minuten mit PBS mit 0,1 % Tween) wurde die Membran getrocknet und mit den Chemiluminolreagentien ECL 1 und ECL 2 für 1×5 und 1×1 Minute detektiert. Hierbei katalysiert die Peroxidase die Oxidation des Luminols in Anwesenheit von H_2O_2 . Unmittelbar nach Oxidation befindet sich das Luminol in angeregtem Zustand, wobei es beim Zurückkehren in seinen Grundzustand Licht emittiert. Zum Nachweis dieser Lichtemission wurde die Membran für 1 bis 5 Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.12 Expression von F_V-Fragmenten

Die Expression von F_V-Fragmenten erfolgte nach Kleymann *et al.* 1995. Die erhaltenen F_V-Fragmente sollten zur Reinigung des Superkomplexes über den am Fragment fusionierten Strep-Tag dienen, und zur Markierung des Superkomplexes unter dem Elektronenmikroskop.

2.2.13 Immunologischer Nachweis von Proteinen über Strep-Tag

Zur Immunodetektion des durch ein F_V-Fragment markierten Proteins nach Immobilisierung auf einer Polyvinylidendifluorid-Membran (ImmobilonTM-P, Millipore) wurden zunächst unspezifische Bindestellen durch eine 1-stündige Inkubation bei RT in TPBS + Avidin (TPBS: 1,4 M NaCl, 0,27 M KCl, 0,8 M Na₂HPO₄ × 2 H₂O, KH₂PO₄, 0,1 % Tween 20 + 20 µg / ml Avidin (aus Hühnereiweiß, Fluka, München)) abgesättigt. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit TPBS und eine 1-stündige Inkubation unter Verwendung eines Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugates (Strep-AP, Amersham life science RPN 1234) in TBSP (1 / 1000). Nach Entfernung unspezifisch gebundener Konjugate in drei Waschschriffen in TPBS (3×5 Minuten) und einmal in Aqua dest. konnte die alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase wurde mit BCIP / NBT Tabletten (0,3 mg / ml p-Nitroblautetrazoliumchlorid / 0,15 mg / ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim) in Aqua dest. durchgeführt. Abgestoppt wurde die Reaktion mit einem Waschschriff mit Aqua dest.

2.2.14 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit Vivaspin 4 ml Concentrator 100.000 MWCO PES Konzentratoren (Vivascience, Hannover) gemäß der Anleitung der Hersteller ankonzentriert.

2.2.15 Messung enzymatischer Aktivitäten

Alle Messungen erfolgten bei 30°C an einem Shimadzu UV-300 Spektrometer in Halbmikro-Küvetten.

2.2.15.1 NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I

Für die Bestimmung der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität wurde DBQ (n-decyl-Ubichinon) als Substrat eingesetzt. Bei Anwesenheit der alternativen Dehydrogenase, wie z.B. in der Komplex I Deletionsmutante, wurde statt NADH deamino-NADH eingesetzt. Dieses wird spezifisch von Komplex I oxidiert (Matsushita *et al.*, 1987). Die NADH Oxidation wurde bei 340 – 400 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) gemessen (Okun *et al.*, 2000). Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest enthielt 50 mM Tris / HCl, pH 7,4 und 2 mM KCN. 200 μM NADH bzw. dNADH und Enzym wurden vor dem Test vorgelegt; gestartet wurde die Reaktion mit 60 μM DBQ. DQA wurde als Hemmstoff der Reaktion verwendet.

2.2.15.2 NADH:HAR Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I

Der Elektronentransport von NADH auf den artifiziellen Elektronenakzeptor HAR (Hexamminruthenium (III)-chlorid) wird vom hydrophilen Teil des Komplex I katalysiert (Sled und Vinogradov, 1993). HAR Aktivitäten wurden im Vergleich zu NADH:Ubichinon Oxidoreduktase gemessen, um den Gehalt an intakten Komplex I und damit die Qualität der Präparation abzuschätzen.

Die NADH Oxidation wurde bei 340-400 nm ($\epsilon_{340-400} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) verfolgt. Aktivitätstestpuffer (20 mM HEPES, 250 mM Sucrose, 0,2 mM EDTA, 2 mM NaN_3 pH 8) mit 2 mM HAR und 200 μM NADH wurden vorgelegt und die Reaktion mit *Paracoccus denitrificans* Membranen gestartet.

2.2.15.3 Succinat:Dichloroindophenol Reduktase Aktivität des Komplex II

Die Succinat:Dichloroindophenol Reduktase Aktivität (Schägger und Pfeiffer, 2001) wurde als Thenoyltrifluoroaceton-sensitive Reduktion von Dichloroindophenol (DCIP : 0,1 %, $\epsilon_{610\text{nm}-750\text{nm}} = 20,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) gemessen. Als Substrat diente 50 mM Succinat. Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 50 mM Na-Phosphat, 1 mM EDTA, 2 mM NaN_3 pH 7. 5 mM DBQ, 20 mM Na-Succinat und 0,1 % DCIP wurden vor dem Test vorgelegt, gestartet wurde die Reaktion mit Enzym.

2.2.15.4 Ubichinol:Cytochrom *c* Reduktase Aktivität des Komplex III

Die Messung der Ubichinol:Cytochrom *c* Reduktase Aktivität (nach Schägger und Pfeiffer, 2001) wurde als Antimycin-sensitive Reduktion von (Pferdeherz) Cytochrom *c* (Cyt.*c*: 50 μM , $\epsilon_{540\text{nm}-550\text{nm}} = 19,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) durchgeführt. Als Substrat diente 75 μM Decylbenzochinol (DBH). Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 150 mM NaCl, 75 mM Imidazol / HCl und 5 mM KCN, pH 7. 50 μM Cyt.*c*. und 75 μM DBH wurden vor dem Test vorgelegt, gestartet wurde die Reaktion mit Enzym.

2.2.15.5 Cytochrom *c* Oxidase Aktivität des Komplex IV

Die Messung der Cytochrom *c* Oxidase Aktivität (nach Schägger und Pfeiffer, 2001) wurde als Cyanid-sensitive Oxidation von (Pferdeherz) Cytochrom *c* (Cyt.*c*: 50 μM , $\epsilon_{540\text{nm}-550\text{nm}} = 19,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) durchgeführt. Als Elektronenakzeptor in diesem Test dient Sauerstoff. Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 150 mM NaCl und 75 mM Imidazol / HCl, pH 7. 50 μM Cyt.*c* wurden vor dem Test vorgelegt, gestartet wurde die Reaktion mit Enzym.

2.2.15.6 Gekoppelte Ubichinol Oxidase Aktivität der Komplexe III und IV

Die Messung der Ubichinol Oxidase Aktivität (nach Schägger und Pfeiffer, 2000) wurde als Antimycin-sensitive Oxidation von Decylbenzochinol (DBH: 70 μM , $\epsilon_{280\text{nm}-290\text{nm}} = 4,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) durchgeführt. Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 150 mM NaCl und 75 mM Imidazol / HCl, pH 7 supplementiert mit 50 μM Cytochrom *c*. Das Enzym wurden vor dem Test vorgelegt, gestartet wurde die Reaktion mit 70 μM DBH.

2.2.15.7 Gekoppelte NADH Cytochrom *c* Reduktase Aktivität der Komplexe I und III

Die Messung der NADH Cytochrom *c* Reduktase Aktivität (nach Schägger und Pfeiffer, 2000) wurde als DQA- und Antimycin-sensitive Reduktion von Cytochrom *c* (Cyt. *c*: 50 μM , $\epsilon_{540\text{nm}-550\text{nm}} = 19,0 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) durchgeführt. NADH diente als Elektronen-Donor. Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 150 mM NaCl, 75 mM Imidazol / HCl und 5 mM KCN, pH 7. 50 μM Cytochrom *c*, 200 μM NADH wurden vor dem Test vorgelegt, gestartet wurde die Reaktion mit Enzym.

2.2.15.8 Gekoppelte NADH Oxidase Aktivität der Komplexe I, III und IV

Die Messung der NADH Oxidase Aktivität wurde als Cyanid-sensitive Oxidation von NADH (NADH: 200 μM , $\epsilon_{340\text{nm}-400\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) durchgeführt. Der verwendete Puffer für den Aktivitätstest bestand aus 150 mM NaCl und 75 mM Imidazol / HCl, pH 7. 200 μM NADH wurden vor dem Test vorgelegt, gestartet wurde die Reaktion mit Enzym.

2.2.16 Darstellung von Decylubihydrochinon

DBQ wurde durch Zugabe von Natrium-Dithionit zu DBH reduziert (Brandt *et al.*, 1997). Die Konzentration von DBH wurde bei 290-350 nm ($\epsilon_{290-350} = 4,2 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) bestimmt.

2.2.17 Bestimmung von gebundenem Phospholipid

Der Phospholipidgehalt wurde als anorganisches Phosphat nach Veraschung bestimmt (Chen *et al.*, 1956). Der Bestimmung liegt die Bildung eines Phosphomolybdatkomplexes mit Ammoniummolybdat und anschließender Reduktion dieses Komplexes durch Ascorbinsäure zugrunde (Extinktion bei 820 nm). Kaliumphosphat in den Konzentrationen 50-500 nmol / ml diente als Phosphatstandard für die Eichreihe.

2.2.18 Qualitative und quantitative Bestimmung von Ubichinon

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Ubichinon wurde aus *Paracoccus denitrificans* Membranen und aus dem NADH Oxidase Superkomplex Ubichinon extrahiert und mittels einer „reversed phase“ HPLC analysiert. Dies erfolgte nach einer Vorschrift von Dröse *et al.*, 2002.

2.2.19 Bestimmung von freiem Flavin

Zur Bestimmung von freiem Flavin wurden die folgendermaßen modifizierten Vorschriften von Koziol (1971) und Hatefi & Stempel (1969) verwendet:

2 - 3 mg Membranen oder 0,2 - 0,5 mg isolierter Komplex wurden mit 50 mM Tris / HCl, 2 mM KCN, pH 7,4 auf 500 μl verdünnt und mit ca. 80 mg Glasperlen versetzt. Nach Zugabe von 100 μl HClO_4 (1 M, 0°C) wurde kurz gemischt und 15 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde für 2 min bei 13.000 rpm in einer Biofuge A zentrifugiert und der Überstand abpipettiert (Überstand 1). Das Sediment wurde homogenisiert und mit 500 μl HClO_4 (1 M, 0°C) extrahiert. Nach kurzem Durchmischen wurde wieder für 2 min

zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und mit Überstand 1 vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden mit 50 μl KOH (10 M) und 50 μl K_2HPO_4 (4 M) neutralisiert und 4 min zentrifugiert. Der neutralisierte Überstand wurde von weißem Sediment aus KClO_4 abpipettiert.

Für die fluorimetrische Flavin-Bestimmung wurde 1 ml des neutralisierten Überstandes in eine 1 ml Rührküvette gegeben (Quarzglas unter N_2 -Atmosphäre). Die Fluoreszenzmessung von freiem Flavin in der Probe erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm in einem Spex Fluorolog 212 Spektralfluorimeter.

Als interner Standard wurde mit einer Hamilton Mikroliterspritze (10 μl) in 1 μl Schritten FMN ($\epsilon_{445\text{nm} - 500\text{nm}} = 12,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) von einer Stammlösung (100 μM FMN in 50 mM Tris/ HCl, 2 mM KCN, pH 7,4) der Probe zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur FMN-Konzentration.

2.2.20 Aufnahme von EPR-Spektren

Tieftemperatur EPR Spektren wurden in einem Bruker ESP 300E Spektrometer, ausgestattet mit einer Flüssighelium-Kühlung (ESR 900, Oxford Instruments), aufgenommen. EPR Proben wurden in den Probenröhrchen mit NADH reduziert und nach 30 s Reaktionszeit in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Durchgeführt wurde die EPR-Spektroskopie von Dr. Klaus Zwicker.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung der Atmungsketten-Superkomplexe aus *Paracoccus denitrificans*

Assoziationen von Atmungsketten-Enzymen zu Superkomplexen konnten bisher in mitochondrialen und bakteriellen Atmungsketten beobachtet werden (Berry *et al.*, 1985, Cruciat, *et al.*, 2000, Schägger *et al.*, 2002). Obwohl stabile Interaktionen von bakteriellem Komplex III und IV zu Chinol-Oxidasen (Berry *et al.*, 1985) gezeigt werden konnten, konnte eine Beteiligung von Komplex I nicht nachgewiesen werden. Dies scheint auf eine ausgeprägte Detergenz-Sensitivität von Komplex I in verschiedenen Bakterien zurückzuführen zu sein. Bisher konnte Komplex I aus vier Bakterien isoliert werden : *Escherichia coli* (Leif *et al.*, 1995), *Rhodothermus marinus* (Fernandes *et al.*, 2002), *Klebsiella pneumoniae* (Gemperli *et al.*, 2002) und *Aquifex aeolicus* (Peng *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Assemblierung der Komplexe I, III und IV zu einem supramolekularen NADH Oxidase Komplex in *Paracoccus denitrificans* nachgewiesen und dieser Superkomplex chromatographisch für detaillierte strukturelle und funktionelle Analysen isoliert.

3.1.1 Identifizierung von Superkomplexen aus *Paracoccus denitrificans*

Als Ausgangsmaterial für diese Preparationen dienten die unter 2.2.2 erstellten *Paracoccus denitrificans* Membranen, die bei -80°C gelagert wurden. Die cytoplasmatischen Membranen besaßen eine Gesamtproteinkonzentration von ca. 30 mg / ml.

P. denitrificans Membranen wurden mit Hilfe von Digitonin (2g / g Protein) solubilisiert und mit der BN-PAGE getrennt. Als Hauptbande wurde monomerer Komplex V (M_{app} 530 kDa) und daneben eine Vielzahl zusätzlicher Banden mit apparenten Massen von 460 - 1900 kDa detektiert (Abb. 3-1 A, Banden a-e). Eine Zuordnung dieser Banden wurde nach SDS-PAGE in der zweiten Dimension und anschließender immunologischer Detektion möglich (Abb. 3-1 B).

Die Zuordnung der Banden a-c wurde zudem durch die Analyse des chromatographisch isolierten NADH Oxidase Superkomplexes erleichtert, der Bande a entspricht. Er enthält monomeren Komplex I, vier Kopien des Komplex III, vier Kopien Komplex IV sowie etwa zwei Moleküle Cytochrom c_{552} (s. 3.1.4.5).

Die kleineren Komplexe b und c enthalten keinen Komplex I. Sie bestehen aus tetramerem Komplex III und vier bzw. zwei Kopien von Komplex IV, abgeleitet aus den apparenten Massen im BN-Gel (Abb. 3-1), und aus densitometrischen Analysen Coomassie-gefärbter 2D-Gele. Da andere Formen mit einer oder drei Kopien von Komplex IV nicht gefunden wurden kann man davon ausgehen, dass Komplex IV als Dimer am Superkomplex gebunden ist, obwohl das Monomer die strukturelle und funktionelle Einheit darstellt (Iwata *et al.*, 1995).

Bande d enthielt Cytochrom c_1 , Cytochrom b und das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Abb. 3-4), was darauf hindeutete, dass Komplex III voll assembliert ist. Etwas Cytochrom c_{552} war außerdem gebunden, woraus sich schließen lässt, dass Cytochrom c_{552} nicht nur an KIV, sondern auch an KIII bindet. Bande e wurde als Subkomplex von Komplex III identifiziert, dem das Rieske Eisen-Schwefel Protein und das Cytochrom c_{552} fehlt (siehe Abb. 3-4).

Die apparenten Massen der Banden d und e im BN-Gel deuten an, dass sowohl der voll assemblierte Komplex III als auch der Subkomplex in tetramerer Form in *P. denitrificans* vorliegen. Geringe Mengen von dimerem Komplex III, der die kleinste strukturelle Einheit des Cytochrom bc_1 Komplexes darstellt (Xia *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 1998; Hunte *et al.*, 2000), wurden ebenfalls immunologisch detektiert (Abb. 3-1 B, schwarze Pfeile). Monomerer, nicht im Superkomplex gebundener Komplex I konnte nicht detektiert werden.

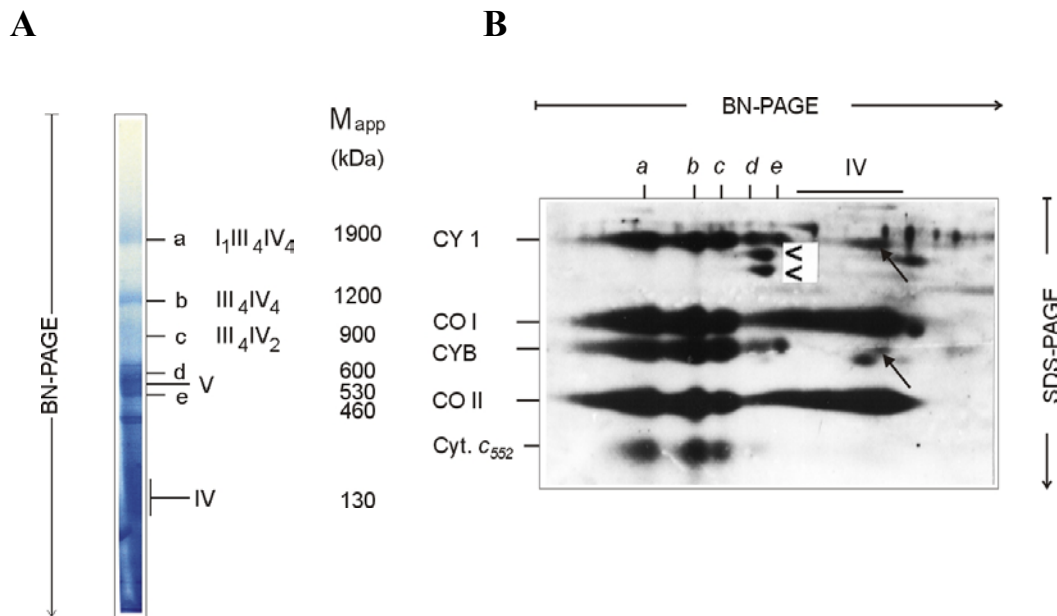


Abb. 3-1 (A) Auftrennung von Atmungskettenkomplexen und Superkomplexen in der BN-PAGE / (B) Westernblot einer 2D Tricin-SDS-PAGE

Als molekularerer Größenstandard wurden die oxidativen Phosphorylierungskomplexe aus Rinderherzmitochondrien (BHM), die mit 2,5 g /g Dodecylmaltosid solubilisiert wurden, verwendet. (Pfeilspitzen auf weißem Hintergrund markieren nicht-spezifische Interaktionen der Antikörper mit der alpha und beta Untereinheit der ATP Synthase; schwarze Pfeile markieren dimeren Komplex III.)

Superkomplexe konnten auch nach Auflösung mit Triton X-100 und Dodecylmaltosid (Abb. 3-2) beobachtet werden.

Unter Verwendung von Triton X-100 konnte eine zusätzliche Bande f, die aus dimerem Komplex III und dimerem Komplex IV besteht, detektiert werden (s. Abb. 3-2).

Nach Auflösung mit Dodecylmaltosid wurden die Banden a, b, c, d, e sowie eine zusätzliche Bande a' identifiziert. Bande a' ist ein teilweise dissoziierter Superkomplex an dem die Untereinheiten NQO1, 2, und 3 des Komplex I und 2 Kopien des Komplex IV fehlen (s. Abb. 3-3 E).

Die Isolierbarkeit von Superkomplexen über BN-PAGE nach Auflösung mit drei verschiedenen Detergenzien täuscht eine vergleichbare Stabilität der Atmungskettenkomplexe gegenüber diesen drei Detergenzien vor, die tatsächlich nicht gegeben ist.

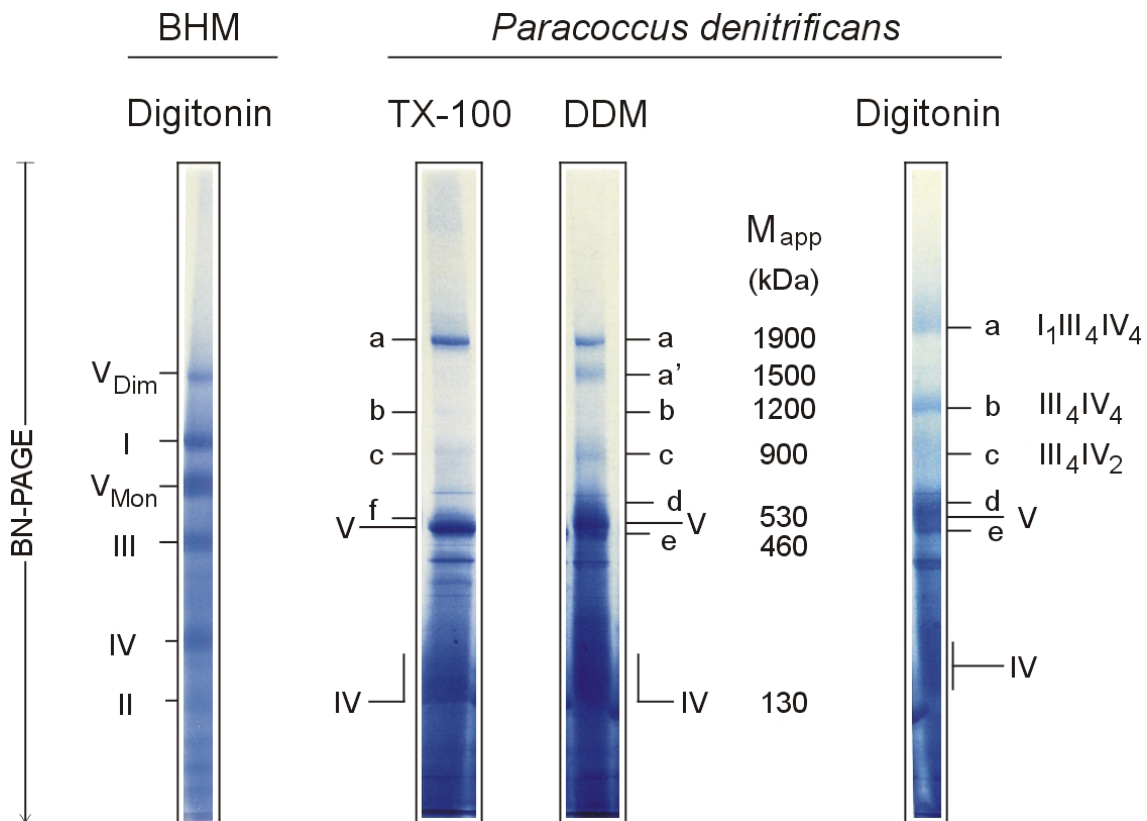


Abb. 3-2 Auftrennung von Atmungskettenkomplexen und Superkomplexen mit der BN-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 4-13 % Acrylamid Gradienten

Die Solubilisierung erfolgte mit Triton X-100 (2g / g), DDM (1g / g) und Digitonin (2g / g). Als molekularerer Größenstandard wurden die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I-V aus Rinderherzmitochondrien (BHM), die mit 2,5 g / g Dodecylmaltosid solubilisiert wurden, verwendet.

Versuche, den NADH-Oxidase Superkomplex unter der Verwendung von Triton X-100 oder Dodecylmaltosid chromatographisch zu isolieren schlugen aufgrund der Instabilität der Einzelkomplexe fehl. Diese Detergenzsensitivität konnte mit 2D-Gelen nachgewiesen werden (Abb. 3-3).

Nach Auflösung mit Triton X-100 konnte lediglich monomerer Komplex IV, jedoch kein tetramerer Komplex III detektiert werden (Bande d und e sind nicht vorhanden) (Abb. 3-3 A). Dissoziierte Untereinheiten der Komplexe IV und III konnten an der Lauffront (rechte Seite des Gels) beobachtet werden, was eine Triton X-100-Sensitivität der Komplexe IV und III andeutet. Nach Auflösung mit Dodecylmaltosid war der Komplex IV stabil, jedoch konnten geringe Mengen an dissoziierten Komplex III Untereinheiten detektiert werden (Abb. 3-3 B). Mit Digitonin konnten keine Untereinheiten der Komplexe III und IV in dissoziierter Form beobachtet werden (Abb. 3-3 C).

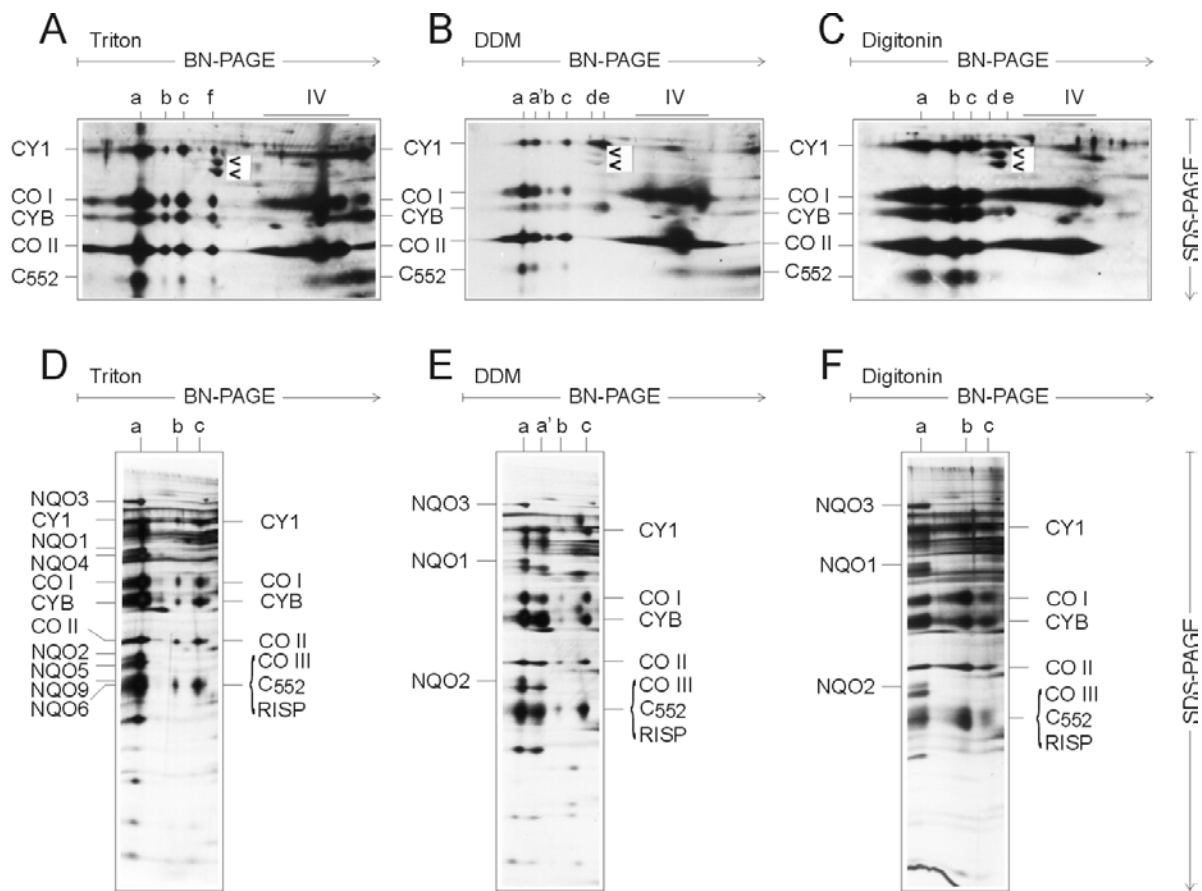


Abb. 3-3 Identifizierung der Proteinzusammensetzung der Komplexe nach 2D Tricin-SDS-PAGE

A-C Immunologische Detektion der Proteinuntereinheiten: 2D Tricin-SDS-PAGES der BN-Gelstreifen (siehe Abb. 3-2) wurden zu nach Auflösung mit Triton X-100 (A), Dodecylmaltosid (DDM)(B) und Digitonin (C) eingesetzt und auf eine PVDF Membran elektrogeblottet. Eine Mischung von Antikörpern (CY1, Cytochrom c₁; CYB, Cytochrom b; CO I und CO II, Cytochrom c Oxidase Untereinheit I und II; Cytochrom c₅₅₂) wurde verwendet, um Einzelkomplexe und supramolekulare Assemblierungen zu lokalisieren (aufgelistet in Tabelle 3-1). Nichtspezifische Wechselwirkungen der Antikörpermischung mit der alpha und beta Untereinheit der ATP Synthase (Pfeile auf weißem Hintergrund) erleichterten die exakte Lokalisierung des tetrameren Komplex III (Abb. C, Bande d) und die Assemblierung dimeren Komplex III mit zwei Kopien Komplex IV (Abb. A, Bande f)

D-F Silber-gefärbte 2D-SDS-Gele, mit Zuordnung weiterer mit spezifischen Antikörpern identifizierter Proteinuntereinheiten

Untereinheit III des Komplex IV (CO III), Cytochrom c₅₅₂ und das Rieske Eisen Schwefel Protein (RISP) des Komplex III kolokalisieren zu einer breiteren Bande.

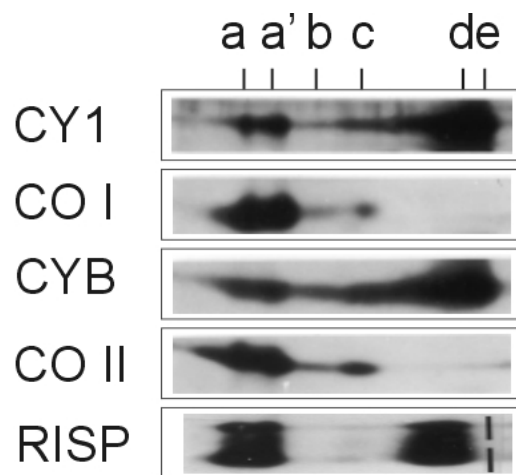


Abb. 3-4 Identifizierung des Rieske Eisen Schwefel Proteins in Subkomplex d

Immunologische Detektion der Proteinuntereinheiten: Vorbereitung der Probe siehe Text Abb. 3-3

Tabelle 3-1 Zusammensetzung der *Paracoccus denitrificans* Superkomplexe

Komplex	Zusammensetzung ^a	M _{app} (kDa)	M _{calc} (kDa)	Bemerkungen
a	I ₁ III ₄ IV ₄	1900	1511	enthält etwa 2 Moleküle Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂
a'	I _{Frag} III ₄ IV ₂	1500	1139	NQO1, 2, und 3 Untereinheiten des Komplex I und 2 Kopien Komplex IV sind dissoziiert
b	III ₄ IV ₄	1200	984	Assemblierungsintermediat oder Fragment des Komplex <i>a</i>
c	III ₄ IV ₂	900	722	Assemblierungsintermediat oder Fragment des Komplex <i>a</i>
d	III ₄	600	460	Tetramer bestehend aus RISP und Spuren von Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂
e	III ₄	460	379	Tetramer ohne RISP und Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂
f	III ₂ IV ₂	600	528	Nur in Anwesenheit von Triton X-100 detektiert

^a Anzahl der Cytochrom *c*₅₅₂-Moleküle pro Komplex ist nicht exakt bekannt. Die Berechnungen basieren auf den Werten der Tabelle 7-1 (siehe Anhang).

3.1.2 Detergenz-Sensitivität der Komplexe I, II, III und IV aus Wildtyp Membranen

Um die Stabilität der Einzelkomplexe zu testen und das zur chromatographischen Reinigung am besten geeignete Detergenz zu finden, wurden Auflösungsreihen mit *Paracoccus denitrificans* Membranen durchgeführt und enzymatische Aktivitäten (s. Abb. 3-5) ermittelt.

Zur Auflösung der Membranen wurden Detergenz / Protein Verhältnisse gewählt, die knapp über dem zur vollständigen Lösung notwendigen liegen: Digitonin (3 g / g), Dodecylmaltosid (1,5 g / g) und Triton X-100 (1,5 g / g).

Die höchsten spezifischen Aktivitäten für die Komplexe I, III und IV wurden unter den Solubilisierungsbedingungen mit 3 g Digitonin pro Gramm Protein erhalten.

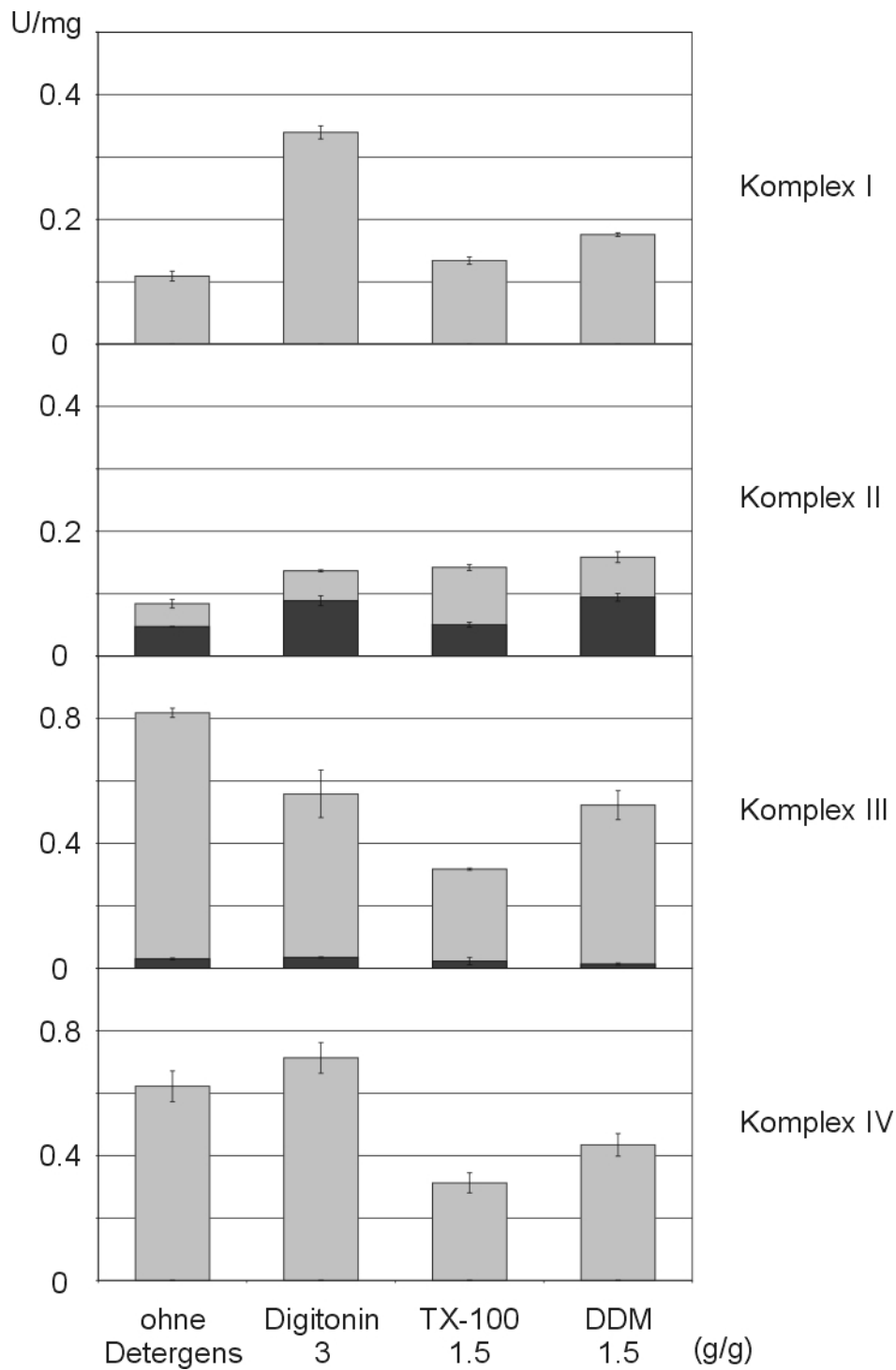


Abb. 3-5 Spezifische Enzymaktivitäten der Komplexe I-IV

Komplex I: NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität, Komplex II: Succinat:Dichloroindophenol Reduktase Aktivität, Komplex III: Ubichinol:Cytochrom c Reduktase Aktivität, Komplex IV: Cytochrom c Oxidase Aktivität in Paracoccus denitrificans Membranen mit 3g Digitonin / g Protein, 1.5g Triton X-100 / g Protein und 1.5g DDM / g Protein. Schwarz : Inhibitor in-sensitive Aktivität

3.1.3 Chromatographische Reinigung des NADH Oxidase Superkomplexes

Mit Hilfe von weiteren Vorversuchen (Tabelle 3-2) wurden die optimalen Parameter für die Protein-Bindung, die Waschschrte und die Elution der Superkomplexe von der Hydroxylapatit-Säule bestimmt.

Tabelle 3-2 Einstellung der optimalen Versuchsbedingungen zur Isolierung von Superkomplexen

Arbeitsschritt :	getestete Parameter :		optimale Bedingung :
Solubilisierung der <i>P. denitrificans</i> Membranen	Triton X-100	0,5 - 5 g / g	3 g / g Digitonin
	Dodecylmaltosid		
	Digitonin		
Auftrag der Probe auf die Säule	Probenauftrag : Phosphatkonzentration 50 mM-250 mM		150 mM NaPi
Waschschritt zur Entfernung von Fremdprotein	Waschpuffer: Phosphatkonzentration 50 mM-250 mM Detergenz : 0,1 - 0,5 % Digitonin		150 mM NaPi 0,1 % Digitonin
Elution des Superkomplex von der Hydroxylapatit- Säule	Elutionspuffer : Phosphatkonzentration 50 mM-300 mM		0,05 % Triton X-100 / 150 mM NaPi oder
	Triton X-100	0,025-0,2 %	
	Dodecylmaltosid		
	Digitonin		0,05 % DDM / 250 mM NaPi

Für die Totalextraktion der Membranen wurde Digitonin (3 g / g) eingesetzt. 1 mM EDTA und 2 mM Aminocaprinsäure wurden als Protease-Hemmer zugesetzt. Alle Schritte der Präparation mit Ausnahme der Hydroxylapatit-Chromatographie, die durch den hohen Phosphatgehalt des Puffers bei RT durchgeführt werden musste, wurden bei 4°C durchgeführt. Der Extraktionsansatz wurde 5 Minuten lang auf Eis gerührt und anschließend 30 Minuten bei 35000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vor dem Auftrag auf eine 40 ml Hydroxylapatit-Säule auf 150 mM NaPi eingestellt, wobei dies die höchste Phosphat-Konzentration war, die gewählt werden konnte, um ein effektives Durchlaufen von Fremdproteinen bei gleichzeitiger stabiler Bindung des Superkomplexes an die Säule zu gewährleisten.

Nach Auftrag des Extraktes wurde die Säule mit 80 ml (zwei Säulenvolumina) Puffer A gewaschen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 168 ml / h mit vier Säulenvolumina

Puffer B eluiert. Zur Regeneration wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina Puffer C gewaschen und mit 5 Säulenvolumina Puffer D äquilibriert.

Da der Reinigungsschritt der Hydroxylapatit-Chromatographie noch nicht zu einem reinen Protein führte, wurde eine Gelfiltrationschromatographie an diesen Reinigungsschritt angeschlossen.

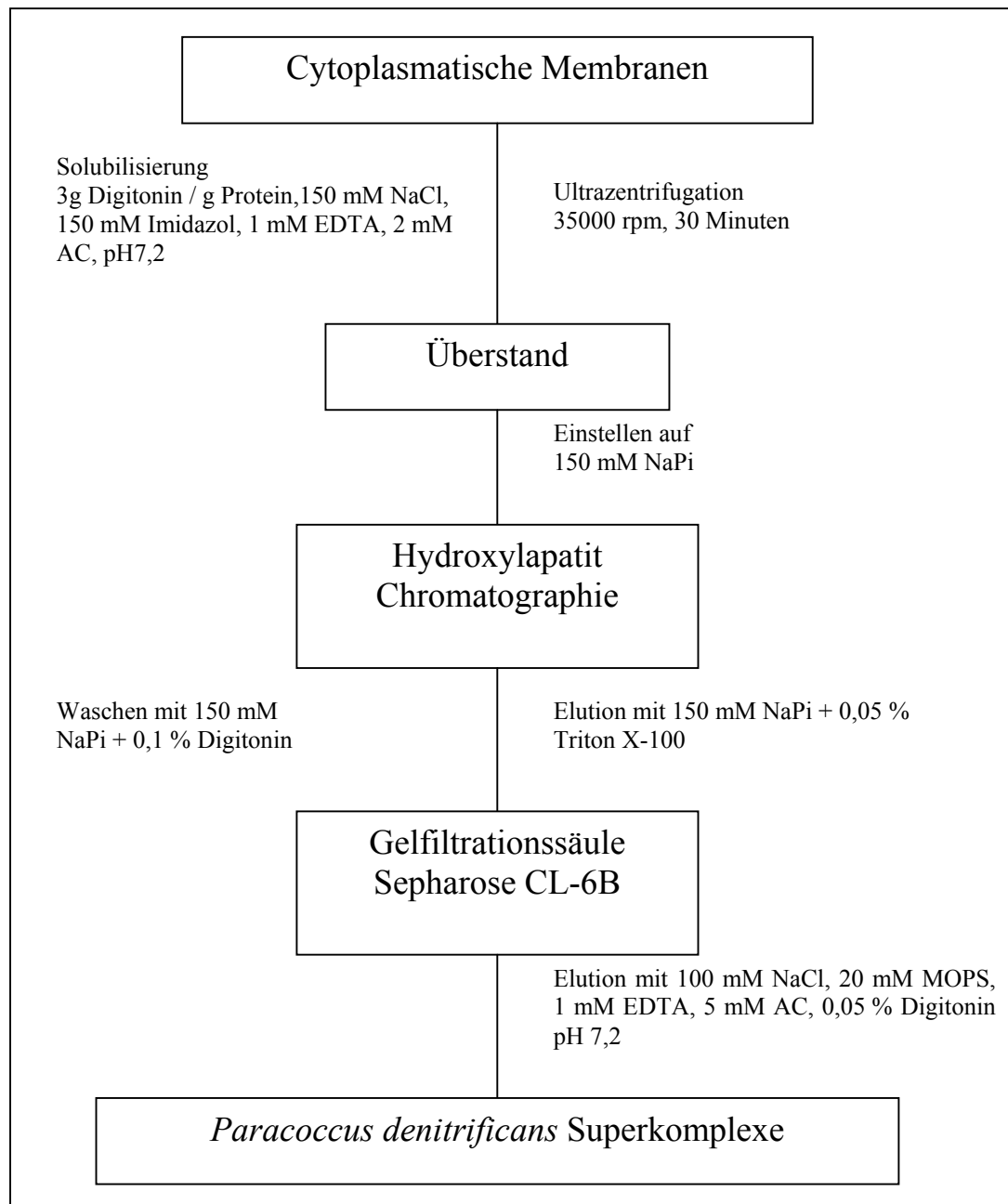


Abb. 3-6 Reinigungsschema der Superkomplex-Präparation aus *Paracoccus denitrificans*

Fractionen, die in der BN-PAGE (Abb. 3-7) Superkomplexe zeigten, wurden vereinigt und durch Zentrifugation in Vivaspin-Konzentratoren aufkonzentriert. Um Aggregationen zu vermeiden, wurde das Eluat maximal um den Faktor sechs ankonzentriert. Das konzentrierte Eluat (1-2 % des Säulenvolumens der Gelfiltrationssäule) wurde auf eine 80 ml Sepharose CL 6B-Gelfiltrationssäule (Ausschlussgrenze: 10 – 4000 kDa), die mit Puffer E äquilibriert wurde, aufgetragen. Die Chromatographie wurde mit einer Flussrate von 6 ml / h in Puffer E durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden per BN-PAGE (Abb. 3-8) und 2D-Gelelektrophorese analysiert.

Alle Fraktionen wurden parallel zur Gelelektrophorese auf ihre katalytische Enzymaktivität hin untersucht.

Tabelle 3-3 Zur Isolierung von Superkomplexen verwendete Puffer

Puffersubstanz	A	B	C	D	E
Na-Phosphat	150 mM	150 mM	300 mM	20 mM	
Digitonin	0,1 %				0,05 %
Triton X-100		0,05 %	0,5 %		
NaCl					100 mM
MOPS					20 mM
EDTA					1 mM
Aminocaprinsäure					5 mM
pH	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2

3.1.4 Charakterisierung der Superkomplexe aus *Paracoccus denitrificans*

Die isolierten Atmungskettenkomplexe wurden bezüglich ihrer Funktion, Stabilität, enzymatischen Aktivität, Stöchiometrie und ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung aus *Paracoccus denitrificans* Wildtyp-Membranen mit folgenden Methoden analysiert:

3.1.4.1 Analyse der Eluate nach Hydroxylapatitchromatographie und Gelfiltration durch BN-Gelelektrophorese

Um die Atmungskettenenzyme aus *Paracoccus denitrificans* zu identifizieren wurden blau-native Gele (nach Schagger H. *et al.* 1991) verwendet. 2D-Gele und Western Blots für die immunologische Detektion wurden im Anschluss daran zur Identifizierung der Enzymuntereinheiten benutzt.

Für die BN-PAGE wurden die Atmungskettenkomplexe aus Rinderherzmitochondrien als molekularer Größenstandard verwendet. Pro Tasche wurden maximal 100 - 200 µg Protein mit 375 mM Aminocaprinsäure aufgetragen. Den Elutionsfraktionen wurde kein Coomassiefarbstoff zugesetzt, da die Mischung des anionischen Farbstoffes mit dem vorhandenen neutralen Detergens Eigenschaften eines anionischen Detergens imitieren und zur Dissoziation von Superkomplexen führen kann.

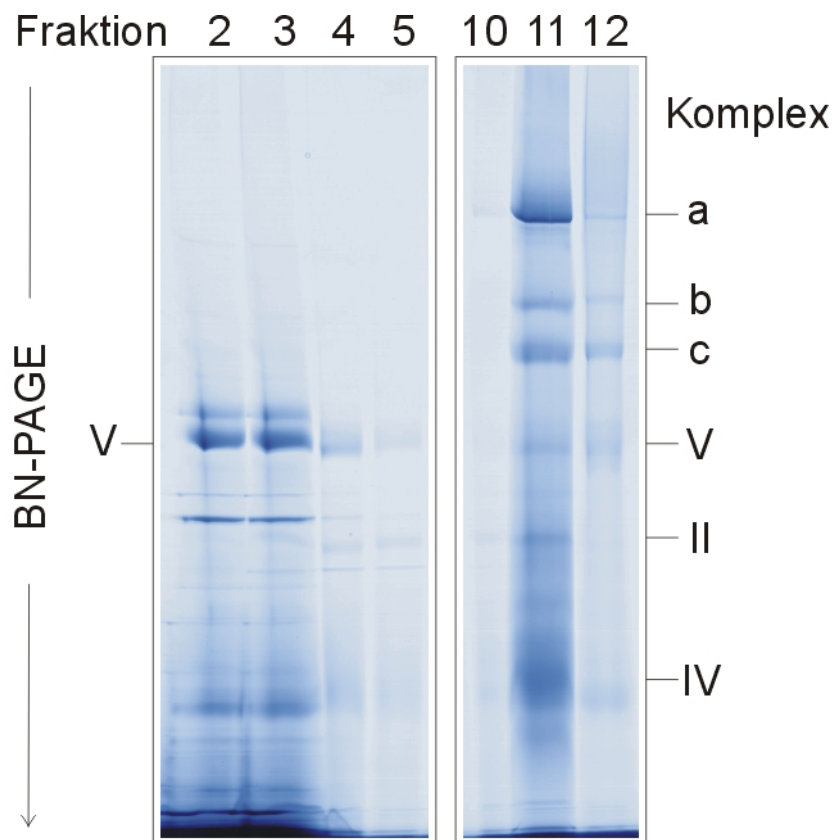


Abb. 3-7 BN-PAGE der Hydroxylapatit-Eluate

Proben aus allen Präparationsstufen wurden auf blau native Gele aufgetragen. Abb. 3-7 zeigt Eluate der Hydroxylapatit-Chromatographie. In den Fraktionen 2-4 war etwa 70% des aufgetragenen Proteins wiederzufinden. Als Hauptkomponente dieser Durchlaufaktionen wurde Komplex V identifiziert.

*Die Superkomplexe a, b und c eluierten in Fraktion 11 und 12 zusammen mit Komplex V (V), der Succinat-Dehydrogenase (II) und der Cytochrom Oxidase (IV). Die Zusammensetzung der Superkomplexe a, b und c sind **Tabelle 3-1** zu entnehmen.*

Im anschließenden denaturierenden 2D-Gel und durch immunologische Detektion im Western-Blot mit Antikörpern gegen Komplex I, III und IV sowie c_{552} ließen sich die Untereinheiten der Komplexe a, b und c identifizieren.

Um in einem weiteren Reinigungsschritt eine Abtrennung der nicht zum Superkomplex zugehörigen Proteine vom Superkomplex zu erreichen, wurde eine Gelfiltrationschromatographie angeschlossen. Den Elutionsfraktionen wurde ebenfalls kein Coomassiefarbstoff zugesetzt.

In der BN-PAGE nach Gelfiltration (Abb. 3-8) war eine teilweise Trennung des Superkomplexes a von den Komplex I freien Komplexen b und c, sowie eine Abtrennung der Komplexe II, IV und V zu beobachten. Komplex II ist eindeutig nicht mit der NADH Oxidase assoziiert.

Nur die Fraktionen 4 - 6 der Gel-Filtration wurden für weitere spektrometrische und enzymatische Analysen verwendet, um die Kontamination der NADH Oxidase (Superkomplex a) durch Komplex I-freie Superkomplexe b und c möglichst gering zu halten.

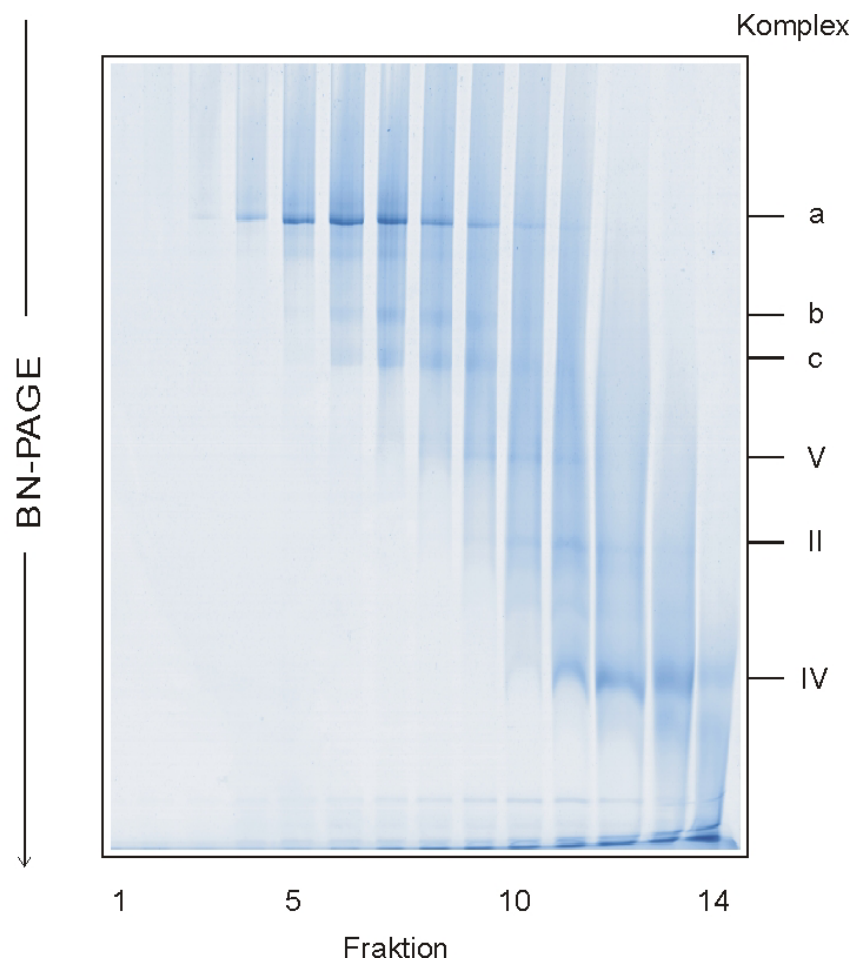


Abb. 3-8 BN-PAGE der Gelfiltrationseluat

Fraktionen 1-14; die Zusammensetzung der Superkomplexe a, b und c sind der Tabelle 3-1 zu entnehmen; V: ATP-Synthase; II: Succinat-Dehydrogenase; IV: Cytochrom c Oxidase

3.1.4.2 Immunologische Identifizierung von Untereinheiten der Superkomplexe

Superkomplex-Untereinheiten wurden mittels Western Blot (s. 2.2.11) von 2D-SDS-Gelen (10%) nach blau nativer oder farblos nativer Gelelektrophorese detektiert und identifiziert. Es wurde eine Mischung von polyklonalen Antikörpern gegen Komplex I-, Komplex III- und IV-Untereinheiten verwendet. Tabelle 3-4 zeigt eine Übersicht über alle verwendeten Antikörper. Die Antikörper gegen Komplex I Untereinheiten wurden in einer Verdünnung von 1:500 und die Antikörper gegen Komplex III und IV-Untereinheiten 1:1000 in PBS-Puffer mit 0,1 % Tween verdünnt und zur Immunodetektion verwendet.

Tabelle 3-4 Übersicht über die verwendeten Antikörper gegen *Paracoccus denitrificans* Proteine

Name des Antikörpers	Bindet an Untereinheit	Massen der Untereinheiten (Da)	Untereinheit des:
1	NQO 1	47191	Komplex I
2	NQO 2	26122	Komplex I
3	NQO 3	73028	Komplex I
4	NQO 4	46674	Komplex I
5	NQO 5	23600	Komplex I
6	NQO 6	19117	Komplex I
7c	NQO7c	13633	Komplex I
9	NQO9	18959	Komplex I
AE	CYB	50116	Komplex III
R	CY1	44654 ^a	Komplex III
AD	UCRI (RISP)	20299	Komplex III
AH	CO I	62439	Komplex IV
AI	CO II	27981 ^b	Komplex IV
AJ	CO III	30655	Komplex IV
BA	c ₅₅₂	18209	Elektronentransport zwischen KIII und KIV

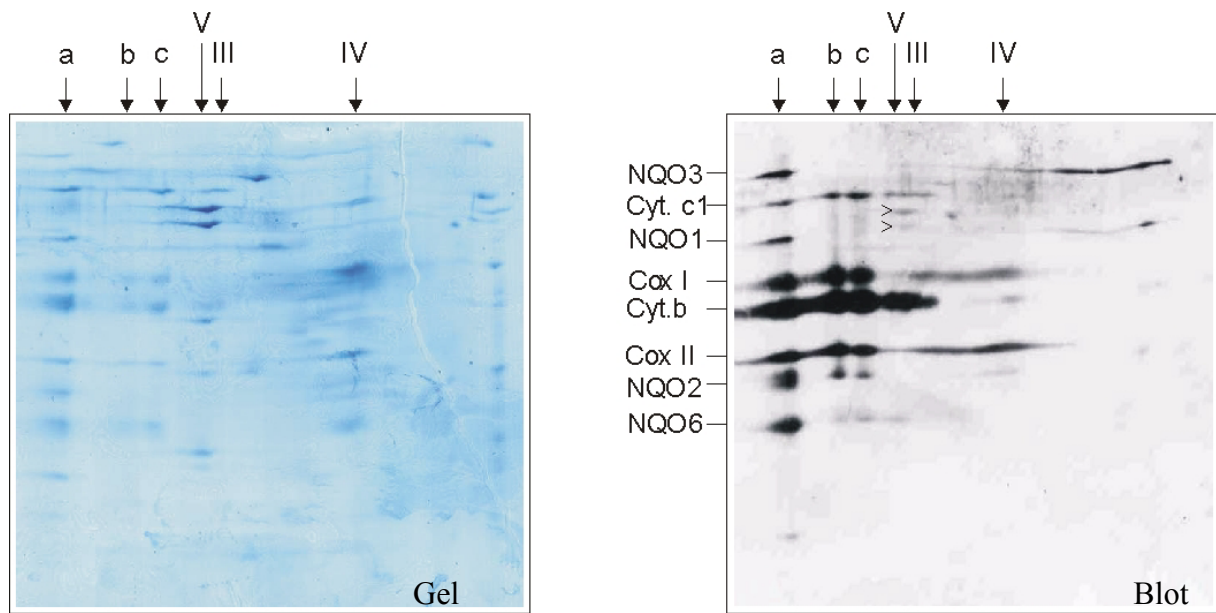


Abb. 3-9 2D-SDS-Gel (10 % Acrylamid) (links) und Western-Blot (rechts) des Hydroxylapatit-Eluates
Die Positionen der Superkomplexe a, b, c sowie der Komplexe V, III und IV sind markiert.

Nach 2D SDS-Gel und anschließenden Immuno-Blotting (Abb. 3-9) konnten die Komplex I-, III- und IV-Untereinheiten der Superkomplexe identifiziert werden. Der große Superkomplex a, enthielt Untereinheiten der Komplexe I, III und IV; die zwei kleinen Superkomplexe c und d, enthielten nur Untereinheiten der Komplexe III und IV. Ferner konnten die individuellen Komplexe III, IV und V identifiziert werden. Alle den Komplexen I, III und IV zugehörigen Untereinheiten wurden zusätzlich durch aminoterminaler Protein-Sequenzierung nachgewiesen.

Ebenso wie die Hydroxylapatit-Eluate wurden auch die Gelfiltrationseluate immunologisch untersucht. Dazu wurde eine Fraktion mit chromatographisch isolierter NADH-Oxidase mit Hilfe eines Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blot mit den in Tabelle 3-4 beschriebenen Antikörpern untersucht. In Abb. 3-10 wird die Untereinheiten-Zusammensetzung des chromatographisch präparierten und des durch direkte BN-Gelelektrophorese isolierten NADH-Oxidase-Komplexes mit Komplex III und IV als Referenz verglichen. Dabei lassen sich die Banden der isolierten Komplexe eindeutig den Banden im isolierten Superkomplex a zuordnen. Das Rieske-Eisen-Schwefelprotein des Komplex III, sowie Cytochrom c_{552} und die Untereinheit Cox III des Komplex IV sind nicht markiert; sie kolokalisieren im Bereich von NQO6 und NQO9. Die Untereinheiten-Zusammensetzung der chromatographisch und der BN-Gelelektrophorese isolierten NADH

Oxidase ist sehr ähnlich, aber in der chromatographischen Präparation sind einige zusätzliche Proteine zu finden.

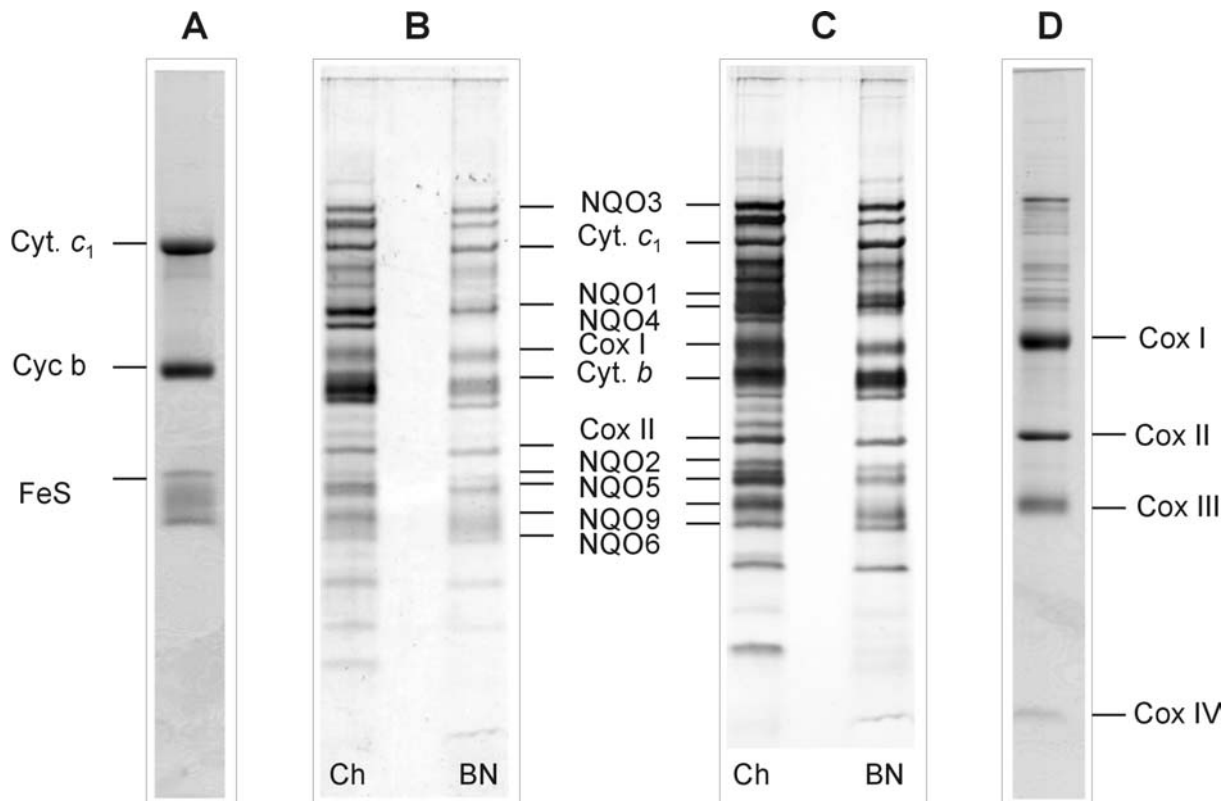


Abb. 3-10 Untereinheiten-Zusammensetzung des NADH-Oxidase-Superkomplexes

Die NADH-Oxidase aus *P. denitrificans* wurde sowohl chromatographisch (Ch) als auch durch direkte BN-Gelelektrophorese (BN) präpariert. Die Untereinheiten wurden per Tricin-SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) getrennt und mit den gereinigten Komplexen III und IV verglichen.

- (A) Coomassie-gefärbte Spur eines SDS-Gels mit gereinigter Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase aus *P. denitrificans*;
- (B) Coomassie-gefärbte Spur eines SDS-Gels mit isoliertem NADH Oxidase Komplex;
- (C) Silber gefärbte Spur eines SDS-Gels mit isoliertem NADH Oxidase Komplex;
- (D) Coomassie-gefärbte Spur eines SDS-Gels mit gereinigter Cytochrom c Oxidase aus *P. denitrificans*.

Untereinheiten aus Komplex I (NQO 1-6, 9), Komplex III (cyt. c_1 and cyt. b) und Komplex IV (Cox I, II) konnten immunologisch identifiziert werden. Untereinheiten Cox III, Cytochrom c_{552} , und das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein wurden durch Immunodetektion im Bereich der NQO 9 und NQO 6 Banden lokalisiert (nicht gekennzeichnet).

3.1.4.3 Enzymatische Aktivitäten des NADH Oxidase Superkomplexes

Zur quantitativen und qualitativen Analyse der Superkomplex *a* Präparation wurden die Enzymaktivitäten der Einzelkomplexe und gekoppelte Aktivitäten mehrerer Komplexe gemessen.

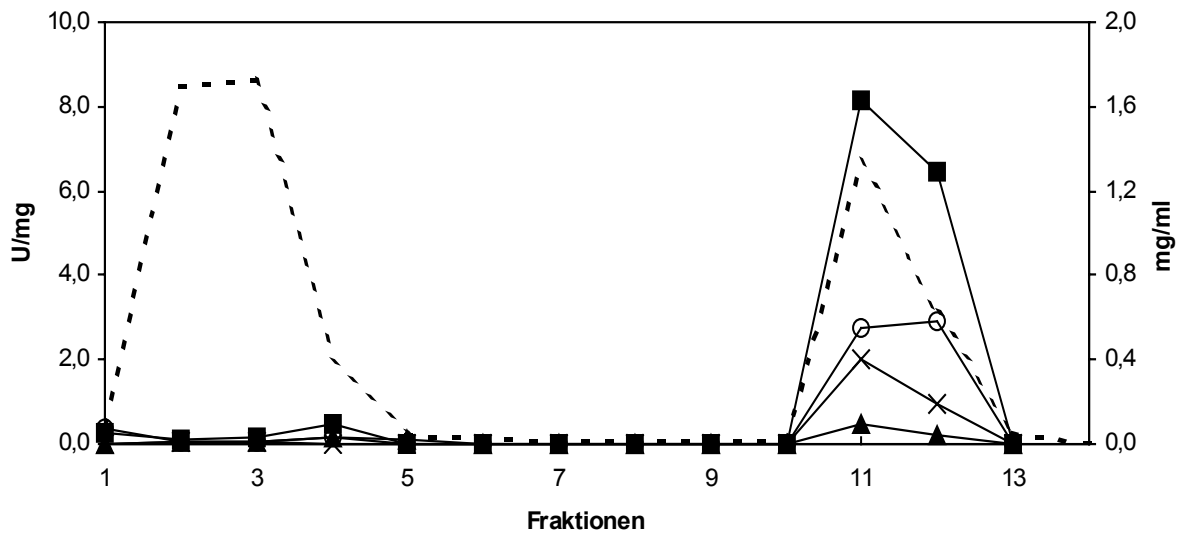


Abb. 3-11 Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Chromatographie; Messung der Aktivitäten der Einzelkomplexe

- ×-×-× KI : NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität (U/mg)
- ▲-▲-▲ KII : Succinat:Dichloroindophenol Reduktase Aktivität (U/mg)
- KIII: Ubichinol:Cytochrom c Reduktase Aktivität (U/mg)
- KIV: Cytochrom c Oxidase Aktivität (U/mg)
- - - - Protein (mg/ml)

Die enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Komplexe sind im Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Säule in Abb. 3-11 gezeigt. Im Durchfluss der Säule (Fraktion 1 – 5) sind mehr als 70 % des applizierten Proteins inklusive der ATP-Synthase (Komplex V) zu finden, jedoch keinerlei Aktivitäten der Komplexe I-IV. Alle Atmungskettenkomplexe werden annähernd quantitativ gebunden und eluieren gemeinsam in den Fraktionen 11 und 12, die zur Gelfiltration verwendet wurden. Diese enzymatischen Ergebnisse sind in Einklang mit der korrespondierenden BN-PAGE (Abb. 3-7).

Der Vergleich der Elutionsprofile der Einzel- (Abb. 3-11) und der gekoppelten Aktivitäten (Abb. 3-12) der Atmungskettenkomplexe zeigte, dass die in den Fraktionen 11 und 12 eluierten Komplexe zumindest teilweise noch als Einzelkomplexe vorliegen müssen.

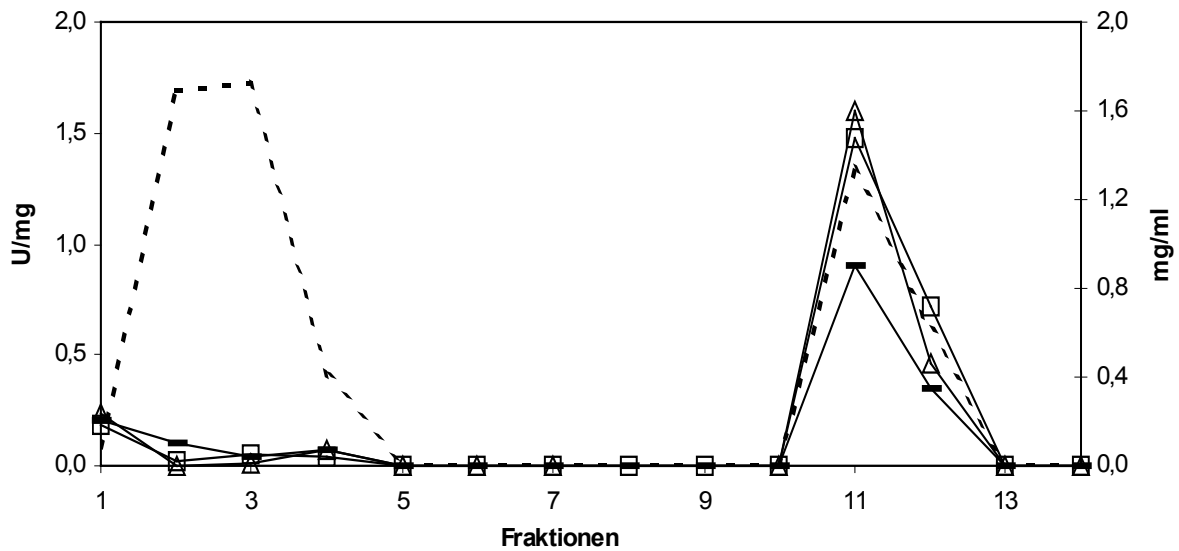


Abb. 3-12 Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Chromatographie; Messung der gekoppelten Aktivitäten mehrerer Atmungskettenkomplexe

- Δ - Δ - Δ *KIII + KIV : Ubichinol Oxidase Aktivität (U/mg)*
- \square - \square - \square *KI + KIII : NADH Cytochrom c Reduktase Aktivität (U/mg)*
- — — — — *KI+KIII+KIV: NADH Oxidase Aktivität (U/mg)*
- - - - - *Protein (mg/ml)*

Die Fraktionen der Gelfiltrationssäule wurden ebenfalls auf ihre einzelnen und gekoppelten katalytischen Enzymaktivitäten hin untersucht.

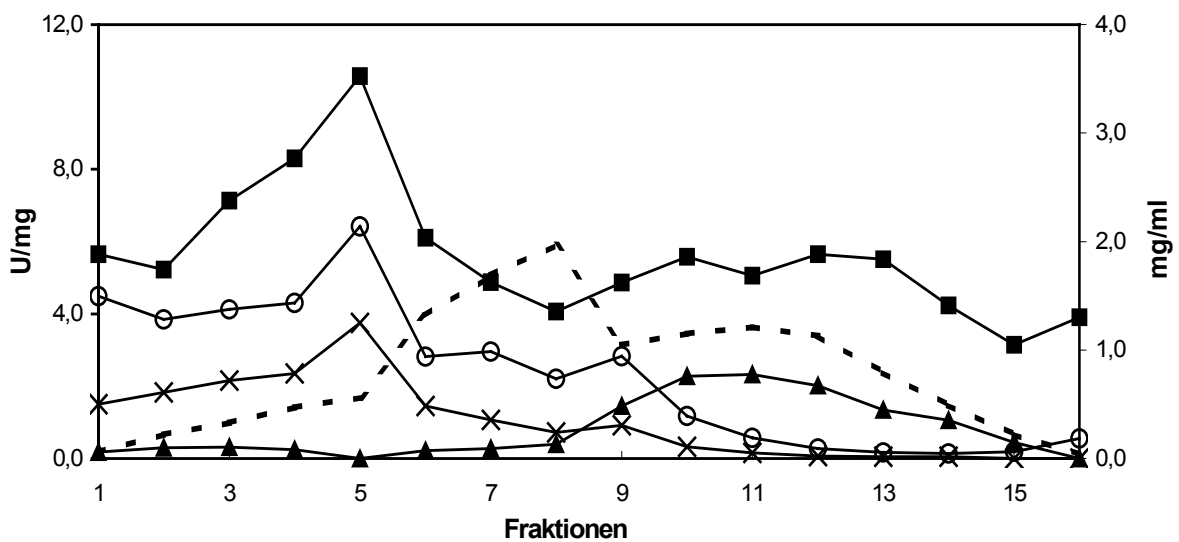


Abb. 3-13 Elutionsprofil der Gelfiltrationssäule; Messung der Aktivitäten der Einzelkomplexe

- \times - \times - \times *KI : NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität (U/mg)*
- \blacktriangle - \blacktriangle - \blacktriangle *KII : Succinat:Dichloroindophenol Reduktase Aktivität (U/mg)*
- \circ - \circ - \circ *KIII: Ubichinol:Cytochrom c Reduktase Aktivität (U/mg)*
- \blacksquare - \blacksquare - \blacksquare *KIV: Cytochrom c Oxidase Aktivität (U/mg)*
- - - - - *Protein (mg/ml)*

Das Elutionsprofil der enzymatischen Aktivitäten der Einzelkomplexe (Abb. 3-13) und die korrespondierende BN-PAGE (Abb. 3-8) weisen darauf hin, dass der NADH-Oxidase Komplex, der die Komplexe I, III und IV enthält, zuerst eluiert, gefolgt von Assoziationen der Komplexe III und IV und schließlich den individuellen Komplexen V, II und IV.

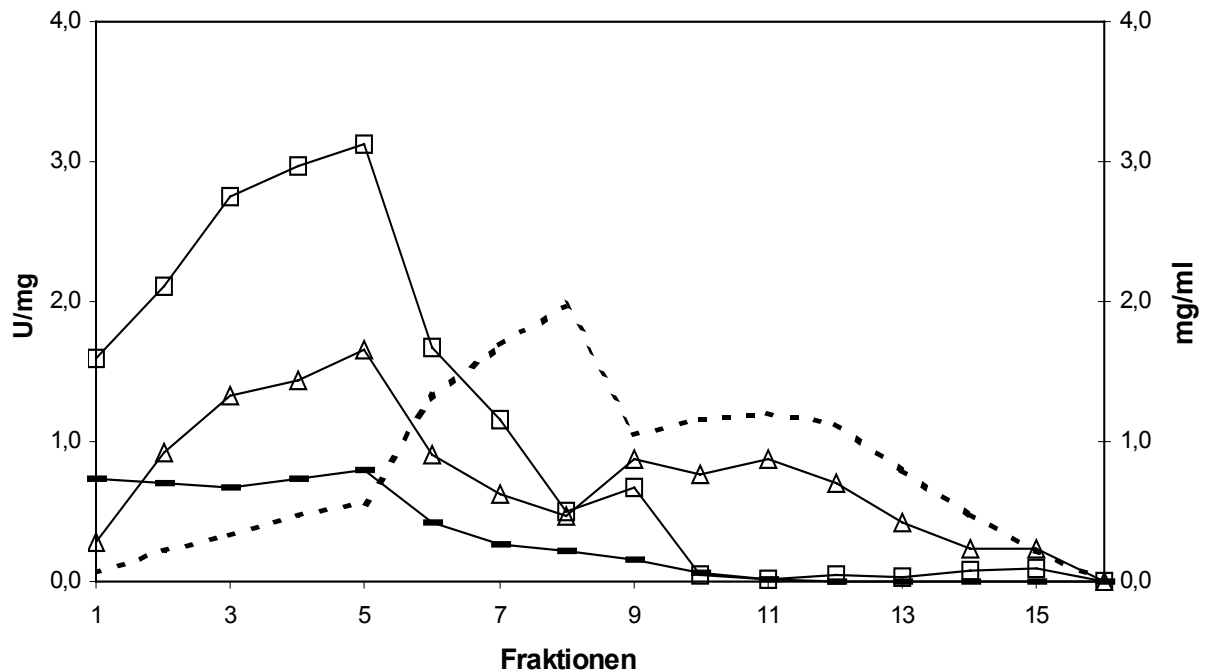


Abb. 3-14 Elutionsprofil der Gelfiltrationssäule; Messung der gekoppelten Aktivitäten mehrerer Atmungskettenkomplexe

- Δ - Δ - Δ *KIII+KIV* : Ubichinol Oxidase Aktivität (U/mg)
- \square - \square - \square *KI+KIII* : NADH Cytochrom c Reduktase Aktivität (U/mg)
- — — *KI+KIII+KIV* : NADH Oxidase Aktivität (U/mg)
- - - - Protein (mg/ml)

Der Vergleich der Aktivitätsprofile in Abb. 3-13 und Abb. 3-14 zeigt, dass der NADH-Oxidase-Superkomplex a vor allem in den ersten Fraktionen enthalten ist (Fraktion 1-7), gefolgt von Assoziationen der Komplexe III und IV.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte ist in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5 Reinigung des NADH Oxidase Superkomplex aus *Paracoccus denitrificans*

		Membranen	Überstand	Hydroxyl- apatit	Sepharose Frakt. 4-6
Protein	mg (%)	202 (100)	84 (42)	23 (11)	4 (2)
NADH:DBQ Oxidoreduktase					
	$\mu\text{mol min}^{-1}$ (%)	83 (100)	87 (106)	38 (47)	8.7 (10)
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	0.41	1.04	1.66	2.18
DBH:cyt. <i>c</i> Oxidoreduktase					
	$\mu\text{mol min}^{-1}$ (%)	101 (100)	76 (76)	64 (64)	16 (16)
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	0.50	0.91	2.80	3.99
	nmol Cytochrom <i>b</i> (%)	25.1 (100)	20.5 (82)	12.9 (51)	2.8 (11)
	$\mu\text{mol Cyt. } b/ \text{g}$	0.12	0.24	0.56	0.71
Cytochrom <i>c</i> Oxidase					
	$\mu\text{mol min}^{-1}$ (%)	349 (100)	272 (78)	176 (50)	30.5 (9)
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	1.73	3.24	7.63	7.62
	nmol Cytochrom <i>aa</i> ₃ (%)	34.8 (100)	27.8 (80)	20.9 (60)	3.14 (9)
	$\mu\text{mol Cyt. } aa_3/ \text{g}$	0.17	0.33	0.90	0.80
Succinat:DCIP Oxidoreduktase					
	$\mu\text{mol min}^{-1}$ (%)	30.7 (100)	31.1 (101)	8.7 (28)	0 (0)
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	0.15	0.37	0.38	0

3.1.4.4 Reinheitsgrad des isolierten Superkomplexes

Ein Vergleich der Wechselzahlen (Tabelle 3-6) der Komplexe I, III und IV im isolierten Superkomplex a und in solubilisierten Membranen sollte Aufschluss darüber geben, ob in Membranen alternative Enzyme mit Cytochrom *a*, *b* oder Flavin vorhanden sind bzw. ob die Wechselzahlen während der Präparation konstant geblieben sind.

Tabelle 3-6 Abschätzung der Wechselzahlen der Komplexe I, III und IV im isolierten Superkomplex a, im Vergleich zu solubilisierten Membranen

	Wechselzahlen		
	Komplex I	Komplex III	Komplex IV
	(1 / sec)	(1 / sec)	(1 / sec)
Membranen + Digitonin	74 ± 5	66 ± 0,6	168 ± 9
Isolierter Superkomplex a	188 ± 16 (n = 2)	95 ± 14 (n = 3)	160 ± 15 (n = 3)

Zur Ermittlung der Wechselzahlen wurden die Konzentrationen der Komplexe III und IV spektral ermittelt. Es wurde außerdem von der Annahme ausgegangen, dass die Absorption bei 560 nm ausschließlich dem Cytochrom *b* des Komplex III und die Absorption bei 605 nm ausschließlich dem Komplex IV zuzurechnen ist. Die Konzentration des Komplex I wurde durch fluorimetrische Bestimmungen von FMN (Flavin) ermittelt.

Die sehr ähnlichen Wechselzahlen für Komplex IV in Membranen und isoliertem Superkomplex deuten darauf hin, dass die Absorption bei 605 nm ausschließlich Komplex IV zuzuordnen ist, und dass die Wechselzahl in Membranen und isoliertem Superkomplex gleich ist. Die scheinbar geringere Wechselzahl für Komplex III weist darauf hin, dass in der Membran auch andere Cytochrom *b*-enthaltende Proteine neben Komplex III vorliegen. Die im Vergleich zur Membran stark erhöhte Wechselzahl des Komplex I zeigt an, dass das durch die Flavin Bestimmung extrahierbare FMN scheinbar auch in anderen Proteinen als Komplex I enthalten ist.

Tabelle 3-7 Verhältnis der HAR:dNADH Aktivität im Superkomplex a und in solubilisierten Membranen

	HAR : dNADH Aktivität	
	Membranen + Digitonin	Isolierter Superkomplex a
Mittelwert	3.9 ± 0.2 (n = 3)	4.6 ± 0.3 (n = 3)

Das Verhältnis der HAR- zu dNADH DBQ Oxidoreduktase Aktivität (Tabelle 3-7) wurde in Membranen im Vergleich zum isolierten NADH Oxidase Superkomplex a gemessen, um den Gehalt von Komplex I und die Qualität der Präparation abzuschätzen. Während der Präparation lag ein konstantes Verhältnis der HAR zur dNADH: DBQ Oxidoreduktaseaktivität vor. Daraus lässt sich schließen, dass es sowohl qualitativ in Bezug auf die spezifische Aktivität als auch quantitativ zu keinem erheblichen Verlust an Komplex I während der Präparation kam.

3.1.4.5 Stöchiometrie der zum Superkomplex assemblierten Komplexe

Das Verhältnis der Komplexe wurde mit Hilfe der fluorimetrischen Bestimmung von FMN (Flavin) als Marker für Komplex I und mittels Pyridin-Hämochrom-Spektren für Häm a, b, und c bestimmt. Sowohl zur FMN-Bestimmung als auch für die Pyridin-Hämochromogen-Spektren wurden 300-500 µg gereinigter Superkomplex *a* eingesetzt. Die Berechnung der Stöchiometrie basiert auf den Verhältnissen von 1 FMN / Komplex I, 2 Häm a / Komplex IV, 2 Häm b und 1 c-Typ Häm (Cytochrom *c*₁) / Komplex III (Gabellini, N., *et al.* 1982). Die Cytochrom *c*₅₅₂ Konzentration wurde aus dem Häm c Gehalt bestimmt (Cytochrom *c*₁ plus *c*₅₅₂), da die Cytochrom *c*₁ Konzentration aus der Konzentration des äquimolaren Cytochrom *b* bzw. der halben Häm b Konzentration bestimmt werden konnte. Daraus resultierend konnte eine Stöchiometrie der Komplexe I, III und IV im Superkomplex von 1:4:4 bestimmt werden (siehe Tabelle 3-8).

In diesem Superkomplex wurden 1,6 ± 0,8 Moleküle Cytochrom *c*₅₅₂ pro 4 Kopien Komplex IV bestimmt. Wenn man von einer 1:1 Stöchiometrie ausgeht, bedeutet dies, dass 40-80 % des gesamten Cytochrom *c*₅₅₂ während der Isolierung verloren gegangen sind.

Die 1:4:4 Stöchiometrie der Komplexe bzw. die Kurzbeschreibung des Superkomplex a als I₁III₄IV₄-Komplex sagt noch nichts darüber aus, ob die individuellen Komponenten als Einzelkomplexe, Dimere oder Tetramere vorliegen. Da Komplex III als stabiler Tetramer isolierbar ist und auch eine dimere Form, wenn auch in geringerer Menge, detektierbar ist

(siehe Abb. 3-1 B), bildet der Komplex III wahrscheinlich den tetrameren Kern des Superkomplexes der vermutlich durch stabile Assoziation zweier Dimere entstanden ist. Komplex IV dissoziierte nie als Einzelkomplex vom NADH-Oxidase-Superkomplex, sondern es wurde immer die Dissoziation von zwei Komplex IV-Kopien gleichzeitig beobachtet (siehe Abb. 3-1). Deshalb ist davon auszugehen, dass der Komplex IV als Dimer an den KIII-Kern gebunden ist, also in Form eines $I_1(III_4)(IV_2)_2$ -Komplexes.

Tabelle 3-8 Stöchiometrie der Komplexe im Superkomplex a

(nmol/mg)	FMN	Häm <i>a</i>	Häm <i>b</i>	Häm <i>c</i>	
Probe 1	0,16	1,18	1,20	0,90	
Probe 2	0,20	1,42	1,62	0,89	
Probe 3	0,13	1,04	1,00	0,90	
Mittelwert	0,16 ± 0,03	1,21 ± 0,16	1,27 ± 0,26	0,9 ± 0,01	
	Komplex I	Komplex IV	Komplex III	Cyt. <i>c</i> ₁	Cyt. <i>c</i> ₅₅₂
Mittelwert	0,16 ± 0,03	0,61 ± 0,08	0,64 ± 0,13	0,64 ± 0,13	0,26 ± 0,13
Stöchiometrie	1,00	3,8 ± 0,5	4,0 ± 0,8	4,0 ± 0,8	1,6 ± 0,8

3.1.4.6 Phospholipid- und Ubichinongehalt in Membranen und NADH-Oxidase-Superkomplex

Der Phospholipidgehalt des isolierten Komplexes wurde nach der unter 2.2.17 angegebenen Methode bestimmt. In den Membranen ließ sich eine Phospholipidkonzentration von 980 ± 80 nmol PL / mg Protein bestimmen. Im Superkomplex a Eluat nach der Gelfiltrationssäule lag der Lipidgehalt bei 290 ± 10 nmol PL / mg Protein, wohingegen der Ubichinon-Gehalt von $2,7 \pm 0,3$ nmol / mg in Membranen auf $6,7 \pm 0,8$ nmol / mg in isolierter NADH-Oxidase anstieg.

3.1.5 Die Assemblierung zu einem NADH Oxidase Superkomplex stabilisiert Komplex I

Um die Ursache der Komplex I Stabilität im NADH Oxidase Komplex zu untersuchen, sollten die Aktivitäten von Digitonin-solubilisierten Membranen und die Stabilität von Komplex I im Wildtyp und Mutantenstämmen (s. 2.1.7, Tabelle 2-1) während der Chromatographie und im BN-PAGE verglichen werden. Bisher war es nicht klar, ob die Stabilität im isolierten Superkomplex von besonderen Detergenz-Eigenschaften des milden

Detergenz Digitonin herrührte, oder von einer zusätzlich stabilisierenden Rolle des Superkomplexes.

3.1.5.1 Vergleich der katalytischen Aktivitäten von *Paracoccus denitrificans* Wildtyp und Mutanten in Digitonin-gelösten Membranen

Um die einzelnen Atmungskettenkomplexe zu quantifizieren, wurden die spezifischen katalytischen Aktivitäten der Atmungskettenenzyme (Komplex I: NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität; Komplex III: DBH:Cytochrom *c* Oxidoreduktase Aktivität; Komplex IV: Cytochrom *c* Oxidase Aktivität) im Wildtyp, im Δc_{552} , Δ Komplex I-, Δ Komplex III- und Δ Komplex IV-Mutanten-Stamm gemessen (s. Abb. 3-15).

Die spezifische Komplex III Aktivität wurde durch einen Verlust von Cytochrom *c*₅₅₂, Komplex I oder Komplex IV im korrespondierenden Mutanten-Stamm nicht nachteilig beeinflusst. Dennoch führte ein Verlust von Komplex III im Komplex III Mutanten-Stamm zu einer deutlichen Reduktion der Komplex I und IV Aktivitäten. Dies deutet auf geringere Gehalte des Komplex I und Komplex IV oder geringere Stabilität der Komplexe nach Solubilisierung mit Digitonin hin.

Eine Reduktion von Komplex I und IV konnte ebenfalls im *c*₅₅₂ Mutanten Stamm beobachtet werden. Außerdem war eine Reduktion von Komplex IV in allen untersuchten Mutanten-Stämmen zu beobachten.

Die Komplex I Aktivität war in allen Mutanten-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp wesentlich geringer, aber in allen Fällen für 60 Minuten nach der Solubilisierung unter Verwendung niedriger Digitonin-/ Protein-Verhältnisse stabil. Dies weist auf einen geringeren Komplex I-Gehalt in den Mutanten Stämmen hin, denen Komplex III oder IV fehlte, was aus den folgenden Analysen hervorgeht.

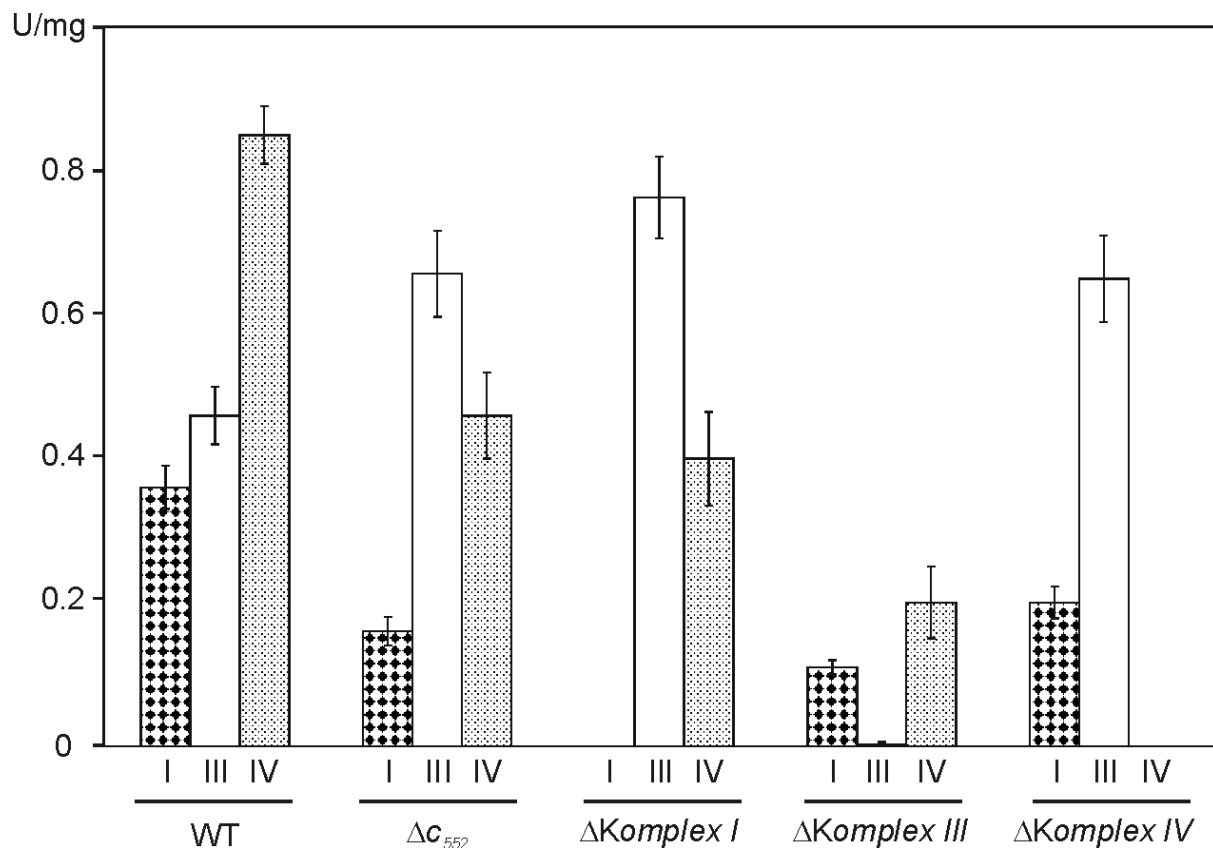


Abb. 3-15 Spezifische Aktivitäten Digitonin-solubilisierter Membranen von *P. denitrificans*

Die Membranen wurden mit 3g Digitonin / g Protein ausgelöst.

Wildtyp und Mutantenstämme mit deletiertem Cytochrom c_{552} : Δc_{552} , Δ Komplex I, Δ Komplex III und Δ Komplex IV, WT, Parentalstamm

I NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I;

III DBH: Cytochrom c Oxidoreduktase Aktivität des Komplex III;

IV Cytochrom c Oxidase Aktivität des Komplex IV

Alle Versuche, Komplex I-enthaltende Superkomplexe mit Hilfe des Reinigungsprotokolls für den Wildtypstamm aus Mutantenstämmen zu isolieren, denen Komplex III oder IV fehlte, führten zum vollständigen Verlust der NADH:DBQ Oxidoreduktase-Aktivität. Sogar die direkte Gelfiltration unter Einsatz von Digitonin, wobei auf den Hydroxylapatit Schritt verzichtet wurde, der niedrige Triton X-100 Konzentrationen zur Protein-Elution erfordert, war nicht erfolgreich.

3.1.5.2 Identifizierung von Atmungskettenkomplexen und Untereinheiten in *Paracoccus denitrificans* Wildtyp und Mutantenstämmen

Der Parental- und die Mutantenstämmen wurden mit 3 g Digitonin / g Protein solubilisiert, die Komplexe durch BN-PAGE aufgetrennt, gefolgt von einer 2D SDS-PAGE und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran. Zur Immunodetektion wurde eine Mischung von Antikörpern gegen Untereinheiten der Komplexe I, III, and IV verwendet.

In Abb. 3-16 A konnten mit Hilfe der Antikörper die Superkomplexe *a*, *b*, *c* und geringe Mengen Komplex III und IV, aber kein individueller Komplex I im Wildtyp identifiziert werden. Nur die dissoziierten Komplex I Untereinheiten NQO 3 und 1 waren an der Front des Gels zu beobachten.

Die Analyse der Cytochrom *c*₅₅₂-Mutante (Abb. 3-16 B) zeigt die Superkomplexe *a*, *b* und *c*. Dies beweist, dass dieser Elektronen-Carrier nicht essentiell zur Bildung der Superkomplexe *a*, *b* und *c* ist. Jedoch sind in diesem Stamm die Mengen an Superkomplex reduziert und die Mengen der dissoziierten Untereinheiten von Komplex I erhöht.

Im verwendeten Komplex III Deletionsstamm (Abb. 3-16 C) konnte nur individueller Komplex IV, aber kein assemblierter Komplex I gefunden werden.

Die Detektion der Komplex IV Deletionsmutante (Abb. 3-16 D) ergab ein ähnliches Ergebnis. Kein Superkomplex *a* war zu beobachten, aber stabiler tetramerer Komplex III und Komplex I Untereinheiten an der Front.

In der Immunodetektion der Komplex I Deletionsmutante (Abb. 3-16 E) konnte kein assemblierter Superkomplex *a*, aber Komplex *c* und *d* detektiert werden. Außerdem war assemblierter Komplex III und IV zu identifizieren. Nicht deletierte Untereinheiten des Komplex I waren an der Front des Gels zu beobachten. Jedoch war kein intakter Komplex I zu erkennen.

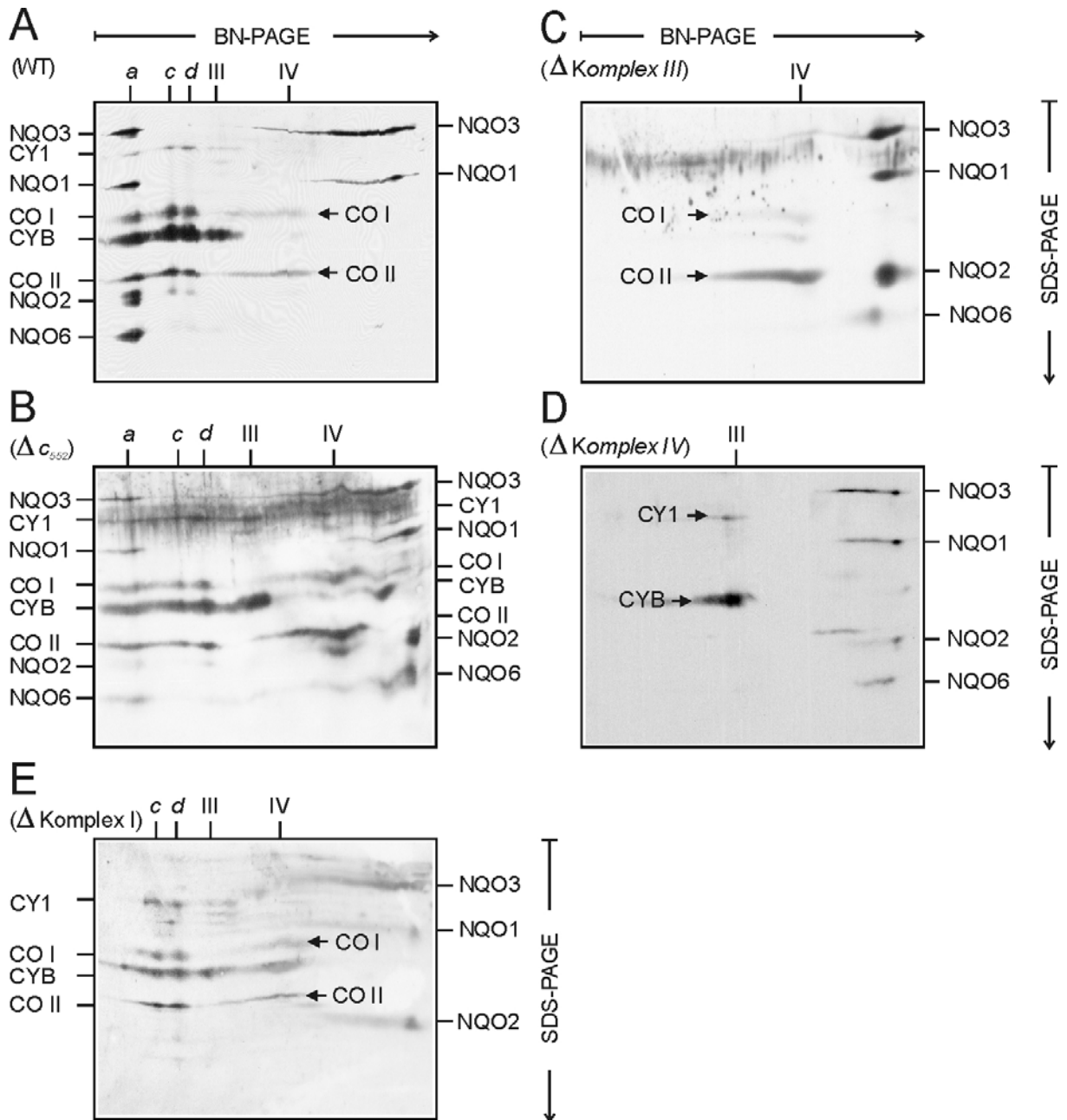


Abb. 3-16 Immunodetektion von Atmungskettenkomplexen-Untereinheiten im *Paracoccus denitrificans* Wildtyp und Mutantenstämmen

(A) *P. denitrificans* Parentalstamm Pd1222 (WT)

(B) AT110 Stamm mit einer insertionalen Inaktivierung des *cycM* Genes, das Cytochrom c_{552} kodiert (Δc_{552})

(C) MK6 Stamm, in dem das *fbc* Operon das Komplex III kodiert deletiert ist (Δ Komplex III)

(D) MR31 Stamm, in dem beide Genkopien der Untereinheit I des Komplex IV inaktiviert sind (Δ Komplex IV).

(E) Pd92-223 Stamm, in dem die Untereinheiten NQO8 und NQO9 deletiert und die alternative NDH2 aus *E. coli* ergänzt wurde (Δ Komplex I).

4 Diskussion

4.1 Identifizierung von Superkomplexen aus *Paracoccus denitrificans*

Verschiedene Superkomplexe konnten aus *Paracoccus denitrificans* durch eine chromatographische Reinigung, wie in 3.1.3 beschrieben, präpariert werden. Die Reinigung bestand aus drei Schritten:

- Solubilisierung / Zentrifugation
- Hydroxylapatit Chromatographie
- Gel Filtration

Das Elutionsprofil der Einzelaktivitäten (s. Abb. 3-11) und gekoppelten Aktivitäten (s. Abb. 3-12) der Hydroxylapatit-Säule und die dazu korrespondierende BN-Gelelektrophorese (s. Abb. 3-7) zeigten, dass mehr als 70 % des applizierten Proteins inklusive der ATP Synthase (Komplex V) die Säule ungebunden passierten. Alle Atmungskettenkomplexe wurden annähernd quantitativ gebunden und eluierten gemeinsam.

Das Elutionsprofil der enzymatischen Aktivitäten (s. Abb. 3-13 / Abb. 3-14) der nachfolgenden Gelfiltration und das korrespondierende BN-PAGE (s. Abb. 3-8) wiesen darauf hin, dass der NADH Oxidase Superkomplex a, assoziiert aus monomerem Komplex I, vier Komplex III und vier Komplex IV zuerst eluierte, gefolgt von den kleineren Superkomplexen b und c, bestehend aus tetramerem Komplex III und vier bzw. zwei Kopien von Komplex IV. Da Formen mit einer oder drei Kopien von Komplex IV nicht gefunden wurden, lässt sich daraus schließen, dass dimerer Komplex IV am Superkomplex gebunden ist, obwohl Komplex IV in seiner strukturellen und funktionellen Einheit nur aus einem Monomer besteht (Iwata *et al.*, 1995).

Resultierend aus den apparenten Massen in der BN-Gelelektrophorese der Bande d und e ergibt sich, dass Bande d aus voll assembliertem Komplex III und Bande e aus einem Subkomplex von Komplex III besteht, dem das Rieske Eisen-Schwefel Protein und das Cytochrom c_{552} fehlt. Ebenfalls lässt sich aus den apparenten Massen ableiten, dass Komplex III im Superkomplex als Tetramer vorliegt, obwohl ein Dimer die kleinste strukturelle Einheit des Komplexes III bildet (Mayer *et al.* 2002, Xia *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 1998; Hunte *et al.*, 2000).

Im Anschluss an die Superkomplexe eluierten die einzelnen Komplexe V, II und IV. Tabelle 3-5 fasst die Reinigung dieses NADH Oxidase Superkomplexes zusammen. Komplex II ist damit eindeutig nicht mit der NADH Oxidase assoziiert.

Trotz schonender Bedingungen zur Reinigung der Superkomplexe mit dem milden Detergenz Digitonin, wurde Coomassie bei der BN-Gelelektrophorese eingesetzt, was in Mischung mit dem vorhandenen neutralen Detergenz als mildes anionisches Detergenz angesehen werden kann. Die Anwesenheit von Coomassie kann physiologische Superkomplexe und Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe dissoziieren. Daher scheint eine Dissoziation von physiologischen Assemblierungen von Superkomplexen in der BN-Gelelektrophorese wahrscheinlicher als die Bildung artifizieller Superkomplexe.

Der NADH Oxidase Superkomplex α könnte zusätzlich zu den Komponenten der Komplexe I, III und IV (M_r 1,55 MDa) Protein-Untereinheiten beinhalten, die bisher noch nicht identifiziert wurden. Da die apparente Masse des Holo-Komplexes in der BN-Gelelektrophorese bei ca. 1,9 MDa lag, würde die Masse dieser nicht identifizierten Komponenten bei ca. 350 kDa liegen.

Die Cytochrom *b* und aa_3 Gehalte der NADH Oxidase Superkomplex α Präparation lagen bei jeweils 0,71 und 0,8 $\mu\text{mol} / \text{g}$. Dies ist deutlich unter dem theoretisch zu erwartenden Wert von 2,6 $\mu\text{mol} / \text{g}$, bezogen auf die berechnete Masse von 1,55 MDa und 2,1 $\mu\text{mol} / \text{g}$, bezogen auf die apparente Masse in der BN-Gelelektrophorese von 1,9 MDa, wenn man von einer Stöchiometrie von 4 mol / mol Superkomplex für beide Cytochrome ausgeht. Diese beträchtliche Abweichung kann nur teilweise durch Protein-Verunreinigungen erklärt werden, da die Untereinheiten-Zusammensetzung der chromatographisch oder durch BN-Gelelektrophorese isolierten NADH Oxidase sehr ähnlich war, abgesehen von ein paar zusätzlichen Banden, im Gel der chromatographischen Präparation (s. Abb. 3-10). Dennoch scheint es wahrscheinlicher, dass die Protein-Elutionsprofile aus Abb. 3-13 und Abb. 3-14 eine Nicht-Protein-Kontamination widerspiegeln, die in den Fraktionen 5 - 9 mit der Lowry Bestimmungsmethode interferiert. Digitonin und Lipid können als Nicht-Protein-Kontaminante ausgeschlossen werden, da keine Störung des Lowry durch Digitonin und extrahierte Lipide festgestellt werden konnte. Jedoch stört bereits weniger als 1 % Digitonin die Proteinbestimmung nach den Biuret- und Bradford-Methoden, und mehr als 1 % Digitonin ebenfalls die BCA-Bestimmung.

Superkomplexe wurden bisher meist über BN-PAGE identifiziert und isoliert. Viele Funktionen von Superkomplexen wurden bereits vorgeschlagen. Dennoch wurde die Existenz von Superkomplexen immer wieder in Frage gestellt. In dieser Arbeit konnten supramolekulare Strukturen bestehend aus den Atmungskettenenzymen Komplex I, III und IV durch chromatographische Reinigungen nachgewiesen werden. Somit konnte ein weiterer Hinweis für die Existenz von Superkomplexen erbracht werden. Da in dieser Arbeit Detergenz / Protein Verhältnisse gewählt wurden, die eine ausreichende Auflösung der Lipidbereiche zwischen den mitochondrialen Atmungskettenenzymen hervorrufen, was man aus der Solubilisierung der Komplexe V und II erkennen kann, lässt sich daraus schließen, dass Superkomplexe stabile Verbindungen zwischen den einzelnen Atmungskettenenzymen I, III und IV ausbilden.

4.2 Detergenz-Sensitivität der Komplexe I, II, III und IV

In vergleichbaren Experimenten mit Triton X-100 und Dodecylmaltosid konnten ähnliche Superkomplexe beobachtet werden (s. Abb. 3-2). Im Falle von Triton X-100 konnte neben den Banden a-c eine zusätzliche Bande f aus dimerem Komplex III und dimerem Komplex IV beobachtet werden. Dies deutet an, dass Triton X-100 einen Zerfall größerer Superkomplexe hervorrufen kann. Unter Solubilisierungsbedingungen mit Dodecylmaltosid konnte neben den Banden a-c und e eine Bande a' identifiziert werden. Sie resultierte aus dissoziiertem Superkomplex a, dem die Untereinheiten NQO 1-3 und zwei Kopien des Komplex IV fehlten. Stabiler Superkomplex konnte nur unter Solubilisierungsbedingungen mit Digitonin zur weiteren Analyse verwendet werden.

Dieses Ergebnis lässt sich ebenfalls aus den Resultaten der Einzelaktivitätsmessungen ableiten, wobei im Vergleich der Detergenzien Triton X-100, Dodecylmaltosid und Digitonin (s. Abb. 3-5) mit Digitonin die höchsten und stabilsten Enzymaktivitäten messbar waren, die bis zu eine Stunde konstant blieben.

Versuche, den NADH-Oxidase Superkomplex unter Verwendung von Triton X-100 und Dodecylmaltosid chromatographisch zu isolieren schlugen fehl. Als Ursache hierfür lässt sich die Instabilität der Einzelkomplexe gegenüber den verwendeten Detergenzien anführen, die sich durch 2D-Gele nachweisen ließ.

4.3 Enzymatische Charakterisierung des NADH Oxidase Superkomplexes

Die Wechselzahl der Cytochrom *c* Oxidase war $160 \pm 15 \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$) in isolierter NADH Oxidase im Vergleich zu $168 \pm 15 \text{ s}^{-1}$ in mit Digitonin solubilisierten Membranen, wenn man annimmt, dass es sich bei der spektralen Absorption bei 603 nm nur um Cytochrom *aa*₃ handelt. Diese übereinstimmenden Daten scheinen anzuzeigen, dass alternative Enzyme wie die *ba*₃ Chinol Oxidase und die *cbb*₃ Oxidase nicht in wesentlichem Maße in den verwendeten, aerob angezogenen Zellen anwesend waren. Die Wechselzahl der DBH: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III) betrug $95 \pm 14 \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$) im isolierten NADH Oxidase Komplex. Die spektralen Absorptionen von Komplex III bei 560 nm in Membranen können durch mehrere andere b-Typ Cytochrome, z.B. das der Succinat Dehydrogenase (Pennoyer *et al.*, 1998), überlagert sein. Deshalb konnte die Komplex III Aktivität in Membranen nicht zuverlässig quantifiziert werden.

NADH:DBQ Oxidoreduktase (Komplex I) Wechselzahlen in Digitonin-solubilisierten Membranen konnten basierend auf der extrahierbaren Menge an FMN in Membranen ($0.096 \mu\text{mol Flavin / g}$, $n = 6$) nicht kalkuliert werden, weil das extrahierbare Flavin offenbar auch von anderen Proteinen außer Komplex I herkommt und die berechnete Zahl bei ca. $74 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu $188 \pm 16 \text{ s}^{-1}$ für die isolierte NADH Oxidase Komplex lag. Dennoch war es möglich, durch den Vergleich der deamino-NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität mit der deamino-NADH:HAR Oxidoreduktase Aktivität, einer stabilen Aktivität des hydrophilen Teils des Komplex I, die sich nicht durch eine potentielle Dissoziation des hydrophoben Teils verändert, zu prüfen, ob sich die Komplex I Wechselzahl während der NADH Oxidase Isolierung verändert oder nicht (Zickermann *et al.*, 1998). Deamino-NADH wurde anstelle von NADH verwendet, um potentielle alternative Dehydrogenasen auszuschließen, obwohl alternative Dehydrogenasen für *P. denitrificans* nicht zu existieren scheinen (Finel, 1996). Das Verhältnis der deamino-NADH:HAR / deamino:NADH:DBQ Aktivität in Membranen betrug $3,9 \pm 0,2$ und in isoliertem NADH Oxidase Superkomplex $4,6 \pm 0,3$, woraus man schließen kann, dass es während der Präparation zu keinen erheblichen Veränderungen, sowohl qualitativ in Bezug auf die spezifische Aktivität als auch quantitativ in Bezug auf Verluste an Komplex I, kam.

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) Aktivität des isolierten NADH Oxidase Superkomplex betrug $2,24 \pm 0,08 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Dies ist die maximale theoretisch erreichbare Aktivität für gekoppelte Aktivitäten der Komplexe I, III und IV, da die Einzelaktivitäten von Komplex III und Komplex IV durch den vierfachen Überschuss im Vergleich zu Komplex I signifikant höher wären. Die NADH: Cytochrom *c* Oxidoreduktase Aktivität (Komplex I + III) derselben Protein Probe des Superkomplex a ($1,51 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) zeigte ein Optimum an Elektronen-Transfer von Komplex I zu Komplex III an; dies steht in Übereinstimmung mit einem hohen endogenen Phospholipid und Chinon Gehalt, der zum Elektronentransfer nötig ist. Basierend auf der Lowry Protein Bestimmungsmethode nimmt der Phospholipidgehalt von $980 \pm 80 \text{ nmol / mg}$ in Membranen zu $290 \pm 10 \text{ nmol / mg}$ in isolierter NADH Oxidase ab, wohingegen der Ubichinon Gehalt von $2,7 \pm 0,3 \text{ nmol / mg}$ in Membranen auf $6,7 \pm 0,8 \text{ nmol / mg}$ in isolierter NADH Oxidase ansteigt. Bei diesem achtfachen Anstieg von Chinon / Phospholipid scheint es sich um eine spezifische Anreicherung von Ubichinon im NADH Oxidase Superkomplex zu handeln. Ein Ubichinon / Superkomplex Verhältnis von 10 mol / mol konnte basierend auf der Lowry Bestimmungsmethode berechnet werden.

Dennoch war die spezifische NADH Oxidase Aktivität (Komplex I + III + IV) um 74 % auf $0,53 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ reduziert. Ebenfalls war die DBH: Oxidase Aktivität (Komplex III + IV) um 70 % reduziert auf $1,19 \pm 0,01 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, im Vergleich zu $4,07 \pm 0,12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ im Falle der DBH: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III). Dies weist darauf hin, dass der Transfer der Elektronen zwischen den Komplexen III und IV durch den vermutlichen partiellen Verlust von Cytochrom *c*₅₅₂ behindert wird.

4.4 Die Assemblierung zu einem NADH Oxidase Superkomplex stabilisiert Komplex I

Digitonin ist eines der mildesten bekannten Detergenzien. Dennoch war es nicht klar, ob die Integrität des Komplexes I im isolierten Superkomplex von den besonderen Detergenzeigenschaften herrührte oder von einer zusätzlich stabilisierenden Rolle der Superkomplexbildung. Um diese Frage zu untersuchen, sollten die enzymatischen Aktivitäten von Atmungskettenenzymen in Digitonin-solubilisierten Membranen und die Stabilität von Komplex I im Wildtyp und Mutantenstämmen während der Chromatographie und in der BN-Gelelektrophorese verglichen werden.

Die Komplex III Aktivität wurde durch einen Verlust von Cytochrom c_{552} , Komplex I oder Komplex IV im korrespondierenden Mutanten-Stamm nicht nachteilig beeinflusst (s. Abb. 3-15). Dennoch führte eine Deletion von Komplex III im Komplex III Mutanten-Stamm zu einer beachtlichen Reduktion der Komplex I und IV Aktivitäten, woraus sich schließen lässt, dass Komplex III für die Assemblierung und die Stabilisierung der beiden Komplexe von Bedeutung ist. Eine moderate Reduktion der Komplexe I und IV konnte ebenfalls in dem Cytochrom c_{552} Insertionsstamm, dem Cytochrom c_{552} fehlt, beobachtet werden. Dies deutet auf geringere Komplex I und IV Gehalte hin, oder dass Cytochrom c_{552} eine Assemblierung bzw. Stabilisierung der beiden Komplexe begünstigt.

Die Komplex I Aktivität war in allen Deletions und Insertionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp wesentlich geringer (s. Abb. 3-15), was ein Hinweis auf eine Behinderung der Assemblierung und Stabilisierung des Komplexes I in diesen Membranen sein kann. Obwohl die Komplex I Aktivitäten für 60 Minuten nach der Solubilisierung unter Verwendung niedriger Digitonin / Protein Verhältnisse stabil waren, reduzierte sich die Stabilität des Komplexes I scheinbar in den Mutanten-Stämmen, denen die Komplexe III oder IV fehlten, was aus den unter in Abb. 3-15 durchgeführten Analysen hervorgeht.

Versuche, Komplex I mit Hilfe des selben Reinigungsprotokolls wie im Wildtypstamm aus Mutantenstämmen zu isolieren, denen die Komplexe III oder IV fehlten, führte zum vollständigen Verlust der NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität. Sogar das Auslassen des Hydroxylapatit-Schritts, der die Verwendung von niedrigen Konzentrationen Triton X-100 zur Protein Elution erfordert, und direkte Gelfiltration unter Einsatz von Digitonin war nicht erfolgreich. Dieser Befund zeigt, dass Komplex I in diesen Mutanten-Stämmen bei niedrigen Digitonin / Lipid Verhältnissen, die bei der Solubilisierung vorlagen, stabil ist, sich aber unter den Bedingungen, die bei der Chromatographie vorherrschen, verringert. Da die Anwesenheit

von nur einem der beiden Komplexe III und IV in den korrespondierenden Mutantenstämmen Komplex I nicht vor einer Inaktivierung während der Chromatographie schützen konnte, lässt sich daraus schließen, dass Komplex I einen vollständig assemblierten NADH Oxidase Komplex für ein Optimum an Stabilität benötigt.

Erniedrigte Stabilität des Komplexes I machte sich ebenfalls in den Mutantenstämmen unter den Bedingungen der BN-Gelelektrophorese durch eine komplette Dissoziation des Komplexes I bemerkbar. Eine anschließende 2D SDS-Gelelektrophorese und Immunodetektion (s. Abb. 3-16) mit einer Mischung spezifischer Antikörper wurde dazu benutzt, um die assemblierten Komplexe und die dissoziierten Untereinheiten zu lokalisieren und zuzuordnen.

Unter Verwendung des Parentalstamms Pd1222 (s. Abb. 3-16 A) konnte man mit Hilfe der Antikörper die Superkomplexe a, b und c sowie die individuellen Komplexe III und IV, jedoch keinen individuellen Komplex I identifizieren. Die dissoziierten Komplex I Untereinheiten NQO3 und NQO1 konnten an der Lauffront der BN-Gelelektrophorese gefunden werden. Im Augenblick kann man jedoch nicht zwischen zwei möglichen Erklärungsansätzen unterscheiden: Die dissoziierten Untereinheiten können durch einzeln vorliegenden Komplex I zustande kommen, wenn größere Teile von Komplex I mit Superkomplex b und c im Gleichgewicht standen. Andererseits dürfte annähernd die Gesamtmenge an Komplex I anfänglich im NADH Oxidase Komplex assembliert sein, wovon sich ein Teil während der BN-Gelelektrophorese abgelöst haben kann.

Bei der Untersuchung des Komplex III Deletionsstamms (s. Abb. 3-16 C) konnte zwar individueller Komplex IV, aber kein assemblierter Komplex I gefunden werden. Das scheint darauf hinzuweisen, dass der gesamte Komplex I, der nach der Solubilisierung mit Digitonin in einer aktiven Form vorliegt, unter den Bedingungen der BN-Gelelektrophorese dissoziiert.

Die Analyse des Komplex IV Deletionsstammes (s. Abb. 3-16 D) führte zu einem ähnlichen Ergebnis, mit dem Unterschied, dass nur stabiler tetramerer Komplex III identifiziert werden konnte. Die Untereinheiten des Komplexes I NQO1-3 und NQO6 konnten an der Lauffront beobachtet werden.

In der Komplex I Deletionsmutante (s. Abb. 3-16 E) konnte man mit Hilfe der Antikörper die Superkomplexe b und c sowie individuellen Komplex III und IV. Die nicht deletierten Untereinheiten des Komplexes I NQO1-3 konnten an der Lauffront der BN-Gelelektrophorese gefunden werden.

Die Proteine, die in die Interaktion zwischen den Komplexen III und IV involviert sind, sind nicht bekannt. Fest gebundenes Cytochrom c_{552} , das einen Membrananker (Turba *et al.*, 1995) besitzt, wurde anfänglich als Kandidat für ein Linker Protein eingestuft, da es sich vorzugsweise an Komplex IV bindet. Eine kleine Menge davon konnte auch assoziiert an Komplex III nachgewiesen werden. Die Analyse des Stamms, der ein inaktiviertes *cycM* Gen besitzt, das Cytochrom c_{552} codiert (s. Abb. 3-16 B), beweist, dass dieser Elektronen-Carrier nicht essentiell zur Bildung der Superkomplexe a, b und c ist. Allerdings sind in diesem Stamm die Mengen an Superkomplex reduziert und die Mengen an dissoziierten Untereinheiten von Komplex I erhöht, was darauf hinweist, dass Cytochrome c_{552} die Superkomplex-Bildung fördert und indirekt zur Stabilisierung des Komplex I beiträgt.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass der detergentlabile Komplex I aus *Paracoccus denitrificans* durch die Bildung eines Superkomplexes geschützt wird. Die Deletion der Komplexe III und IV verursacht eine Abnahme des Komplex I Gehalts in Membranen, was darauf hindeutet, dass die Stabilität und Assemblierung des Komplexes I, der nicht in einem kompletten NADH Oxidase Superkomplex, vorliegt auch in den Membranen verändert wird. Allerdings ist für detergentstabile NADH-Dehydrogenasen, wie die des *E. coli* Komplex I, keine Superkomplex-Bildung vonnöten. Tatsächlich besitzt *E. coli* keinen Komplex III. Ähnlich ist es bei Komplex I aus der Hefe *Yarrowia lipolytica* und dem hyperthermophilen Eubakterium *Aquifex aeolicus*, beide sind stabil (Kashani-Poor *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2003), und es konnten keine Atmungsketten-Superkomplexe detektiert werden. Die strukturelle Stabilisierung von labilen Membran-Protein-Komplexen scheint eine Hauptfunktion der Superkomplexbildung zu sein, zusätzlich zum „Substrat channelling“ (Schägger *et al.*, 2000; Schägger, 2001, Genova *et al.*, 2003), was für die Interaktion des Komplex III und IV in *Paracoccus denitrificans* mit Cytochrome c_{552} vorgeschlagen (Berry und Trumpower, 1985; Turba *et al.*, 1995) wurde, aber es scheint auch eine Rolle für die Interaktion von Komplex I und III über Ubichinon zu spielen, wie bereits für das Rinder-Respirasom berichtet wurde (Genova *et al.*, 2003).

5 Zusammenfassung

5.1 Isolierung von Atmungsketten-Superkomplexen aus *Paracoccus denitrificans*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Reinigungsprotokoll zur Präparation der Atmungskettenkomplexe I, III und IV des Gram-negativen, fakultativ anaeroben Bodenbakteriums *Paracoccus denitrificans* in Form eines NADH Oxidase Komplexes erstellt. Bisher konnten stabile Superkomplexe bakterieller Atmungskettenkomplexe nur in Gestalt einer Chinol Oxidase, bestehend aus den Komplexen III (Ubichinol: Cytochrom *c* Oxidoreduktase) und IV (Cytochrom *c* Oxidase), isoliert werden (Berry, *et al.*, 1985). Jedoch enthielten diese Assemblierungen keinen Komplex I (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase). Dies ist die erste chromatographische Isolierung eines kompletten „Respirasoms“ aus *Paracoccus denitrificans*.

Unter der Verwendung des milden Detergenz Digitonin zur Solubilisierung von *Paracoccus denitrificans* Membranen gefolgt von zwei chromatographischen Reinigungsschritten, der Hydroxylapatit-Chromatographie und der Gelfiltration, konnte eine NADH Oxidase, bestehend aus den Komplexen I, III und IV in einer 1:4:4 Stöchiometrie isoliert werden. Neben der Isolierung der NADH Oxidase konnten weitere kleine Superkomplexe identifiziert werden, die aus vier Komplex III und vier Komplex IV (III₄IV₄) sowie vier Komplex III und zwei Komplex IV (III₄IV₂) assoziiert waren.

5.2 Charakterisierung der Superkomplexe aus *Paracoccus denitrificans*

Die isolierten Atmungskettenkomplexe wurden zur Charakterisierung bezüglich ihrer Funktion, enzymatischen Aktivität, Stöchiometrie und Untereinheiten-Zusammensetzung aus *Paracoccus denitrificans* Wildtyp-Membranen analysiert. Proben aller Präparationsstufen wurden parallel zur BN-Gelelektrophorese und für enzymatische Einzel- und kombinierte Aktivitäten der Komplexe I-IV eingesetzt. Mittels BN-Gelelektrophorese konnten die apparenten Massen der Komplexe bestimmt werden. Im folgenden denaturierenden SDS-Gel wurde die Untereinheiten-Zusammensetzung der Superkomplexe durch Immunodetektion mit Antikörpern gegen die Komplexe I, III, IV und Cytochrom *c*₅₅₂ analysiert. Abschließend konnte nach der Gelfiltration festgestellt werden, dass Komplex II eindeutig nicht Teil des Superkomplexes (I₁III₄IV₄) war. Die Stöchiometrie des Superkomplexes a wurde mit Hilfe der fluorimetrischen Bestimmung von FMN (Flavin) als Marker für Komplex I und mittels

Pyridin Hämochromogen Spektren für Häm a, b und c bestimmt. Da Komplex III physiologisch als Dimer vorliegt (Mayer *et al.* 2002), müsste die Stöchiometrie der funktionellen Einheit des Superkomplex a folgendermaßen lauten: I₁ (III₂)₂ IV₄.

In diesem Fall diente der Vergleich der Wechselzahl einzelner Präparationsstufen als Maß der Verunreinigung der ergab, dass Fremdkomplexe mit Flavin und Cytochrom *b* im Ausgangsmaterial der Präparation vorhanden waren. Nur die Wechselzahl des Komplexes IV blieb während der Präparation konstant. Um den Gehalt an Komplex I und die Qualität der Präparation abzuschätzen, wurde das Verhältnis der HAR zu dNADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität in Membranen und isoliertem Superkomplex a bestimmt. Es war während der Präparation konstant.

Die Bestimmung des Phospholipidgehalts aus isoliertem Superkomplex a im Vergleich zu *P. denitrificans* Membranen ergab eine Abnahme von 980 ± 80 nmol PL / mg Protein in Membranen auf 290 ± 10 nmol / mg Protein in isoliertem Superkomplex a, wohingegen der Ubichinongehalt von $2,7 \pm 0,3$ nmol / mg auf $6,7 \pm 0,8$ nmol / mg in isolierter Oxidase anstieg.

Katalytische Aktivitäten von *P. denitrificans* Membranen des Parentalstamms und verschiedener Mutantenstämme zeigten, dass die Inaktivierung des Gens für fest gebundenes Cytochrom *c*₅₅₂ die Bildung eines Superkomplexes nicht verhindern konnte, was ein Hinweis dafür ist, dass dieses Elektronen Carrier Protein nicht essentiell für die strukturelle Verbindung zwischen den Komplexen III und KIV ist. Komplex I Aktivität wurde ebenfalls in Membranen von Mutanten-Stämmen, denen Komplex III oder Komplex IV fehlte, gefunden. Jedoch enthielten diese Stämme keinen assemblierten Komplex I, sondern nur dissoziierte Untereinheiten des Komplexes.

Trotz der Verwendung der selben Protokolle für die elektrophoretische Trennung und chromatographische Isolierung wie für Superkomplexe aus dem Wildtyp-Stamm, führte die Isolierung aus Mutantenstämmen, denen Komplex III oder IV fehlte, zum vollständigen Verlust der NADH:DBQ Oxidoreduktaseaktivität. Dies weist darauf hin, dass *Paracoccus denitrificans* Komplex I durch die Assemblierung in Form eines NADH Oxidase Superkomplex stabilisiert wird. Zusätzlich zum Substrat Channeling scheint die strukturelle Stabilisierung von Membran Protein Komplexen die Hauptaufgabe von respiratorischen Superkomplexen zu sein.

5.3 Ausblick

5.3.1 Strukturaufklärung des NADH Oxidase Superkomplexes

In dieser Arbeit wurde die Stöchiometrie des NADH Oxidase Superkomplexes α bestimmt. Dabei stellte sich die Frage: Wie sieht die Struktur des Superkomplexes aus und wie sind die einzelnen Komponenten des Superkomplexes α zueinander angeordnet?

Um diese Fragestellung zu klären, wurden nach Beendigung der vorliegenden Arbeit Vorexperimente durchgeführt. Zur Markierung der Einzelkomplexe im Superkomplex sollten F_V -Fragmente gegen Komplex IV und polyklonale Antikörper gegen Untereinheiten der Komplexe I, III und IV verwendet werden. Es konnte bisher jedoch in keinem Fall eine Bindung an den Superkomplex detektiert werden.

Um den Superkomplex identifizieren zu können, soll er elektronenmikroskopisch untersucht werden. Dies erfolgt in Kooperation mit Michael Rademacher und Teresa Ruiz, die die gesamten elektronenmikroskopischen Arbeiten durchführen sollen.

Um Superkomplexe effektiver und schonender reinigen zu können, und um in kürzerer Zeit höhere Ausbeuten an reinem Superkomplex zu erhalten, wurden Vorexperimente mit einem wildtypischen *Paracoccus denitrificans* Stamm durchgeführt, der einen mit einem „His-Tag“ markierten Komplex IV besitzt. Es wurden erste Ansätze für die Erstellung eines Reinigungsprotokolls über eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie-Säule durchgeführt, die aber noch nicht abgeschlossen sind. Ziel dieser Reinigung wird sein, eine höhere Ausbeute des Superkomplexes α zu erreichen, die die elektronenmikroskopische Einzelpartikel-Analyse erleichtern würde. Außerdem könnte die Isolierung des Affinitäts-markierten Superkomplexes α aus *Paracoccus denitrificans* die Lokalisierung des Komplex IV im Superkomplex per Elektronenmikroskopie ermöglichen z.B. über das Anheften einer Goldmarkierung am His-Tag.

6 Literaturverzeichnis

- Abramson, J., Svensson-Ek, M., Byrne, B., Iwata, S. (2001) Structure of cytochrome *c* oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochim Biophys Acta.*; **1544** (1-2): 1-9.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schägger, H. (1999) ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene. *J Biol Chem.*; **274** (1): 36-40.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schägger H. (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.*; **17** (24): 7170-8.
- Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.M., van Spanning, R.J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62** (4): 1046-78.
- Beijerinck, M., and D.C.J., Minkman. (1910) Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt. II* **25**: 30–63.
- Bernardi, G., (1973) Chromatography of proteins on hydroxylapatite. *Methods Enzymol.* **XXVII**, 471-479
- Bernardi, G., (1971) Chromatography of proteins on hydroxylapatite. *Methods Enzymol.* **XXII**, 325-339
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem.*; **69**: 1005-75.
- Berry, E.A., Huang, L.S., Zhang, Z., Kim, SH. (1999) Structure of the avian mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31** (3):177-90.
- Berry, E. A., and B. L., Trumpower, (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal. Biochem.*; **161**: 1–15.
- Berry, E. A., and Trumpower, B. L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc₁ and cytochrome c-aa₃ complexes. *J. Biol. Chem.* **260**, 2458-2467
- Blair, P.V. (1967) Preparation and properties of repeating units of mitochondrial electron transfer. *Methods Enzymol.* **10**, 208-212
- Böttcher, B., Scheide, D., Hesterberg, M., Nagel-Steger, L., Friedrich, T. (2002) A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.*; **277** (20): 17970-7.
- Boumans H., Grivell, L.A., Berden, J.A., (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem.*; **273** (9): 4872-7.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Brandt, U., Kerscher, S., Droese, S., Zwicker, K., Zickermann, V. (2003) Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett.*; **545**(1): 9-17.
- Brandt, U., Okun, J.G. (1997) Role of deprotonation events in ubihydroquinone:cytochrome *c* oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry.*; **36** (37): 11234-40.
- Brandt, U., Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*; **29** (3): 165-97
- Brandt, U. (1989) Zum Mechanismus des mitochondrialen Elektronentransports-Untersuchungen mit spezifischen Hemmstoffen, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Bronfman, M., Loyola, G., Koenig, C.S. (1998) Isolation of intact organelles by differential centrifugation of digitonin-treated hepatocytes using a table Eppendorf centrifuge. *Anal Biochem.*; **255** (2): 252-6.
- Bruel, C., Basseur, R., Trumpower, B.L. (1996) Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*₁ complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr.*; **28** (1): 59-68.
- Campbell, N. A., Reese, J. B. *Biologie* (2003) 6. Auflage, Spektrum Verlag Heidelberg
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J., and Walker J. E. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell Proteomics* **2**, 117-126
- Chance, B. (1957) TECHNIQUES FOR THE ASSAY OF THE RESPIRATORY ENZYMES *Methods Enzymology* **4**, 273-329, Academic Press, New York
- CHANCE B, WILLIAMS GR. (1955) A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature.*; **176** (4475): 250-4.
- Chen, P.S. Jr., Toribara, T.Y. & Warner, H. (1956) Microdetermination of phosphorus. *Analyt. Chem.* **28**: 1756-58
- Cruciat, C. M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., and Stuart, R. A. (2000) The cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **275**, 18093-18096
- De Gier, J.W., Lubben, M., Reijnders, W.N., Tipker, C.A., Slotboom, D.J., van Spanning, R.J., Stouthamer, A.H., van der Oost, J. (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol Microbiol.*; **13** (2): 183-96
- De Vries, G. E., Harms, N., Hoogendijk, J. & Stouthamer, A. H. (1989) Isolation and characterization of *Paracoccus denitrificans* mutants with increased conjugation frequencies and pleiotropic loss of a n(GATC)n DNA-modifying property. *Arch. Microbiol.* **152**: 52-57

- Di Bernardo, S., Yano, T., Yagu, T., (2000) Exploring the Membrane Domain of the Reduced Nicotinamide Adenin Dinucleotide-Quinone Oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*: Characterization of the NQO7 Subunit. *Biochemistry* **39**, 9411-9418
- Di Bernardo, S, Yagi T. (2001) Direct interaction between a membrane domain subunit and a connector subunit in the H(+)-translocating NADH-quinone oxidoreductase. *FEBS Lett.*; **508** (3): 385-8
- Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schägger, H., 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** (1): 230-8.
- Drews, J. (2000) Drug discovery: A historical perspective. *Science*; **287**, 960-964
- Dröse, S., Zwicker, K., and Brandt, U. (2002) Full recovery of the NADH:ubiquinone activity of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica* by the addition of phospholipids. *Biochem. Biophys. Acta* **1556**, 65-72
- Drosou, V., Malatesta, F., Ludwig, B. (2002) Mutations in the docking site for cytochrome *c* on the *Paracoccus* heme *aa*₃ oxidase. Electron entry and kinetic phases of the reaction. *Eur J Biochem.*; **269** (12): 2980-8.
- Eubel, H., Jansch, L., Braun, H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.*; **133** (1): 274-86.
- Fernandes, A. S., Pereira, M. M., and Teixeira, M. (2002) Purification and characterization of the complex I from the respiratory chain of *Rhodothermus marinus*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 413-421
- Fersht, A. (1999) Structure and Mechanism in Protein Science. *WH Freeman & Co*, New York
- Finel, M. (1996) Genetic inactivation of the H(+)-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* is facilitated by insertion of the *ndh* gene from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **393** (1) 81-85
- Fowler L.R., Richardson S.H. (1963) Studies on the electron transfer system. *J Biol Chem.*; **238**: 456-63
- Gabellini, N., Bowyer, J. R., Hurt, E., Melandri, B. A., and Hauska, G. (1982) A cytochrome b/c₁ complex with ubiquinol-cytochrome c₂ oxidoreductase activity from *Rhodopseudomonas sphaeroides* GA. *Eur. J. Biochem.* **126**, 105-111
- Gemperli, A. C., Dimroth, P., and Steuber, J. (2002) The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump. *J. Biol. Chem.* **277**, 33811-33817
- Genova, A. L., Bianchi, C., and Lenaz, G. (2003) Structural organization of the mitochondrial respiratory chain. *Ital. J. Biochem.* **52**, 58-61

- Guenebaut, 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** (1): 105-12.
- Guenebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H., Leonard, K.R. (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J Mol Biol.*; **265** (4): 409-18.
- Gupte, S. S., and Hackenbrock, C. R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5248–5253
- Gupte, S. S., and Hackenbrock, C. R. (1988a) *J. Biol. Chem.* **263**, 5241–5247
- Gupte, S. S., Wu, E.-S., Hoehli, L., Hoehli, M., Jacobson, K., Sowers, A. E., and Hackenbrock, C. R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 2606–2610
- Gutierrez-Cirlos, E.B., Trumpower, B.L. (2002) Inhibitory analogs of ubiquinol act anti-cooperatively on the Yeast cytochrome *bc₁* complex. :Evidence for an alternating, half-of-the-sites mechanism of ubiquinol oxidation. *J. Biol Chem.* **277** (2): 1195-202
- Grigorieff, N. (1998) Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol.*; **277** (5): 1033-46.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., Gupte, S.S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr.*; **18** (5): 331-68.
- Hagstrom, J.E., J.J. Ludtke, M.C. Bassik, M.G. Sebestyaen, S.A. Adam, J.A. Wolff, (1994) Effect of Mitochondrial Protein Concentration on the Efficiency of Outer Membrane Removal by the Cholesterol-Selective Detergent Digitonin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1190** (2): 304-308.
- Haltia T., Semo N., Arrondo J.L., Goni F.M., Freire E. (1994) Thermodynamic and structural stability of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.*; **33**(32): 9731-40.
- Harms, N., van Spanning, R.J. (1991) C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*: genetics of *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr.*; **23** (2): 187-210
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem.* **54**: 1015-69. Review
- Hatefi, Y., Stempel, K.E. (1969) Isolation and Enzymatic Properties of the Mitochondrial Reduced Diphosphopyridine Nucleotide Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **244** (9): 2530-2537
- Hatefi, Y., Rieske, J.S. (1967) The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I-III of the respiratory chain) *Methods Enzymol.* **10**, 225-231
- HATEFI Y, HAAVIK AG, GRIFFITHS DE. (1962) Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem.*; **237**: 1676-80.
- Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E. und Tanford, C.(1979) Properties of detergents. *Methods Enzymol.* **LVI**, 734-749

- Helenius, A., Simons, K. (1972) The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* **247** (11): 3656-3661.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, **6**, 103-112.
- Hollingworth R.M., Ahammadsahib, K.I., Gadelhak, G. und McLaughlin, J.L. (1994) New Inhibitors of complex I of the mitochondrial electron transport chain with activity as pesticides. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 230-233
- Hunte, C., Palsdottir, H., Trumppower, B.L. (2003) Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome *bc*₁ complex. *FEBS Lett.*; **545** (1): 39-46.
- Hunte, C., Michel, H., (2002) Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr Opin Struct Biol.* **12** (4): 503-8.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T., Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure Fold Des.*; **8** (6): 669-84.
- Itzhaki, R. F., and Gill, D. M. (1964) A MICRO-BIURET METHOD FOR ESTIMATING PROTEINS *Anal. Biochem.* **9**, 401-410
- Iwasaki, T., Matsuura, K., and Oshima, T. (1995a) Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **270**, 30881-30892
- Iwasaki, T., Wakagi, T., Isogai, Y., Iizuka, T., and Oshima, T. (1995b) Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. II. Characterization of the archaeal terminal oxidase subcomplexes and implication for the intramolecular electron transfer. *J. Biol. Chem.* **270**, 30893-30901
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Science*; **281** (5373): 64-71.
- Iwata, S. (1998a) Structure and Function of Bacterial Cytochrome c Oxidase *J. Biochem.* **123**, 369-375
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669
- Izzo G., Guerrieri F., Papa S. (1978) On the mechanism of inhibition of the respiratory chain by 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide. *FEBS Lett.*; **93** (2): 320-2.
- Jaworowski, A., Campbell, H.D., Poulis, M.I., Young, I.G. (1981) Genetic identification and purification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20** (7): 2041-7
- John, P., Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* **254**, 495-8

- Kadenbach, B., Kuhn-Nentwig, L. and Büge, U. (1987) Evolution of a regulatory enzyme: cytochrome c oxidase (Complex IV). *Curr. Top. Bioenerg.* **15**, 113-61.
- Kadenbach, B., Jarausch, J., Hartmann, R., and Merle, P. (1983) Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal. Biochem.* **129**, 517-521
- Kao, M.C., Di Bernardo, S., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T. (2003) Characterization and topology of the membrane domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.* **42** (15): 4534-43
- Kashani-Poor, N., Kerscher, S., Zickermann, V., and Brandt, U. (2001) Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 363-70
- Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A. & Michel, H. (1995). Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes. *Bio/Technology* **13**, 155-160.
- Komorowski, L., Verheyen, W., and Schäfer, G. (2002) The archaeal respiratory supercomplex SoxM from *S. acidocaldarius* combines features of quinone and cytochrome c oxidases. *Biol. Chem.* **383**, 1791-1799
- Korn, M. (1994) *Diploma thesis Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main, Germany*
- Kotlyar AB, Sled VD, Burbaev DS, Moroz IA, Vinogradov AD.(1990) Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles. *FEBS Lett.*; **264** (1): 17-20.
- Koziol, J. (1971) Fluorometric Analysis of Riboflavin and its Coenzymes. *Methods Enzymol.* **18B**: 253-285
- Kurowski, B., Ludwig, B. (1987) The genes of the *Paracoccus denitrificans* bc1 complex. Nucleotide sequence and homologies between bacterial and mitochondrial subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 13805-13811
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., and Friedrich, T. (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 538-548
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.R., Farr, A.L.und Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Ludwig, B. (1986) Cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Methods Enzymol.* **126**, 153-159
- Ludwig, B. and Schatz, G. (1980) A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa₃) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77** (1), 196-200.
- Maneg O, Ludwig B, Malatesta F. (2003) Different interaction modes of two cytochrome-c oxidase soluble CuA fragments with their substrates. *J Biol Chem.*; **278** (47): 46734-40.

Marcus Korn, *diploma thesis* (1994)

Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryote Cells*. Yale University Press, New Haven

Matsushita, K., Ohnishi, T., Kaback, H.R., (1987) NADH-Ubiquinone Oxidoreductase of the *Escherichia coli* Aerobic Respiratory Chain. *Biochem.* **26**: 7732-7737

Mayer, G., Anderka, O., Ludwig, B., Schubert, D. (2002). The State of Association of the Cytochrome bc₁ Complex from *Paracoccus denitrificans* in Solutions of Dodecyl Maltoside *Progr. Colloid Polym. Sci.* **119**, 77-83

Meinhardt, S.W., Kula, T., Yagi, T., Lillich, T., Ohnishi, T. (1987) EPR characterization of the iron-sulfur clusters in the NADH: ubiquinone oxidoreductase segment of the respiratory chain in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.* **262** (19): 9147-53

Michel H. (1999) Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping-- a discussion. *Biochemistry*; **38** (46): 15129-40.

Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol.*; **62** (2): 327-67.

MITCHELL P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften.*; **191**: 144-8.

Neugebauer, J.M. (1990) Detergents an overview. *Methods Enzymol.* **182**, 239-282

Neugebauer, J.M. (1992) „A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry“, Calbiochem-Novabiochem Corporation.

Niebisch, A., and Bott, M. (2003) Purification of a cytochrome bc-aa₃ supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome aa₃ oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome c₁. *J. Biol. Chem.* **278**, 4339-4346

Okun, J.G., Zickermann, V., Zwicker, K., Schägger, H. and Brandt, U. (2000) Binding of Detergents and Inhibitors to Bovine Complex I - A Novel Purification Procedure of Bovine Complex I Retaining Full Inhibitor Sensitivity. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 77-87

Ostermeier, C., Iwata, S., Michel, H. (1996) Cytochrome c oxidase. *Curr Opin Struct Biol.*; **6** (4): 460-6.

Otten, M.F., Reijnders, W.N., Bedaux, J.J., Westerhoff, H.V., Krab, K., Van Spanning, R.J. (1999) The reduction state of the Q-pool regulates the electron flux through the branched respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem.*; **261** (3): 767-74.

Otten, M.F., Stork, D.M., Reijnders, W.N., Westerhoff, H.V., Van Spanning, R.J. (2001) Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem.*; **268** (8): 2486-97

Peng, G., Fritsch, G., Zickermann, V., Schägger, H., Mentele, R., Lottspeich, F., Bostina, M., Radermacher, M., Huber, R., Stetter, K. O., and Michel, H. (2003) Isolation, characterization and electron microscopic single particle analysis of the NADH:ubiquinone

- oxidoreductase (complex I) from the hyperthermophilic eubacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry* **42** (10), 3032-3039
- Pennoyer, J. D., Ohnishi, T., and Trumpower, B. L. (1988) Purification and properties of succinate-ubiquinone oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. Biophys. Acta* **935**, 195-207
- Pietrobon D., Azzone G.F., Walz D. (1981) Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H⁺-pumps in mitochondria: on the nature of 'leaks'. *Eur. J. Biochem.* **117** (2): 389-94.
- Ragan C.I., Heron C. (1978) The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association. *Biochem J.*; **174** (3): 783-90
- Raitio, M., Jalli, T., and Saraste, M. (1987) *EMBO J.* **6**, 2825-2833
- Raitio, M., Pispä, J.M., Metso, T., Saraste, M. (1990) Are there isoenzymes of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*? *FEBS Lett.*; **261** (2): 431-5
- Raitio, M., and Wikström, M. (1994) An alternative cytochrome oxidase of *Paracoccus denitrificans* functions as a proton pump. *Biochem. Biophys. Acta* **1186**, 100-106
- Rasmussen, T., Scheide, D., Brors, B., Kintscher, L., Weiss, H., Friedrich, T. (2001) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry.*; **40** (20): 6124-31
- Rich P.R. (1984) Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim Biophys Acta.*; **768** (1): 53-79.
- Richardson, D.J. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* ;**146** (3): 551-71
- Rieske, J. S. (1967) The Quantitative Determination of Mitochondrial Hemoproteins. *Methods Enzymol.* **10**: 488-493.
- Riistama, S., Puustinen, A., Garcia-Horsman, A., Iwata, S., Michel, H., and Wikström, M. (1996) Channeling of dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 1-4
- Ritter, M., Anderka, O., Ludwig, B., Mantele, W., Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome bc₁ complex from *Paracoccus denitrificans*: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding. *Biochemistry*; **42** (42): 12391-9
- Robinson, B.H. (1998) Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta.*; **1364** (2): 271-86.
- Saiki, K., Mogi, T., Tsubaki, M., Hori, H., and Anraku, Y. (1997) Exploring subunit-subunit interactions in the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase by extragenic suppressor mutation analysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 14721-14726

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lubben, M., van der Oost, J. (1991) The happy family of cytochrome oxidases. *Biochem Soc Trans.*; **19** (3): 608-12
- Sazanov, L.A., Carroll, J., Holt, P., Toime, L., Fearnley, I.M. (2003) A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.*; **278** (21): 19483-91.
- Schägger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta.*; **1555** (1-3): 154-9
- Schägger, H. (2001a) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life.*; **52** (3-5): 119-28.
- Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 37861-37867.
- Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777-1783
- Schägger, H. (1995a) Quantification of oxidative phosphorylation enzymes after blue native electrophoresis and two-dimensional resolution: normal complex I protein amounts in Parkinson's disease conflict with reduced catalytic activities. *Electrophoresis* **16**, 763-770
- Schägger, H., Brandt, U., Gencic, S., and von Jagow, G. (1995b) Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Meth. Enzymol.* **260**, 82-96
- Schägger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **217**, 220-30.
- Schägger H., von Jagow G, (1994). *A Practical Guide to Membrane Protein Purification. Academic Press London* 107-124
- Schägger, H. und G. von Jagow. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**: 223-231.
- Schägger, H. and Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**; 368-379
- Schewe T., Hiebsch C. (1977) Action of respiratory inhibitors on the electron transport system of *Escherichia coli*. *Acta Biol Med Ger.*; **36** (7-8): 961-6
- Sled, V.D., Vinogradov, A.D. (1993) Kinetics of the Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Interaction with Hexammineruthenium (III). *Biochim. Biophys. Acta* **1141**: 262-268

- Schröter, T., Hatzfeld, O. M., Gemeinhard, S., Korn, M., Friedrich, T., Ludwig, B., and Link, T. A. (1998) Mutational analysis of residues forming hydrogen bonds in the Rieske [2Fe-2S] cluster of the cytochrome *bc*₁ complex in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 100-106
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- Sone, N., Sekimachi, M., and Kutoh, E. (1987) Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a *bc*₁ complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3. *J. Biol. Chem.* **262**, 15386-15391
- Stouthamer, A. H. (1992) Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **61** (1), 1-33
- Stouthamer AH, Bettenhausen CW. (1980) Growth and physiology of potassium-limited chemostat cultures of *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol.*; **125** (3): 239-44.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., Schägger, H. (2003) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.* **279** (6):5000-5007
- Stryer, L. (1990) Biochemie, Spektrum Verlag
- Takano, S., Yano, T., Yagi, T. (1996) Structural studies of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*: identity, property, and stoichiometry of the peripheral subunits. *Biochemistry*; **35** (28) : 9120-7.
- Tisdale, H.D. (1967) Preparation and properties of succinic-cytochrome c reductase (complex II-III). *Methods Enzymol.* **10**, 213-216
- Trumpower, B.L. (1991) The three-subunit cytochrome *bc*₁ complex of *Paracoccus denitrificans*. Its physiological function, structure, and mechanism of electron transfer and energy transduction. *J Bioenerg Biomembr.*; **23** (2): 241-55.
- Tiselius, A., Hjerten, S. und Levin, O. (1956) Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 132-155
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.5 Å. *Science* **272**, 1136-1144.
- Turba, A., Jetzek, M., and Ludwig, B. (1995) Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₂ and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem.* **231**, 259-265
- Turba, A. (1993) *PhD thesis Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main, Germany*
- Tzung S.P., Kim K.M., Basanez G., Giedt C.D., Simon J., Zimmerberg J., Zhang K.Y., Hockenbery D.M. (2001) Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol.*; **3** (2): 183-91.

- Van Spanning, R. J., Wansell, C., Harms, N., Oltmann, L. F., und Stouthammer, A. H. (1990) Mutagenesis of the gene encoding cytochrome *c*₅₅₀ of *Paracoccus denitrificans* and analysis of the resultant physiological effects. *J.Bact.* **172**, 986-996
- Voet, D., Voet, J.G.; (1994) Biochemie, VCH Verlag
- Wikstrom M, Bogachev A, Finel M, Morgan JE, Puustinen A, Raitio M, Verkhovskaya M, Verkhovsky MI. (1994) Mechanism of proton translocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* **1187** (2):106-11.
- Witt, H., Ludwig, B. (1997) Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.*; **272** (9): 5514-7.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev.*; **51** (2): 221-71
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria *Science* **277** (5322): 60-66
- Xu, X., Matsuno-Yagi, A., and Yagi, T. (1993) DNA sequencing of the seven remaining structural genes of the gene cluster encoding the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **32**, 968-981
- Yagi, T., Matsuno-Yagi, A. (2003) The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry.*; **42** (8): 2266-74.
- Yagi, T. Yano, T., Di Bernardo, S., Matsuno-Yagi, A., (1998) Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 125-133
- Yagi, T., (1993) The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 1-17
- Yang, X., and Trumpower, B. L. (1986) Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **261**, 12282-12289
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yano T, Sklar J, Nakamaru-Ogiso E, Takahashi Y, Yagi T, Ohnishi T. (2003) Characterization of cluster N5 as a fast-relaxing [4Fe-4S] cluster in the Nqo3 subunit of the proton-translocating NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.* **278** (18): 15514-22
- Yano, T., Sled, V.D., Ohnishi, T., Yagi, T. (1996) Expression and characterization of the flavoprotein subcomplex composed of 50-kDa (NQO1) and 25-kDa (NQO2) subunits of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.*; **271** (10): 5907-13
- Yano, T., Yagi, T., Sled, V.D., Ohnishi, T. (1995) Expression and characterization of the 66-kilodalton (NQO3) iron-sulfur subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem.* **270** (31) :18264-70.

- Yano, T., Sled, V.D., Ohnishi, T., Yagi, T. (1994) Expression of the 25-kilodalton iron-sulfur subunit of the energy-transducing NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*. **33** (2): 494-9
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* 280, 1723-1729
- Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.*; **277** (46): 43553-6
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S. H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. *Nature* **392**, 677-684
- Zickermann, I., Tautu, O.S., Link, T.A., Korn, M., Ludwig, B., Richter, O.M. (1997) Expression studies on the *ba*₃ quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A *bb*₃ variant is enzymatically inactive. *Eur J Biochem.*; **246** (3): 618-24.
- Zickermann, I., (1996) Biochemische und spektroskopische Charakterisierung der *ba*₃-Chinioxidase aus *Paracoccus denitrificans*, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt
- Zickermann, V., Bostina, M., Hunte, C., Ruiz, T., Radermacher, M., Brandt, U. (2003) Functional implications from an unexpected position of the 49-kDa subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J Biol Chem.*; **278** (31): 29072-8. Epub 2003 May 16.
- Zickermann, V., Barquera, B., Wikström, M., and Finel, M. (1998) Analysis of the pathogenic human mitochondrial mutation ND1/3460, and mutations of strictly conserved residues in its vicinity, using the bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **37**, 11792-11796

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

3×	3fach konzentriert
AC	6-Aminocaprinsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
b	Cytochrom <i>b</i>
b _H	b-Typ Häm mit hohem Potential
b _L	b-Typ Häm mit niedrigem Potential
BN-PAGE	Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin
c _x	Cytochrom <i>c</i> ₁ , <i>c</i> ₅₅₂ , <i>c</i> ₅₅₀
CMC	Critical Micellar Concentration
CNP	(colourless native Page) farbloses nativ Gel
Cu _{A/B}	Kupferzentrum A/B
Cyt. <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
DBH	n-decyl-Ubihydrochinon
DBQ	n-decyl-Ubichinon
DCIP	Dichloroindophenol
DDM	n-Dodecyl β-D-Maltosid (Laurylmaltosid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNADH	deamino Nicotinsäureamidadeninindinukleotid

DQA	Decylquinazolinamin
ECL	“enhanced chemiluminescence”
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPR	Electron Paramagnetic Resonance (s. auch ESR)
ESR	Elektronenspinresonanz Spektroskopie
FAD	Flavinadenindinukleotid
FeS	Eisen Schwefel Zentrum
FMN	Flavinmononukleotid
FP	Flavoprotein-Anteil
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HP	Hydrophober Proteinanteil
IP	Eisen-Schwefel-Proteinanteil
ISP	Rieske Eisen-Schwefel Protein (Iron-Sulfur-Protein)
KI	NADH:Ubichinon Oxidoreduktase
KII	Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase
KIII	Ubichinol:Cytochrom <i>c</i> Oxidoreduktase
KIV	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
KV	F ₁ F ₀ -ATP Synthase
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumdihydrogenphosphat
MDa	Megadalton
MW	Molekulargewicht
NAD	Nicotinsäureamidadenindinukleotid

NADH	Nicotinsäureamidadenindinukleotid, reduziert
NaPi	Natriumdihydrogenphosphat
NDH	NADH:Ubichinon Oxidoreduktase
NQR	Na ⁺ -translozierenden NADH:Chinon Oxidoreduktase
ORF	Open Reading Frame („offener Leserahmen“)
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARDE	<i>Paracoccus denitrificans</i>
PES	Polyethersulfon-Membranen
PL	Phospholipid
Q	Ubichinon (Pool)
QH ₂	Ubihydrochinon
Q _i	Ubichinon Reduktionsstelle
Q _o	Ubichinol Oxidationsstelle
Rif	Rifampicin
rpm	random per minute (Umdrehungen die Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDH	Succinat Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
Strep	Streptomycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-Tris[hydroxymethyl]methylglycerin

Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TTFA	2 Thenoyltrifluoroaceton
U	Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
URF	Unassigned Reading Frame (ORF dessen Funktion noch unbekannt ist)
UZ	Ultrazentrifugation
% T	Total concentration of both monomers
% C	Percentage of cross-linker to total monomer

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Die mitochondriale Atmungskette	2
Abb. 1-2	Verzweigter Elektronentransportweg von <i>Paracoccus denitrificans</i> (Baker <i>et al.</i>, 1998).....	4
Abb. 1-3	Mitochondrialer und bakterieller Komplex I.....	6
Abb. 1-4	Q-Zyklus nach Berry (http://www.life.uiuc.edu/crofts/bc-complex_site/index.html).....	10
Abb. 1-5	Reaktionsmechanismus der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	12
Abb. 2-1	Reduziertes, oxidiertes und Differenzspektrum von <i>Paracoccus denitrificans</i> Wildtyp Membranen	29
Abb. 2-2	Beispiel: Komplexbildung von Pyridin und einem Cytochrom vom Typ b. 30	
Abb. 3-1	(A) Auftrennung von Atmungskettenkomplexen und Superkomplexen in der BN-PAGE / (B) Westernblot einer 2D Tricin-SDS-PAGE	40
Abb. 3-2	Auftrennung von Atmungskettenkomplexen und Superkomplexen mit der BN-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 4-13 % Acrylamid Gradienten.....	41
Abb. 3-3	Identifizierung der Proteinzusammensetzung der Komplexe nach 2D Tricin-SDS-PAGE	42
Abb. 3-4	Identifizierung des Rieske Eisen Schwefel Proteins in Subkomplex d	43

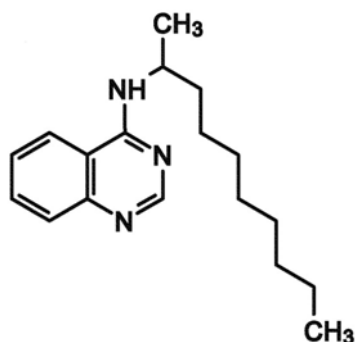
Abb. 3-5	Spezifische Enzymaktivitäten der Komplexe I-IV	45
Abb. 3-6	Reinigungsschema der Superkomplex-Präparation aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	47
Abb. 3-7	BN-PAGE der Hydroxylapatit-Eluate.....	49
Abb. 3-8	BN-PAGE der Gelfiltrationseluete	50
Abb. 3-9	2D-SDS-Gel (10 % Acrylamid) (links) und Western-Blot (rechts) des Hydroxylapatit-Eluates.....	52
Abb. 3-10	Untereinheiten-Zusammensetzung des NADH-Oxidase-Superkomplexes ..	53
Abb. 3-11	Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Chromatographie; Messung der Aktivitäten der Einzelkomplexe.....	54
Abb. 3-12	Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Chromatographie; Messung der gekoppelten Aktivitäten mehrerer Atmungskettenkomplexe	55
Abb. 3-13	Elutionsprofil der Gelfiltrationssäule; Messung der Aktivitäten der Einzelkomplexe	55
Abb. 3-14	Elutionsprofil der Gelfiltrationssäule; Messung der gekoppelten Aktivitäten mehrerer Atmungskettenkomplexe	56
Abb. 3-15	Spezifische Aktivitäten Digitonin-solubilisierter Membranen von <i>P. denitrificans</i>	62
Abb. 3-16	Immunodetektion von Atmungskettenkomplexen-Untereinheiten im <i>Paracoccus denitrificans</i> Wildtyp und Mutantenstämmen.....	64

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Untereinheiten des Komplex I.....	8
Tabelle 2-1 Verwendete <i>Paracoccus denitrificans</i> Stämme.....	23
Tabelle 2-2 Verwendete <i>E.coli</i> Stämme	24
Tabelle 3-1 Zusammensetzung der <i>Paracoccus denitrificans</i> Superkomplexe.....	43
Tabelle 3-2 Einstellung der optimalen Versuchsbedingungen zur Isolierung von Superkomplexen	46
Tabelle 3-3 Zur Isolierung von Superkomplexen verwendete Puffer.....	48
Tabelle 3-4 Übersicht über die verwendeten Antikörper gegen <i>Paracoccus denitrificans</i> Proteine.....	51
Tabelle 3-5 Reinigung des NADH Oxidase Superkomplex aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	57
Tabelle 3-6 Abschätzung der Wechselzahlen der Komplexe I, III und IV im isolierten Superkomplex <i>a</i> , im Vergleich zu solubilisierten Membranen	58
Tabelle 3-7 Verhältnis der HAR:dNADH Aktivität im Superkomplex <i>a</i> und in solubilisierten Membranen	59
Tabelle 3-8 Stöchiometrie der Komplexe im Superkomplex <i>a</i>	60
Tabelle 7-1 Übersicht über die Untereinheiten des Komplex I, III und IV zur Berechnung der Molekulargewichte.....	98

7.4 Kenndaten der Inhibitoren

DQA (2-n-Decyl-Quinazolin-4-yl-Amine; SAN 549)



Quelle: Aventis Crop Science, Biochemical Research, Frankfurt am Main

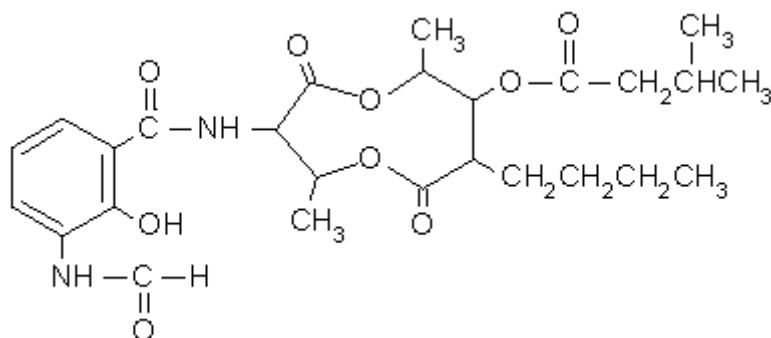
Literatur: Hollingwoth *et al.* (1994)

Summenformel: $C_{18}H_{27}N_3$

Molmasse: 285,4 g / mol

Bemerkung: löslich in Ethanol; $\epsilon_{291nm} = 8,14 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ in abs. Ethanol

Antimycin A



Quelle: Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Literatur: Izzo, *FEBS Lett.* 93, 320 (1978); D. Pietrobon, *Eur. J. Biochem.* 117, 389 (1981); Tzung, Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nature Cell Biol.* 3, 183 (2001)

Summenformel: $C_{26}H_{36}N_2O_9$

Molmasse: 520,6 g / mol

Bemerkung: löslich in Ethanol

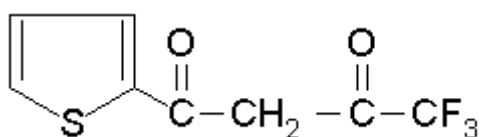
Kaliumcyanid**KCN**

Quelle: Merck, Darmstadt

Summenformel: KCN

Molmasse: 65,11 g / mol

Bemerkung: löslich in Wasser

TTFA (2 Thenoyltrifluoroacetone)

Quelle: Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Literatur: Schewe T., Hiebsch C. (1977) Action of respiratory inhibitors on the electron transport system of *Escherichia coli*, *Acta Biol Med Ger.*; 36 (7-8): 961-6

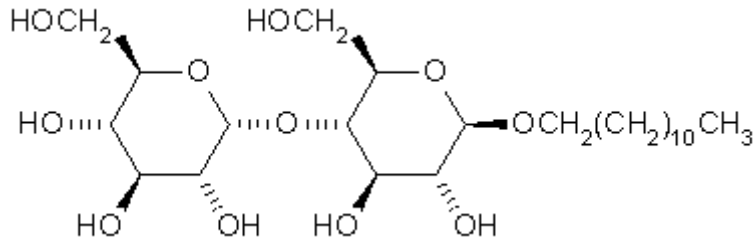
Summenformel: C₈H₅F₃O₂S

Molmasse: 222,18

Bemerkung: schlecht löslich 0,02g / 100ml

7.5 Kenndaten der Detergenzien

DDM (n-Dodecyl β -D-Maltosid / Laurylmaltosid)



Quelle: Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg)

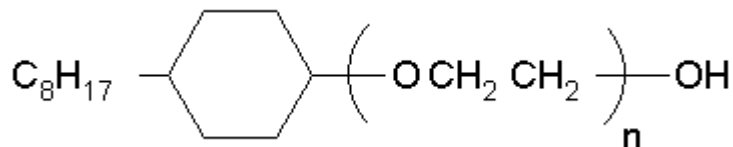
Literatur: „A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry“ (Neugebauer, 1992), Übersichtsartikel: Neugebauer (1990); Helenius *et al.* (1979); Helenius & Simons (1972)

Summenformel: $C_{24}H_{46}O_{11}$

Molmasse: 510,7 g / mol

Bemerkung: Löslich in Wasser, CMC (50mM NaCl, 25°C) = 0,009% (0,18mM)

Triton X-100



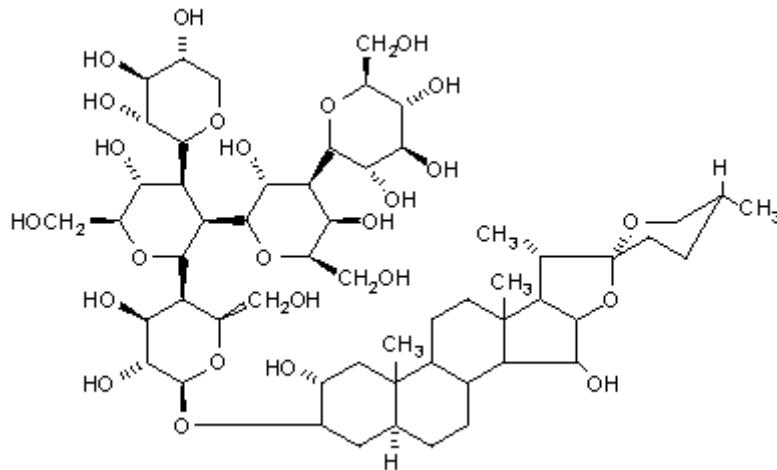
Quelle: Serva (Heidelberg)

Literatur: „A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry“ (Neugebauer, 1992), Übersichtsartikel: Neugebauer (1990); Helenius *et al.* (1979); Helenius & Simons (1972)

Summenformel: $C_{34}H_{62}O_{11}$

Molmasse: 646,9 g / mol

Bemerkung: löslich in Wasser, CMC (50 mM NaCl, 25°C) = 0,013% (0,18 mM), inhomogenes Gemisch aus Molekülen mit neun oder zehn Polyoxyethyleneinheiten, Nicht-ionisches Detergenz

Digitonin

Quelle: Sigma, Deisenhofen

Literatur: Bronfman M, Loyola G, Koenig CS. (1998) Isolation of Intact Organelles by Differential Centrifugation of Digitonin-Treated Hepatocytes Using A Table Eppendorf Centrifuge. *Analytical Biochemistry.*, 255(2): 252-256., Hagstrom, J.E., J.J. Ludtke, M.C. Bassik, M.G. Sebestyaen, S.A. Adam, J.A. Wolff, (1994) Effect of Mitochondrial Protein Concentration on the Efficiency of Outer Membrane Removal by the Cholesterol-Selective Detergent Digitonin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1190(2): 304-308..

Summenformel: $C_{56}H_{92}O_{29}$

Molmasse: 1229.3 g/ mol

Bemerkung: Löslich in Ethanol und kochendem Wasser, Nicht-ionisches Detergenz zur Solubilisierung von Membran gebundenen Proteinen

Tabelle 7-1 Übersicht über die Untereinheiten des Komplex I, III und IV zur Berechnung der Molekulargewichte

Untereinheit	Molekulargewicht (Da)	Anzahl Aminosäuren	Untereinheit des:
NQO 1	47190	431	Komplex I
NQO 2	26121	239	Komplex I
NQO 3	73159	672	Komplex I
NQO 4	46674	412	Komplex I
NQO 5	23891	206	Komplex I
NQO 6	19372	173	Komplex I
NQO 7	13632	121	Komplex I
NQO 8	38750	345	Komplex I
NQO 9	18959	163	Komplex I
NQO 10	21818	200	Komplex I
NQO 11	10855	101	Komplex I
NQO 12	77705	703	Komplex I
NQO 13	56417	513	Komplex I
NQO 14	52534	499	Komplex I
CYB	50116	440	Komplex III
CY1	44654 ^a	450	Komplex III
UCRI	20299	190	Komplex III
COX 1	62439	558	Komplex IV
COX 2	27981 ^b	297	Komplex IV
COX 3	30655	273	Komplex IV
COX 4	5370	49	Komplex IV
c ₅₅₂	18209	176	Elektronentransport zwischen KIII und KIV

^a B. Kurowski et al. JBC 1987, ^b T. Haltia et al. Biochemistry 1994; als Quelle der Molekulargewichte und Aminosäureanzahlen diente Swissprot und Mitopick.

Lebenslauf

Anke Stroh

Schönbornring 5

63263 Neu-Isenburg

Email: stroh@zbc.kgu.de

geboren 17.01.1974 in Offenbach

1980 - 1984 Freiligrath-Grundschule, Frankfurt

1984 - 1993 Schule am Ried, Frankfurt

Schulabschluß: Abitur

1993 - 1994 Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

1994 - 2000 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Abschluss: Diplom

Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Genetik, Biochemie

Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, AG Prof. Entian,

Thema : Untersuchungen zur Biosynthese des Bacteriocins Subtilosin A in *Bacillus subtilis*

Tätigkeiten als studentische Hilfskraft im Institut für Mikrobiologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

Juni 1999 - Nov. 1999 AG Prof. Entian

Juli 1998 – Aug. 1998 AG Prof. Entian

seit Mai 2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie I im Zentrum für biologische Chemie am Universitätsklinikum Frankfurt

seit Mai 2000 Promotion am Institut für Biochemie I im Zentrum für biologische Chemie am Universitäts-Klinikum Frankfurt, AG Prof. Schägger,

Thema: Isolierung und Charakterisierung von Atmungsketten-Superkomplexen aus *Paracoccus denitrificans*