

**Charakterisierung der alternativen
NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH2)
aus *Yarrowia lipolytica***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Andrea Eschemann

aus Bremerhaven

Frankfurt am Main 2004

(DF1)

Vom Fachbereich Chemie und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang-Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Schwalbe

Gutachter: Prof. Ulrich Brandt
Prof. Bernd Ludwig

Datum der Disputation:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2000 bis Mai 2004 am Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

Hiermit bedanke ich mich herzlich bei Prof. Ulrich Brandt für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Förderung meiner Dissertation, sowie für Interesse, Diskussionsbereitschaft und viele Ideen zum Thema.

Die externe Betreuung der Arbeit übernahm Prof. Bernd Ludwig, wofür ich mich an dieser Stelle auch recht herzlich bedanken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Stefan Kerscher, der maßgeblich an der Planung und Koordination der Arbeit mitwirkte und mir bei allen wissenschaftlichen und technischen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin bedanke ich mich bei

- Gudrun Beyer für die Einweisung in die Methoden der Molekularbiologie und für hervorragende technische Unterstützung.
- Dr. Volker Zickermann für stete Diskussionsbereitschaft zu verschiedenen wissenschaftlichen Themen
- Andrea Böttcher für die Netzwerk-Administration und das Lösen sämtlicher Probleme mit den Computern
- meinen MitdotorandInnen Aurelio Garofano (für die Wartung der Kaffeemaschine), Ljuban Grigic (für die Einarbeitung des Microplate Readers), Anke Stroh und Albina Abdrakhmanova
- Prof. Hermann Schägger und Kathy Pfeiffer für die Einführung in die Gelelektrophorese
- Dr. Alexander Galkin for helpful support in terms of kinetics and basic arithmetics
- Prof. Walter Oettmeier (Ruhr Universität, Bochum) für die Quinolone
- allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen für die freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre im Labor.

1	Einleitung	1
1.1	<i>Die mitochondriale Atmungskette</i>	1
1.2	<i>Alternative Dehydrogenasen</i>	2
1.2.1	Interne und externe Orientierung von NDH2	2
1.2.2	Substrate und Inhibitoren	4
1.2.3	Konservierte Sequenzmotive	6
1.2.3.1	Dinukleotid Bindungsstellen	6
1.2.3.2	Apolar/aromatische Bereiche	8
1.2.3.3	Membranassoziation	8
1.3	<i>Die Hefe Yarrowia lipolytica</i>	9
1.4	<i>Zielsetzung</i>	11
2	Material und Methoden	12
2.1	<i>Material</i>	12
2.1.1	Chemikalien	12
2.1.1.1	Chinonanaloga (siehe auch 7.6)	12
2.1.1.2	Detergentien	13
2.1.1.3	Inhibitoren	13
2.1.1.4	Antibiotika	13
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	Medien	14
2.1.4	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	15
2.1.5	Stämme	17
2.1.6	Plasmide	17
2.2	<i>Molekulargenetische Methoden</i>	18
2.2.1	Gelelektrophorese von DNA	18
2.2.2	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	18
2.2.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	18
2.2.4	Phosphorylierung von PCR-Produkten	18
2.2.5	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	18
2.2.6	Ligation	19
2.2.7	Transformation von <i>Y. lipolytica</i> mit der PLATE Methode	19

2.2.8	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Y. lipolytica</i>	19
2.2.9	Darstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	19
2.2.10	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	19
2.2.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	19
2.2.12	Sequenzierung von Plasmid DNA.....	20
2.2.13	Zielgerichtete Mutagenese.....	20
2.2.14	Konjugation.....	20
2.2.15	Sporulation und Sporenaufarbeitung nach der „random spore detection“ Methode.....	21
2.2.16	Southern Blot.....	21
2.2.17	Markierung von DNA Fragmenten mit ³² P.....	22
2.2.18	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA Sonden.....	22
2.2.19	Heterologe Expression von YLNDH2.....	22
2.3	<i>Proteinchemische Methoden</i>	23
2.3.1	Anzucht von <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
2.3.2	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.3.3	Präparation von mitochondrialen Membranen.....	24
2.3.4	Präparation von mitochondrialen Membranen in kleinem Maßstab.....	24
2.3.5	Bestimmung des Proteingehaltes.....	24
2.3.6	Bestimmung der Cytochromgehalte in mitochondrialen Membranen..	24
2.3.7	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.3.8	Western Blot.....	25
2.3.9	Bestimmung der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität.....	26
2.3.10	Bestimmung der Ubihydrochinon: Cytochrom c Oxidoreduktase Aktivität	26
2.3.11	Darstellung von Decylubihydrochinon.....	27
2.3.12	Bestimmung der NADH:HAR Oxidoreduktase Aktivität.....	27
2.3.13	Testen von Hemmstoffen und Bestimmung des apparenten I ₅₀ Wertes	27
2.3.14	Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC).....	28
2.3.15	N-terminale Sequenzierung.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	<i>Charakterisierung der katalytischen Aktivität von NDH2 und Komplex I in mitochondrialen Membranen von Y. lipolytica</i>	29
3.1.1	Bestimmung des pH Optimums von YLNDH2.....	29

3.1.2	Interaktion mit verschiedenen Elektronenakzeptoren.....	30
3.1.3	Untersuchung der Abhängigkeit des apparenten K_M Wertes von der Membranmenge	31
3.1.4	Auswertung von kinetischen Messdaten	32
3.1.4.1	Vergleich von Testmessungen an beiden Geräten	33
3.1.5	Untersuchung des Reaktionsmechanismus von YLNDH2	35
3.1.6	Hemmstoffe.....	37
3.1.7	HDQ zeigt nicht-kompetitive Hemmung für beide Substrate von NDH2	40
3.2	<i>Heterologe Expression von YLNDH2</i>	44
3.2.1	Herstellung eines Expressionsvektors	45
3.2.2	Anzucht und Induktion des <i>E. coli</i> Expressionsstammes	45
3.2.3	Zellernte und –aufschluss	46
3.2.4	Reinigung des Proteins mittels denaturierender Affinitätschromatographie.....	46
3.2.5	Untersuchung des polyklonalen Antiserums auf Kreuzreaktion mit der nativen YLNDH2.....	48
3.3	<i>Erzeugung eines NDH2/Komplex I Deletionsstammes</i>	49
3.3.1	Stämme zur Konjugation und anschließender Sporulation	49
3.3.2	Southern Blot und Hybridisierung.....	50
3.4	<i>Zielgerichtete Mutationen im offenen Leseraster von YLNDH2</i>	52
3.4.1	Übersicht über die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren	52
3.4.2	Herstellung eines Expressionsvektors	54
3.4.3	Aktivitäten und Enzymgehalte in Membranen der Mutantenstämme ..	54
3.4.4	Der apparente K_M Wert für DBQ zeigt eine lineare Abhängigkeit zur V_{max} in Mutanten- und Wildtypmembranen	59
3.4.5	Testen der Abhängigkeit von apparenten K_M und V_{max} Werten bei anderen Enzymen	62
4	Diskussion.....	64
4.1	<i>Charakterisierung von YLNDH2 in mitochondrialen Membranen</i>	64
4.2	<i>Untersuchung des Reaktionsmechanismus von YLNDH2</i>	64
4.3	<i>Struktur und Funktion von YLNDH2</i>	65
4.3.1	Physiologische Funktion von NDH2	65
4.3.2	Zielgerichtete Mutationen im offenen Leseraster von YLNDH2	66

4.3.3	Identifikation des nativen N-Terminus von YLNDH2	68
4.4	<i>Die Abhängigkeit von V_{max} und K_M kann mit dem Modell externer Diffusionslimitierung beschrieben werden.....</i>	68
4.4.1	Externe Diffusionslimitierung bei YLNDH2 und anderen Enzymen	72
5	Zusammenfassung und Ausblick	74
5.1	<i>Zusammenfassung.....</i>	74
5.2	<i>Ausblick.....</i>	76
5.2.1	Reinigung der YLNDH2 mittels Affinitätschromatographie.....	76
5.2.2	Weitere Studien zur Diffusionslimitierung hydrophober Substrate	77
5.2.3	Bindungsstellen für NADH und FAD	77
5.2.4	Kristallisation.....	77
5.2.5	Physiologische Funktion von YLNDH2.....	78
6	Literatur.....	79
7	Anhang.....	86
7.1	<i>NDH2 Gen (ACC. No. AJ006852).....</i>	86
7.2	<i>Sequenz des NUAM Gens (ACC. No. AJ249781)</i>	88
7.3	<i>„Multiple Cloning site“ des Expressionsvektors pRSETA.....</i>	90
7.4	<i>Verwendete Oligonukleotide</i>	91
7.5	<i>Beginn eines Protokolls zur Isolierung von NDH2 aus <i>Y. lipolytica</i> mittels Affinitätschromatographie</i>	92
7.5.1	Herstellung eines Konstrukts zur Expression von NDH2 mit N-terminalem His-tag als internes Enzym	92
7.5.1.1	Der C-Terminus von NDH2 ist essentiell für die messbare Aktivität des Enzyms	93
7.5.2	Herstellung eines Konstrukts zur Expression von YLNDH2 mit C-terminalem His-tag	94
7.5.3	Darstellung der beiden Stämme mit His-tag tragender NDH2.....	94
7.5.4	Extraktion der His-tag tragenden NDH2 aus Membranen	96
7.5.5	Affinitätschromatographie und anschließende Reinigungsschritte des internen Konstrukts mit N-terminalem His-tag	97
7.5.6	Affinitätschromatographie und anschließende Reinigungsschritte des externen Konstrukts mit C-terminalem His-tag	98

7.6	<i>Verwendete Chinonanaloga</i>	101
7.7	<i>Verzeichnis der Abkürzungen</i>	102
7.8	<i>Verzeichnis der Abbildungen</i>	104
7.9	<i>Verzeichnis der Tabellen</i>	106

1 Einleitung

1.1 Die mitochondriale Atmungskette

Die Umwandlung von der in der Nahrung enthaltenen Energie in eine für den Stoffwechsel nutzbare Form geschieht in aeroben Organismen durch oxidative Phosphorylierung. Diese bildet den letzten Schritt der vollständigen Oxidation von Substraten wie z.B. Glucose unter Verbrauch von Sauerstoff. Die oxidative Phosphorylierung findet in der Atmungskette statt, die in Eukaryontenzellen in der inneren Mitochondrienmembran, in Bakterien in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Elektronen der Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 , die vor allem aus dem Citratzyklus und der Fettsäureoxidation stammen, werden über die Atmungskettenkomplexe bis auf den terminalen Endakzeptor Sauerstoff weitergeleitet, der dadurch zu Wasser reduziert wird. Dieser Elektronentransport verläuft entlang einer Kette von prosthetischen Gruppen, deren Redoxpotentiale immer positiver werden; er ist daher exergon, setzt also Energie frei. Die freiwerdende Energie wird von den Atmungskettenkomplexen dazu genutzt, Protonen über die Membran zu pumpen. Der entstehende Protonengradient treibt die ATP-Synthase an, die durch Rückfluss von Protonen über die Membran ADP zu ATP phosphoryliert. Der Zusammenhang des Elektronentransportes mit der Energiekonservierung über einen Protonengradienten wurde erstmals 1961 als „Chemiosmotische Theorie“ postuliert [Mitchell, 1961].

Die Redoxkomplexe der mitochondrialen Atmungskette sind große, meist transmembrane Enzyme, die Elektronen aufnehmen und weitergeben. Neueren Erkenntnissen zufolge sind sie nicht wahllos in der inneren mitochondrialen Membran verteilt, sondern zu übergeordneten Strukturen, sog. Superkomplexen zusammengelagert [Schägger und Pfeiffer, 2000; Schägger, 2001 und 2002]. In Säugetierzellen besteht die mitochondriale Atmungskette aus vier (mit der ATP-Synthase fünf) multimeren Enzymkomplexen (siehe auch Abb. 1.2), in der Reihenfolge ihrer Redoxpotentiale aus der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), der Ubihydrochinon: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III) und der Cytochrom *c*:Sauerstoff Oxidoreduktase (Komplex IV).

In andere Organismen wie Pflanzen, Pilzen oder Bakterien gibt es eine Vielzahl von Verkürzungen oder alternativen Varianten dieses Elektronentransportweges.

1.2 Alternative Dehydrogenasen

Neben der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH-1), dem Komplex I der Atmungskette, stellen nicht-protonenpumpende NAD(P)H Dehydrogenasen (NDH-2) einen alternativen Stoffwechselweg dar. Sie katalysieren ebenso wie Komplex I die Elektronenübertragung von NADH oder NADPH auf Ubichinon, pumpen jedoch dabei keine Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Alternative Dehydrogenasen sind in den Atmungsketten von Pflanzen [Rasmusson *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2003], Pilzen [de Vries und Grivell, 1988; Kerscher *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 1999 und 2001; Duarte *et al.*, 2003], Eubakterien [Björklöf *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2001] und Archaeobakterien [Gomes *et al.*, 2001; Bandejas *et al.*, 2002 und 2003] verbreitet und unterscheiden sich in mehreren Aspekten grundsätzlich von Komplex I. Im Gegensatz zu dem großen Multiproteinkomplex bestehen sie nur aus einer Polypeptidkette und haben eine Masse von 40-60 kD. Alle bislang untersuchten alternativen Dehydrogenasen sind insensitiv gegen klassische Komplex I Inhibitoren wie beispielsweise Piericidin A und Rotenon. Mit Ausnahme der erst kürzlich identifizierten Enzyme aus den thermophilen Archebakterien *Acidianus ambivalens* und *Sulfolobus metallicus* enthalten alle alternativen Dehydrogenasen ein nicht kovalent gebundenes FAD als prosthetische Gruppe. Die archebakteriellen Enzyme enthalten ein kovalent gebundenes FMN, was möglicherweise eine Adaptation an die extremen Temperaturen der Umgebung dieser Organismen darstellt. Eine weitere Ausnahme bildet die als Dimer vorliegende 33 kD große NADH Dehydrogenase aus dem afrikanischen Parasiten *Trypanosoma brucei* [Fang und Beattie, 2002], die ebenfalls nicht kovalent gebundenes FMN als prosthetische Gruppe trägt.

1.2.1 Interne und externe Orientierung von NDH2

Welche physiologische Rolle alternative NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreduktasen spielen, ist weitestgehend ungeklärt. Sie sind peripher mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert, wobei ihr aktives Zentrum entweder zur cytosolischen Seite der Membran gerichtet sein kann (externe Enzyme) oder zur Matrixseite (interne Enzyme). Die Elektronenübertragung von NAD(P)H auf Ubichinon ist nicht mit dem Aufbau eines Protonengradienten über die Membran gekoppelt. Von Møller [2001] wurde vorgeschlagen, dass alternative Dehydrogenasen daher als „Überlauf-System“ für Elektronen fungieren, um oxidierte Coenzyme in Form von NAD^+ oder NADP^+ für andere Stoffwechselwege zurück zu

gewinnen und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch „Elektronenstau“ in der Atmungskette zu vermeiden.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt drei alternative Dehydrogenasen, von denen zwei (SCNDE1 und SCNDE2 [Luttik *et al.*, 1998; Small und McAlister-Henn, 1998]) extern und eines (SCNDI1 [Marres *et al.*, 1991; de Vries *et al.*, 1988 und 1992]) intern orientiert ist. Das letztere übernimmt in *S. cerevisiae* die metabolische Funktion des fehlenden Komplex I, nämlich die Elektronen von matrixständigem NADH in die Atmungskette einzuspeisen. Eine $\Delta ndi1$ Deletionsmutante war zwar in der Lage, auf Glucose oder Ethanol zu wachsen, nicht aber auf Acetat oder Pyruvat, bei deren Abbau Reduktionsäquivalente ausschließlich in der Matrix entstehen [Marres *et al.*, 1991]. Demgegenüber wuchsen $\Delta nde1$ und sogar $\Delta nde1/\Delta nde2$ Deletionsmutanten unter Glucose-limitierten Bedingungen respiratorisch [Luttik *et al.*, 1998]. Das bedeutet, dass *S. cerevisiae* andere Mechanismen als alternative Dehydrogenasen besitzen muss, um Elektronen von cytosolisch generiertem NADH in die Atmungskette zu schleusen.

Der filamentöse Pilz *Neurospora crassa* besitzt sowohl Komplex I als auch drei alternative Dehydrogenasen, NDE1 [Melo *et al.*, 1999 und 2001], NDE2 [Carneiro *et al.*, 2003] und NDI1 [Duarte *et al.*, 2003]. NDE2 kann sowohl NADH, als auch NADPH oxidieren. Doppel- ($nde1\Delta/nde2\Delta$) und sogar Dreifachmutanten ($nde1\Delta/nde2\Delta/ndi1\Delta$) waren uneingeschränkt lebensfähig [Carneiro *et al.*, 2003]. Bereits 1988 war es Selker und Garrett gelungen, Deletionsmutanten von Komplex I durch „repeat induced point mutations“ zu erzeugen. Allerdings war es nicht möglich, haploide Doppelmutanten aus Kreuzungen des $ndi1\Delta$ Stammes mit letalen Komplex I Mutanten zu erzeugen [Duarte *et al.*, 2003]. Diese Versuche belegen, dass NDI1 in *N. crassa* Mitochondrien offensichtlich die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I kompensieren kann, und dass NDI1 die einzige intern orientierte alternative Dehydrogenase ist. Überraschenderweise war eine Kreuzung zwischen einem $nde2\Delta$ Stamm und Mutanten in essentiellen Genen von Komplex I ebenfalls unmöglich [Carneiro *et al.*, 2003], obwohl NDI1 im genetischen Hintergrund vorhanden war. Die Autoren folgerten, dass NDE2 bei Verlust des Komplex I möglicherweise ein Defizit der NADH Oxidation in der mitochondrialen Matrix ausgleicht. Dies würde voraussetzen, dass *N. crassa* Möglichkeiten hat, Reduktionsäquivalente zwischen matrixständigem und cytosolischem NADH auszutauschen. Die Expression der NDE2 und der NDI1 aus *Neurospora crassa* wird am Ende der exponentiellen Wachstumsphase stark herunterreguliert [Carneiro *et al.*, 2003].

Unser Modellorganismus, die obligat aerobe Hefe *Yarrowia lipolytica*, besitzt auch Komplex I [Djafarzadeh *et al.*, 2000], im Gegensatz zu *N. crassa* jedoch nur eine einzige Genkopie für eine extern orientierte alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase [Kerscher *et al.*, 1999]. Die Deletion des NDH2 Gens durch homologe Rekombination beeinflussten das Wachstum der Zellen in Voll- und Minimalmedium nicht. Im Gegensatz zu der Situation in *N. crassa* war es nicht möglich, haploide Deletionsmutanten von essentiellen Komplex I Untereinheiten zu erzeugen [Kerscher *et al.*, 2001]. Es war jedoch vor Beginn dieser Arbeit gelungen, eine gekürzte Variante des NDH2-Leserahmens mit der Präsequenz der Komplex I Untereinheit NUAM zu fusionieren und damit die alternative Dehydrogenase an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran zu exprimieren. Mit Hilfe dieser NDH2₁ konnten haploide Deletionsmutanten von Komplex I Untereinheiten erzeugt, sowie das Wachstum von Zellen in Gegenwart des Komplex I Hemmstoffes DQA ermöglicht werden [Kerscher *et al.*, 2001].

1.2.2 Substrate und Inhibitoren

Alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktasen reagieren mit einer Reihe von Chinonanaloga wie Q₁, Q₂, Q₆, und Q₁₀, n-Decylubichinon (DBQ), Hydroxydecyl-Ubichinon, Durochinon und Menachinon, sowie mit den artifiziellen Elektronenakzeptoren DCPIP und Ferricyanid. Die höchste NADH-Oxidationsrate hatte NDH1 aus *S. cerevisiae* mit Q₂, einem weniger hydrophoben Analogon, als dem natürlich vorkommenden Q₆ [de Vries und Grivell, 1988]. Die überexprimierte und mittels Affinitätschromatographie gereinigte NDH2 aus *E. coli* zeigte mit Q₁, Q₂ und DBQ hohe Aktivitäten, mit Durochinon, DCPIP und Ferricyanid jedoch nur sehr geringe [Björklöf *et al.*, 2000]. Die Autoren folgerten daraus, dass das katalytische Zentrum des Enzyms wahrscheinlich für wasserlösliche Akzeptoren nur schwer zugänglich ist.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Elektronenakzeptoren sind alle auf Substratspezifität hin untersuchten alternativen Dehydrogenasen auf NADH und NADPH als Substrat beschränkt. Kein bislang gefundenes Enzym oxidierte deamino-NADH (von [Matsushita *et al.*, 1987] zum erstenmal postuliert), was sich für die ausschließliche Messung von Komplex I Aktivitäten in Gegenwart von alternativen Dehydrogenasen als nützlich erwiesen hat. Sauerstoffelektrodenmessungen an intakten Mitochondrien von *N. crassa* ergaben, dass ein externes Enzym (NDE1) NADPH oxidiert [Melo *et al.*, 2001], das andere (NDE2) sowohl NADH als auch NADPH [Carneiro *et al.*, 2003]. Unser Modellorganismus *Y. lipolytica*

konnte weder dNADH noch NADPH als Substrat für alternative Dehydrogenase Aktivität nutzen, wie von Kerscher *et al.* [1999] anhand von Messungen mit mitochondrialen Membranen in Gegenwart eines Komplex I Inhibitors herausgefunden wurde.

Alternative NADH:Ubichinon Dehydrogenasen katalysieren eine Reaktion zwischen zwei Substraten, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften grundlegend voneinander unterscheiden, dem wasserlöslichen (hydrophilen) NADH und dem größtenteils hydrophoben Ubichinon, bzw. dessen Analoga. Kinetische Messungen an teilweise gereinigter NDI1 aus *S. cerevisiae* zeigten, dass die Elektronenübertragung von NADH auf den artifiziellen, wasserlöslichen Akzeptor DCPIP einem Ping-Pong Mechanismus folgt [Velázquez und Pardo, 2001]. Dies könnte bedeuten, dass beide Substrate in ein- und derselben Tasche des Enzyms binden. Den gleichen Reaktionsmechanismus fanden auch Fang und Beattie [2002] für die NADH:DCPIP Oxidoreduktase Aktivität einer gereinigten, als Dimer vorliegenden Rotenon-insensitiven Dehydrogenase von *T. brucei* heraus. Entsprechende Messungen mit einem physiologischen Akzeptor lagen zu Beginn der Arbeit nicht vor; der Reaktionsmechanismus ist unbekannt.

Es wurden bislang kaum spezifische Hemmstoffe für alternative NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreduktasen gefunden. Alternative Dehydrogenasen sind insensitiv gegen die klassischen Komplex I Inhibitoren wie beispielsweise Piericidin A, Amytal und Rotenon. Ältere Studien verweisen auf Dicumarol [Day und Wiskisch, 1975] und Flavon [Referenz in Ravanel *et al.*, 1990] als Hemmstoffe für „exogene NADH Dehydrogenase“ in Pflanzenmitochondrien. Flavon hemmte die NADH:Q₂ Aktivität von NDI1 in *S. cerevisiae* mit einer I₅₀ von 95 µM [de Vries und Grivell, 1988]. Eine Studie über die Hemmwirkung von verschiedenen Hydroxyflavonen auf die externe alternative Dehydrogenase von Pflanzen [Ravanel *et al.*, 1990] ergab, dass Platanetin mit einer I₅₀ von 2 µM ein wirksamer Hemmstoff für dieses Enzym ist. Es stellte sich jedoch heraus, dass es auch die interne alternative Dehydrogenase mit einer I₅₀ von 15 µM, sowie Komplex I mit einer I₅₀ von 33 µM hemmte [Roberts *et al.*, 1996]. Auf eine mögliche Hemmwirkung auf konsekutive und alternative Atmungskettenenzyme wurden Chinolone [Reil *et al.*, 1997] und Acridone [Oettmeier *et al.*, 1994] getestet. Acridone können als Hemmstoffe auf externe NADH Dehydrogenasen wirken, wenn sie mit einer Carboxylgruppe substituiert sind [Oettmeier *et al.*, 1994]. Dabei zeigte 7-Iodo-Acridon-4-Carboxylat (IACA) die beste Hemmwirkung; diese war jedoch ebenfalls nicht auf das externe Enzym beschränkt [Roberts *et al.*, 1996].

1.2.3 Konservierte Sequenzmotive

1.2.3.1 Dinukleotid Bindungsstellen

Alle bislang untersuchten alternativen NADH:Ubichinon Oxidoreduktasen, enthalten mehrere hochkonservierte Sequenzmotive (Abb. 1.1 nach Kerscher *et al.*, 1999). Zwei Dinukleotid Bindungsstellen I und II erfüllen alle von Wierenga *et al.* [1985] postulierten Kriterien einer $\beta\alpha\beta$ Dinukleotid Bindungsdomäne, bestehend aus zwei parallelen β -Strängen, die durch eine α -Helix miteinander verbunden sind, nämlich (1) drei Glycine im Abstand GXGXXG zwischen dem ersten β -Strang und der α -Helix, (2) neutrale bzw. hydrophobe Reste in definierten Abständen an den entsprechend markierten Stellen des Motivs, (3) ein negativ geladener Rest am C-terminalen Ende, sowie (4) ein hydrophiler Rest am N-Terminus. Man geht davon aus, dass diese Motive die Bindungstaschen für den nicht kovalent gebundenen Cofaktor FAD und das Substrat NADH formen, wobei deren Zuordnung noch nicht geklärt wurde. Das nahe dem N-Terminus lokalisierte Dinukleotid Bindungsmotiv I der *E. coli* Sequenz wurde von Björklöf *et al.* [2000] als FAD Bindungsstelle vorgeschlagen. Diese Annahme wird gestützt durch die Kristallstruktur einer Lipoamid Dehydrogenase [Mattevi *et al.*, 1991 und 1992], einem Enzym, das zu NADH:Ubichinon Oxidoreduktasen homolog ist. In dieser Struktur bindet der Cofaktor FAD an die erste der beiden $\beta\alpha\beta$ Domänen.

In mehreren der homologen Enzyme in Abb. 1.1 gibt es Abweichungen von den Dinukleotid Bindungsmotiven. So ist beispielsweise bei *Y. lipolytica* und in allen anderen Hefen (aber nicht in ND11 aus *N. crassa*) das dritte der hochkonservierten Glycine durch Serin oder Alanin ersetzt und der postulierte negativ geladene Rest am C-Terminus ist nur bei *E. coli* als Aspartat vorhanden. Ein weiteres augenfälliges Merkmal in der *E. coli* Sequenz ist eine Folge von basischen Resten an Position 30-35 (RKKKAK), die in den übrigen Enzymen an der homologen Position fehlt. Ein ähnliches Cluster ist jedoch nahe dem N-Terminus des Motivs vorhanden. Möglicherweise erfüllen diese positiv geladenen Reste eine ähnliche Funktion, wie z.B. die Stabilisierung des Dinukleotids oder eine Interaktion mit den negativ geladenen Phospholipiden der Mitochondrienmembran.

Dinukleotid Bindungsstelle II erfüllt dieselben Kriterien wie I, zeichnet sich aber durch einen ungewöhnlich langen α -helikalen „Loop“ aus.

Dinukleotid-Bindungsstelle I

<i>Y.l.</i>	NDH2	82	PSDQLPAD-----PSKKT	TLVVLGSGWGSVSFLKKLDTSN-----	YINVIVVSPR	144
<i>N.c.</i>	NDE2	81	PGPQVEPD-----PSKKT	TLVVLGTGWSVSLKKLDTEH-----	YINVIVISPR	143
<i>S.c.</i>	NDE1	76	PSTQVPQSDTFPNGSKRKT	LVILGSGWGSVSLKLNLD TTL-----	YNVVVVSPR	144
<i>S.c.</i>	NDE2	61	PPKQVPQSTAFANGLKKK	ELVILGTGWGAISLLKKLDTSL-----	YNVTVVSPR	129
<i>S.c.</i>	NDI1	28	PQH-----SDKPN	VLILGSGWGAISFLKHIDTKK-----	YNVSIISPR	85
<i>N.c.</i>	NDE1	111	IFLDDDDSEEKKKKHKEP	RLVILGGWGSVALLKELNPDD-----	YHVTVVSPA	179
<i>S.t.</i>	NDB	45	-VVEQNQPESKKK-----	RVVVLGTGWSVTSFLKDVDISS-----	YDVQVVSPR	87
<i>S.t.</i>	NDA	50	-----GLEATKSDQK	PRIVVLGSGWACRMLKDIDTNI-----	YDVVCVSPR	91
<i>A.t.</i>	AtNDI1	57	LEPQRYDGLAPTKEGEK	PRVVLGSGWACRVLKGIDTSI-----	YDVVCVSPR	105
<i>N.c.</i>	NDI1	39	-----KDRKER	VVLGSGWACYSFAKDLDPDK-----	YERIFISPR	74
<i>E.c.</i>	NDH2	1	-----TTPLKK	IIVVGGCAGLEMATQLGHKLG	RKKKAKITLVL	41

Dinukleotid

Bindungsmuster

△ □ G G G □ □

□ □ Θ

Apolar/aromatischer Bereich I

<i>Y.l.</i>	NDH2	145	NYFLFTPLLPS	156
<i>N.c.</i>	NDE2	144	NYFLFTPLLPS	155
<i>S.c.</i>	NDE1	145	NYFLFTPLLPS	156
<i>S.c.</i>	NDE2	130	SFFLFTPLLPS	141
<i>S.c.</i>	NDI1	86	SYFLFTPLLPS	97
<i>N.c.</i>	NDE1	180	NYFLFTPLLPS	191
<i>S.t.</i>	NDB	88	NYFAFTPLLPS	99
<i>S.t.</i>	NDA	92	NHMFVFTPLLAS	103
<i>A.t.</i>	AtNDI1	106	NHMFVFTPLLAS	117
<i>N.c.</i>	NDI1	75	SYFVFTPLLAS	86
<i>E.c.</i>	NDH2	42	HSHLWKPLLHE	53

Apolar/aromatischer Bereich II

<i>Y.l.</i>	NDH2	245	EIPFDYLVVGVGAMSSTFGIPGVQENACFLKE	246
<i>N.c.</i>	NDE2	212	EIPYDMLVVGVGAENATFGIPGVREHTCFLKE	244
<i>S.c.</i>	NDE1	211	DLKYDYLVVGVGAQFNTFGTPGVYHYSSFLKE	243
<i>S.c.</i>	NDE2	196	SLSYDYLVVSVGAKTTTFNIPGVYGNANFLKE	228
<i>S.c.</i>	NDI1	165	EIKYDYLVISAVGAENPTFGIPGVTDYGHFLKE	197
<i>N.c.</i>	NDE1	244	YVPYDKLVIAVGSTTNPFGVKGLENCHFLKD	276
<i>S.t.</i>	NDB	157	SLQYDYLVVAVGAQVNTFNTPGVMEHCHFLKE	189
<i>S.t.</i>	NDA	164	NVSYDKLVIASGAHALTFGIKGVNEHATFLRE	196
<i>A.t.</i>	AtNDI1	178	KIAYDKLVLACGAENASTFGINGVLENAIFLRE	210
<i>N.c.</i>	NDI1	158	DVPYDKLVIAACGAYSQTFGIEGVREHANFLRD	190
<i>E.c.</i>	NDH2	110	KIAYDTLVMALGSTSNDFNTPGVKENCIFLDN	142

Dinukleotid-Bindungsstelle II

<i>Y.l.</i>	NDH2	277	HTVVVGGGPTGVEFAAELQDFEFEDDLRKWIP-DIRDDFKVTLVEA	321
<i>N.c.</i>	NDE2	276	HMVVVGGGPTGVEFAGELQDFFEEDIKLLIP-DIADRFRVTLIEA	320
<i>S.c.</i>	NDE1	275	SFVVVGGGPTGVEFAAELRDYVDQDLRKWMP-ELSKKIKVTLVEA	319
<i>S.c.</i>	NDE2	260	TFVVVGGGPTGVEFAAELQDYINQDLRKWMP-DLSKEMKVILIEA	304
<i>S.c.</i>	NDI1	229	SIVVVGGGPTGVEAAGELQDYVHQDLRKFLP-ALAEVQIHLVEA	273
<i>N.c.</i>	NDE1	308	SFVVCGGGPTGVEFAAELFDLLNEDLTLHFPRLLRNEISVHLIQS	353
<i>S.t.</i>	NDB	221	HFVIVGGGPTGVEFAAELHDYVYEDLVKLYP-SVKDFVKITVIQS	265
<i>S.t.</i>	NDA	228	HCVVVGGGPTGVEFSGELSDFILKDVHQRYA-HVKDYIHVTLIEA	272
<i>A.t.</i>	AtNDI1	242	HCVVVGGGPTGVEFSGELSDFIMKDVQRYS-HVKDDIRVTLIEA	286
<i>N.c.</i>	NDI1	226	HFAIVGGGPTGIEYASELHDLIHDDLKMYP-DLLKFVRI TVYDV	270
<i>E.c.</i>	NDH2	170	NIAIVGGGATGVELSAELHNAVKQLHSYGYKGLTNEALNVTLVEA	215

Dinukleotid

Bindungsmuster

△ □ G G G □ □

□ □ Θ

Abb. 1.1 Sequenzvergleich hochkonservierter Bereiche von alternativen NADH:Ubichinon Oxidoreduktasen aus *Yarrowia lipolytica* (*Y.l.*), *Neurospora crassa* (*N.c.*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*), *Solanum tuberosum* (*S.t.*), *Arabidopsis thaliana* (*A.t.*) und *Escherichia coli* (*E.c.*). Die drei Glycine beider Dinukleotid Bindungsmuster sind in rot unterlegt, apolare und aromatische Resten in den beiden entsprechenden Bereichen in gelb. Positiv bzw. negativ geladene Aminosäuren sind in türkis bzw. rosa hervorgehoben, zur besseren Übersicht in Dinukleotid-Bindungsstelle I und II nur diejenigen Reste, die auch im Text besprochen werden. Das Dinukleotid Bindungsmuster nach Wierenga ist folgendermaßen abgekürzt: (G) Glycine, (Δ) hydrophiler Rest am N-Terminus, (□) neutrale bzw. hydrophobe Reste in definierten Abständen und (Θ) saurer Rest am C-Terminus.

1.2.3.2 Apolar/aromatische Bereiche

Zwischen den beiden Dinukleotid Bindungsmotiven liegen zwei Bereiche, die durch eine hohe Anzahl konservierter apolarer und aromatischer Reste auffallen. Der erste schließt sich unmittelbar an die erste Dinukleotid Bindungsstelle an; im zweiten sind apolar/aromatische Blöcke von geladenen Resten flankiert. Obwohl kein klassisches Bindungsmotiv nach Rich und Fischer [1999] vorhanden ist, könnten die beiden Bereiche an der Bindung von Ubichinon beteiligt sein. Ebenfalls als putative Q-Bindungsstelle wurde von de Vries *et al.* [1992] Tryptophan 337 in SCNDI1 vorgeschlagen, das in *Y. lipolytica* Tryptophan 385 entspricht.

1.2.3.3 Membranassoziation

So wie die Interaktion mit dem hydrophoben Substrat Ubichinon ist auch die Assoziation alternativer NADH:Ubichinon Oxidoreduktasen mit der inneren Mitochondrienmembran bislang ungeklärt. In keiner der Sequenzen wurden Transmembranhelices gefunden; in NDE1 von *N. crassa* wurde jedoch eine α -helikale Domäne vermutet, die das Enzym N-terminal an der Membran verankern könnte [Melo *et al.*, 2001].

In vitro Import Versuche mit dem internen Enzym aus *S. cerevisiae* [de Vries *et al.*, 1992] zeigten, dass dabei eine 26 Aminosäuren lange Präsequenz abgespalten wird. Der N-Terminus der gereinigten NDI1 aus *N. crassa* [Duarte *et al.*, 2003] war um 31 Aminosäuren verkürzt. Ebenfalls in *in vitro* Import Versuchen zeigten Moore *et al.* [2003], dass das NDI1 Precursor-Protein von *A. thaliana* eine Masse von 60 kD hatte, das prozessierte nur noch eine Masse von 56 kD. Demgegenüber werden jedoch offensichtlich auch bei externen alternativen Dehydrogenasen Präsequenzen abgespalten, wie z.B. 41 Aminosäuren bei NDE1 aus *S. cerevisiae* (N-terminale Sequenzierung des gereinigten Enzyms [Luttik *et al.*, 1998]) und vermutlich 54 Aminosäuren bei NDE2 aus *N. crassa* (Vorhersage anhand der Sequenz [Carneiro *et al.*, 2003]).

Laut Rasmussen *et al.* [1999] könnte auch der weniger hochkonservierte C-terminale Teil von alternativen Dehydrogenasen an einer Membranassoziation beteiligt sein, da die in *E. coli* überexprimierte NDA aus *S. tuberosum* nicht mehr an Membranen gebunden wurde, sobald der C-Terminus des Enzyms durch Proteasen abgebaut worden war.

1.3 Die Hefe *Yarrowia lipolytica*

Die obligat aerobe Hefe *Yarrowia lipolytica* vereinigt viele Vorteile als Modellorganismus, um Struktur und Funktion von Komplex I und alternativer Dehydrogenase zu studieren. Sie besitzt im Gegensatz zu *S. cerevisiae* eine vollständige Atmungskette mit allen Redoxkomplexen, die auch in Säugetieren vorhanden sind (siehe 1.1 und Abb. 1.2). Wie bereits angesprochen, besitzt *Y. lipolytica* nur eine einzige, extern orientierte alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase [Kerscher *et al.*, 1999]. Als weiterer alternativer Stoffwechselweg ist außerdem eine cyanid-resistente Ubihydrochinon Oxidase vorhanden, die Elektronen von Ubihydrochinon direkt auf Sauerstoff übertragen kann, dabei jedoch keine Protonen über die Membran pumpt. Als natürliche Ubichinonspezies kommt Q₉ in der inneren Mitochondrienmembran von *Y. lipolytica* vor, also ein Chinon mit 9 Isoprenoid Einheiten. Dies entspricht ebenfalls eher der Situation in Säugetiermitochondrien (Q₉₋₁₀) als in *S. cerevisiae* (Q₆).

Y. lipolytica wurde als hefegenetisches System bestens etabliert und beschrieben [Barth und Gaillardin, 1997; Ahlers *et al.*, 2000a; Kerscher *et al.*, 2002]. Sie ist nicht pathogen und wächst bei einem Temperaturoptimum von 28°C mit hohen Zellausbeuten. Die Hefe kommt unter natürlichen Bedingungen als Lebensmittelkontaminante in Milch-, Fleisch-, Fisch- und Käseprodukten vor. Aufgrund ihrer Fähigkeit, organische Verbindungen wie Zitronensäure [Arzumanov *et al.*, 2000] oder α -Ketoglutarat [Chernyavskaya *et al.*, 2000] zu synthetisieren und verschiedene Enzyme extrazellulär auszuschleiden [Pignede *et al.*, 2000; McEwen und Young, 1998; Ogrydziak, 1993; Cheng und Ogrydziak, 1986 und 1987], ist sie auch in der Biotechnologie von Bedeutung.

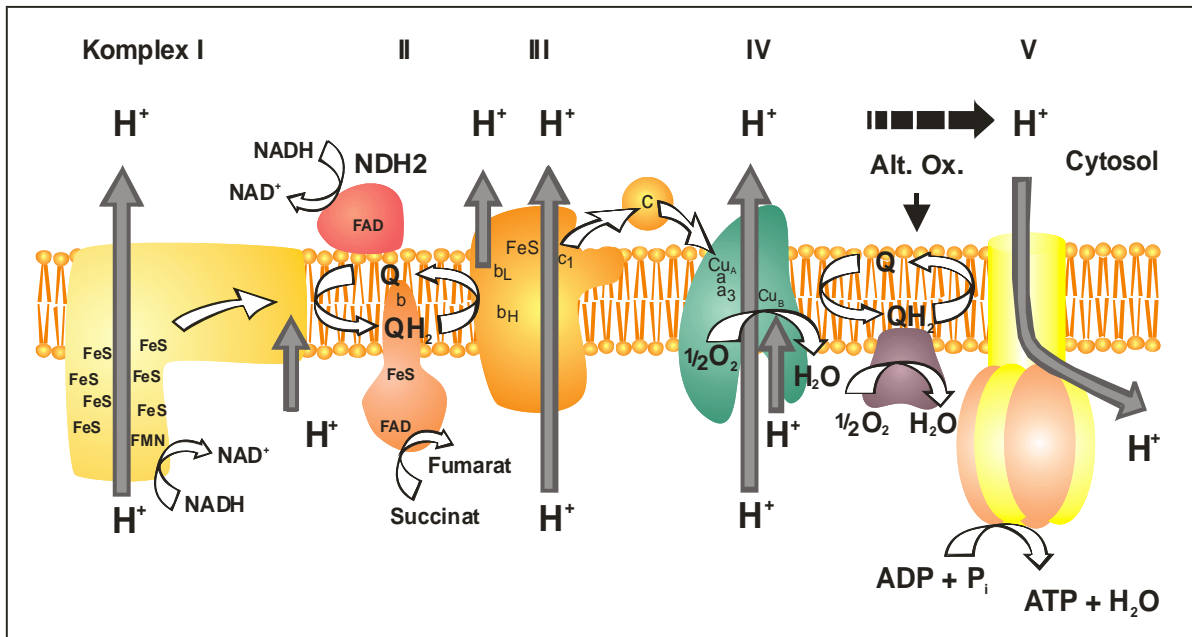


Abb. 1.2 Die mitochondriale Atmungskette der obligat aeroben Hefe *Yarrowia lipolytica*.

Die vier protonenpumpenden Atmungskettenkomplexe sind analog zu Säugetiermitochondrien Komplex I (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase), Komplex III (Ubihydrochinon:Cytochrom *c* Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom *c*:Sauerstoff Oxidoreduktase). Die ATP-Synthase wird auch als Komplex V bezeichnet. Die beiden alternativen, nicht-protonenpumpenden Atmungskettenenzyme von *Y. lipolytica* sind die alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH2) und die alternative Ubihydrochinon Oxidase (Alt. Ox.). Der Elektronentransport ist durch weiße, die Protonentranslokation über die Membran mit grauen Pfeilen gekennzeichnet. Die redoxaktiven Gruppen der Atmungskettenenzyme sind folgendermaßen abgekürzt: FeS (Eisen-Schwefel Zentren) FMN (Flavinmononukleotid), FAD (Flavinadenindinukleotid), a, a₃, b, c, c₁ (Cytochrome *a* und *a*₃, Cytochrom *b*, Cytochrome *c* und *c*₁), Cu_{A/B} (Kupferzentren A und B).

1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, eine möglichst umfassende Charakterisierung der alternativen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase von *Y. lipolytica* (YLNDH2) in der natürlichen Membranumgebung und anhand des gereinigten Enzyms zu erhalten. Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus mit physiologischen Substraten stand dabei im Vordergrund.

Anhand von Mutagenesestudien sollten konservierte Bereiche in der Sequenz bestimmten Funktionen zugeordnet werden, beispielsweise sollte die Identität der beiden Dinukleotidbindungsstellen aufgeklärt und kritische Regionen für die Membranassoziation und die Interaktion mit dem hydrophoben Substrat Ubichinon identifiziert werden.

Schließlich sollten affinitätsmarkierte Stämme zur Reinigung der alternativen Dehydrogenase mittels Affinitätschromatographie generiert und ein Reinigungsprotokoll erarbeitet werden. Für diesen Zweck war eine umfassende Suche nach möglichen Inhibitoren für das Enzym und die Herstellung von Antikörpern gegen YLNDH2 unerlässlich.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe bezogen, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Sigma GmbH (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt):

Acrylamid; Agar (Gibco BRL Life Technologies); Agarose (Biorad Laboratories GmbH, München); Aminocaprinsäure; Aminosäuren; Ammoniumchlorid; Ammoniumsulfat; Antifoam; Bacto™ Peptone (Difco Laboratories); Bisacrylamid; Calciumchlorid; Chelating Sepharose™ Fast Flow“ (Amersham Biosciences) Chloroform; Coumarin; Pferdeherz Cytochrom *c*; Dextranblau; 2,6 dichlorobenzon-indophenol (DPCIP), Dimethylsulfoxid (DMSO); Di-Natriumhydrogenphosphat; Di-Kaliumhydrogenphosphat; d-NADH; Dnase; EDTA; Entwickler- und Fixierlösung für Röntgenfilme; Essigsäure; Ethanol (J.T. Baker, Deventer (Holland)); Ethidiumbromid; Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz; Ferricyanid; Glasperlen (0,25-0,50 mm); Glucose; Glycin; Glycerin; Harnstoff; Hefeextrakt (Gibco BRL Life Technologies); Hepes; Hexamminruthenium(III)-chlorid (HAR); Imidazol; IPTG (BioTech & Trade Service GmbH, St. Leon-Rot); Kalium-Natrium-Tartrat; KCl; KCN; Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumperchlorat; KOH; Kupfersulfat; Luminol; Lysozym; Malzextrakt; Magnesiumchlorid; Magnesiumsulfat; Methanol; β -Mercaptoethanol; Mops; Natriumacetat; Natriumazid; Natriumcitrat; NaCl; Natriumdithionit; NADH; NaOH; Nickelsulfat; Natriumdihydrogenphosphat; Natriumcarbonat; Nukleotide Phenol; PMSF; Rinderserumalbumin (Behringwerke AG, Marburg); Rnase; Röntgenfilme X-OMAT AR und BioMaxMR (Kodak); Salzsäure; Serva Blue G; Sucrose; TEMED; Tricin; Trypton (Gibco BRL Life Technologies); Tris; Wasserstoffperoxid; Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories)

Die verwendeten Oligonukleotide (siehe 7.4) wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

2.1.1.1 Chinonanaloga (siehe auch 7.6)

DBQ (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decyl-1,4-benzochinon), Q₁ (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-benzochinon), Durochinon (2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzochinon), 2-hydroxy-1,4-naphtochinon, Menadion (2-methyl-1,4-naphtochinon)

2.1.1.2 Detergentien

Dodecylmaltosid (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg), Natrium-dodecylsulfat (SDS); Triton-X-100, Tween 20

2.1.1.3 Inhibitoren

DQA (2-decyl-4-quinazolinyllamin) Aventis Crop Science, Frankfurt

HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolon) von Prof. Oettmeier (Ruhr Universität Bochum)

2.1.1.4 Antibiotika

Ampicillin, Chloramphenicol, Hygromycin B, Nystatin

2.1.2 Geräte

10 l Fermenter, Biostat E; Braun (Melsungen)

Schüttler von Braun (Melsungen) und Infors (Stuttgart) mit 1, 2 und 5 l Schikanenkolben

Autoklav, 5075 ELC, Systec GmbH (Wettenberg)

Zentrifugen

Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann Instruments GmbH (München)

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

Biofuge A, Labofuge 400, Minifuge GL und Biofuge 17RS; Heraeus (Hanau)

Cryofuge 8500i; Kendro (Langensfeld)

Rotoren

JA 10 und JA 20; Beckmann Instruments GmbH (München)

Ti 45, Ti 50.2 und Ti 70.1; Beckmann Instruments GmbH (München)

Zell-Desintegrator C; Bernd Euler Biotechnologie und Mikrobiologie (Frankfurt)

Photometer

Photodioden Array Spectrophotometer; Multi Spec 1501; Shimadzu (Duisburg)

Microplate Spectrophotometer ; SPEKTRAm[®] PLUS³⁸⁴; Molecular Devices (München)

Hoefer[®] DyNA Quant[®] 200, Pharmacia Biotech

U-3210 und U-1100 Spectrophotometer, Hitachi (Düsseldorf)

UV 300 Zweistrahlphotometer, Shimadzu (Duisburg)

Speed Vac Concentrator 100H; Fischer (Frankfurt)

Thermocycler

GeneAmp[®] PCR System 2400; Perkin Elmer (Weiterstadt)

Cyclone[®] Gradient; peqlab (Erlangen)

Elektrotransformator *E. coli* Pulser; BioRad (Hercules CA)

Abi Prism 310 Genetic Analyser mit Software Sequence Navigator; Applied Biosystems (Weiterstadt)

Biologic LP Anlage, mit einer Econo Column[®] + Flow Adapter (Ø 2,5 cm) BioRad (Hercules CA)

Bio Sys 2000 Protein-Reinigungs Workstation[®], Beckmann Instruments GmbH (München) mit einer TSKgel G 3000 SW Säule (7,5 mm×60 cm), TosoHaas GmbH (Stuttgart)

Flour S[™] MultiImager + Software „Quantity one“ (beides BioRad, Hercules CA)

2.1.3 Medien

Medien für *Yarrowia lipolytica*

Vollmedium (YPD)

2 % Bacto[™] Peptone

1 % Hefeextrakt

2 % Glucose für Kulturen im Schüttelkolben oder

2,5 % Glucose für Kulturen im Fermenter

Vollmedium zur Konjugation (YM)

0,3 % Hefeextrakt

0,3 % Malzextrakt

0,5 % Bacto[™] Peptone

Minimalmedium (SD)

0,17 % Yeast Nitrogen Base (YNB)

0,5 % (NH₄)₂SO₄

Die Komponenten wurden sterilfiltriert und zur Herstellung von Minimalmedium der autoklavierten C-Quelle (2 % Glucose) zugegeben. Optional wurde das Medium mit 50 mM Na-Phosphat (pH 6,0) gepuffert. Je nach Selektionsbedingungen wurden außerdem 20 mg/l Histidin, 30 mg/l Lysin, 60 mg/l Leucin und 20 mg/l Uracil ebenfalls aus sterilfiltrierten Stocklösungen dazugegeben.

Medium zur Sporulation (CSM)

- 0,17 % Yeast Nitrogen Base (YNB)
- 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 50 mM Na-Citrat

Das Sporulationsmedium wurde wie das SD Medium hergestellt und je nach Selektionsbedingungen mit Aminosäuren supplementiert.

Vollmedium für *Escherichia coli* (LB)

- 1 % NaCl
- 0,5 % Hefeextrakt
- 1 % Bacto™ Trypton pH 7,5

Vollmedium für *Saccharomyces cerevisiae* (Wildtyp)

- 2 % Bacto™ Peptone
- 1 % Hefeextrakt
- 3 % Glycerol

Für feste Nährböden wurde den Medien vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar zugesetzt; für Dauerkulturen wurde 40 % sterilfiltriertes Glycerol zugegeben.

SOC-Medium zur Elektrotransformation

- 2 % Bacto™ Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl

vor Gebrauch steril zugeben:

- je 10 mM MgCl_2 und MgSO_4
- 20 mM Glucose

2.1.4 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

10×TAE Puffer	400 mM Tris/Acetat, 10 mM EDTA, pH 8,3
20×SSC-Puffer	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
TE Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Mitochondrienpuffer	20 mM Na^+ /Mops pH 7,2, 600 mM Sucrose, 1 mM EDTA

2 MATERIAL UND METHODEN

Puffer für Aktivitätstests

NADH: DBQ	20 mM Na ⁺ /Mops pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 mM KCN
NADH: HAR	20 mM Na ⁺ / Hepes pH 8,0, 250 mM Sucrose, 2 mM EDTA, 2 mM NaN ₃
DBH:Cytochrom <i>c</i>	75 mM Imidazol/HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, 5 mM KCN

Puffer für Redoxspektren

Puffer C	4 % Triton-X-100, 20 mM K ⁺ /Mops, 300 mM Sucrose, 1,2 M NaCl
Puffer D	0,5 % Triton-X-100, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 200 mM NaCl

Puffer und Lösungen für SDS Gelelektrophorese

AB-mix	(49,5 % T, 3 % C) 48 g/100 ml Acrylamid, 1,5 g/100 ml Bisacrylamid
3×SDS Gelpuffer	3 M Tris, pH 8,5, 1 M HCl, 0,3 % SDS
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 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/Entfärben	25 % Methanol, 10 % Essigsäure (0,02 % ServaBlue G)
PBS	80 mM Na ₂ HPO ₄ , 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, pH 7,5 optional mit 0,5 % (blocken) oder 0,1 % (waschen) Tween 20
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 ₂ O ₂

2.1.5 Stämme

Tab. 2.1 *Y. lipolytica* Stämme

Name	Genotyp
PIPO	<i>NUGM-Ht2, lys11-23, ura3-302, leu2-270, xpr2-322, MatA</i> [Kerscher et al., 2002]
GB 5.2	<i>ndh2::URA3, his-1, leu2-270, xpr2-322, MatB</i>
$\Delta nuam$	<i>nuam::URA3, his-1, leu2-270, xpr2-322</i>
$\Delta nuim$ IL1	<i>nuim::LEU2, lys11-23, ura3-302, xpr2-322, NDH2i, MatA</i> Der Stamm trägt eine ungerichtet ins Genom integrierte Kopie des <i>NDH2i</i> Gens.

Tab. 2.2 *E. coli* Stämme

Name	Genotyp
XL 10 Gold [®]	siehe Produktbeschreibung, Stratagene, Heidelberg
BL21(DE3)pLysS	siehe Produktbeschreibung Stratagene, Heidelberg

Tab. 2.3 *S. cerevisiae* Stämme

Name	Genotyp
W 303-1A	<i>ade2-1, his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, trp1-1, ura3-1, can1-100, MatA</i> [Brandt et al., 1994]
CB2	<i>qrc8::URA3, lys2-801, ade2-101, trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1</i> [Bruel et al., 1996]

2.1.6 Plasmide

Tab. 2.4 *E. coli* und *Y. lipolytica* Plasmide

Name	Eigenschaften	Herkunft
pUB5	pBlueskript SK ⁻ Derivat; trägt eine Fusion der <i>NUAM</i> Präsequenz (AS 1-34) und einer gekürzten Form von <i>YLNDH2</i> (AS 101-580 mit N101D) = <i>NDH2i</i>	Kerscher et al., 2001
pUB4	pINA443 Derivat; <i>E. coli/Y. lipolytica</i> "Shuttle"-Vektor, in dem der <i>URA3</i> Marker durch das <i>HygB^R</i> Gen ersetzt wurde	Barth & Gaillardin, 1996 Kerscher et al., 2001
pUB7	4,3 kb <i>SalI</i> Fragment des <i>NDH2i</i> Fusionsgens aus pUB 5 in pUB4	Kerscher et al., 2001
pE8	genomischer Klon der <i>YLNDH2</i>	Kerscher et al., 1999
pBlueskript SK ⁻	siehe Produktbeschreibung	Stratagene (Heidelberg)
pRSET A	siehe Produktbeschreibung	Invitrogen (Groningen, NL)

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Gelelektrophorese von DNA

DNA wurde standardmäßig in 1 % Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1×TAE Puffer aufgetrennt. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurde die Agarosekonzentration von 0,7-3,0 % variiert. Für präparative Gele wurde UV-safe Puffer (MWG-Biotech; Ebersberg) verwendet. Die eingesetzten Molekulargewicht-Standards waren 1 kb Ladder und 100 bp Ladder Plus (MBI Fermentas; St. Leon-Rot).

2.2.2 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs GmbH (Frankfurt) laut den Angaben des Herstellers.

2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus präparativen Agarosegelen wurde das „Easy Pure“ DNA Purification Kit von Biozym (Hess. Oldendorf) verwendet.

2.2.4 Phosphorylierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte miteinander ligieren zu können, müssen die 5'-Enden eines Fragments phosphoryliert werden. Für die Phosphorylierung nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* [2000] wurde T4 Polynukleotid Kinase (New England Biolabs) verwendet. Alternativ zum fertigen Fragment können auch die Primer vor der PCR phosphoryliert werden.

2.2.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um bei Klonierungen von DNA-Fragmenten in Vektoren die Selbstligation des leeren Vektors zu verhindern, wurde dieser mittels CIP (calf intestine alkaline phosphatase) oder SAP (shrimp alkaline phosphatase) nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim, Mannheim) dephosphoryliert. CIP wurde mittels Phenol/Chloroform Extraktion aus dem Ansatz entfernt. SAP ist hitzedeaktivierbar.

2.2.6 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase sowie der mitgelieferte Puffer (Gibco BRL Life Technologies) verwendet. Ligationen wurden üblicherweise bei 14°C über Nacht durchgeführt.

2.2.7 Transformation von *Y. lipolytica* mit der PLATE Methode

Die Transformation von *Y. lipolytica* mit Plasmiden erfolgte nach der PLATE Methode von [Ammermann *et al.*, 1992].

2.2.8 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Y. lipolytica*

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte nach dem Protokoll „Rapid isolation of yeast chromosomal DNA“ [Ausubel *et al.*, 2000]. Um Plasmide aus *Y. lipolytica* zu isolieren, wurde die Gesamt-DNA in *E. coli* Zellen transformiert, aus welchen wiederum Plasmid-DNA isoliert wurde (siehe 2.2.9.)

2.2.9 Darstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Elektrokompetente *E. coli* Zellen des Stammes XL 10 Gold[®] (Stratagene, Heidelberg) wurden nach der Vorschrift aus den „Current Protocols“ [Ausubel *et al.*, 2000] hergestellt und bei -80°C gelagert. Sie hatten eine Transformationseffizienz von bis zu 10⁹ Kolonien/μg DNA.

2.2.10 Elektrotransformation von *E. coli*

Die Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte in einem *E. coli* Pulser (Bio-Rad) nach der beschriebenen Methode aus Current Protocols [Ausubel *et al.*, 2000]. Positive Transformanden wurden auf LB-Ampicillin selektiert.

2.2.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinem Maßstab (1,5-3,0 ml Kulturvolumen) wurden die entsprechenden Kits der Firmen Qiagen (Hilden), SeqLab (Göttingen) oder Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Zum Screenen zahlreicher Proben wurde die Präparation aus Kostengründen nach der von Zhou *et al.* [1990] beschriebenen Methode durchgeführt und die DNA für Sequenzierungen nachgereinigt.

2.2.12 Sequenzierung von Plasmid DNA

Die Amplifizierung von 200-500 ng doppelsträngiger Plasmid DNA wurde mit dem „ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit“ (Perkin Elmer, Weiterstadt) laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden bei Raumtemperatur gefällt, in 20 µl Wasser oder Formamid aufgenommen und mit einem Abi Prism 310 Genetic Analyser unter Verwendung der Software „Sequence Navigator“ sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der Software „Sequencing Analysis“ und „Auto Assembler 2.0“ ausgewertet. (Gerät und Programme von Applied Biosystems, Weiterstadt)

2.2.13 Zielgerichtete Mutagenese

Mutagenese-PCR wurde nach dem Protokoll des „QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. 5 ng oder 10 ng Plasmid-DNA (template) wurden mit je 125 ng der beiden Oligonukleotid-Primer, je 300 µM der vier Nukleotid-Triphosphate (dNTP) und 1 µl „10×Cloned *Pfu* buffer“ in einem 10 µl Ansatz zusammen pipettiert. Um Fehlhybridisierungen und Primerdimerbildung zu minimieren, wurde die Reaktion durch einen sog. „hot start“ mit demselben Volumen an „Polymerase-Mix“, also *PfuTurbo*™ DNA Polymerase (5 U) in der entsprechenden Puffer-Verdünnung eingeleitet. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µl.

Bei diesem Verfahren entstand bei Punktmutationen in jedem amplifizierten Plasmid ein Einzelstrangbruch auf dem codierenden und dem nicht-codierenden Strang, der bei der Vervielfältigung der Plasmide in *E. coli* geschlossen wurde. Bei Deletionen bzw. Insertionen im NDH2-Leseraster durch inverse bzw. Anker-PCR entstanden linearisierte Plasmide, die anschließend ligiert wurden und dementsprechend am 5'-Ende phosphoryliert sein mussten (siehe 2.2.4)

2.2.14 Konjugation

Zur Kreuzung von zwei haploiden Stämmen wurden Zellen von in YPD-Medium gewachsenen Kulturen abzentrifugiert und zu je 10^8 Zellen/ml in YM-Medium aufgenommen. Jeweils 1 ml jedes Stammes wurde mit weiteren 8 ml YM gemischt und bei 28°C 16-24 Stunden geschüttelt. Danach wurden Aliquots von 2, 20, 200 und 1000 µl auf den entsprechenden selektiven Minimalplatten ausgespatelt. Von den erscheinenden diploiden Kolonien wurde eine ausgewählt und auf den Selektivplatten weiterkultiviert.

2.2.15 Sporulation und Sporenaufarbeitung nach der „random spore detection“ Methode

Zur Sporulation eines diploiden Kreuzungsstammes wurden die Zellen zunächst in YPD-Medium angezogen, dann abzentrifugiert und zu 5×10^7 Zellen/ml in CSM-Medium mit 20 mg/ml Histidin und 30 mg/ml Lysin aufgenommen, da die entstehenden Sporen für eine der beiden Aminosäuren auxotroph sein sollten. Der Ansatz wurde 3-4 Tage bei Raumtemperatur sporuliert. 5 ml des Sporulationsansatzes wurden zur Sporenaufarbeitung eingesetzt. Die Zellen wurden bei $3000 \times g$ zentrifugiert, in 10 ml YPD-Medium aufgenommen und 2 h bei $28^\circ C$ geschüttelt. Durch die Zugabe von 0,1 M HCl wurde der pH-Wert der Kultur auf 4,5-5,0 eingestellt. Anschließend wurde 0,25 ml Nystatin, aus einer 1 mg/ml Stammlösung in Ethanol, pro 10 ml Kultur zugeben und weitere 1,5 h bei $28^\circ C$ geschüttelt. Durch Nystatinzugabe werden vegetativen Zellen abgetötet, indem ihre Zellwand geschädigt wird. Die Kultur wurde nach dieser Zeit bei $6000 \times g$ sedimentiert, einmal mit 20 ml H_2O gewaschen und in 3,5 ml SD-Medium aufgenommen. Je 0,5 ml dieser Suspension wurden auf 1 ml Reaktionsgefäße verteilt und sedimentiert. Das Sediment wurde in 0,5 ml SD-Medium, versetzt mit 12,5 % Ethanol, aufgenommen. Durch Ethanolzugabe sollten Sporen abgetötet werden, damit aus einem Askus maximal eine Spore überlebt. Nach Inkubationszeiten zwischen 30 und 120 min. wurden die Zellen abzentrifugiert und auf YPD-Platten ausgespatelt. Nach 2-3 Tagen erschienene Sporen wurden auf SD-Platten mit Lysin oder Histidin als Zusatz überimpft. Kolonien, die nur auf einer Platte wuchsen, wurden weiter untersucht.

2.2.16 Southern Blot

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA (genomische DNA: 500 ng; Plasmid-DNA: 50 ng) wurden auf einem Agarosegel mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.1) aufgetrennt. Die DNA wurde über Nacht durch die Kapillarblottechnik (Transferlösung: 0,4 M Natriumhydroxid) auf Hybond N^+ -Membranen (Amersham, Braunschweig) übertragen. Um die DNA mit der Membran zu vernetzen, wurde die Membran optional im Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) mit UV-Licht behandelt.

2.2.17 Markierung von DNA Fragmenten mit ^{32}P

DNA-Fragmente wurden mit dem „Random primer labeling kit - Prime-It[®] II Kit“ (Stratagene, Heidelberg) unter Verwendung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (25 μCi für 25 ng DNA) markiert. Zur Überprüfung der Effizienz der radioaktiven Markierung wurden je 3 μl einer 1:100 Verdünnung des Reaktionsansatzes auf zwei Filterpapier-Scheiben (Whatman DE 81-Ionenaustauschpapier, Whatman International Ltd., Maidstone (England)) pipettiert. Einer der Filter wurde zunächst 5 min. in $2\times\text{SSC}$ -Puffer, dann 5 min. in kaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden beide Filter mit einem Handgeigerzähler kontrolliert, um die Einbaurrate des markierten Nukleotids abschätzen zu können.

2.2.18 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA Sonden

Die Hybridisierung fand in einer Glasröhre eines Hybridisierungsofens (HB-1D, Techne) statt. Die Prähybridisierung wurde 15 min. bei 68°C und die Haupthybridisierung 60 min bei 68°C mit „QuikHyb[®] hybridization solution“ (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Zur Haupthybridisierung wurde das ^{32}P -markierte DNA Fragment mit 500 μl 10 mg/ml Lachs-Sperma-DNA gemischt und der Glasröhre zugesetzt. Der Blot wurde anschließend in vier Waschschritten (2×15 min. mit $2\times\text{SSC}$, 0,1 % SDS; 2×15 min. mit $0,1\times\text{SSC}$, 0,1 % SDS) von nicht-spezifisch gebundener Radioaktivität befreit. Der Ansatz wurden mit Kodak X-Omat AR Filmen mit eine Verstärkerfolie über Nacht oder länger bei -80°C exponiert.

2.2.19 Heterologe Expression von YLNDH2

Für die heterologe Expression der NDH2 aus *Y. lipolytica* wurde der *E. coli* Wirtsstamm BL21(DE3)pLysS (Stratagene, Heidelberg) und der Expressionsvektor pRSET A (Invitrogen, Gronigen, Niederlande) verwendet. Das Expressionssystem basiert auf dem aufeinanderfolgenden Anschalten von zwei induzierbaren Promotoren. Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bewirkt das Anschalten eines genomischen lacUV5 Promotors, welcher das Gens für T7 RNA Polymerase kontrolliert. Diese wiederum induziert den T7 Promotor auf dem Expressionsvektor pRSET A, unter dessen Kontrolle das Gen für das Zielprotein, also in diesem Fall NDH2, steht. Eine vorzeitige Transkription des gewünschten Gens durch einen geringen, nicht-induzierten Basalspiegel an T7 RNA Polymerase wird durch das T7 Lysozym verhindert. Dieses wird auf dem Vektor pLysS codiert und inhibiert die T7 RNA Polymerase.

Der Expressionsvektor pRSET A verfügt über eine „Multiple cloning site“, sowie über eine Polyhistidin-Metallbindungsdomäne, die es ermöglicht, das rekombinante Protein über Affinitätschromatographie zu reinigen. Eine Enterokinase-Schnittstelle zwischen dieser Bindungsdomäne und dem Zielgen erlaubt eine Abtrennung des His-tags nach der Reinigung.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Anzucht von *Yarrowia lipolytica*

Alle verwendeten *Y. lipolytica* NDH2 Wildtyp- und Mutantenstämme wurden in Vollmedium (YPD) entweder in Schikanenkolben oder im 10 l Fermenter bei 28°C gezogen.

Zum Beimpfen eines Kolbens wurde eine Kolonie des entsprechenden Klons von einer möglichst frisch ausgestrichenen YPD-Agarplatte abgenommen und in wenig Medium über Nacht geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurden am Folgetag 500 ml Hauptkultur ad mOD₆₀₀=40 angeimpft. Bei Stämmen, die das HygB^R Markergen auf einem Plasmid trugen, wurden der Vorkultur 100 mg/l, der Hauptkultur 50 mg/l Hygromycin B zugefügt. Da der Verlust (oder eine Mutation) der NDH2 keinen Einfluss auf das Wachstum von *Y. lipolytica* hat [Kerscher *et al.*, 1999], betrug die Wachstumszeit im Kolben immer 18-24 h mit einer Ausbeute von 10-20 g Zellen/l, wobei die Zellen in Gegenwart von Hygromycin B langsamer wuchsen. Der verwendete Komplex I Deletionsstamm $\Delta nuam$ pUB7 wuchs bis zu 45 h zur selben Ausbeute.

Zum Beimpfen eines 10 l Fermenters wurden 800 ml einer Flüssigkultur wie oben beschriebenen verwendet. Diese Vorkultur wurde optional unter Selektionsdruck gezogen, es wurde jedoch kein weiteres Hygromycin B in den Fermenter gegeben. Die typische Zellausbeute nach 16-18 h Wachstumszeit betrug 40-60 g/l.

2.3.2 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht des *S. cerevisiae* Wildtyp Stammes W303-1A erfolgte wie in 2.3.1 beschrieben im Schüttelkolben in Vollmedium. Es wurden jedoch 3 % Glycerol als nicht-vergärbares Substrat statt Glucose verwendet. Der Komplex III Deletionsstamm CB2 $\Delta qcr8$ wuchs in YPD, da er keine nicht-fermentierbaren Substrate verwerten konnte [Bruehl *et al.*, 1996].

2.3.3 Präparation von mitochondrialen Membranen

300-350 g frisch geerntete oder eingefrorene Zellen wurden in 550 ml eiskaltem Mitochondrienpuffer und 2 mM des Proteaseinhibitors PMSF für 2,5 h unter Kühlung im Zelldesintegrator C aufgeschlossen. Für einen Aufschluss wurden 80 ml Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) verwendet und das Rührwerk auf maximale Drehzahl eingestellt. Nach der Hälfte der Zeit wurde noch einmal 1 mM PMSF dazugegeben. Nach dem Aufschluss wurden ganze Zellen und Zelltrümmer in einem niedertourigen Zentrifugationsschritt (30 min 2000 g) abgetrennt. Der Überstand wurde durch Gaze gefiltert und die mitochondrialen Membranfragmente durch hochoptourige Ultrazentrifugation (70 min 100000 g) pelletiert. Sollten die Membranen später als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie verwendet werden, wurden sie in Mitochondrienpuffer ohne EDTA gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Membranpellets wurden in einem Potter-Elvehjen Gefäß homogenisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.4 Präparation von mitochondrialen Membranen in kleinem Maßstab

Für Membranpräparationen in kleinem Maßstab wurden 5-10 g Zellen mit 10 ml Mitochondrienpuffer, 2 mM PMSF und 10 g Glasperlen in ein Falcon-Röhrchen gegeben und 13×1 min mit Kühlintervallen auf Eis gevortext. Der Zellaufschluß wurde dekantiert und die Glasperlen mit Mitochondrienpuffer gewaschen. Alle Zentrifugations- und weiteren Schritte erfolgten wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.5 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung von Gesamtprotein wurde nach Lowry et al. [1951] mit der Modifikation von Helenius und Simons [1972] durchgeführt. Als Eichreihe diente Rinderserumalbumin (BSA) in den Konzentrationen von 0,1 bis 2,0 mg/ml.

2.3.6 Bestimmung der Cytochromgehalte in mitochondrialen Membranen

Die Aufnahme von Redoxspektren zur Bestimmung der Cytochromgehalte erfolgte am UV 300 Zweistrahlphotometer (Shimadzu) bei 500 bis 650 nm. Mitochondriale Membranen wurden ad 1:10 zunächst mit Puffer C, dann mit der gleichen Menge Puffer D verdünnt (siehe 2.1.4) und auf zwei Küvetten verteilt.

Die Meßküvette wurde mit Natrium-Dithionit reduziert, die Referenz mit Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert. Zur Berechnung der Cytochromgehalte wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

Cytochrom *c/c*₁ $\epsilon_{550-540} = 19,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Cytochrom *b* $\epsilon_{562-575} = 28,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Cytochrom *a/a*₃ $\epsilon_{605-630} = 12,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

2.3.7 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Detektion der NDH2 in Membranen und Säulenuaten wurde Tricin SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger [1994] und Schägger und von Jagow [1987] durchgeführt. Für einen optimalen Trennungsbereich wurden standardmäßig 10 % Gele mit einem aufgelagerten 4 % Sammelgel verwendet.

2.3.8 Western Blot

Das Bandenmuster eines SDS Gels wurde nach der Methode von Schägger [1994] auf eine PVDF-Membran (ImmobilonTM P, Millipore, Schwalbach) transferiert.

Zur Detektion von NDH2 mit His-tag wurde das „Strep-tag detection“ Kit von IBA (Göttingen) verwendet, jedoch mit einem Anti-poly-His IgG mAB Peroxidasekonjugat von Sigma statt des StrepTactin Peroxidasekonjugats. Diese Detektion beruht auf einer Farbreaktion. Um die Empfindlichkeit des Nachweises zu erhöhen, wurde auch eine Detektion nach dem ECL Protokoll (Amersham, aber mit eigenen Puffern) mit dem Anti-poly-His IgG mAB Peroxidasekonjugat als erstem und einem Anti-Maus IgG mAB Peroxidasekonjugat (Sigma) als zweitem Antikörper durchgeführt. Dazu wurde der gefärbte Blot zunächst für drei Minuten in Methanol entfärbt. Um alle unspezifischen Bindungsstellen abzudecken („blocken“), wurde der Blot 30 min in PBS Puffer mit 0,5 % Tween 20 inkubiert und dann einmal 15 min und zweimal 5 min in PBS Puffer mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. In diesem Puffer erfolgten dann alle weiteren Schritte. Die Membran wurde mit dem ersten Antikörper für ein bis zwei Stunden inkubiert und dann wie zuvor gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte ebenfalls eine Stunde lang mit einem anschließenden Wasch-Schritt wie zuvor. Die Detektion wurde nach dem ECL Protokoll durchgeführt..

Nachdem ein α -NDH2 polyklonales Antiserum verfügbar war (siehe 3.2.5) konnte damit sowohl wildtypisches als auch affinitätsmarkiertes Enzym nachgewiesen werden.

Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 als erster und ein Anti-Rabbit IgG mAB Peroxidasekonjugat (Sigma) als zweiter Antikörper verwendet.

2.3.9 Bestimmung der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität in Membranen wurde mit n-Decylubichinon (DBQ) als NADH Oxidation bei 340-400 nm ($\epsilon_{340-400} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oder 366-400 nm ($\epsilon_{366-400} = 3,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen. Um die Aktivität der alternativen Dehydrogenase von der Komplex I Aktivität zu unterscheiden, wurden entweder 2 μM DQA in den Test gegeben, was zur vollständigen Hemmung von Komplex I führte, oder es wurde deamino-NADH, welches spezifisch von Komplex I oxidiert wird [Matsushita *et al.*, 1987] statt NADH als Elektronendonator verwendet. Die Aktivitätstests wurden bei 30°C entweder an einem Photodiode Array Spectrophotometer in einer 2 ml Rührküvette oder an einem Microplate Spectrophotometer in einer Mikrotiterplatte gemessen. Um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in einer Einzelmessung abzuschätzen, wurden Membranen in Aktivitätstestpuffer mit 100 μM NADH vorgelegt und die Reaktion mit 60 μM DBQ gestartet.

Für die Bestimmung der Michaelis Menten Parameter K_M und V_{\max} wurde eine Reihe von Aktivitätstest mit verschiedenen Konzentrationen (0-150 μM) des Substrates, für das die Parameter bestimmt werden sollten, aufgenommen, während die Konzentration des anderen Substrats konstant gehalten wurde. Die gemessenen Aktivitäten (Doppelbestimmung) wurden gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen und die Michaelis Menten Parameter mit dem Programm ENZFITTER (Biosoft) berechnet.

2.3.10 Bestimmung der Ubihydrochinon:Cytochrom c Oxidoreduktase Aktivität

Die katalytische Ubihydrochinon:Cytochrom *c* Oxidoreduktase Aktivität in *S. cerevisiae* Membranen wurde als Cytochrom *c* Reduktion bei 550-540 nm ($\epsilon_{550-540} = 19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) mit DBH (siehe 2.3.11) als Substrat gemessen. Für die Bestimmung der Michaelis Menten Parameter wurde DBH in einer Konzentration von 0-200 μM vorgelegt und die Reaktion mit Membranen in Aktivitätstestpuffer mit 100 μM Cytochrom *c* gestartet.

2.3.11 Darstellung von Decylubihydrochinon

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

2.3.12 Bestimmung der NADH:HAR Oxidoreduktase Aktivität

Der Elektronentransport von NADH auf den artifiziellen Elektronenakzeptor HAR (Hexamminruthenium(III)-chlorid) wird spezifisch von Komplex I katalysiert [Sled und Vinogradov, 1993]. HAR Aktivitäten wurden in Membranen gemessen, um den Gehalt von Komplex I und damit die Qualität der Präparation abzuschätzen.

Wie in 2.3.9 beschrieben, wurde die NADH Oxidation bei 340-400 nm ($\epsilon_{340-400} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt. Aktivitätstestpuffer mit 2 mM HAR und 200 μM NADH wurden vorgelegt und die Reaktion mit mitochondrialen Membranen gestartet.

2.3.13 Testen von Hemmstoffen und Bestimmung des apparenten I_{50} Wertes

Mehrere Substanzen aus dem Labor von Prof. Oettmeier (Ruhr Universität Bochum) wurden auf ihre Hemmwirkung auf die alternative sowie auf die Komplex I NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität in Membranen getestet. Um die beiden Aktivitäten einzeln zu messen, wurden Membranen der Stämme *$\Delta nuam$* pUB7 (Komplex I deletiert) und GB 5.2 (NDH2 deletiert) verwendet. Zunächst wurden 10 μM einer Substanz in einen unter Substratsättigung laufenden Aktivitätstest (siehe 2.3.9) gegeben. Zur Bestimmung des I_{50} -Wertes eines potentiellen Inhibitors wurden dann unterschiedliche Konzentrationen bereits vor dem Starten des Tests in die Küvette gegeben und die gehemmten Aktivitäten als Prozentangabe der nicht-gehemmten Aktivität gegen die Hemmstoffkonzentrationen aufgetragen. Der I_{50} -Wert entspricht der Hemmstoffkonzentration die notwendig ist, um die katalytische Aktivität eines Enzyms um 50 % zu hemmen, und wurde direkt aus dem Diagramm abgelesen.

2.3.14 Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Das hierfür verwendete Säulenmaterial war „Chelating Sepharose™ Fast Flow“ von Amersham Biosciences. Dieses bindet zweiwertige Metallionen an Iminodiessigsäure-Gruppen, die wiederum Poly-Histidin binden.

Das Säulenmaterial wurde laut Angaben des Herstellers gepackt, mit 10 Säulenvolumina destilliertem Wasser gewaschen und mit 3 Säulenvolumina 0,1 M NiSO₄-Lösung mit Ni²⁺ beladen. Um überschüssige Ionen zu entfernen, wurde die Säule danach noch mal mit etwa 6 Säulenvolumina dest. H₂O gespült und dann mit den entsprechenden Puffern äquilibriert.

Nach einem Säulenlauf wurden die Ni²⁺ Ionen mit Äquilibrierungspuffer mit 50 mM EDTA abgewaschen und die Säule erst mit 0,5 M NaCl-Lösung und dann mit Wasser gespült. Zur Lagerung wurde ein 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 15 % (v/v) Ethanol verwendet.

2.3.15 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung der NDH2 aus *Y. lipolytica* nach dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaus wurde von der Firma Toplab GmbH (Martinsried) übernommen. Es wurde der Proteinsequencer Procise 492 von Applied Biosystems verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der katalytischen Aktivität von NDH2 und Komplex I in mitochondrialen Membranen von *Y. lipolytica*

Zur Charakterisierung der alternativen und der Komplex I NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität wurden eine Reihe von kinetischen Analysen mit mitochondrialen Membranen durchgeführt. Zur ausschließlichen Messung der Aktivität von NDH2 wurden entweder 2 μM DQA in den Ansatz gegeben oder es wurden Membranen von Komplex I Deletionsstämmen verwendet. Da bereits festgestellt wurde, dass die alternative Dehydrogenase von *Y. lipolytica* weder NADPH noch dNADH oxidiert [Kerscher *et al*, 1999], wurde zur ausschließlichen Bestimmung der Komplex I Aktivität dNADH als Elektronenakzeptor verwendet, oder es wurde mit Membranen des NDH2 Deletionstammes GB 5.2 gearbeitet.

3.1.1 Bestimmung des pH Optimums von YLNDH2

Die alternative NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität in Membranen wurde bei verschiedenen pH Werten unter Substratsättigung (100 μM NADH und 60 μM DBQ) getestet und als spezifische Aktivität in [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] oder kurz [U/mg] angegeben. Der optimale pH für die Aktivität lag zwischen 7,3 und 7,9 (Abb. 3.1).

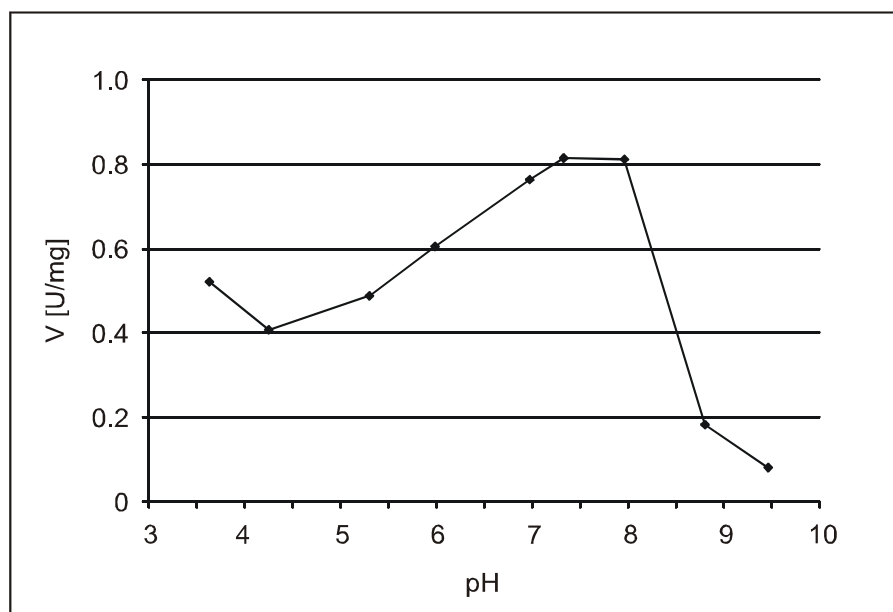


Abb. 3.1 Bestimmung des pH Optimums für die alternative NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität.

Dieses wurde bei Substratsättigung gemessen und lag zwischen pH 7,3 und 7,9. Gemessen wurde mit Membranen des Stammes PIPO in Gegenwart von 2 μM DQA.

3.1.2 Interaktion mit verschiedenen Elektronenakzeptoren

Verschiedene Chinone wurden als Elektronenakzeptoren für die alternative Dehydrogenase und zum Vergleich für Komplex I getestet. Die Chinone unterschieden sich in der Länge ihrer (Isoprenoid-) Seitenkette und damit in ihrer Hydrophobizität, oder darin, dass sie Benzol oder Naphtalinderivate waren (siehe 7.6). Außerdem wurde die Aktivität für 2,6-Dichlorophenol-indophenol (DCPIP) gemessen, ein für chinonabhängige Enzyme häufig verwendeter, unphysiologischer Akzeptor.

Um den Einsatz des Hemmstoffs DQA zu vermeiden, der bei Verwendung von unphysiologischen Substraten in den meisten Fällen unwirksam ist, wurde die NDH2 Aktivität mit Membranen des Komplex I Deletionsstammes $\Delta nuam$ pUB7 gemessen. Dieser Stamm besitzt sowohl eine externe als auch eine gekürzte interne NDH2. Membranen dieses Stammes wurden auch verwendet, um die Hemmbarkeit der Aktivitäten mit dem Hemmstoff 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)chinolon (HDQ) zu testen. Dieser war unter mehreren Chinolonen als wirksamer Inhibitor für die alternative Dehydrogenase herausgefunden worden (siehe 3.1.6ff). Die Komplex I Aktivitäten wurden mit Membranen des NDH2 Deletionsstammes GB 5.2 gemessen.

Die alternative Dehydrogenase reagierte mit dem hydrophilen Chinon Q_1 schneller als mit dem vergleichsweise hydrophoben DBQ, das dem physiologischen Substrat Q_9 am ähnlichsten ist (Tab. 3.1). Im Gegensatz zu der niedrigen NADH:DCPIP Aktivität von überexprimierter und gereinigter NDH2 aus *E. coli* [Björklöf *et al.*, 2000; siehe auch 1.2.2] zeigte YLNDH2 in Membranen eine leicht erhöhte NADH-Oxidationsrate verglichen mit DBQ. Mit Durochinon und Menadion, die durch das Fehlen einer Isoprenoid-Seitenkette noch hydrophiler sind als Q_1 , wurde jedoch nur die Hälfte der Rate mit DBQ erreicht. Nur die Raten mit DBQ und Q_1 waren mit 10 μ M HDQ deutlich hemmbar.

Die Komplex I NADH Oxidationsrate war mit DCPIP als Elektronendonator leicht erhöht und mit Menadion um 40% erniedrigt. Mit Naphtochinon reagierten beide Enzyme nicht.

Tab. 3.1 Aktivitäten von YLNDH2 und Komplex I mit verschiedenen Chinon-Substraten.

Die Aktivitäten wurden bei Substratsättigung (150 μM NADH und jeweils 60 μM der Chinone) mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Membranprotein im Testansatz jeweils ohne und mit Zusatz von 10 μM des Inhibitors HDQ gemessen.

Substrate ⁽¹⁾	NDH2				Komplex I	
	ungehemmt		gehemmt (10 μM HDQ)		U/mg	%
	U/mg ⁽²⁾	% ⁽³⁾	U/mg ⁽²⁾	% ⁽⁴⁾		
DBQ	1.35 \pm 0.24	100	0.24 \pm 0.05	18 \pm 3	0.50	100
Q ₁	2.07 \pm 0.43	153 \pm 4	0.43 \pm 0.12	21 \pm 2	0.49	98
DCPIP	1.50 \pm 0.29	111 \pm 5	1.27 \pm 0.29	85 \pm 3	0.61	122
Durochinon	0.71 \pm 0.18	52 \pm 8	0.54 \pm 0.15	77 \pm 13	0.53	106
Menadion	0.70 \pm 0.15	52 \pm 6	0.81 \pm 0.22	116 \pm 19	0.29	58

⁽¹⁾ <5% Aktivität (NDH2 und Komplex I) mit Naphtochinon

⁽²⁾ Mittelwert aus vier Membranpräparationen des Stammes $\Delta nuam$ pUB7

⁽³⁾ bezogen auf die NADH:DBQ Aktivität der jeweiligen Membranpräparation

⁽⁴⁾ bezogen auf die ungehemmte Rate der jeweiligen Membranpräparation

3.1.3 Untersuchung der Abhängigkeit des apparenten K_M Wertes von der Membranmenge

Für die NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität des Komplex I war eine lineare Abhängigkeit zwischen dem apparenten K_M Wert und der Membranmenge im Testansatz festgestellt worden [Kashani-Poor, Dissertation, 2000]. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften liegt das Verteilungsgleichgewicht von DBQ stark auf Seiten der Lipidphase [Fato *et al.*, 1988]. Die effektiv dem Enzym zur Verfügung stehende DBQ Konzentration ist also umso kleiner, je größer die hydrophobe Membranphase im Testvolumen ist.

Um zu testen, ob dieser Zusammenhang auch für die alternative NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität besteht, wurden die kinetischen Parameter des NDH2 Wildtypstammes PIPO mit vier verschiedenen Mengen an Gesamtprotein im Testansatz gemessen. Hierbei ließ sich ebenfalls eine lineare Abhängigkeit des apparenten K_M Wertes von der im Test eingesetzten Membranmenge (μg Protein/ml Reaktionsvolumen) feststellen (Abb. 3.2), ähnlich wie sie zuvor für den Komplex I beschrieben worden war. Diese war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als beim Komplex I, wie die Steigung der Regressionsgeraden zeigte (Abb. 3.2). Bei allen folgenden vergleichenden Messungen wurde darauf geachtet, die Proteinkonzentration im Test konstant zu halten.

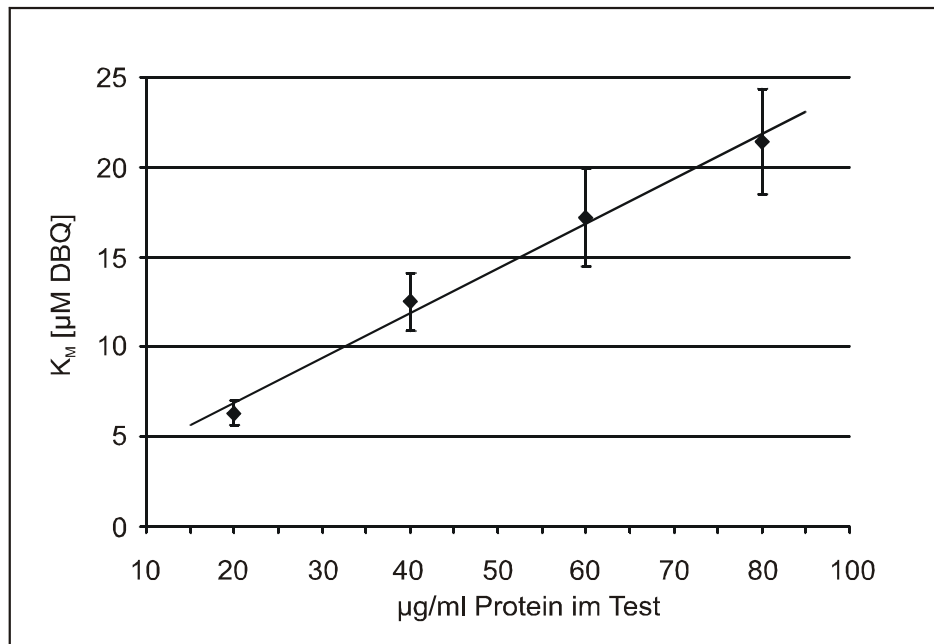


Abb. 3.2 Abhängigkeit des apparenten K_M Wertes von YLNDH2 von der Membranmenge im Test.

Es besteht für NDH2 (analog zum Komplex I) eine lineare Abhängigkeit der apparenten K_M Werte für DBQ von der Membranmenge im Test. Die Michaelis Menten Parameter wurden für die wildtypische NDH2 mit Membranen des Stammes PIPO gemessen und mit dem Programm ENZFITTER berechnet. Die Steigung der Regressionsgeraden $a = 0,25$ war deutlich geringer als die, die für Komplex I Kinetiken mit unterschiedlichen Membranmengen berechnet wurde ($a = 0,69$ [Kashani-Poor, Dissertation, 2000]).

3.1.4 Auswertung von kinetischen Messdaten

K_M und V_{max} wurden mit dem Programm ENZFITTER (Biosoft) berechnet, welches die Parameter der Michaelis Menten Gleichung

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

durch Mittelung der Messdaten im Iterationsverfahren anpasst. Im Laufe der Auswertungen fielen einige Messreihen auf, die als nicht mit der Michaelis Menten Gleichung beschreibbar erschienen. Die Daten zeigten eher einen sigmoid geformten Kurvenverlauf, der typisch für kooperative Enzyme wäre. Eine Beschreibung der Messdaten mit diesem Formalismus war jedoch nicht möglich. Die Ursache schien vielmehr eine systematische Unterschätzung der Aktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen zu sein.

Das Phänomen trat hauptsächlich in Datensätzen auf, die am Microplate Spectrophotometer in Mikrotiterplatten gemessen worden waren. Als mögliche Erklärung wurde eine Bindung des Substrates DBQ an die hydrophobe Polystyrol-Oberfläche der Platten in Erwägung gezogen, die bei Verwendung einer Glasküvette am Photodioden Array Spectrophotometer nicht

vorkommen sollte. Dieser Effekt würde durch die Vergrößerung des Oberflächen/Volumen Verhältnisses (200 µl Reaktionsansatz in der Mikrotiterplatte gegenüber 2 ml in einer Glasküvette) entsprechend verstärkt. Auch eine systematische Unterschätzung der Anfangsgeschwindigkeiten bei kleinen Substratkonzentrationen aufgrund von technisch bedingten Verzögerungen (Mischen des Reaktionsansatzes durch mehrmaliges Aufsaugen in die Pipettenspitze etc.) wäre denkbar.

Obwohl die Ursache für die sigmoid erscheinenden Kurven nicht vollständig geklärt werden konnte, ergab eine Erweiterung der Michaelis Menten Gleichung um einen Korrekturparameter x in

$$v = \frac{v_{\max} \cdot ([S] - x)}{K_M + ([S] - x)}$$

signifikant verbesserte Beschreibung der Messdaten. Die modifizierte Gleichung hat ihren Schnittpunkt nicht im Ursprung, sondern schneidet die X-Achse bei der Substratkonzentration x . Damit wird eine bessere Anpassung an den hyperbolen Verlauf der Daten erreicht, während die Reaktionsraten bei Substratkonzentrationen $< x$ weniger ins Gewicht fallen.

3.1.4.1 Vergleich von Testmessungen an beiden Geräten

Vergleichsweise wurden Michaelis Menten Kinetiken mit denselben Wildtypmembranen sowohl am Microplate Spectrophotometer in Mikrotiterplatten als auch am Photodioden Array Spectrophotometer in Glasküvetten gemessen (Abb. 3.3).

Die Daten aus der Mikrotiterplatten-Messreihe ergaben eine deutlich sigmoid erscheinende Kurve. Die Auswertung mit der modifizierten Michaelis Menten Gleichung ergab eine Halbierung des K_M Wertes (Tab. 3.2). Die Kurve der in Glasküvetten gemessenen Daten wirkte auf den ersten Blick weniger sigmoid, der K_M Wert wurde jedoch bei Verwendung der modifizierten Gleichung auch um 30% korrigiert.

Es muss an dieser Stelle nochmals betont werden, dass es sich wegen der hohen Hydrophobizität des Substrates DBQ immer nur um „scheinbare“ (apparente) K_M Werte handelt, die vom Anteil der hydrophoben Phase und den Eigenschaften des Meßsystems abhängen. Da der Grund der Schwankungen an den verschiedenen Geräten letztlich nicht ermittelt werden konnte, wurden im Folgenden sämtliche vergleichenden kinetischen Messdaten an demselben Gerät gemessen. Alle Daten wurden mit dem modifizierten Verfahren ausgewertet.

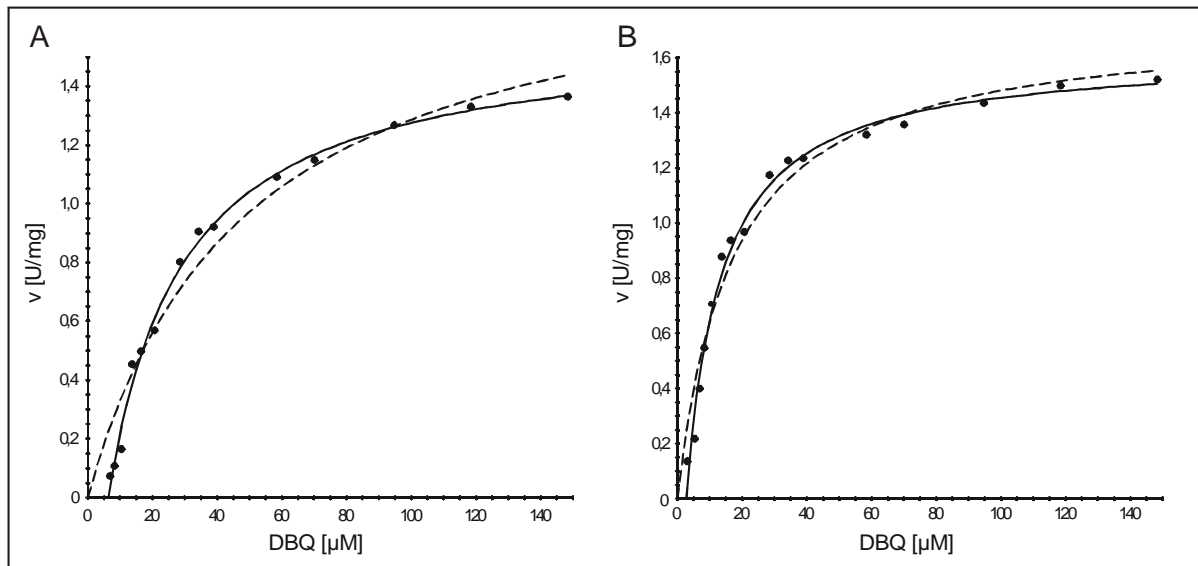


Abb. 3.3 Vergleich von Michaelis Menten Kurven, gemessen an verschiedenen Geräten.

Zwei Datensätze wurden mit Membranen des komplementierten NDH2 Wildtypstammes der Mutantenserie (siehe 3.3) am Microplate Spectrophotometer in Mikrotiterplatten (A) oder am Photodioden Array Spectrophotometer in Glasküvetten (B) aufgenommen. Die gestrichelte Kurve zeigt die Anpassung mit der klassischen Michaelis Menten Gleichung, die solide Kurve die mit der modifizierten Gleichung.

Tab. 3.2 Berechnete apparente K_M und V_{max} Werte der Kurven aus Abb. 3.3.

Die Parameter wurden im Programm ENZFITTER entweder an die klassische oder die modifizierte Michaelis Menten Gleichung angepasst (siehe 3.1.4.) Der von ENZFITTER berechnete Betrag x der modifizierten Gleichung ist angegeben; er hat die Dimension einer Konzentration.

	gemessen in Mikrotiterplatten			gemessen in Glasküvetten		
	ausgewertet mit		x [μ M]	ausgewertet mit		x [μ M]
	MM	MM _{modifiziert}		MM	MM _{modifiziert}	
K_M (app) [μ M]	47.8 ± 9.2	22.9 ± 2.1	6.4	17.0 ± 2.1	10.8 ± 1.0	2.7
V_{max} [U/mg]	1.90 ± 0.16	1.59 ± 0.04		1.73 ± 0.07	1.62 ± 0.09	

3.1.5 Untersuchung des Reaktionsmechanismus von YLNDH2

Um die Interaktion der NDH2 mit ihren Substraten und mit der Membran zu verstehen, war die Kenntnis des Reaktionsmechanismus wünschenswert. Eine Untersuchung an Membranen und nicht mit gereinigtem Enzym war möglich, weil Komplex I-Aktivität in Gegenwart von DQA ausgeschlossen werden konnte [Kerscher *et al.*, 1999 und eigene Messungen]. Die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon ist eine Mehrsubstratreaktion. Misst man die kinetischen Konstanten des einen Substrates, muss man gewährleisten, dass das andere im Überschuss vorliegt. Eine umfassende Analyse des Reaktionsmechanismus erfordert jedoch die gegenseitige Variation beider Substrate.

In der Praxis wurden hierfür die kinetischen Parameter K_M und V_{max} für DBQ mit unterschiedlichen Konzentrationen von NADH bestimmt. Es wurde eine Spanne von der üblicherweise verwendeten Sättigungskonzentration (100 μM) bis zu einer Konzentration unterhalb des K_M Wertes für NADH (10 μM) gewählt. Um die Werte miteinander vergleichen zu können, wurde immer die gleiche Proteinmenge im Test (21 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Tab. 3.3. zeigt die Ergebnisse der fünf Messreihen: Apparente K_M und V_{max} Werte sanken proportional zueinander mit sinkender NADH Konzentration.

Tab. 3.3 Apparente K_M und V_{max} Werte für DBQ gemessen mit unterschiedlichen NADH-Konzentrationen Die Datensätze wurden mit Membranen des Stammes PIPO (21 $\mu\text{g/ml}$) gemessen. Der von ENZFITTER berechnete Betrag x der modifizierten Gleichung ist angegeben.

NADH [μM]	apparente K_M [μM]	V_{max} [U/mg]	x [μM]
100	7.42 ± 0.72	1.11 ± 0.02	5.1
50	5.53 ± 0.62	0.94 ± 0.02	4.1
30	3.86 ± 0.62	0.67 ± 0.02	3.2
20	3.01 ± 0.68	0.60 ± 0.03	3.4
10	1.26 ± 0.42	0.32 ± 0.02	2.2

Die Messdaten wurden in den beiden Linearisierungsverfahren von Lineweaver-Burk ($1/[S]$ gegen $1/v$) und Hanes ($[S]$ gegen $[S]/v$) aufgetragen, indem die x- und y-Achsen Abschnitte der Geraden aus den mit ENZFITTER berechneten K_M und V_{max} Werten konstruiert wurden. Es zeigte sich, dass die doppelt reziproke Darstellung Parallelen ergab (nicht gezeigt), während sich die Geraden in der Hanes Darstellung im ersten Quadranten nahe der Ordinate schnitten (Abb. 3.4). Um die Originalmessdaten in die linearisierten Darstellungen einfügen zu können, musste der Betrag x aus der modifizierten Michaelis Menten Gleichung (siehe Tab. 3.3) von allen Substratkonzentrationen abgezogen werden.

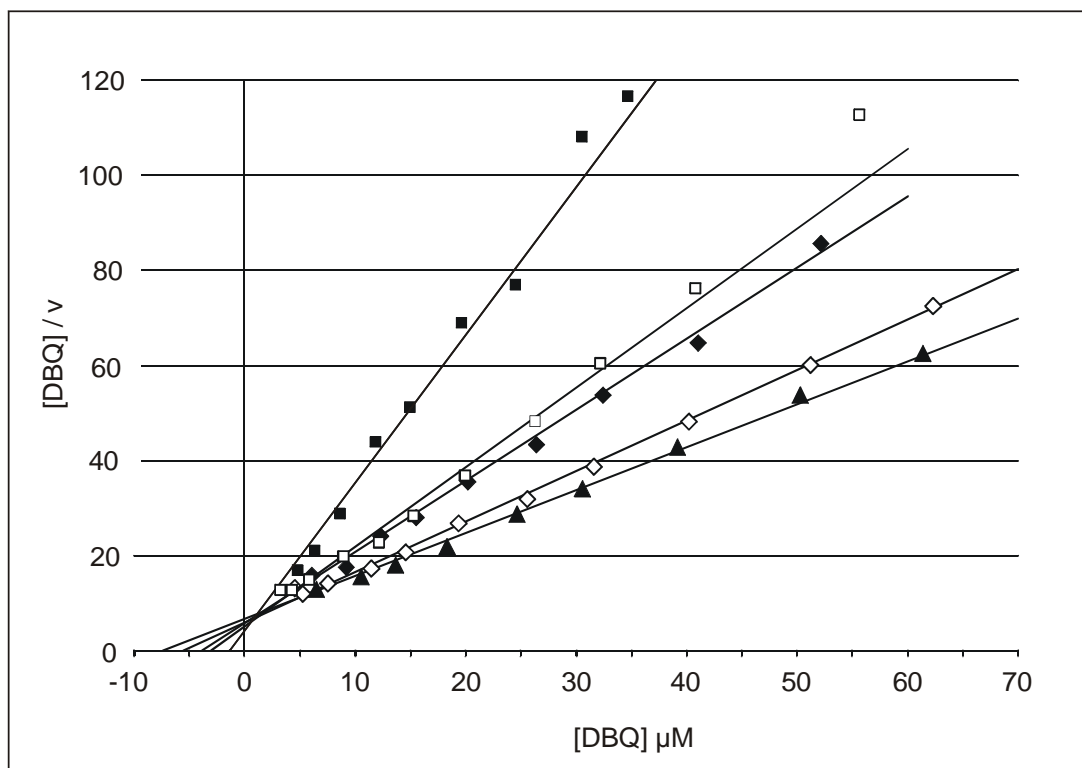


Abb. 3.4 Hanes Darstellung der DBQ-Kinetiken mit unterschiedlichen NADH-Konzentrationen. NADH-Konzentrationen waren $100 \mu\text{M}$ (▲), $50 \mu\text{M}$ (◇), $30 \mu\text{M}$ (◆), $20 \mu\text{M}$ (□) und $10 \mu\text{M}$ (■). Die Geraden wurden aus den in Tab. 3.3 aufgelisteten K_M und V_{max} Werten konstruiert und die Originalmessdaten eingefügt.

Dieses Muster weist auf einen Ping-Pong Mechanismus hin. Idealerweise sollte der Schnittpunkt der Geraden genau auf der Ordinate liegen. Zieht man jedoch in Betracht, dass die Genauigkeit der Daten durch die Verwendung von Membranen und das Problem des Verteilungsgleichgewichtes des hydrophoben Substrats limitiert ist, kann man das Ergebnis als gesichert betrachten.

Der Ping-Pong Reaktionsmechanismus beschreibt im Gegensatz zu sequenziellen Mechanismen eine abwechselnde Bindung der Substrate, wobei das zweite Substrat erst binden kann, wenn das erste freigesetzt ist. Es besteht zu keiner Zeit ein ternärer Enzym-Substrat-Komplex. Für den Fall der NDH2 kann man sich folgendes Modell vorstellen (Abb. 3.5): NADH bindet zuerst, überträgt zwei Elektronen auf FAD und wird freigesetzt; als zweites Substrat bindet das Ubichinon und wird von FADH₂ zu Ubihydrochinon reduziert.

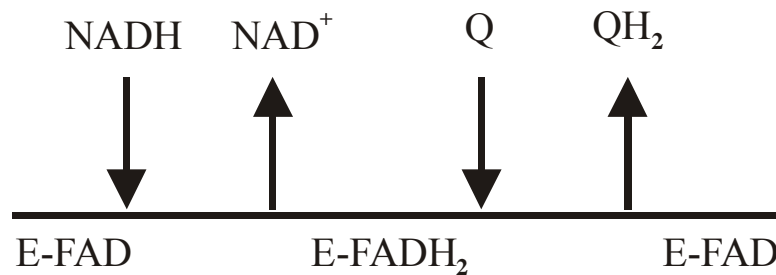


Abb. 3.5 Postuliertes Modell der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Reaktion der NDH2 aus *Y. lipolytica*.

3.1.6 Hemmstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Verbindungen als potentielle Inhibitoren für die alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase von *Y. lipolytica* getestet. Eine Reihe von Chinolonen, die sich, ebenso wie Acridone, als Inhibitoren für die mit Chinonen reagierenden Atmungskettenenzyme erwiesen hatten [Oettmeier *et al.*, 1994; Reil *et al.*, 1997], wurde freundlicherweise von Prof. Oettmeier (Ruhr Universität, Bochum) zur Verfügung gestellt.

Die Festsubstanzen wurden in Ethanol gelöst und in einer Vorauswahl zu je 10 µM in einen laufenden Aktivitätstest mit Membranen des Komplex I Deletionsstammes $\Delta nuam$ pUB7 gegeben. Die beste Hemmwirkung hatte 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)chinolon (HDQ) (Abb. 3.6A). Die Zugabe von 10 µM HDQ bewirkte eine Hemmung von über 90% der alternativen NADH:DBQ Aktivität (Abb. 3.6B).

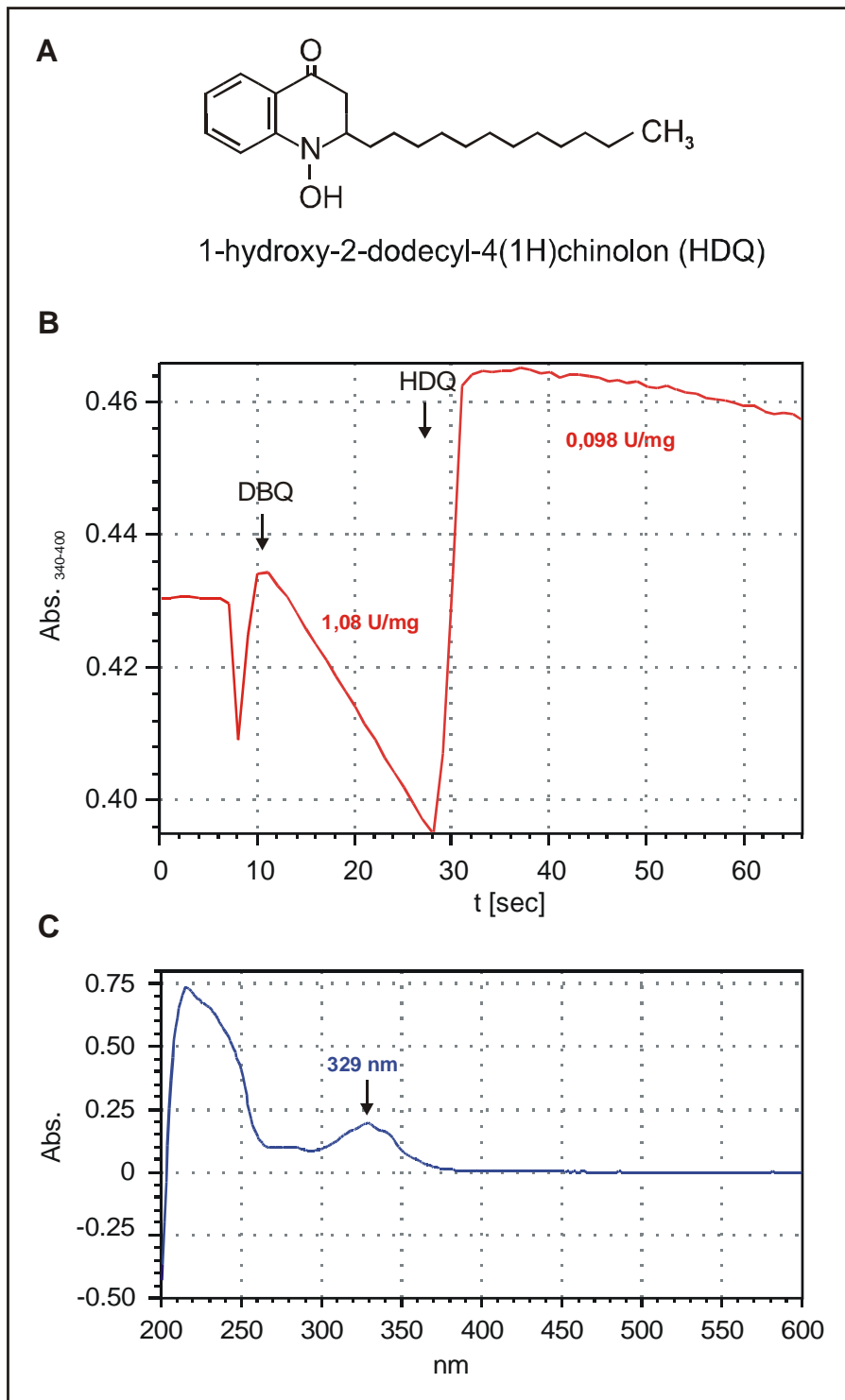


Abb. 3.6 Strukturformel, Hemmwirkung und Spektrum von 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)chinolon (HDQ)

A Strukturformel von HDQ **B** Die Zugabe von 10 μM HDQ bewirkte >90% Hemmung der NADH:DBQ Aktivität in Membranen des Stammes $\Delta nuam$ pUB7, gemessen als NADH Oxidation bei 340-400 nm. **C** Spektrum einer 20 μM Lösung von HDQ in Ethanol. Für das Extinktionsmaximum bei 329 nm wurde ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{329-400} = 9,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet.

Die apparenten I_{50} -Werte von HDQ für NDH2 und Komplex I wurden mit Membranen der Stämme $\Delta nuam$ pUB7 (Komplex I deletiert) und GB 5.2 (NDH2 deletiert) bestimmt. Wie aus Abb. 3.5B und C ersichtlich, absorbierte HDQ bei 340 nm, dem Absorptionsmaximum von reduziertem NADH, relativ stark. Zur Berechnung der NADH Oxidationsraten wurden daher die Wellenlängen 366-400 nm und der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{366-400}=3,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Die HDQ Konzentration, die nötig war, um die alternative NADH:DBQ Aktivität um 50% zu hemmen, war etwa 200 nM. Die Komplex I Aktivität wurde erst bei einer zehnfach höheren Konzentration (2 μM) zu 50% gehemmt (Abb. 3.7).

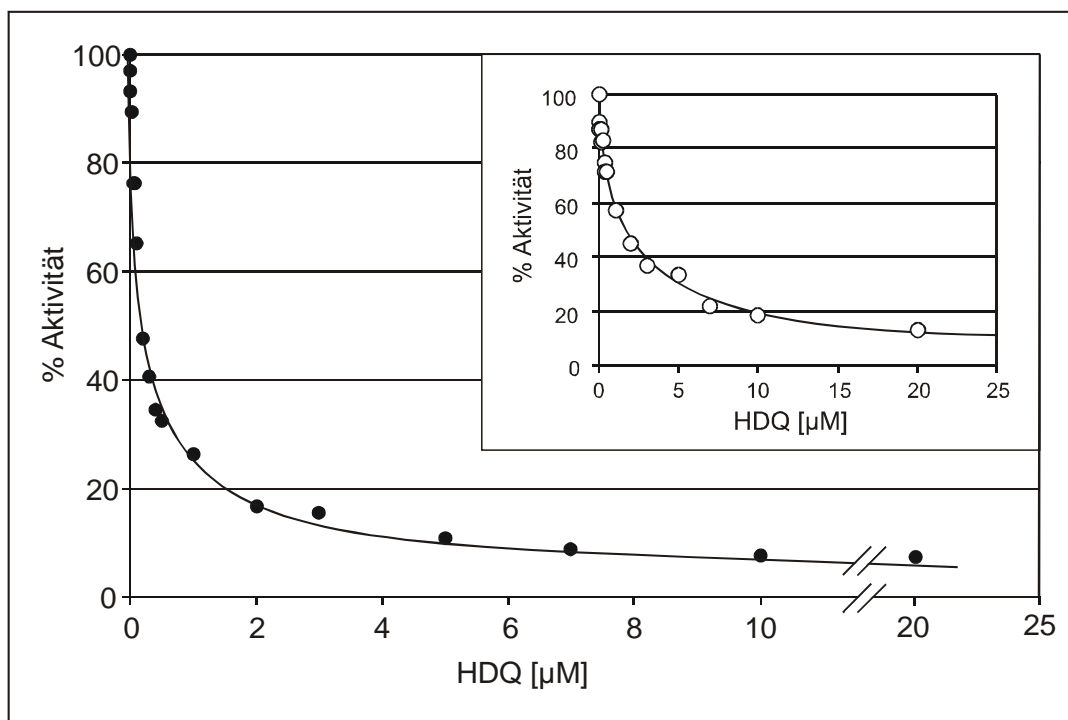


Abb. 3.7 Hemmung der NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität von NDH2 und Komplex I in mitochondrialen Membranen mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors HDQ – I_{50} Messung.

Die Aktivitäten wurden mit jeweils 32 $\mu\text{g/ml}$ Membranen der Stämme $\Delta nuam$ pUB7 (●; nur NDH2) und GB 5.2 (○; nur Komplex I) bestimmt. Der scheinbare I_{50} Wert für die NDH2 Aktivität war etwa 200 nM, der für Komplex I etwa 2 μM .

3.1.7 HDQ zeigt nicht-kompetitive Hemmung für beide Substrate von NDH2

Der neu gefundene Inhibitor für die alternative Dehydrogenase HDQ wurde zur weiteren kinetischen Charakterisierung von NDH2 in Wildtyp Membranen verwendet. Es wurden K_M und V_{max} Werte sowohl für DBQ als auch für NADH bestimmt, zunächst ohne, dann in Gegenwart von 50, 200 und 500 nM HDQ. Mit steigender Inhibitorkonzentration sanken die maximalen Reaktionsraten für die Messreihen beider Substrate, während die apparenten K_M Werte nahezu konstant blieben (Tab. 3.4). Alle DBQ und alle NADH Messreihen wurden in der Lineweaver-Burk Darstellung ($1/[S]$ gegen $1/v$) in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 3.8). Wie theoretisch zu erwarten war, bildeten die Geraden einen Schnittpunkt auf der X-Achse mit leichten Abweichungen im Rahmen des Messfehlers.

Tab. 3.4 Berechnete Michaelis Menten Parameter der HDQ Hemmkinetiken

HDQ [nM]	DBQ		NADH	
	K_M (app) [μ M]	V_{max} [U/mg]	K_M (app) [μ M]	V_{max} [U/mg]
0	5.99 ± 0.70	1.18 ± 0.04	14.8 ± 1.1	1.11 ± 0.02
50	6.89 ± 0.98	0.92 ± 0.04	16.5 ± 1.5	0.92 ± 0.02
200	5.76 ± 0.66	0.66 ± 0.02	13.1 ± 1.1	0.57 ± 0.01
500	6.66 ± 0.61	0.47 ± 0.01	15.5 ± 1.6	0.40 ± 0.01

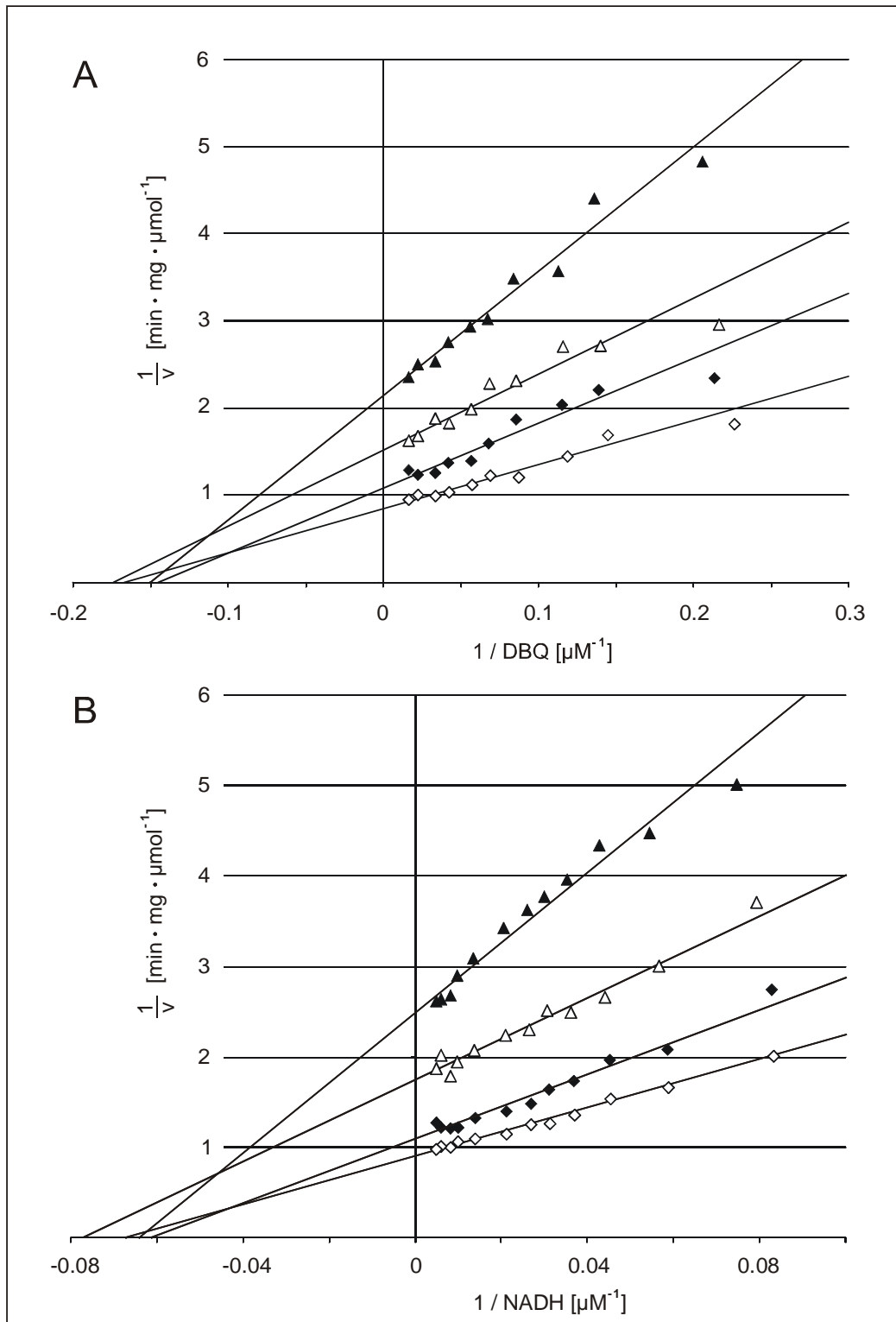


Abb. 3.8 Lineweaver Burk Darstellungen der HDQ Hemmkinetiken für die Substrate DBQ und NADH.

Die kinetischen Parameter wurden mit Membranen des Stammes PIPO (jeweils 21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein) für DBQ (A, gemessen mit 100 μM NADH) und für NADH (B, gemessen mit 60 μM DBQ) bestimmt, ohne (\diamond) und mit 50 (\blacklozenge), 200 (\triangle) und 500 (\blacktriangle) nM HDQ. Alle Messungen enthielten 2 μM DQA. K_M und V_{\max} Werte wurden mit der modifizierten Michaelis Menten Gleichung berechnet (siehe Tab. 3.4) und zur Konstruktion der doppelt reziproken Darstellung benutzt.

Dieses Muster weist auf den klassischen Fall nicht-kompetitiver Hemmung hin, die bei Cleland [1963] ausführlich beschrieben wurde. Wenn nach der dort verwendeten Nomenklatur entweder die Steigung oder der Y-Achsenabschnitt der Lineweaver-Burk Darstellungen eine lineare Funktion der Hemmstoffkonzentration ist, ändert sich die Gleichung der ungehemmten Reaktion

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

in

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

für eine linear kompetitive Hemmung oder in

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_{ii}}\right) \quad (3)$$

für eine linear unkompetitive Hemmung.

Sind sowohl Steigung als auch Y-Achsenabschnitt eine Funktion der Hemmstoffkonzentration

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_{ii}}\right) \quad (4)$$

schneiden sich die Geraden links der Y-Achse und ergeben das Bild einer nicht-kompetitiven Hemmung. In diesem Fall bindet der Inhibitor sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substrat Komplex. Bei der klassischen nicht-kompetitiven Hemmung sind die beiden Hemmkonstanten K_i und K_{ii} gleich groß und die Lineweaver-Burk Plots schneiden sich auf der X-Achse. Das bedeutet, dass sich der Inhibitor und das Substrat nicht gegenseitig beeinflussen. Für $K_i < K_{ii}$ gilt, dass der Hemmstoff die Substratbindung stört, was häufig der Fall ist. Seltener ist $K_i > K_{ii}$, wenn sich Hemmstoff und Substrat in ihrer Bindung begünstigen. Der Schnittpunkt der Lineweaver Burk Plots läge dann nicht wie in Abb. 3.8 auf, sondern über bzw. unter der X-Achse. Alle drei Fälle werden unter dem Mechanismus der nicht-kompetitiven Hemmung zusammengefasst, obwohl $K_i < K_{ii}$ und $K_i > K_{ii}$ auch häufig als „gemischte“ Hemmtypen bezeichnet werden [Bisswanger, 2000, S.89/90].

Die beiden Hemmkonstanten wurden graphisch mit Hilfe sog. Sekundärdiagramme ermittelt. Dazu wurden die Steigungen und die Ordinatenabschnitte der Lineweaver–Burk Plots (Tab. 3.5) gegen die Hemmstoffkonzentration in der Messung aufgetragen (Abb. 3.9 [nach Bisswanger, 2000, S.91]). Die daraus resultierenden Geraden schneiden die X-Achse bei $-K_i$ bzw. $-K_{ii}$. Die vier abgelesenen Hemmkonstanten stimmten mit bemerkenswerter Genauigkeit überein (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Steigungen (m) und Ordinatenabschnitte (b) der Lineweaver-Burk Plots aus Abb. 3.8. Durch Auftragung gegen die Hemmstoffkonzentration (Abb. 3.9) wurden K_i und K_{ii} erhalten.

HDQ[nM]	Kinetiken für DBQ		Kinetiken für NADH	
	m	b	m	b
0	5.07	0.85	13.48	0.90
50	7.46	1.08	17.80	1.09
200	8.72	1.52	22.62	1.74
500	14.25	2.14	38.77	2.48
K_i	334 ± 42		286 ± 20	
K_{ii}	372 ± 35		305 ± 31	

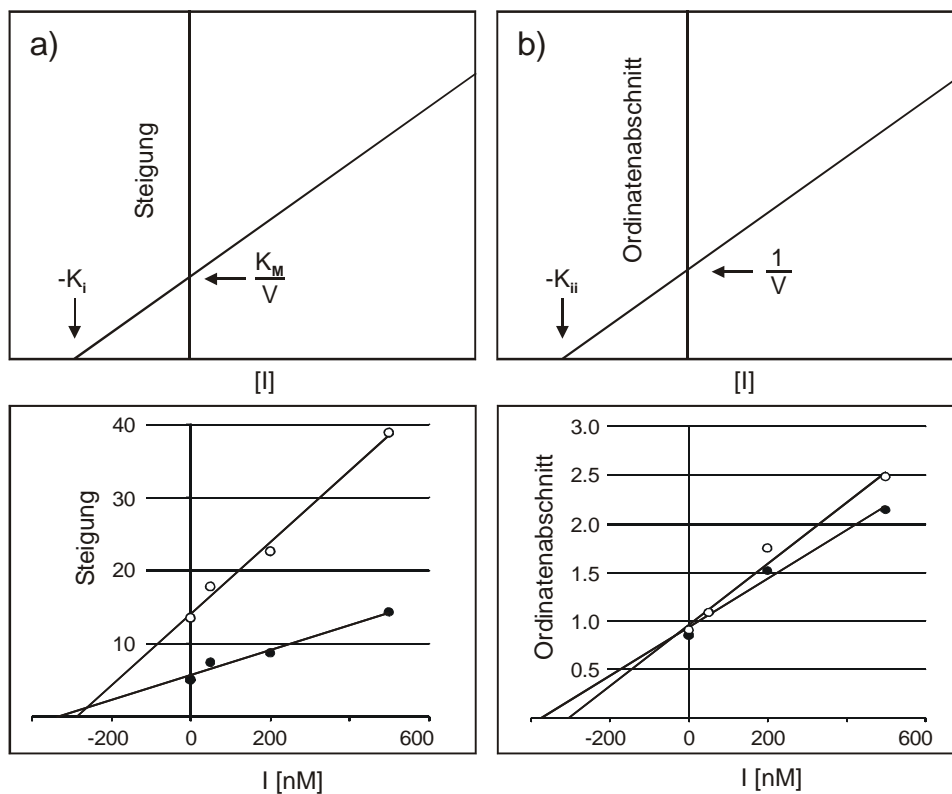


Abb. 3.9 Graphische Ermittlung der Hemmkonstanten K_i und K_{ii} . Oben: Schema nach Bisswanger [2000, S.91]; unten: Sekundärauftragungen der Messdaten für die Kinetiken für DBQ (●) und NADH (○).

Das Ergebnis einer nicht-kompetitiven Hemmung widersprach auf den ersten Blick den Erwartungen, dass HDQ als Chinonanalogen sich eigentlich kompetitiv zum Substrat DBQ verhalten sollte. Im Falle eines Ping-Pong Reaktionsmechanismus tritt jedoch genau dieses Muster zutage, wenn der Inhibitor sowohl an das Enzym, als auch an dessen intermediäre Form bindet [Cleland, 1963]. Für YLNDH2 würde dies bedeuten, dass HDQ sowohl an die oxidierte (E-FAD), als auch an die reduzierte Form (E-FADH₂) des Enzyms bindet (Abb. 3.10).

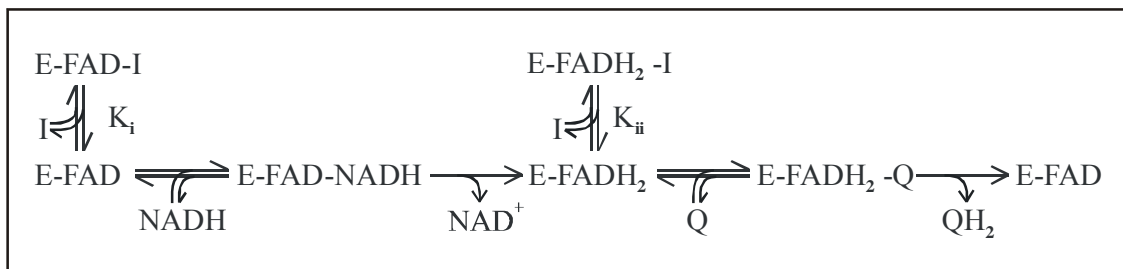


Abb. 3.10 Postuliertes Modell des Hemmmechanismus der NDH2 von *Y. lipolytica* durch den Inhibitor HDQ.

3.2 Heterologe Expression von YLNDH2

Mit dem Ziel, Antikörper gegen die alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase aus *Y. lipolytica* zu generieren oder auf lange Sicht größere Mengen Material für die Kristallisation zur Verfügung zu haben, wurde das Enzym in *E. coli* überexprimiert.

Es war bereits in früheren Versuchen geglückt, eine gekürzte Variante der NDH2 durch Fusion mit der Präsequenz der Komplex I Untereinheit NUAM auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran zu exprimieren [Kerscher *et al.*, 2001]. Diese NDH₂ ermöglichte das Überleben von Komplex I Deletionsmutanten, beispielsweise bei dem in 3.1.2 verwendeten Stamm $\Delta nuam$ pUB7.

Für die heterologe Expression von NDH2 wurde der offene Leserahmen in derselben gekürzten Form wie in dem Fusionskonstrukt in den Expressionsvektor eingebaut.

3.2.1 Herstellung eines Expressionsvektors

Das Ausgangsplasmid zur Herstellung eines Expressionsvektors war der genomische Klon des *NDH2* Gens pE8. In diesen wurden eine *Sall* (298 bp stromabwärts des Startcodons) und eine *EcoRI* (133bp stromabwärts des Stopcodons) Schnittstelle mittels Anker-PCR eingefügt. (Für die Sequenz und genaue Bindungsstelle der Primer siehe Tab. 7.4) Das 1,5 kb große *Sall/EcoRI* Fragment, das den gekürzten offenen Leserahmen von YLNDH2 von Aminosäure 101-582 (mit N101D) beinhaltet, wurde in die mit *XhoI/EcoRI* restringierte „Multiple cloning site“ des Expressionsvektor pRSET A kloniert (Abb. 3.11; und siehe auch 7.3). Der 4,5 kb große Vektor pRSET A-YLNDH2 wurde in den *E. coli* Wirtstamm BL21(DE3)pLysS (Stratagene) transformiert, positive Klone auf LB-Platten mit je 50 mg/l Ampicillin (Resistenzgen auf pRSETA) und Chloramphenicol (Resistenzgen auf pLysS) selektiert.

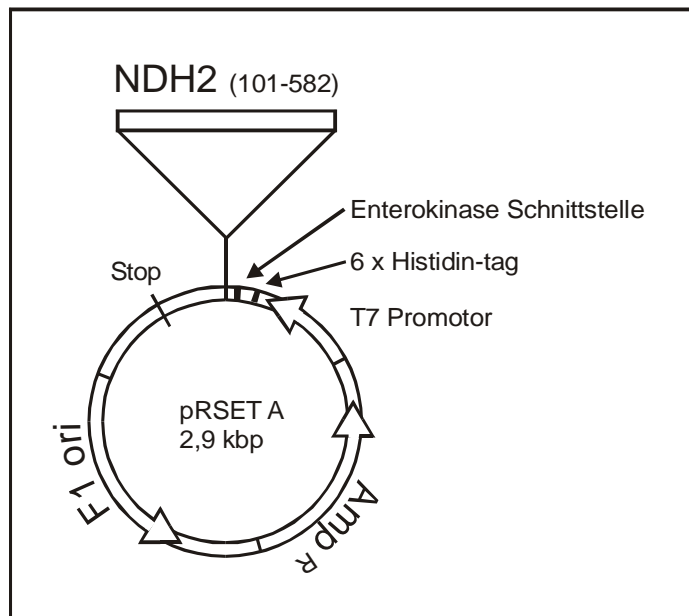


Abb. 3.11 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pRSETA-YLNDH2.

3.2.2 Anzucht und Induktion des *E. coli* Expressionsstammes

Der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS pRSETA-YLNDH2 wurde bei 37°C in Schikanekolben in LB Medium mit je 50 mg/l Ampicillin und Chloramphenicol gezogen. Bei einer Dichte von $OD_{600} = 0,7$ wurde die Kultur mit 0,4 mM IPTG induziert und weiter geschüttelt. Um das Auftreten des rekombinanten Proteins über die Zeit hinweg zu verfolgen, wurden der Kultur alle 30 min Proben entnommen und mittels Western Blot Analyse mit einem Anti-poly-His Antikörper (Sigma) untersucht.

Bereits bei einer Induktionszeit von 30 min konnte eine ca. 60 kD große Bande detektiert werden. Die Stärke des Signals erreichte nach 60 min ein Maximum und veränderte sich über weitere vier Stunden nicht mehr (Abb. 3.12)

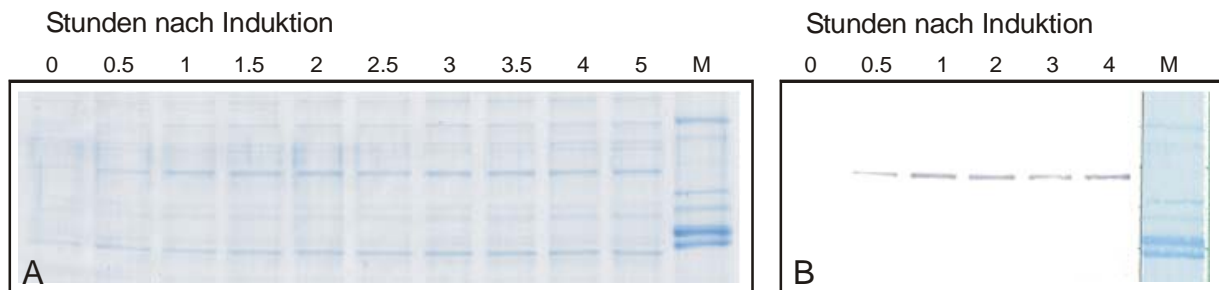


Abb. 3.12 SDS-Gel (A) und Western Blot (B) der induzierten *E. coli* Kultur.

Die rekombinante NDH2 war nach 30 min detektierbar. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-poly-His mAB nach dem Protokoll des „Strep-tag detection“ Kit. Als Marker (M) wurde gereinigter *bc₁* Komplex aus Rind aufgetragen.

3.2.3 Zellernte und –aufschluss

Nach einer Stunde Induktionszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1/10 des Ursprungsvolumens Lyse-Puffer (40 mM NaPi pH 8,0, 500 mM NaCl) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Lysozymbehandlung (30 µg/ml) für 30 min bei 30°C und zweimaliges Frieren/Tauen. Dann wurden der viskosen Suspension je 25 µg/ml DNase und RNase zugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 3500×g erhielt man das Zell-Lysat als Überstand.

3.2.4 Reinigung des Proteins mittels denaturierender Affinitätschromatographie

Es zeigte sich, dass nach 10 minütiger Zentrifugation des Zell-Lysats bei 10000×g das Signal des Anti-poly-His Antikörpers ausschließlich in der Pellet-Fraktion gefunden wurde (Abb 3.13). Hieraus konnte gefolgert werden, dass die Überexpression von YLNDH2 zur Bildung von Einschlusskörpern („inclusion bodies“) geführt hatte. Die Anzucht und Induktion der Zellen bei 23°C lieferte dasselbe Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

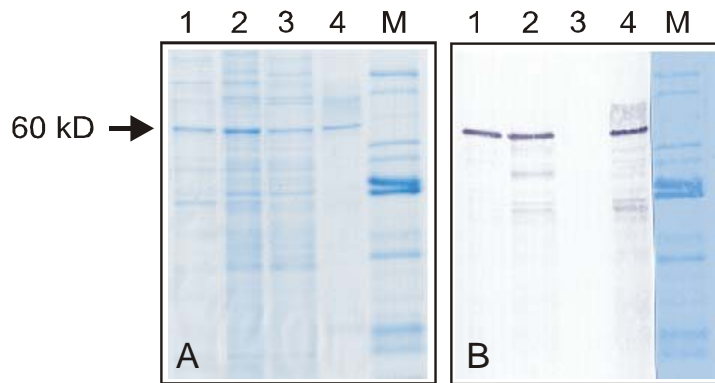


Abb. 3.13 Die Überexpression von YLNDH2 in *E. coli* führte zur Bildung von Einschlusskörpern. Diese konnten durch niedertourige Zentrifugation vollständig sedimentiert werden. SDS Gel (A) und Western Blot (B) der *E. coli* Kultur eine Stunde nach der Induktion (1); Zell-Lysat (2); Überstand 10000×g (3) und Pellet 10000×g (4). Als Marker (M) wurde gereinigter *bc₁* Komplex aus Rind aufgetragen. Zur Detektion wurde der Anti-poly-His mAB und das „Strep-tag detection“ Kit verwendet.

Diese durch einen einfachen Zentrifugationsschritt bereits recht saubere Fraktion von Einschlusskörpern wurde in Lyse-Puffer mit 8 M Harnstoff und 0,5 % SDS aufgelöst, auf 6 M Harnstoff verdünnt und auf eine mit Ni^{2+} beladene Sepharose Fast flow Säule aufgetragen, die mit 8 M Harnstoff und 0,05 % Laurylmaltosid in Lyse-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit einem Volumen desselben Puffers, jedoch mit 6 M Harnstoff gewaschen und das Protein mit einem Stufengradienten von 50-500 mM Imidazol eluiert.

SDS Gel und Western Blot Analyse der Fraktionen zeigt, dass die überexprimierte YLNDH2 bei 200-300 mM Imidazol eluierte (Abb. 3.14). Die Hauptfraktionen wurden vereinigt, gegen Wasser dialysiert, was zum Ausfallen des Proteins führte, und anschließend lyophilisiert. Das lyophilisierte Protein wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen (4468g und 4469g) an die Firma Bio Genes company (Berlin) geschickt.

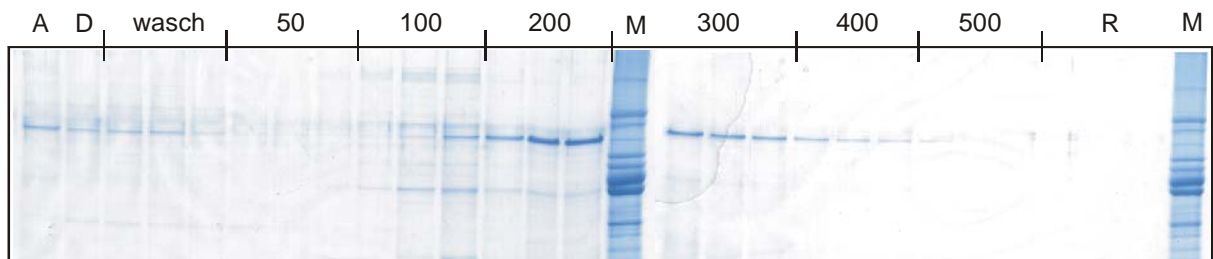


Abb. 3.14 Elutionsprofil der in *E. coli* überexprimierten YLNDH2 von der denaturierenden Ni^{2+} Säule. Gezeigt sind folgende Spuren: Auftrag (A), Durchlauf (D), Waschfraktionen ohne und Elutionsfraktionen mit entsprechend 50-500 mM Imidazol. Das Enzym eluierte bei ca. 200-300 mM. Spur (R) ist EDTA-haltiger Regenerationspuffer; der Marker (M) ist gereinigter *bc₁* Komplex aus Rind.

3.2.5 Untersuchung des polyklonalen Antiserums auf Kreuzreaktion mit der nativen YLNDH2

Die beiden Antiseren aus Kaninchen wurden im Western Blot mit Membranen verschiedener *Y. lipolytica* Stämme auf ihre Spezifität getestet, die native NDH2 zu detektieren. (Es wird im Folgenden nur das Antiserum von Tier 4469g gezeigt.) Das Antiserum wurde 1:500 oder 1:1000 verdünnt, als zweiter Antikörper wurde ein Anti-Rabbit IgG mAB Peroxidasekonjugat von Sigma verwendet. Abb. 3.15 zeigt ein Test SDS Gel und den dazu gehörigen Western Blot: Im NDH2-Wildtyp Stamm PIPO wurde eine ca. 60 kD Bande detektiert. Im Komplex I Deletionsstamm $\Delta nuam$ pUB7 waren zwei Banden zu sehen, die 60 kD Bande des nativen externen Enzyms und die ca. 45 kD Bande der gekürzten internen Version von NDH2, die in 3.1 erwähnt worden war. Diese Bande war deutlich schwächer, das interne Enzym also vermutlich weniger exprimiert als die externe Form. (Dieser Sachverhalt wird in 7.5.1.1 ausführlicher behandelt.) Als weitere Referenz wurden Membranen des Stammes GB 5.2 pAE2 aufgetragen. Dieser Stamm enthält ebenfalls eine interne NDH2, jedoch als N-terminale His-tag Variante, und wird in Abschnitt 7.5.1 genauer beschrieben. In der NDH2 Deletionsmutante GB 5.2 gab es kein Signal. Das Antiserum kreuzreagierte mit nur wenigen anderen Proteinen.

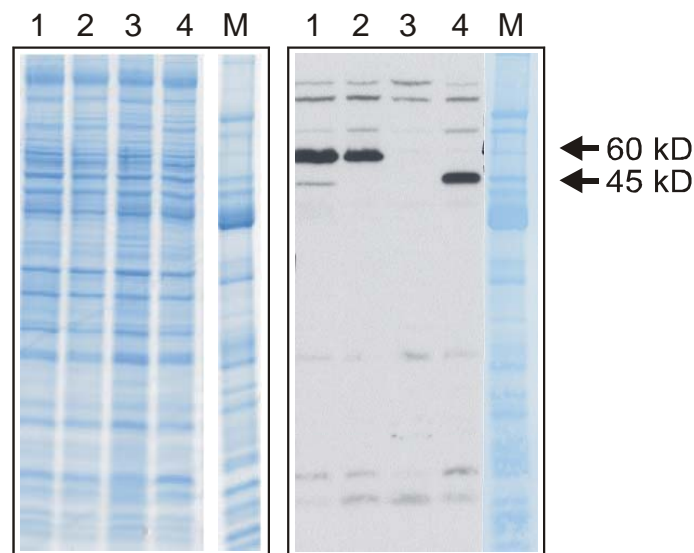


Abb. 3.15 Detektion der externen NDH2 und der gekürzten internen Variante mit dem polyklonalen Antiserum. Aufgetragen wurden je 20 μ g Membranprotein der Stämme $\Delta nuam$ pUB7 (1), PIPO (2), GB 5.2 (3) und GB 5.2 pAE2 (4). Die Verdünnung des Antiserums war 1:500. Als Marker wurde gereinigter bc_1 Komplex aus Rind aufgetragen.

3.3 Erzeugung eines NDH2/Komplex I Deletionsstammes

Laut einer kürzlich veröffentlichten Publikation von Carneiro *et al.* [2003] war es nicht möglich, in dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa* eine Doppelmutante zu generieren, die ohne Komplex I und eine ihrer beiden externen alternativen Dehydrogenasen (NDE2) überleben konnte. In Anbetracht dessen, dass *N. crassa* noch eine weitere externe (NDE1) und eine interne alternative Dehydrogenase (NDI1) besitzt, war dieses Ergebnis überraschend, denn es würde bedeuten, dass NDE2 bei Verlust von Komplex I ein Defizit der matrixständigen NADH Oxidation ausgleicht. Das wiederum würde einen Shuttlemechanismus für Reduktionsäquivalente aus der Matrix ins Cytosol voraussetzen.

Für *Y. lipolytica* war postuliert worden, dass ein solcher Shuttlemechanismus nicht vorhanden oder in seiner Funktion nicht ausreichend ist [Kerscher *et al.*, 2001]. In diesem Zusammenhang war es interessant herauszufinden, ob eine gleichzeitige Deletion von Komplex I und externer alternativer Dehydrogenase (in Gegenwart von NDH_{2i}) möglich wäre. Zur Klärung dieser Frage wurden haploide Deletionsstämme von NDH2 und einer essentiellen Komplex I-Untereinheit miteinander gekreuzt, anschließend sporuliert und auf eine gleichzeitige Abwesenheit der beiden Gene hin selektiert und mittels Southern Blot Analyse überprüft.

3.3.1 Stämme zur Konjugation und anschließender Sporulation

Zur Kreuzung wurden die haploiden Stämme GB 5.2 (*ndh2::URA3, his-1, leu2-270, xpr2-322, MatB*) und $\Delta nuim$ IL1 (*nuim::LEU2, lys11-23, ura3-302, xpr2-322, MatA*, mit einer ungerichtet ins Genom integrierten Version von NDH_{2i}) verwendet. Da sich in einem diploiden Kreuzungsstamm die beiden Auxotrophien für Histidin und Lysin, sowie für Uracil und Leucin gegenseitig komplementieren sollten, wurde der Ansatz auf Minimalmedium ohne weitere Zusätze ausgespatelt. Von den erscheinenden Kolonien wurde eine ausgewählt, in YPD-Medium angezogen und anschließend für 4 Tage in 20 ml CSM-Medium mit je 20 mg/ml Histidin und Lysin sporuliert. 5 ml des Ansatzes wurden nach der „random spore selection“ Methode (siehe 2.2.15) aufgearbeitet und auf YPD Platten ausplattiert. Da die gewünschten Sporen beide Markergene für die Abwesenheit von *NUIM* und *NDH2*, sowie eine der beiden Auxotrophien besitzen sollten, wurden die erscheinenden Kolonien auf Minimalplatten mit Histidin oder Lysin überimpft. Sporen, die nur auf einer der beiden Selektionsplatten wuchsen, wurden zur weiteren Charakterisierung verwendet. Es wurden 26 Kolonien mit dem Genotyp *his*⁻ und eine mit dem Genotyp *lys*⁻ erhalten.

3.3.2 Southern Blot und Hybridisierung

Die entstanden Kolonien wurden mittels Southern Blot Analyse auf die Abwesenheit des *NUIM* und des *NDH2* Gens überprüft. Dazu wurden je 500 ng Gesamt-DNA mit *XhoI* bzw. *BamHI* verdaut, auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mittel alkalischem Kapillartransfer auf eine Hybond N⁺-Membran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierten *SalI* Fragmenten, die den gesamten offenen Leserahmen des *NUIM* und des wildtypischen *NDH2* Gens, sowie größere flankierende Bereiche des entsprechenden Genlokus enthielten (Abb. 3.16). Das erhaltene Fragmentmuster belegte, dass in 26 von 27 untersuchten Stämmen weder das *NUIM* Gen, noch das wildtypische *NDH2* Gen vorhanden waren. Die Analyse einiger ausgewählter Stämme zeigt Abb. 3.16. Ein *his⁻*-Stamm (Abb. 3.16A Spur 1) war vermutlich aneuploid. Es fällt auf, dass das Fragmentmuster von *NDH2_i* vier statt drei Banden enthält (Abb. 3.16B, Spur I). Möglicherweise gibt es in diesem Stamm eine zweite ungerichtete genomische Integration des *NDH2* Leserahmens oder Teilen davon. Das entsprechende *BamHI*-Fragment ergäbe dann bei der Hybridisierung ein Signal.

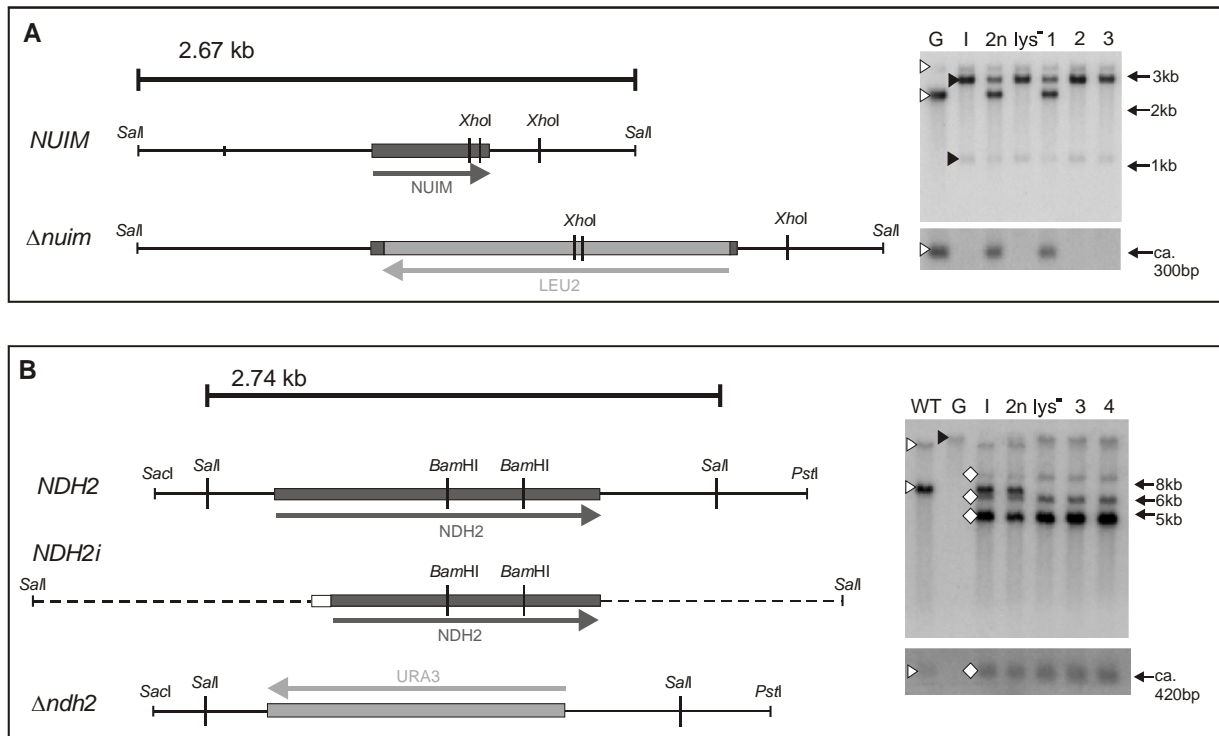


Abb. 3.16 Southern Blot Analyse von Sporen zur Überprüfung der Genloci für *NUIM* (A, Restriktion mit *XhoI*) und *NDH2* (B, Restriktion mit *BamHI*).

Anhand der Schnittstellen innerhalb der Sequenz, den die Sonde abdeckt, ergeben sich charakteristische Bandenmuster für die wildtypischen und die deletierten Genloci, die in den Kontrollstämmen mit weißen und schwarzen Dreiecken hervorgehoben sind. (WT) Wildtyp, (G) GB 5.2, (I) *Δnuim* IL1, (2n) diploider Kreuzungsstamm, (*lys⁻*) Stamm mit dem Phänotyp *lys⁻*, (1-4) ausgewählte Stämme mit dem Phänotyp *his⁻*, von denen Nr.1 als einzige aneuploid war. Im Falle des *NDH2* Gens musste noch zwischen der wildtypischen externen Variante (B, *NDH2*) und der gekürzten internen Variante (B, *NDH2_i*) unterschieden werden. Diese ist mit der *NUAM* Präsequenz fusioniert (weißer Bereich); die gestrichelte Linie soll verdeutlichen, dass die flankierenden Bereiche aus dem *NUAM* Genlokus stammen. Das Bandenmuster von *NDH2_i* ist mit weißen Rhomben gekennzeichnet.

3.4 Zielgerichtete Mutationen im offenen Leseraster von YLNDH2

Mehrere Punktmutationen, zwei Deletionen und eine Insertion wurden durch zielgerichtete Mutagenese in den offenen Leserahmen von YLNDH2 eingeführt. Dabei wurden vor allem Aminosäuren innerhalb der konservierten Domänen ausgetauscht (siehe Einleitung Abb. 1.1). Eine vorläufige Charakterisierung der Membranen dieser Stämme sollte erste Anhaltspunkte geben über die Assoziation des Enzyms mit der inneren Mitochondrienmembran und seine Interaktion mit Ubichinon. Außerdem sollten die beiden Dinukleotid Bindungsmotive den Bindungsstellen für FAD bzw. NADH zugeordnet werden. Es wurden insgesamt 21 Mutantenstämme konstruiert; sowie ein Stamm mit einer unveränderten Kopie des Leserasters als komplementierter Wildtyp mit gleichem genetischen Hintergrund.

3.4.1 Übersicht über die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren

In Abb. 3.17 sind die ausgetauschten Aminosäuren sowie ihre Positionen im offenen Leserahmen der NDH2 schematisch aufgelistet: Innerhalb der beiden Dinukleotid Bindungsmotive I und II wurde das jeweils zweite der drei hoch konservierten Glycine gegen Valin ausgetauscht. Die drei Glycine bilden einen Knick am Übergang zwischen dem ersten β -Strang und der α -Helix, was die enge Packung der beiden Strukturelemente, sowie eine korrekte Bindung des Nukleotids gewährleistet [Lesk, 1995]. Jede andere Aminosäure an dieser Stelle mit einer größeren Seitenkette als Glycin würde die Faltung und die Bindung von FAD oder NADH verhindern oder zumindest stark einschränken.

Das in Hefen konservierte Serin 142 am Ende des ersten Dinukleotid Bindungsmotivs wurde in den bei Wierenga *et al.* [1985] postulierten sauren Rest umgewandelt. Umgekehrt wurde der saure Rest im zweiten Motiv, nämlich Glutamat 320, in Serin umgewandelt.

In der *E. coli* Sequenz ist eine Reihe von aufeinanderfolgenden basischen Aminosäuren an Position 30-35 vorhanden, die in allen übrigen Sequenzen fehlt. Diese tragen möglicherweise mit ihrer positiven Ladung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zu einer Membranassoziation bei. Um dies zu testen, wurden drei Lysine an der homologen Position (zwischen Asparagin 135 und Tyrosin 136) in die *Y. lipolytica* Sequenz eingefügt. Analog dazu wurden in einer anderen Mutante zwei Lysine an Position 112 und 113 deletiert, die eine ähnlich basische Region in Hefen repräsentieren, die dafür in *E. coli* fehlt. Beide Änderungen wurden in einer Doppelmutante kombiniert.

Im Dinukleotid Bindungsmotiv II wurden innerhalb des ungewöhnlich langen α -helikalen „loop“ Bereiches die Aminosäuren E294 bis E300 deletiert.

Mit der Absicht, die Bindungseigenschaften des Enzyms bezüglich Ubichinon zu beeinflussen, wurden in den beiden apolar/aromatischen Bereichen der Sequenz Tyrosin-, Phenylalanin- und Leucinreste gegen Histidin oder Glutamat ausgetauscht. Im Gegenzug wurden die beiden flankierenden sauren Reste des apolar/aromatischen Bereichs II, Aspartat 219 und Glutamat 239, durch ihre neutralen Amide ersetzt. Drei weitere aromatische Reste und ein Leucin wurden außerdem in putativen α -helikalen Bereichen des weniger konservierten C-terminalen Abschnitts der Sequenz mutagenisiert. W385 entspricht dabei dem konservierten Tryptophan, das bei deVries *et al.* [1992] im Zusammenhang mit einer möglichen Ubichinon-Bindungsstelle in NDI1 von *S. cerevisiae* vorgeschlagen wurde.

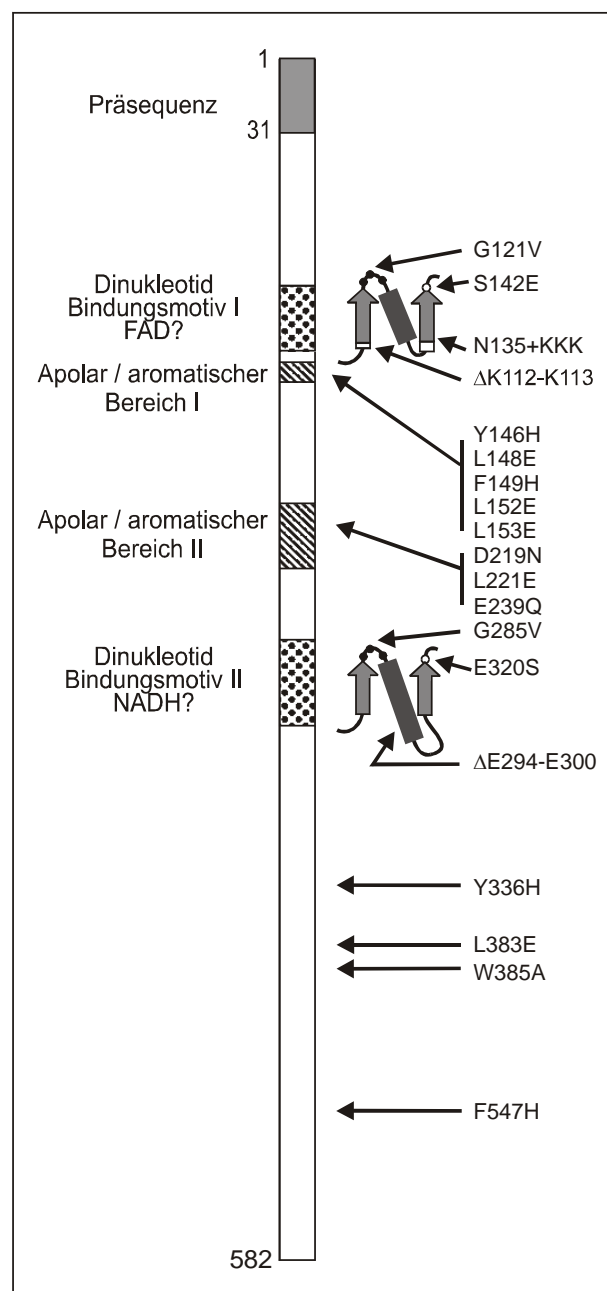


Abb. 3.17 Positionen von zielgerichteten Mutationen im offenen Leserahmen von NDH2.

3.4.2 Herstellung eines Expressionsvektors

Als Matrize für die Mutagenese PCR wurde der genomische Klon der NDH2 pE8 verwendet. Ein 2,7 kb großes *SalI* Fragment, das den kompletten offenen Leserahmen enthielt, wurde in den *E. coli/Y. lipolytica* „Shuttle“-Vektor pUB4 kloniert. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung des gesamten NDH2 Gens überprüft, bevor die Plasmide in den haploiden *ndh2* Deletionsstamm GB 5.2 transformiert wurden. Die Selektion erfolgte auf Platten mit YPD-Hygromycin B.

3.4.3 Aktivitäten und Enzymgehalte in Membranen der Mutantenstämme

Von den Mutantenstämmen, sowie vom komplementierten Wildtyp wurden mitochondriale Membranen im kleinen Maßstab präpariert und zunächst die maximalen NADH:DBQ Aktivitäten in Gegenwart von DQA bestimmt (Tab. 3.6). Als Qualitätskontrolle wurden auch NADH:HAR Aktivitäten gemessen, diese wurden jedoch nicht zur Normierung der alternativen NADH:DBQ Aktivitäten eingesetzt. Mehr als die Hälfte der Stämme waren entweder völlig inaktiv oder zeigten nur noch eine geringe Restrate.

Um die Expression der mutierten Enzyme in Membranen zu quantifizieren, wurden Western Blots mit dem polyklonalen Antiserum angefertigt und die Chemilumineszenz mittels eines Imagers gemessen (Abb. 3.18). Dabei wurden die Expressionsgrade der mutierten Enzyme in % des Wildtyps angegeben (Tab. 3.6). Trotz der relativ hohen Streuung der Chemilumineszenzdaten zwischen den einzelnen Membranpräparationen konnte man bereits die Aussage treffen, dass in allen inaktiven Membranen bis auf L152E, G285V und F547H auch keine Expression von NDH2 stattgefunden hatte, was diese Mutanten für weitere Untersuchungen wertlos machte.

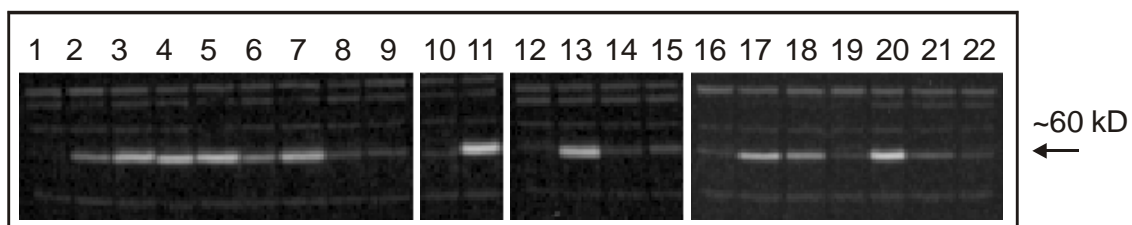


Abb. 3.18 Chemilumineszenz von Wildtyp- und Mutantenmembranen.

Pro Spur wurden 10 µg Membranprotein aufgetragen; es ist jeweils nur eine Präparation dargestellt. Die Nummerierung ist zur besseren Übersicht in Tab. 3.6 mit angegeben.

Tab. 3.6 Übersicht über Aktivität und NDH2-Gehalt in Wildtyp- und Mutantenmembranen.

Von den meisten Stämmen wurden die Daten von 2-3 Membranpräparationen gemittelt. Die Chemilumineszenz der Mutantenmembranen im Western Blot wurde auf drei gemittelte Wildtyp-Präparationen normiert.

Domäne	Spur in Abb. 3.18	Mutation	NADH:DBQ+DQA Aktivität		Expression
			[U/mg]	%	%
	11	Wildtyp	0.74 ± 0.15	100	100 ± 39
Dinukleotid Bindungs- motiv I	16	G121V	0.01	1	4
	12	S142E	0.01 ± 0.01	1	8 ± 6
	15	N135+KKK	0.02 ± 0.01	3	7 ± 3
	1	ΔK112-K113	0.04	5	1
	14	N135+KKK/ ΔK112-K113	0.01 ± 0.01	1	4 ± 3
Apolar/ aromatischer Bereich I	3	Y146H	0.69 ± 0.06	93	91 ± 19
	2	F147H	0.33 ± 0.09	45	28 ± 3
	9	L148E	0.11 ± 0.01	15	7 ± 1
	20	F149H	0.32 ± 0.02	43	69 ± 24
	18	L152E	0.03	4	19
	19	L153E	0.02	3	4
Apolar/ aromatischer Bereich II	4	D219N	0.66 ± 0.03	89	70 ± 17
	21	L221E	0.02	3	7
	7	E239Q	0.67 ± 0.08	91	77 ± 30
Dinukleotid Bindungs- motiv II	17	G285V	0.01	1	32
	13	E320S	0.21 ± 0.03	28	73 ± 15
	10	ΔE294-E300	0.02 ± 0.02	3	9 ± 6
C-terminaler Bereich	5	Y336H	0.35 ± 0.04	47	103 ± 30
	22	L383E	0.01	1	4
	8	W385A	0.11 ± 0.02	15	10 ± 3
	6	F547H	0.05 ± 0.05	7	18 ± 15

Eine Reihe von Mutanten wurde detaillierter untersucht, indem die kinetischen Parameter für DBQ und NADH, sowie ein zweites Mal die Chemilumineszenz von 2-3 Membranpräparationen mit dem polyklonalen Antiserum im Western Blot bestimmt wurden (Abb. 3.19 und Tab. 3.7). Für aktive Mutanten wurden alle K_M und V_{max} Werte, wie in 3.1.4 beschrieben, mit der modifizierten Michaelis Menten Gleichung berechnet. Die absoluten Werte stimmen daher nicht mit Tab. 3.6 überein, wo die Maximalgeschwindigkeiten per Einzelmessung unter Substratsättigung ($100 \mu\text{M}$ NADH und $60 \mu\text{M}$ DBQ) bestimmt wurden. Relativ zueinander ergeben die Daten der einzelnen Mutanten aber ein übereinstimmendes Bild. Für die drei inaktiven Mutanten (L152E, G285V und F547H) sind die Einzelmessungen aus Tab. 3.6 auch in Tab 3.7 angegeben.

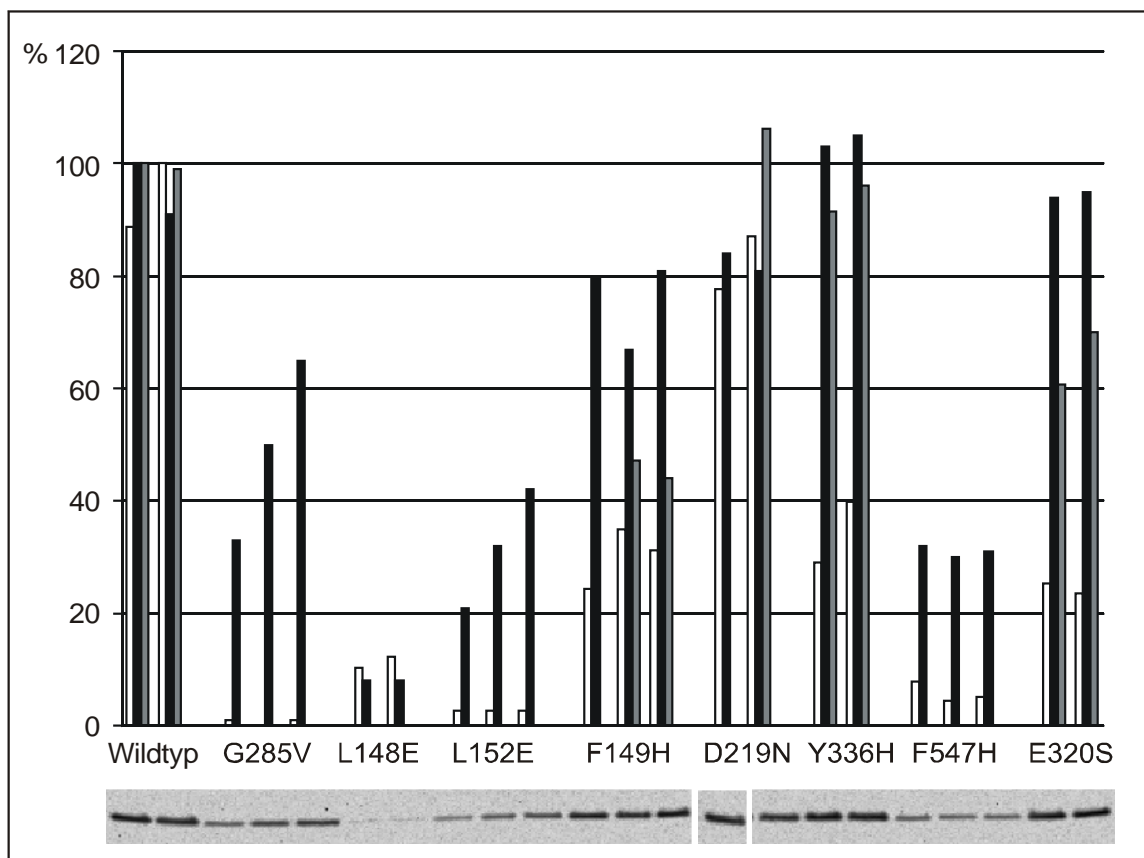


Abb. 3.19 Relative Darstellung der in Tab. 3.7 aufgelisteten Kinetik- und Chemilumineszenz Daten ausgewählter NDH2 Mutanten. Gezeigt sind maximale Aktivitäten (V_{max} sofern vorhanden aus Kinetiken) mit DBQ (weiße Säulen), mit NADH (graue Säulen) und Expressionsniveaus (schwarze Säulen) einzelner Präparationen. Darunter sind die dazugehörigen Spuren des Western Blots, die zur Quantifizierung der Chemilumineszenz verwendet wurden, invertiert abgebildet.

Tab. 3.7 Zusammenfassung detaillierter Kinetik- und Chemilumineszenz Daten ausgewählter NDH2 Mutanten. Für die Kinetikmessungen wurden jedes Mal 35 µg/ml Membranprotein eingesetzt. Die Expression wurde auf die Wildtyp Präparation mit der höchsten Chemilumineszenz normiert. Jede Zeile der Tabelle entspricht einer Membranpräparation des entsprechenden Mutantenstammes.

Mutation	Kinetiken für DBQ		Kinetiken für NADH		% Exp
	K_M [µM]	V_{max} [U/mg]	K_M [µM]	V_{max} [U/mg]	
Wildtyp	13.6 ± 1.4	1.03 ± 0.03	14.5 ± 1.5	0.94 ± 0.02	100
	16.5 ± 2.3	1.16 ± 0.03	11.6 ± 1.9	0.93 ± 0.03	91
Y146H	7.40 ± 0.04	0.62 ± 0.00	n.g.		n.g.
F147H	6.25 ± 0.68	0.36 ± 0.01	n.g.		n.g.
L148E	4.47 ± 2.07	0.12 ± 0.01	nicht auswertbar		8
	3.52 ± 0.66	0.14 ± 0.01	nicht auswertbar		8
F149H	7.10 ± 1.05	0.28 ± 0.01	n.g.		80
	7.69 ± 1.47	0.40 ± 0.01	12.8 ± 1.2	0.44 ± 0.01	67
	4.81 ± 0.90	0.36 ± 0.01	12.0 ± 0.8	0.41 ± 0.01	81
L152E		0.03			21
		0.03			32
		0.03			42
D219N	12.5 ± 1.6	0.90 ± 0.03	n.g.		84
	11.2 ± 0.9	1.00 ± 0.03	21.9 ± 3.3	1.00 ± 0.037	81
G285V		0.01			33
		0			50
		0.01			65
E320S	3.45 ± 0.88	0.29 ± 0.02	121.2 ± 22.6	0.57 ± 0.05	94
	4.92 ± 0.59	0.27 ± 0.01	210.8 ± 123.2	0.66 ± 0.23	95
Y336H	4.56 ± 0.47	0.34 ± 0.01	133.3 ± 27.7	0.86 ± 0.09	103
	8.26 ± 1.08	0.46 ± 0.02	163.6 ± 63.5	0.90 ± 0.20	105
F547H		0.09			32
		0.05			30
		0.06			31

Man kann die Ergebnisse der Mutagenese von NDH2 wie folgt zusammenfassen:

In sämtlichen Stämmen, bei denen eine Mutation im Dinukleotid Bindungsmotiv I eingeführt worden war, war keine alternative Dehydrogenase Aktivität oder Expression in mitochondrialen Membranen nachzuweisen. Es kann vermutet werden, dass das Enzym unmittelbar nach seiner Synthese durch Proteasen abgebaut wurde, beispielsweise aufgrund von unkorrekter Faltung.

Wurden Leucinreste in den beiden apolar/aromatischen Bereichen durch den sauren Rest Glutamat ersetzt, fand in den meisten Fällen ebenfalls eine drastische Reduktion der Expression von NDH2 statt. Die einzige Ausnahme bildet hier der Stamm L152E, in dessen Membranen noch durchschnittlich 30% der wildtypischen Enzymmenge nachweisbar waren, jedoch keine NADH:DBQ+DQA Aktivität. Stamm L148E zeigte eine vergleichsweise hohe Restaktivität von ca. 15%. Wurden in den apolar/aromatischen Bereichen Phenylalanin- und Tyrosinreste in Histidin umgewandelt, war der Effekt auf Aktivität und Expression weniger stark ausgeprägt. In Stamm Y146H war die V_{\max} (für DBQ) bei nahezu wildtypischer Expression des Enzyms um etwa 40% reduziert. Die Stämme F147H und F149H zeigten bei Substratsättigung ca. 30% Restaktivität. Während in Stamm F147H (mit 30% Expression) die Aktivität pro Enzymmolekül praktisch unverändert war, zeigte Stamm F149H (mit 70-80% Expression) eine Reduktion der auf den Enzymgehalt korrigierten Aktivität.

Nach Umwandlung der beiden sauren Reste Aspartat 219 und Glutamat 239 in ihre Amide war die Aktivität bei leicht verringerter Expression von NDH2 immer noch wildtypisch. Der K_M Wert von Mutante D219N war etwas erhöht.

Die beiden Mutationen im Dinukleotid Bindungsmotiv II G285V und E320S verursachten die vergleichsweise stärkste Verringerung der Enzymaktivität in Bezug auf das Expressionsniveau: In Stamm G285V ließ sich bei 30%iger Expression von NDH2 keine Enzymaktivität mehr nachweisen. Bei der kinetischen Messung für DBQ sah es in dem wildtypisch exprimierten Stamm E320S zunächst so aus, als sei die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms auf eine Restrate von 30% reduziert. Die Messung mit dem hydrophilen Substrat NADH ergab jedoch einen drastisch erhöhten K_M Wert, so dass der V_{\max} Wert, der unter Standardbedingungen mit 100 μ M NADH gemessen wurde, unterschätzt und unter Substratsättigung von NADH ein V_{\max} Wert von 65% erreicht wurde.

Eine Verkürzung des α -helikalen „Loops“ um sieben Aminosäuren (Δ E294-E300) verhinderte die Expression des Enzyms.

Im C-terminalen Bereich des offenen Leserahmens schließlich führte eine weitere Substitution eines Leucinrestes in Glutamat wiederum zum Verlust der NDH2 in Membranen.

Die Mutation des von deVries [1992] erwähnten konservierten Tryptophan 385 erzeugte einen Stamm mit 15% alternativer Aktivität bei 10% Expression. Dessen Wechselzahl entspricht damit derjenigen des Wildtypenzym. Der Austausch von aromatischen Resten im C-terminalen Bereich gegen Histidin führte bei Stamm Y336H zu einem drastisch erhöhten K_M Wert für NADH bei wildtypischer Expression und V_{max} . Ähnlich wie bei Stamm E320S wurde die Maximalgeschwindigkeit erst bei der kinetischen Messung für NADH, also bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht. In Stamm F547H war bei 30% Expression keine NDH2 Aktivität mehr nachzuweisen.

Berücksichtigt man die Expressionsniveaus als Maß für der Gehalt an alternativer Dehydrogenase in Membranen, war die Aktivität von NDH2 in den Stämmen Y146H, F149H, L152E, G285V, E320S und F547H signifikant herabgesetzt.

3.4.4 Der apparente K_M Wert für DBQ zeigt eine lineare Abhängigkeit zur V_{max} in Mutanten- und Wildtypmembranen

Alle apparenten K_M Werte der Mutantenmembranen für DBQ aus Tab. 3.7 wurden gegen ihre entsprechenden V_{max} Werte aufgetragen. Diese Auftragung resultierte in dem ungewöhnlichen Muster, dass K_M und V_{max} proportional zueinander anstiegen, also in etwa durch eine Gerade beschrieben werden konnten (Abb. 3.20). Dies Ergebnis war recht ungewöhnlich, da sich zwar die Maximalgeschwindigkeit des Enzyms mit seiner Menge (bzw. seinem Expressionsniveau) ändern sollte ($V_{max} = k_3 \cdot [E_0]$), der K_M Wert jedoch davon unabhängig sein sollte. Außerdem waren alle Parameter mit derselben Membranmenge (35 $\mu\text{g/ml}$) im Testansatz bestimmt worden (siehe 3.1.3), um die apparenten K_M Werte für DBQ miteinander vergleichen zu können.

Um diesem Sachverhalt auf den Grund zu gehen, wurden Membranen des komplementierten Wildtyps der Mutantenserie mit Membranen des *ndh2* Deletionsstammes GB 5.2 in einem Verhältnis verdünnt, dass Mischungen mit 10%, 25%, 50%, 75% und 100% Wildtyp-NDH2 entstanden. Mit diesen Membranmischungen wurden wiederum mit je 35 $\mu\text{g/ml}$ Gesamtprotein die Michaelis Menten Parameter für DBQ bestimmt (Tab. 3.8). Erwartungsgemäß sank die Maximalgeschwindigkeit mit sinkendem Anteil an Wildtyp NDH2; die apparenten K_M Werte sanken jedoch wiederum proportional dazu, wie vorher bei den Mutanten. Gegeneinander aufgetragen fügten sich die Punkte genau in die für Mutantenmembranen beobachtete lineare Abhängigkeit (Abb. 3.20). Zwei zur Kontrolle gemessene K_M Werte für das hydrophile Substrat NADH blieben dagegen bei niedrigem und hohem Wildtypanteil konstant (Tab. 3.8)

3 ERGEBNISSE

Tab. 3.8 Michaelis Menten Parameter für DBQ und NADH mit verdünnten Wildtyp Membranen.

Es wurden Membranzmischungen mit 10% bis 100% Anteil des komplementierten Wildtyps der Mutantenserie hergestellt. Zum Mischen wurden Membranen des *ndh2* Deletionsstammes GB 5.2 verwendet. Alle Kinetiken wurden mit 35 µg/ml Gesamtprotein gemessen und mit der modifizierten Michaelis Menten Gleichung im Programm ENZFITTER berechnet.

% WT	DBQ		NADH	
	$K_M(\text{app.})$ [µM]	V_{max} [U/mg]	$K_M(\text{app.})$ [µM]	V_{max} [U/mg]
9.4	1.69 ± 0.94	0.09 ± 0.01		
24	4.55 ± 0.34	0.25 ± 0.00	10.0 ± 1.9	0.20 ± 0.01
48	6.73 ± 0.82	0.50 ± 0.01		
74	9.66 ± 1.15	0.74 ± 0.02		
100	16.4 ± 2.4	1.15 ± 0.05	11.9 ± 2.2	0.86 ± 0.00

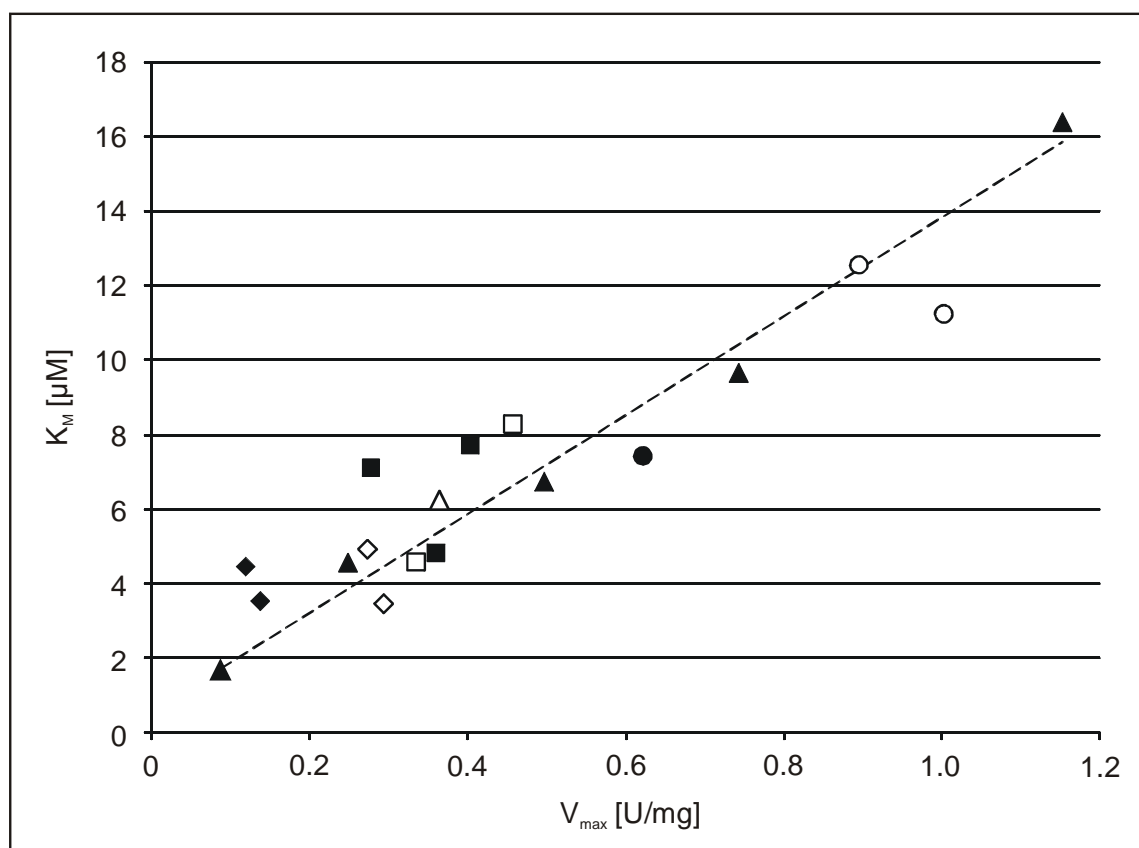


Abb. 3.20 Apparente K_M und V_{max} Werte von Mutantenmembranen und gemischten Wildtypmembranen stiegen linear proportional zueinander an. Die Daten der gemischten Wildtypmembranen (▲: 9,4%, 24%, 48%, 74% und 100% NDH2) sind in Tab. 3.8 angegeben; die anderen Symbole repräsentieren je eine Membranpräparation der Stämme Y146H (●), F147H (△), L148E (◆), F149H (■), D219N (○), E320S (◇) und Y336H (□) (siehe Tab. 3.7). Die Regressionsgerade wurde nur durch die Daten der Wildtyp-Messungen gelegt.

Das Ergebnis konnte mit mehreren anderen Membranpräparationen des komplementierten Wildtyps, sowie mit dem Stamm PIPO (mit der nativen genomischen Variante von NDH2) reproduziert werden (Abb. 3.21). Bei Präparationen mit besonders hoher spezifischer Aktivität war ein noch steilerer Anstieg der apparenten K_M zu beobachten, so dass der Zusammenhang zwischen Aktivität und apparenter K_M für DBQ nur bei V_{max} Werten unter ~ 1 U/mg quasi-linear war.

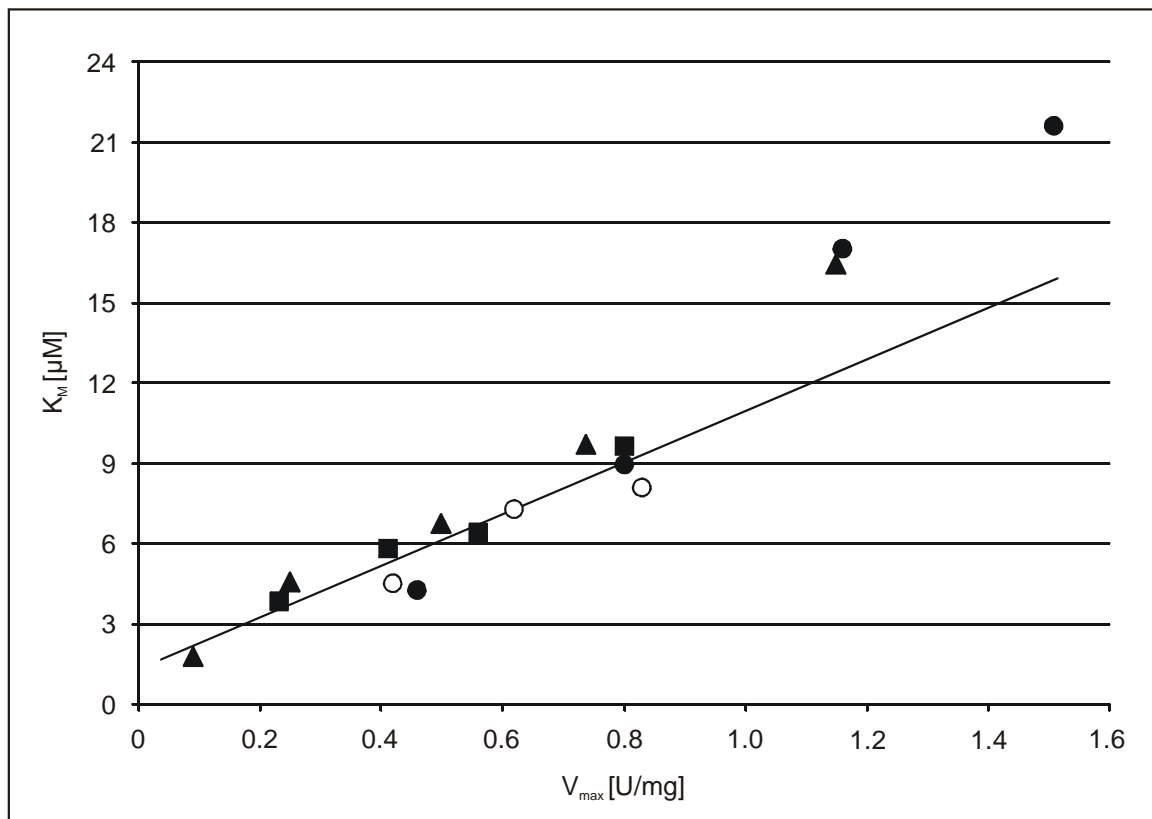


Abb. 3.21 Lineare Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten in gemischten Membranen von drei verschiedenen Präparationen des komplementierten Wildtyps (▲ siehe Abb. 3.18, sowie ■ und ●) und des Stammes PIPO (○). Der Gehalt an Wildtyp-NDH2 war immer 25%, 50%, 75% und 100%. Die Kinetiken wurden mit je 35 μ g/ml Gesamtprotein gemessen. Eine Regressionsgerade wurde durch alle Punkte < 1 U/mg gelegt. Diese hatte die Gleichung $y = 9,62x + 1,29$.

3.4.5 Testen der Abhängigkeit von apparenten K_M und V_{max} Werten bei anderen Enzymen

Michaelis Menten Kinetiken mit gemischten Membranen, die jeweils nur prozentuale Anteile an Wildtyp-Enzym enthielten, wurden für die Komplex I Aktivität von *Y. lipolytica* und die Komplex III Aktivität von *S. cerevisiae* gemessen.

Um ausschließlich die Komplex I NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität zu messen, wurde dNADH als Elektronendonator eingesetzt. Zum Herstellen der Membrangemische wurde der komplementierte Wildtyp der NDH2 Mutantenserie verwendet, der die native genomische Version von Komplex I enthielt, sowie der Stamm PIPO, der zwar die genomisch integrierte Version des *NUGM*-His-tag trug, jedoch bezüglich seiner Aktivität wildtypisch war. Die Membranen wurden mit dem Komplex I Deletionsstamm $\Delta nuam$ pUB7 verdünnt. Es stellte sich heraus, dass auch für Komplex I eine lineare Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten bestand, die aber etwas schwächer ausgeprägt war (Abb. 3.22).

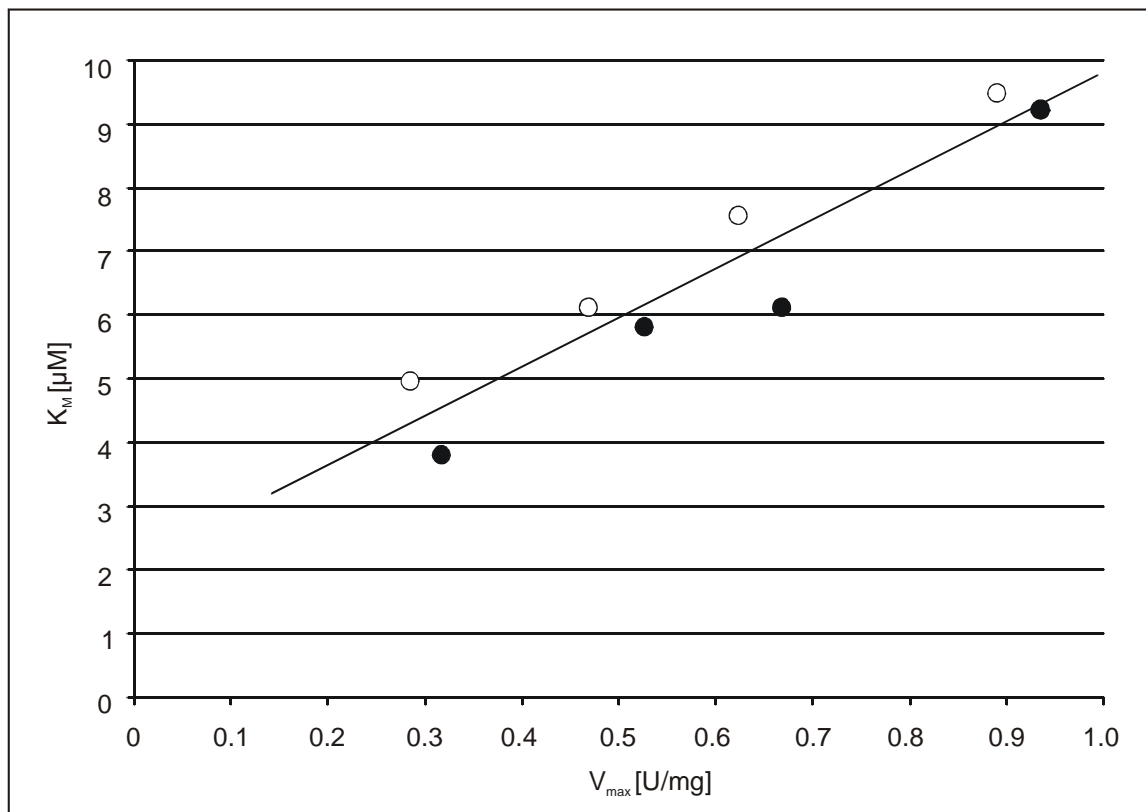


Abb. 3.22 Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten von Komplex I in gemischten Membranen des komplementierten Wildtyps (●) und des Stammes PIPO (○). Der Gehalt an Wildtyp-Komplex I war immer 25%, 50%, 75% und 100%. Die Kinetiken wurden mit je 35 μ g/ml Gesamtprotein gemessen. Eine Regressionsgerade durch alle Punkte hatte die Gleichung $y=7,77x+2,05$

In *S. cerevisiae* Membranen wurde die katalytische Ubihydrochinon:Cytochrom *c* Oxidoreduktase Aktivität mit Decylubihydrochinon (DBH) als Elektronendonator bestimmt. Membranen des haploiden Wildtypstammes W303-1A wurden mit Membranen des Komplex III Deletionsstammes CB2 $\Delta qcr8$ in den entsprechenden Verhältnissen verdünnt. Es war nicht möglich, diese Messungen mit *Y. lipolytica* Membranen durchzuführen, weil keine Komplex III Nullmutante existiert. Die Raten wurden als Cytochrom *c* Reduktion bei 550-540 nm gemessen und mit $\epsilon_{550-540} = 19\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet. Die Sättigungskurven der DBH:Cytochrom *c* Aktivitäten zeigten keinen abweichenden Kurvenverlauf; die kinetischen Parameter wurden daher mit der unveränderten Michaelis Menten Gleichung berechnet. In drei Membranpräparationen ließen sich keine oder nur sehr leichte Anstiege der K_M Werte mit steigendem Anteil an Wildtyp Protein feststellen (Abb. 3.23).

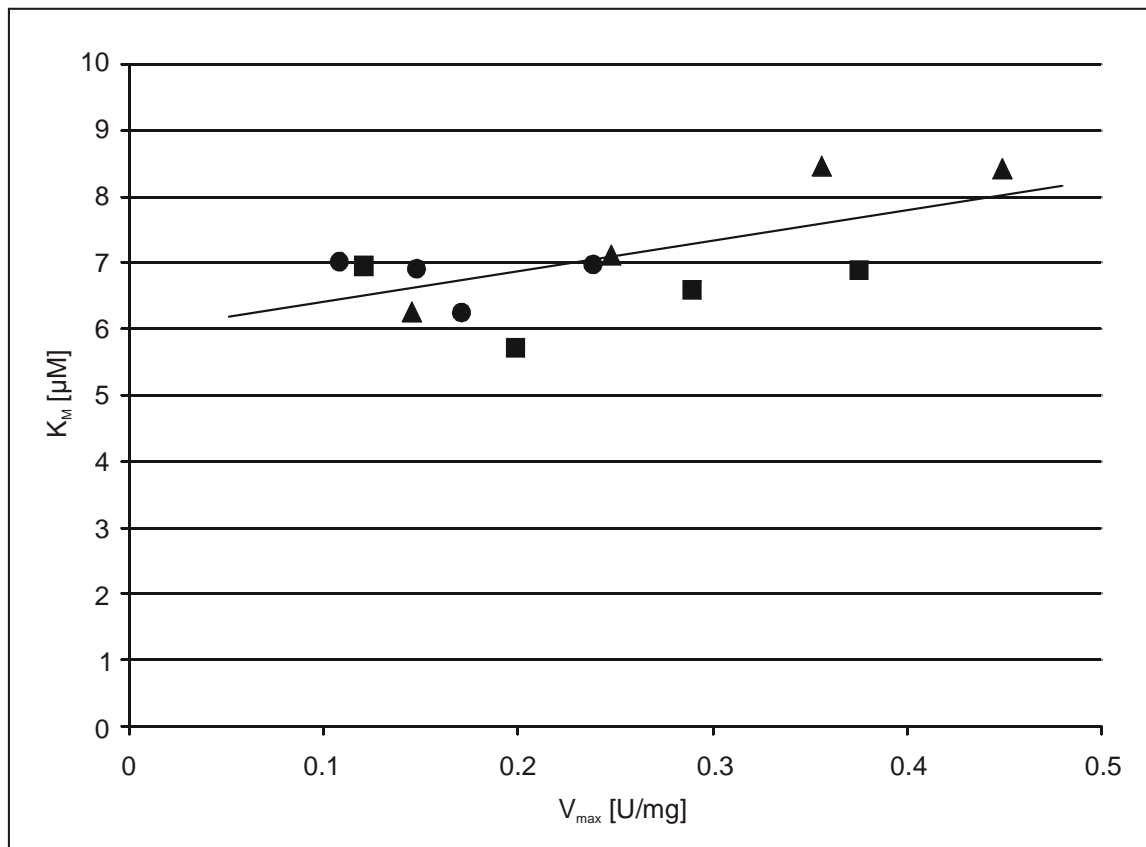


Abb. 3.23 Abhängigkeit zwischen K_M und V_{max} Werten von Komplex III in gemischten Membranen.

Drei Präparationen (●, ■ und ▲) des *S. cerevisiae* Wildtypstammes W303-1A wurden mit Membranen des Komplex III Deletionsstammes CB2 $\Delta qcr8$ in einem Verhältnis gemischt, dass der Gehalt an Wildtyp Membranen 25%, 50%, 75% und 100% war. Die Kinetiken wurden mit je 50 µg/ml Gesamtprotein gemessen. Die Regressionsgerade durch alle Punkte hatte die Gleichung $y=4,65x+5,85$.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von YLNDH2 in mitochondrialen Membranen

In der vorliegenden Arbeit wurde die alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase von *Yarrowia lipolytica* überwiegend durch Messungen ihrer katalytischen Aktivität in natürlicher Membranumgebung charakterisiert. Das Enzym reagierte wie viele andere alternative Dehydrogenasen mit verschiedenen Chinonanaloga und dem artifiziellen Elektronenakzeptor DCPIP. Im Gegensatz zur Situation in *E. coli* [Björklöf *et al.*, 2000] waren die Reaktionsraten mit DCPIP sogar wesentlich höher verglichen mit dem Standardsubstrat DBQ.

1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)chinolon (HDQ) wurde unter mehreren Chinolonen als wirksamer Inhibitor für YLNDH2 identifiziert. Mit einer I_{50} von 200 nM in mitochondrialen Membranen ist HDQ etwa 500× so wirkungsvoll wie Flavon bei *S. cerevisiae* NDI1 [de Vries und Grivell, 1988]. Interessanterweise wurden Reaktionsraten mit vergleichsweise hydrophoben Substraten (DBQ und Q_1) signifikant besser gehemmt als mit hydrophilen Substraten.

Obwohl es sich bei YLNDH2 im Gegensatz zu Komplex I nicht um ein integrales Membranprotein handelt, wurde eine ähnliche lineare Abhängigkeit des apparenten K_M Wertes für das hydrophobe Substrat DBQ von der Membranmenge, die im Test eingesetzt worden war, festgestellt. Danach wurden alle vergleichenden Kinetiken mit derselben Menge an Gesamtprotein im Testansatz gemessen.

Aus bislang nicht vollständig geklärter Ursache hatten einige Michaelis Menten Kurven einen Verlauf, der einer sigmoiden Kurve ähnlich sah. Analyse der Daten mit dem Programm ENZFITTER ergab jedoch keinerlei Hinweise auf einen kooperativen Reaktionsmechanismus. Die Auswertung mit dem Programm ENZFITTER wurde deshalb durch Modifikation der klassischen Michaelis Menten Gleichung

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \text{ in } v = \frac{v_{\max} \cdot ([S] - x)}{K_M + ([S] - x)} \text{ signifikant verbessert.}$$

4.2 Untersuchung des Reaktionsmechanismus von YLNDH2

Anhand von kinetischen Messungen mit mitochondrialen Membranen wurde für die alternative NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität aus *Y. lipolytica* ein Ping-Pong Reaktionsmechanismus bestimmt. Dieser wurde bereits in zwei Studien für die alternative NADH:DCPIP Oxidoreduktase Aktivität von *S. cerevisiae* NDI1 [Velázquez und Pardo,

2001] und dem als Dimer vorliegenden, FMN-haltigen alternativen Enzym von *T. brucei* [Fang und Beattie, 2002] herausgefunden. Die Messung mit DBQ spiegelt jedoch eher als mit dem wasserlöslichen Akzeptor DCPIP die physiologische Situation in Membranen wider, zumal *Y. lipolytica* ein längerkettiges Ubichinon (Q₉) verwendet als *S. cerevisiae* (Q₆).

Das für *Y. lipolytica* entwickelte Modell beschreibt die abwechselnde Bindung beider Substrate so, dass zunächst Elektronen von NADH auf FAD übertragen und diese dann von reduziertem FADH₂ an DBQ weitergegeben werden (siehe Abb. 3.5). Möglicherweise binden die reaktiven Gruppen von NADH und DBQ sogar in der gleichen Bindungstasche. Einen Hinweis darauf liefert ein analoges Enzym, die Chinonreduktase (QR1) aus Säugetieren, die eine Zwei-Elektronen-Übertragung von NAD(P)H auf wasserlösliche Chinone katalysiert. Kristallstrukturen des rekombinanten menschlichen Enzyms mit NADPH und mit Durochinon belegen deutlich, dass beide Substrate in ähnlicher Weise binden, nämlich so, dass der Isoalloxazinring des Cofaktors FAD mit Durochinon bzw. mit dem Nicotinamidring von NADPH flach aneinander gelagert ist [Faig *et al.*, 2000]. Ein ähnliches Szenario wäre auch für YLNDH₂, die als Cofaktor ebenfalls FAD besitzt, denkbar.

Ebenfalls mit Hilfe von Kinetikstudien wurde für den Inhibitor HDQ ein nicht-kompetitiver Mechanismus der Hemmung gezeigt, der im Falle des Ping-Pong Reaktions besagt, dass der Inhibitor sowohl an die oxidierte als auch an die reduzierte Form von YLNDH₂ binden würde. Für DBQ und NADH wurden ähnlich große Hemmkonstanten K_i und K_{ii} ermittelt.

4.3 Struktur und Funktion von YLNDH₂

4.3.1 Physiologische Funktion von NDH₂

Die Atmungsketten verschiedener Ascomyceten unterscheiden sich grundlegend bezüglich ihrer Ausstattung mit externen und internen NADH Dehydrogenasen (Abb. 4.1). In *Y. lipolytica* hatten *ndh2Δ* Deletionsmutanten keinen sichtbaren Wachstumsnachteil. In *N. crassa* war es möglich, alle alternativen Dehydrogenasen in sämtlichen Kombinationen zu deletieren. Die Deletion eines oder beider externen Enzyme in *S. cerevisiae* hatte keinen Einfluss auf das respiratorische Wachstum mit Glucose. Diese Ergebnisse sprechen grundsätzlich für eine funktionelle Redundanz der extern orientierten alternativen Enzyme. Potentielle alternative Stoffwechselwege wären z.B. das Ethanol/Acetaldehyd Shuttle und/oder das Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase System, die beide bei Luttik *et al.* [1998] beschrieben werden.

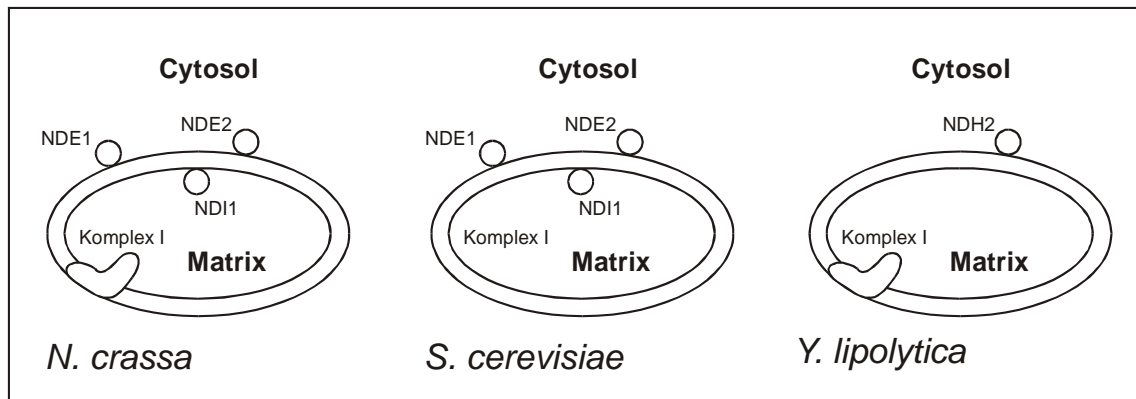


Abb. 4.1 Schematische Darstellung von externen und internen NADH Dehydrogenasen in Ascomyceten und deren Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran.

In *Y. lipolytica* war es jedoch nicht möglich, Komplex I Deletionsmutanten zu generieren. Dies bedeutet, dass die extern orientierte NDH2 den Funktionsausfall von Komplex I nicht kompensieren kann. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass Shuttlesysteme, die in der Matrix anfallende Reduktionsäquivalente ins Cytosol transportieren könnten, in *Y. lipolytica* fehlen oder keine genügend große Kapazität haben. Vermutlich aus demselben Grund war auch in *N. crassa* eine gleichzeitige Deletion von Komplex I und NDI1 nicht möglich.

Überraschenderweise ließen sich in *N. crassa* aber auch keine haploiden Doppelmутanten aus *nde2Δ* und Stämmen ohne funktionellen Komplex I herstellen [Carneiro *et al.*, 2003]. Dies würde bedeuten, dass *N. crassa* NDE2 die Funktion von Komplex I kompensieren kann, was wiederum voraussetzen würde, dass doch Reduktionsäquivalente aus der Matrix ins Cytosol transportiert werden.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, war es in *Y. lipolytica* möglich, haploide Stämme ohne Komplex I und NDH2 in Gegenwart von NDH2_i zu generieren. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Annahme, dass Shuttlemechanismen in *Y. lipolytica* keine Rolle spielen.

4.3.2 Zielgerichtete Mutationen im offenen Leseraster von YLNDH2

In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Mutationen in konservierte Bereiche des offenen Leserasters der alternativen Dehydrogenase von *Y. lipolytica* eingeführt, um anhand der Aktivitäten in mitochondrialen Membranen erste Anhaltspunkte über die Membranassoziation des Enzyms und seine Interaktion mit Ubichinon zu erhalten. Außerdem sollten die beiden $\beta\alpha\beta$ Dinukleotid Bindungsmuster den Bindungsstellen für den Cofaktor FAD und das Substrat NADH zugeordnet werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde die N-terminale Bindungsdomäne des *E. coli* Enzyms von Björklöf *et al.* [2000] als FAD Bindungsstelle vorgeschlagen. Die Autoren kamen zu diesem Schluss, weil die Enzymaktivität während einer Affinitätsreinigung bewahrt wurde, möglicherweise dank einer Stabilisierung des Cofaktors durch den N-terminal angefügten His-tag. Außerdem stimmte die Annahme mit der Kristallstruktur der NDH2-homologen Lipoamid Dehydrogenasen von *Pseudomonas putida* und *Azotobacter vinelandii* [Mattevi *et al.*, 1991 und 1992] überein, in der FAD ebenfalls in der ersten der beiden $\beta\alpha\beta$ -Domänen bindet.

Die Daten der vorliegenden Mutagenese lieferten erstmals eindeutige Belege für dieses Modell: Die Substitution des C-terminalen sauren Restes (E320S), der laut Lesk [1995] die Bindung der Ribose der Adenosinhälfte des Dinukleotids stabilisiert, resultierte in einer mehr als 10fachen Erhöhung des K_M Wertes für NADH. Dies kann als klares Indiz dafür gesehen werden, dass NADH tatsächlich im Bindungsmotiv II bindet. Die V_{max} der NADH-Kinetik war mit 65% gegenüber dem Wildtyp mäßig reduziert, das Expressionsniveau des Enzyms wildtypisch. Die Mutation eines Tyrosinrestes 16 Aminosäuren stromabwärts von E320 (Y336H) ergab einen ähnlichen Phänotyp: 10fache Erhöhung des K_M Wertes für NADH bei wildtypischer V_{max} und Expression. Tyrosin 336 befindet sich in einem weniger konservierten, aber mit Hilfe des PROF-Algorithmus [Ouali & King, 2000] als α -helical vorhergesagten Bereich der Sequenz; man kann annehmen, dass diese Helix ebenfalls an der Bindung von NADH beteiligt ist.

Sämtliche Mutationen, die das Dinukleotid Bindungsmotiv I betrafen, führten zu einem vollständigen Verlust der Expression von YLNDH2. Dies ergibt dann einen Sinn, wenn man annimmt, dass eine Assemblierung des Enzyms ohne den Cofaktor FAD gar nicht erst zustande kommt. Im Gegensatz dazu führte die Mutation des essentiellen zweiten Glycins im Dinukleotid Bindungsmotiv II (G285V) zwar zur Inaktivität des Enzyms, es ließen sich aber immerhin noch 30 % NDH2 in Membranen nachweisen.

Durch die eingeführten Punktmutationen von apolaren oder aromatischen Resten in den beiden entsprechenden Regionen konnte die Ubichinon Bindungsstelle von YLNDH2 nicht näher identifiziert werden, da keine der noch aktiven Mutanten eine erhöhte K_M für DBQ aufwies. Vielleicht ist es aufgrund des ungewöhnlichen Verhaltens von Michaelis Menten Parametern (siehe 4.4) auch gar nicht möglich, diese durch kinetische Messungen in Membranen herauszufinden.

Während der Konstruktion eines Stammes, der an der NDH2 N-terminal einen Sechsfach Histidin-tag tragen sollte, wurde herausgefunden, dass die Veränderung des nativen C-Terminus von YLNDH2 einen großen Einfluss auf die Expression und die DQA insensitive Aktivität in mitochondrialen Membranen hatte (siehe 7.5.1.1). Dies würde der Theorie von Rassmusson [1999], dass der C-terminale Teil alternativer Dehydrogenasen an der Membranassoziation beteiligt sein könnte, zumindest nicht widersprechen.

4.3.3 Identifikation des nativen N-Terminus von YLNDH2

Im Rahmen eines unvollendeten Reinigungsprotokolls für die alternative Dehydrogenase aus *Y. lipolytica* mittels Affinitätschromatographie (siehe 7.5) konnte der native N-Terminus des Enzyms durch Sequenzierung bestimmt werden. Dieser beginnt ab Aminosäure 31 des offenen Leserahmens, welches in der Basensequenz ein Asparagin ist, das vermutlich durch artifizielle Deaminierung als Aspartat erkannt wurde. Damit wäre YLNDH2 neben NDE1 aus *S. cerevisiae* [Luttik *et al.*, 1998] das zweite Beispiel dafür, dass auch externe alternative Dehydrogenasen N-terminal prozessiert werden.

4.4 Die Abhängigkeit von V_{max} und K_M kann mit dem Modell externer Diffusionslimitierung beschrieben werden

Ein unerwartetes Ergebnis der kinetischen Messungen, die für die alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität in Mutantenmembranen und gemischten Wildtypmembranen durchgeführt worden waren, war die lineare Abhängigkeit zwischen den V_{max} Werten und den apparenten K_M Werten für das hydrophobe Substrat DBQ. Wurden Wildtypmembranen mit Membranen von YLNDH2 Deletionsmutanten in definierten Verhältnissen gemischt, so dass der NDH2 Gehalt im Verhältnis zum Gesamtprotein abnahm, sanken sowohl die V_{max} , als auch die K_M Werte proportional zueinander. Normalerweise ist jedoch nur die Maximalgeschwindigkeit eines Enzyms abhängig von seiner Menge im Ansatz ($V_{max}=k_3 \cdot [E_0]$), aber nicht die K_M . Außerdem waren (*gerade um* Verteilungseffekte des DBQ zwischen wässriger und Membranphase auszuschließen!) alle Tests mit der gleichen Menge an Gesamtprotein (35 $\mu\text{g/ml}$) gemessen worden.

So wurde folgendes Erklärungsmodell entwickelt:

YLNDH2 überträgt Elektronen von einem hydrophilen Reaktionspartner (NADH) auf einen hydrophoben (Ubichinon). Da das Enzym selbst wasserlöslich und auf bisher nicht geklärte Weise, jedoch ohne membrandurchspannende Helices mit der Membran assoziiert ist, würde man das katalytische Zentrum des Enzyms, bzw. den Isoalloxazinring des Cofaktors FAD in unmittelbarer Nähe zur Membranoberfläche, jedoch in hydrophiler Umgebung erwarten. In Übereinstimmung mit dem gezeigten Ping-Pong Reaktionsmechanismus und der QR1 Struktur (siehe 4.2) müsste das hydrophobe Ubichinon demnach die Grenzfläche zwischen Lipid- und wässriger Phase überwinden, um Elektronen von FADH₂ aufnehmen zu können (Abb 4.2). Die lineare Abhängigkeit, die zwischen K_M und V_{max} Werten für das hydrophobe Substrat DBQ beobachtet wurde, ließe sich daher mit dem Modell einer externen Diffusionskontrolle beschreiben [Bisswanger, 2000, S.140/141].

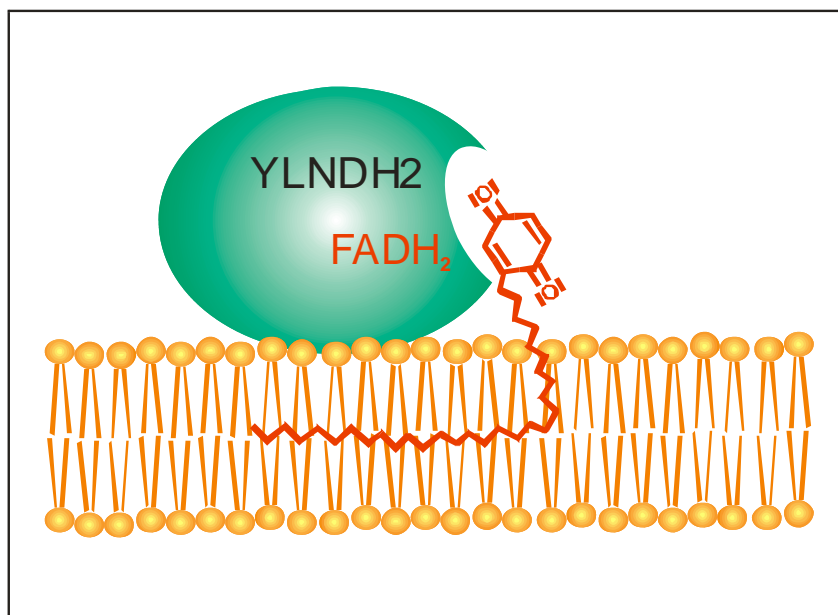


Abb. 4.2 Schematisches Modell von YLNDH2 und seiner Reaktion mit dem hydrophoben Substrat Ubichinon

Das Modell wurde entwickelt, um die Reaktion von immobilisierten Enzymen auf festen Oberflächen zu beschreiben. Die Prozesse von Transport und Katalyse erfolgen nacheinander. Das Modell geht davon aus, dass - im Fließgleichgewicht - der diffusionskontrollierte Transport von Substraten aus der umgebenden Flüssigkeit zum Enzym mit gleicher Geschwindigkeit abläuft wie deren enzymatische Umsetzung.

$$v' = h_Q(Q_0 - Q) = \frac{V_{\max} \cdot Q}{K_M + Q} \quad \text{mit} \quad h_Q = \frac{D_Q}{\delta} \quad (1)$$

Hierbei ist h_Q der Transportkoeffizient des Substrats. Dieser wird gebildet aus dem Diffusionskoeffizienten D_Q des Substrates in der umgebenden Flüssigkeit (also in diesem Fall aus dem Diffusionskoeffizienten von DBQ in der Membran) dividiert durch die effektive Grenzsichtdicke δ (hier der Abstand zwischen der Membranoberfläche und dem katalytischen Zentrum von NDH2).

$[Q_0]$ ist diejenige DBQ Konzentration, die in den Testansatz gegeben wurde und nahezu vollständig in der Lipidphase der Membranen gelöst vorliegt; $[Q]$ ist die effektiv am katalytischen Zentrum herrschende Konzentration, die unbekannt ist. Für kleine Substratkonzentrationen vereinfacht sich Formel (1) zu

$$v' = h_Q(Q_0 - Q) = \frac{V_{\max} \cdot Q}{K_M} \quad (2)$$

Die Gesamtreaktion verläuft dann nach einer Kinetik erster Ordnung; die effektiv am katalytischen Zentrum vorliegende Substratkonzentration ist

$$Q = \frac{h_Q \cdot Q_0}{h_Q + \frac{V_{\max}}{K_M}} \quad (3)$$

Setzt man den Term für $[Q]$ aus Gleichung (3) in Gleichung (2) ein, ergibt sich nach mehreren Umformungen folgende Formel:

$$v' = \frac{Q_0}{\frac{1}{h_Q} + \frac{K_M}{V_{\max}}} \quad (4)$$

Für $h_Q \gg V_{\max}/K_M$ wird

$$v' = v_{\text{kin}} = \frac{V_{\max} \cdot Q_0}{K_M} \quad (5)$$

und die Reaktion ist kinetisch kontrolliert; d.h. die Transportrate ist höher als die kinetische Rate. Umgekehrt gilt für $h_Q \ll V_{\max}/K_M$

$$v' = v_{\text{diff}} = h_Q \cdot Q_0 \quad (6)$$

und die gesamte Reaktion wird diffusionslimitiert.

Für sehr große Substratkonzentrationen, also unter Substratsättigung wird v' zu V_{\max} . Im mittleren Sättigungsbereich tragen v_{kin} und v_{diff} entsprechend ihrer Größe zur Gesamtrate v' bei (Abb. 4.3). Es wird also ein scheinbar erhöhter $K_{M(\text{obs})}$ Wert bei gegebener Substratkonzentration $[Q_0]$ gemessen.

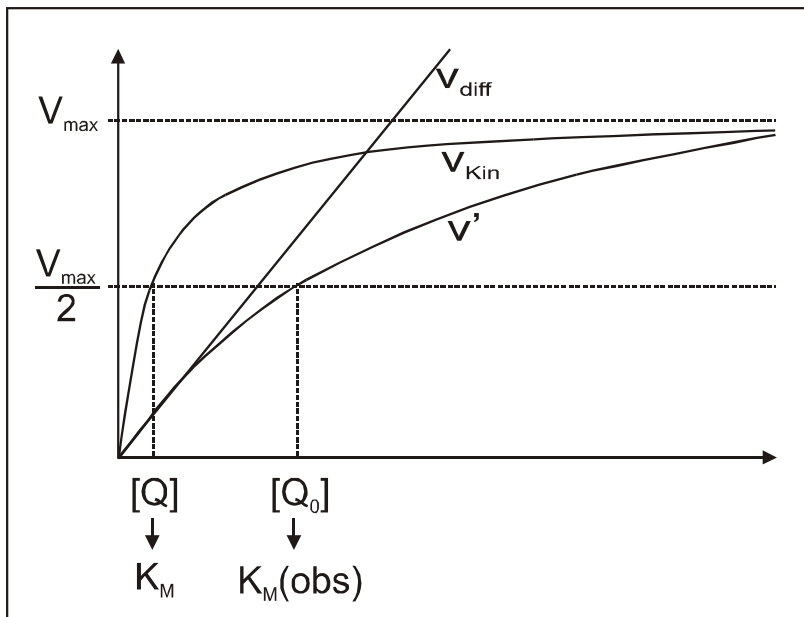


Abb. 4.3 Reaktion immobilisierter Enzyme [nach Bisswanger, 2000 S.141]

Ist der Transportkoeffizient h_Q bekannt, kann man die „wahre“ K_M graphisch herausfinden. Da dieser jedoch in unserem Fall unbekannt war, wurde der Formalismus von Goldstein [1976] angewendet. Ausgehend von Gleichung (1) entsteht durch Umformung nach $[Q_0]$

$$Q_0 = \frac{V_{\max} \cdot Q}{K_M \cdot h_Q} + Q \quad (7)$$

Nimmt man nun eine Substratkonzentration $[Q] = K_M$ und $[Q_0] = K_{M(\text{obs})}$ an, erhält man mit

$$K_{M(\text{obs})} = \frac{1}{h_Q} \cdot V_{\max} + K_M \quad (8)$$

eine Gradengleichung ($y = mx+b$), die die beobachtete lineare Abhängigkeit von K_M und V_{\max} Werten quantitativ beschreibt.

Werden die Michaelis Menten Parameter sämtlicher Messungen mit gemischten Wildtypmembranen aus Abb. 3.21 zugrunde gelegt, erhält man aus der Steigung der Regressionsgeraden (durch alle Punkte mit $V_{\max} < 1 \text{ U/mg}$)

$$m = \frac{1}{h_Q} = \frac{1}{0,27}$$

einen Wert für $h_Q = 3,7 \text{ min}^{-1}$. Der y-Achsenabschnitt b entspricht der „wahren“ $K_M = 1,29 \mu\text{M}$ (Abb. 4.4). Um auf die richtigen Dimensionen zu kommen, muss V_{\max} als Volumenaktivität [$\mu\text{M}/\text{min}$] angegeben werden und nicht als spezifische Aktivität wie in Abb. 3.21. Diese Umformung veränderte die Werte jedoch nur proportional, da alle Kinetiken mit derselben Proteinmenge gemessen worden waren.

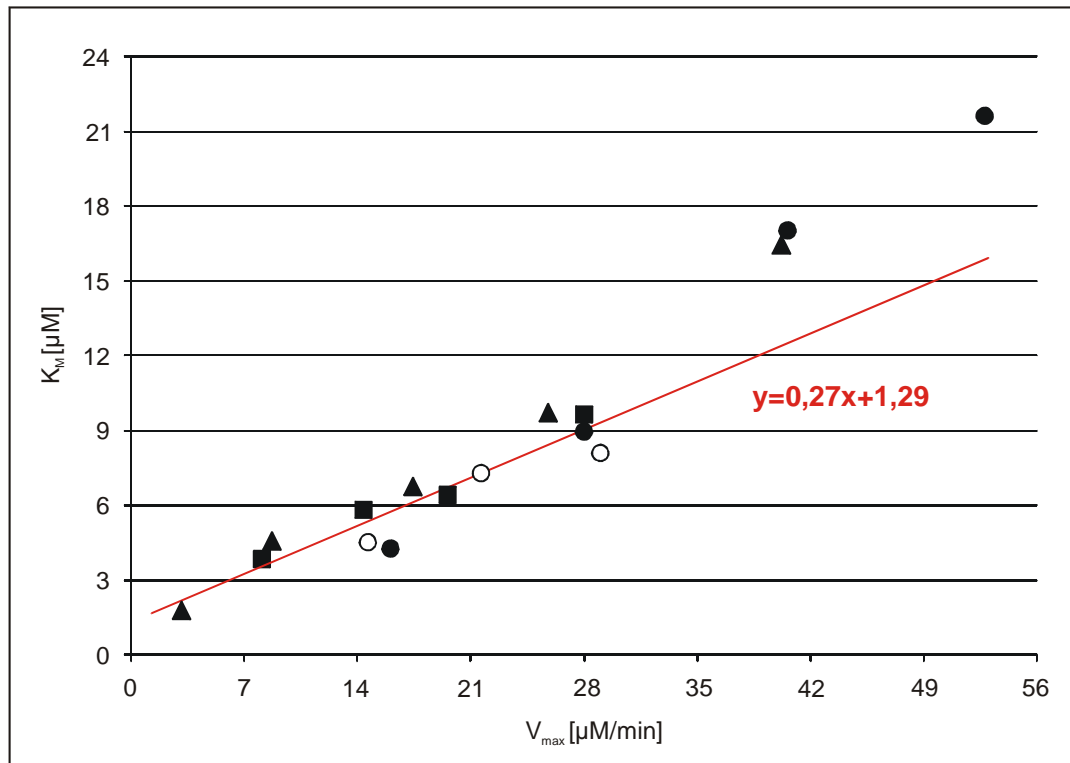


Abb. 4.4 Berechnung von h_Q und „wahrer“ K_M aus den Messdaten aus Abb. 3.21 (siehe Text).

Diese zeigt die Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten in gemischten Membranen, deren Gehalt an wildtypischer NDH2 zwischen 25% und 100% variiert wurde. Die Regressionsgerade wurde durch die Punkte mehrerer Membranpräparationen mit $V_{max} < 1\text{U}/\text{mg}$ (hier entsprechend $35 \mu\text{M}/\text{min}$) gelegt, da die Abhängigkeit nur in diesem Bereich linear war.

4.4.1 Externe Diffusionslimitierung bei YLNDH2 und anderen Enzymen

Nach diesem Erklärungsmodell wäre die externe Diffusionslimitierung der alternativen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität von *Y. lipolytica* ein typisches Merkmal wasserlöslicher Enzyme, deren einer Reaktionspartner ein hydrophobes Substrat ist. Unter diesen Umständen ist es fraglich, ob die Chinonbindungsstelle des Enzyms überhaupt durch Mutagenese und anschließendes Messen von kinetischen Parametern bestimmt werden könnte. Wenn die K_M immer in Abhängigkeit von V_{max} variiert, also auch bei hoch exprimierten, aber wenig aktiven Mutanten, dann würde eine Mutation der Q-Bindungsstelle einerseits die K_M erhöhen und somit die katalytische Rate erniedrigen, andererseits das Konzentrationsgefälle zwischen katalytischem Zentrum und Membran erniedrigen, also den Effekt der Diffusionslimitierung mindern. Es ist möglich, dass sich diese zwei Effekte auf die Gesamtreaktion gegenseitig beeinflussen, vielleicht sogar kompensieren würden.

Man kann auch spekulieren, ob die Diffusionslimitierung mit hydrophileren Chinonen als DBQ, die einen höheren Verteilungskoeffizienten zwischen wässriger- und Lipidphase haben, weniger stark ausgeprägt wäre. Ein Anhaltspunkt hierfür ist die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit von YLNDH2 mit Q₁. Mit Q₁ können jedoch unter diesen Versuchsbedingungen keine kinetischen Parameter bestimmt werden, da die Komplex I Aktivität, die in allen Membranen vorhanden ist, mit Q₁ als Substrat nur unvollständig mit DQA gehemmt werden kann.

Für den Inhibitor HDQ, der durch die Länge seiner Kohlenwasserstoff-Seitenkette eine ähnliche Hydrophobizität wie DBQ besitzt, gelten durch die Diffusionsbarriere an der Membran-Cytosol-Grenzfläche dieselben Beschränkungen wie für die Substrate. Hierdurch wird auch plausibel, warum die Hemmwirkung in dem Maße abnimmt, wie die Hydrophilizität der Substrate zunimmt (DBQ: 82%, Q₁: 79% und DCPIP: 15% Hemmung durch 10 µM HDQ, siehe Tab. 3.1).

Unerwartet war das Ergebnis, dass auch bei der Komplex I NADH:DBQ Aktivität eine lineare Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten bestand. Komplex I ist ein transmembraner multimerer Enzymkomplex, für dessen Reaktion mit Ubichinon man zunächst keine Substratlimitierung durch Grenzflächeneffekte erwarten würde. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Komplex I von *Y. lipolytica* [Djafarzadeh *et al.*, 2000] und anderen Organismen hatten gezeigt, dass das Enzym L-förmig ist, wobei der sog. Membranarm in die innere Mitochondrienmembran eingebettet ist und der sog. periphere Arm in die Matrix hinein ragt. Das katalytische Zentrum des Komplexes wird im peripheren Arm vermutet [zur Literaturübersicht siehe Kerscher *et al.*, 2002]. Maßgeblich an der Chinonbindung beteiligt ist die 49 kD Untereinheit, deren Position erst kürzlich als klar getrennt vom Membranteil des Proteinkomplexes lokalisiert wurde [Zickermann *et al.*, 2003]. Neben zahlreichen anderen Erklärungsmodellen wäre eine Chinonbindungsdomäne in hydrophiler Umgebung und eine damit verbundene Diffusionslimitierung der Reaktion nicht ausgeschlossen.

Demgegenüber befinden sich im Komplex III beide Chinonbindungsstellen innerhalb der Membran, was durch mehrere Strukturen [Lange und Hunte, 2002; Abramson *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 1991] und eine fundierte Theorie zum Reaktionsmechanismus (Q-Zyklus [Brandt und Trumpower, 1994]) belegt ist. Es passt daher ins Bild, dass es bei Messung der Ubihydrochinon:Cytochrom *c* Oxidoreduktase Aktivität in *S. cerevisiae* keine oder nur sehr geringe (möglicherweise messtechnisch bedingte) Abweichungen der K_M Werte in verschiedenen Membranverdünnungen gibt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Neben dem protonenpumpenden Komplex I (NDH-1) der Atmungskette besitzt die obligat aerobe Hefe *Yarrowia lipolytica* eine alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH-2). Diese Enzyme, die in den Atmungsketten von Pflanzen, Pilzen und Bakterien vorkommen, bestehen aus nur einer Untereinheit, führen jedoch dieselbe Reaktion aus wie Komplex I, nämlich die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon, wobei allerdings keine Protonen über die Membran transloziert werden. Nur peripher mit der Membran assoziiert, können alternative Dehydrogenasen entweder zur cytosolischen Seite (extern) oder zur Matrixseite (intern) orientiert sein. *Y. lipolytica* besitzt im Gegensatz zu anderen Ascomyceten nur eine einzige extern orientierte alternative Dehydrogenase mit einer vorhergesagten Masse von ca. 60 kD und einem nicht kovalent gebundenem Molekül FAD als Cofaktor. Durch Fusion des Leserasters mit der Präsequenz der 75 kD Untereinheit von Komplex I war die interne Expression des Enzyms (NDH2i) gelungen, die das Überleben von Komplex I Deletionsmutanten ermöglichte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die alternative Dehydrogenase von *Y. lipolytica* innerhalb ihrer natürlichen Membranumgebung charakterisiert. Das Enzym reagierte mit verschiedenen Chinonanaloga, wobei mit dem hydrophilen Q₁ eine höhere katalytische Rate erzielt wurde als mit DBQ, das dem natürlich vorkommenden Q₉ am ähnlichsten ist. Da hydrophobe Substrate fast ausschließlich in der Lipidphase der Membranen gelöst vorliegen, musste bei der Bestimmung von kinetischen Parametern (ebenso wie bei Komplex I) auf eine gleichbleibend große Membranphase im Messvolumen geachtet werden.

Mit dem standardmäßig benutzten Substrat DBQ reagierte YLNDH2 nach einem Ping-Pong Reaktionsmechanismus. Dieser beschreibt eine abwechselnde Bindung der beiden Substrate, wobei das Enzym die Elektronen von NADH aufnimmt (E-FADH₂) und an Ubichinon weitergibt (E-FAD); es existiert kein ternärer Enzym-Substrat Komplex. Gestützt durch Kristallstrukturen des analogen Enzyms QR1 mit NADPH bzw. mit Durochinon, liegt die Vermutung nahe, dass beide Substrate in ähnlicher Weise und sehr wahrscheinlich in der gleichen Bindungstasche binden. Ein Ping-Pong Reaktionsmechanismus wurde bereits für die NADH:DCPIP Oxidoreduktase Aktivität von zwei weiteren alternativen Enzymen postuliert, jedoch noch nie für ein physiologisches Substrat.

Als bislang wirksamster Inhibitor für alternative Dehydrogenasen wurde 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)chinolon (HDQ) entdeckt. HDQ hemmte NDH2 in Membranen aus *Y. lipolytica* mit einer I_{50} von 200 nM, was der 500fachen Hemmwirkung des gängig verwendeten Flavon auf das isolierte Enzym NDI1 von *S. cerevisiae* entspricht. Allerdings hemmte HDQ auch Komplex I mit einer I_{50} von 2 μ M, ähnlich wie es bei Platanetin in Pflanzenmitochondrien der Fall war [Roberts *et al.*, 1996].

Mit dem Ziel, ein polyklonales Antiserum gegen die native YLNDH2 zu generieren, wurde das Enzym in *E. coli* heterolog exprimiert. Die Expression führte zur Bildung von Einschlusskörpern, aus denen das rekombinante Enzym unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet werden konnte. Das Antiserum kreuzreagierte mit der nativen und der internen Version von YLNDH2 und zeigte nur wenige unspezifische Bindungen.

Es wurde gezeigt, dass *Y. lipolytica* Stämme ohne NDH2 und Komplex I mit NDH2_i als einziger Dehydrogenase erzeugt werden konnten. In *N. crassa* war der Versuch, NDE2 und Komplex I gleichzeitig zu deletieren, gescheitert, was zu der Schlussfolgerung führte, dass sich die beiden Enzyme in diesem Organismus möglicherweise kompensieren könnten. Dies war in *Y. lipolytica* ausgeschlossen worden, da wahrscheinlich kein (oder nur unzureichender) Austausch zwischen matrixständigem und cytosolischem NADH stattfindet.

Die zielgerichtete Mutagenese hochkonservierter Bereiche im offenen Leserahmen von YLNDH2 lieferte das eindeutige Ergebnis, dass die zweite der beiden $\beta\alpha\beta$ Bindungsdomänen NADH binden muß, da sich der K_M Wert für NADH bei Mutation des essentiellen sauren Restes E320 drastisch erhöhte. Alle Mutationen, die die Dinukleotid Bindungsdomäne I betrafen, die danach folgerichtig den Cofaktor FAD binden muß, führten zu einem vollständigen Verlust von NDH2. Dieselbe Zuordnung der Bindungsstellen war bereits von Björklöf *et al.* [2000] vorgeschlagen worden.

Eine Chinonbindungstelle konnte durch Mutagenese der beiden apolar/aromatischen Bereiche der Sequenz nicht identifiziert werden.

Die Modifikation des C-Terminus von NDH2_i führte zu nicht mehr messbarer Aktivität und stark verringerter Expression des Enzyms in mitochondrialen Membranen (siehe Anhang 7.5.1.1). Es kann daher vermutet werden, dass der C-Terminus für die korrekte Faltung eine wichtige Rolle spielt, möglicherweise sogar bei der Membranassoziation, wie bei Rasmusson [1999] vorgeschlagen wurde. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass die C-terminal modifizierte NDH2_i trotzdem das Überleben von Komplex I Deletionsmutanten bzw. das Wachstum auf DQA ermöglichte.

In Membranen, die einen unterschiedlichen Gehalt an NDH2, jedoch die gleiche Gesamtmenge an Protein enthielten, wurde eine unerwartete lineare Abhängigkeit zwischen K_M und V_{max} Werten beobachtet. Dieses Phänomen wurde mit dem Modell der externen Diffusionslimitierung beschrieben, die in ähnlicher Weise auch bei immobilisierten Enzymen auftritt. Danach wird die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion von YLNDH2 sowohl durch die kinetisch kontrollierte Rate, als auch durch die Transportrate des Ubichinons bestimmt, das aus der Membran heraus in die wässrige Umgebung des katalytischen Zentrums gelangen muss. Aus diesem Grund ist nicht nur die Maximalgeschwindigkeit, sondern auch die Michaelis Menten Konstante K_M abhängig vom Gehalt des Enzyms in Membranen. Dies führte bei niedrig exprimierten mutanten Enzymen zur gleichzeitigen Abnahme von K_M und V_{max} .

Eine externe Diffusionskontrolle der enzymatischen Reaktion wurde auch für Komplex I, dessen Reaktionszentrum im peripheren Arm vermutet werden kann, aber nicht für Komplex III aus *S. cerevisiae*, dessen Chinonbindungsstellen sich definitiv in hydrophober Umgebung befinden, beobachtet.

5.2 Ausblick

5.2.1 Reinigung der YLNDH2 mittels Affinitätschromatographie

Ein Reinigungsprotokoll zur Isolierung der alternativen Dehydrogenase aus *Y. lipolytica* mittels eines angefügten Sechsfach Histidin-tags wurde begonnen, im Laufe der Arbeit jedoch nicht zuende geführt. Zwei affinitätsmarkierte Stämme (N- und C-terminal) stehen zur Verbesserung des begonnenen oder zum Beginn eines neuen Protokolls zur Verfügung.

Das externe C-terminal markierte Enzym war in mitochondrialen Membranen geringer exprimiert als die N-terminal markierte interne Variante. Durch Sequenzierung einer teilweise gereinigten Bande konnte der native N-Terminus des Enzyms identifiziert werden. Man könnte nun also auch einen Stamm konstruieren, der den His-tag N-terminal direkt hinter der Spaltstelle der Präsequenz trägt. Damit wäre eine Reinigung der nativen externen NDH2 ohne Modifikation des C-Terminus möglich.

5.2.2 Weitere Studien zur Diffusionslimitierung hydrophober Substrate

Komplex I aus *Y. lipolytica* verliert während der Reinigung durch Delipidierung seine NADH:DBQ Aktivität, die sich jedoch durch Rekonstitution in Asolektinvesikel vollständig wiederherstellen lässt. Es wäre interessant, herauszufinden, ob ähnliche Effekte auch bei der Reinigung der alternativen Dehydrogenase eine Rolle spielen, da bereits während der Solubilisierung und dem Durchlauf durch die Ni²⁺-Sephrose Säule Aktivitätsverluste auftraten.

Falls es gelingen sollte, YLNDH2 in Proteoliposomen zu rekonstituieren, könnte man auch die Effekte der Diffusionslimitierung systematisch unter Beibehaltung einer definierten Lipidphase im Ansatz und mit unterschiedlich hydrophoben Substraten untersuchen. Mit der bisher angewandten Methode, nämlich Membranen von Wildtypstämmen mit solchen von NDH2 Deletionsmutanten zu mischen, konnte nur DBQ als Substrat verwendet werden, weil die Komplex I Aktivität, die in allen Membranen vorhanden ist, mit anderen Substraten nicht vollständig hemmbar war.

5.2.3 Bindungsstellen für NADH und FAD

Einen weiteren Beleg für die Zuordnung der NADH- und FAD-Bindungsdomänen im Rahmen der vorliegenden Mutagenesestudie würde eine Reinigung der zu 30 % exprimierten Mutante G285V mit anschließender Bestimmung des FAD-Gehaltes liefern. Befände sich noch FAD im gereinigten Enzym, handelte es sich bei dem Bindungsmotiv I um die FAD-, beim Bindungsmotiv II um die NADH-Bindungsstelle. Für eine Affinitätsreinigung müsste das mutierte Enzym zuvor mit dem in 5.2.1 vorgeschlagenen N-terminalen His-tag direkt hinter der Präsequenz versehen werden.

5.2.4 Kristallisation

Ein langfristiges Ziel nach der Reinigung von NDH2 aus *Y. lipolytica* wäre sicherlich die Kristallisation. Es existieren keine Kristallstrukturen alternativer Enzyme, obwohl bereits mehrere aus verschiedenen Organismen isoliert wurden. Im Hinblick auf die Ausgangsfragen, wie ein wasserlösliches Protein mit hydrophoben Chinonen und mit der Membran interagieren kann (um dieses dann als einfaches Modell für größere und kompliziertere Enzyme zu nutzen), gibt eine Struktur möglicherweise mehr Aufschluss als weitere Mutagenesestudien: Wie in 4.4.1 diskutiert, ist es fraglich, ob sich eine Mutation der Chinonbindungsstelle durch Messen von kinetischen Parametern überhaupt erfassen ließe, da

sich Änderungen der katalytischen Rate mit den Effekten der Diffusionslimitierung überschneiden würden.

5.2.5 Physiologische Funktion von YLNDH2

Es ist wenig bekannt darüber, welche physiologische Rolle alternative Dehydrogenasen im Stoffwechsel spielen. Sie stellen möglicherweise ein Auffangsystem dar, um Elektronen in die Atmungskette zu leiten und damit die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die bei der Reaktion von Komplex I anfallen [Møller, 2001], zu minimieren. Ihre hohe Reaktionsgeschwindigkeit spricht für diese These.

Einige alternative Enzyme, wie beispielsweise NDE2 und NDI1 von *N. crassa*, werden ausschließlich in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert [Carneiro *et al.*, 2003]. Diese metabolische Kontrolle macht dann Sinn, wenn man bedenkt, dass in dieser Phase maximalen Wachstums Substrate zum großen Teil in Grundgerüste für den Aufbau von Biomasse umgewandelt werden, jedoch zu einem vergleichsweise geringen Teil in Energie zur Aufrechterhaltung der Homöostase umgesetzt werden. Es wäre interessant herauszufinden, ob die Expression von YLNDH2 einer ähnlichen Regulation unterliegt. Zu diesem Zweck müsste RNA von Zellen, die zu unterschiedlichen Wachstumsphasen geerntet wurden, mittels Northern Blot mit einer YLNDH2-spezifischen Sonde analysiert werden.

6 Literatur

1. Abramson J, Riistama S, Larsson G, Jasaitis A, Svensson-Ek M, Laakkonen L, Puustinen A, Iwata S, Wikström MKF (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nature Struct Biol* **7**: 910-917
2. Ahlers P, Zwicker K, Kerscher S, Brandt U (2000) Function of conserved acidic residues in the PSST-homologue of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **275**: 23577-23582
3. Ammermann E, Lorenz G, Schelberger K, Wenderoth B, Sauter H, Rentzea C (1992) BAS 490 F - a broad-spectrum fungicide with a new mode of action. *Proceedings 1992 Brighton Crop Protection Conference -Pest And Diseases*, Brighton, UK, pp 403-410
4. Arzumanov TE, Shishkanova NV, Finogenova TV (2000) Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 525-529
5. Bandejas TM, Salgueiro C, Kletzin A, Gomes CM, Teixeira M (2002) *Acidianus ambivalens* type-II NADH dehydrogenase: genetic characterisation and identification of the flavin moiety as FMN. *FEBS Lett* **531**: 273-277
6. Bandejas TM, Salgueiro CA, Huber H, Gomes CM, Teixeira M (2003) The respiratory chain of the thermophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: studies on the type-II NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1557**:13-19
7. Barth G, Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica*. In K Wolf, ed, *Non-conventional yeasts in biotechnology*, Springer, Berlin-Heidelberg, pp 313-388
8. Barth G, Gaillardin C (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol Rev* **19**: 219-237
9. Bisswanger H (2000) *Enzymkinetik* 3. Auflage WILEY-VCH Verlag GmbH ISBN 3-527-30096-1
10. Björklöf K, Zickermann V, Finel M (2000) Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. *FEBS Lett* **467**: 105-110

11. Brandt U, Okun JG (1997) Role of deprotonation events in ubihydroquinone:cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry* **36**: 11234-11240
12. Brandt U, Trumpower BL (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *CRC Crit Rev Biochem* **29**: 165-197
13. Bruel C, Brasseur R, Trumpower BL (1996) Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc₁ complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *Journal of Bioenergetics & Biomembranes* **28**: 59-68
14. Carneiro P, Duarte M, Videira A (2003) The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1608**:45-52
15. Cheng SC, Ogrydziak DM (1986) Extracellular RNase produced by *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **168**: 581-589
16. Cheng SC, Ogrydziak DM (1987) Processing and secretion of the *Yarrowia lipolytica* RNase. *J Bacteriol* **169**: 1433-1440
17. Chernyavskaya OG, Shishkanova NV, Il'chenko AP, Finogenova TV (2000) Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 152-158
18. Cleland WW (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II Inhibition:Nomenclature and theory. *Biochim Biophys Acta* **67**: 173-187
19. Current protocols in molecular biology. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 2000. New York.
20. Day DA, Wiskisch JT (1975) Isolation and properties of the outer membrane of plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **171**:117-123
21. de Vries S, Grivell LA (1988) Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q₆ oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **176**: 377-384

22. de Vries S, van Witzenburg R, Grivell LA, Marres CAM (1992) Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **203**: 587-592
23. 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 - Bioenerg* **1459**: 230-238
24. Duarte M, Peters M, Videira A (2003) The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem J* **371**:1005-1011
25. Faig M, Bianchet MA, Talalay P, Chen S, Winski S, Ross D, Amzel LM (2000) Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: Species comparison and structural changes with substrate binding and release. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3177-3182
26. Fang J, Beattie DS (2002) Novel FMN-Containing Rotenone-Insensitive NADH Dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* Mitochondria: Isolation and Characterization. *Biochemistry* **41**: 3065-3072
27. Fato R, Castelluccio C, Palmer G, Lenaz G (1988) A simple method for the determination of the kinetic constants of membrane enzymes utilizing hydrophobic substrates:ubiquinol cytochrome c reductase. *Biochim Biophys Acta* **932**: 216-222
28. Goldstein L (1976) Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Methods Enzymol* **44**:397-443
29. Gomes CM, Bandejas TM, Teixeira M (2001) A New Type-II NADH Dehydrogenase from the Archaeon *Acidianus ambivalens*: Characterization and in vitro Reconstitution of the Respiratory Chain. *J Bioenerg Biomembr* **33**: 1-8
30. Helenius A, Simons K (1972) The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J Biol Chem* **247**: 3656-3661
31. Kashani-Poor N (2000) Identifizierung des katalytischen Zentrums im Komplex I (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase) von *Yarrowia lipolytica* (Dissertation)

32. Kerscher S, Dröse S, Zwicker K, Zickermann V, Brandt U (2002) *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1555**: 83-91
33. Kerscher S, Eschemann A, Okun PM, Brandt U (2001) External alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* **114**: 3915-3921
34. Kerscher S, Okun JG, Brandt U (1999) A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* **112**: 2347-2354
35. Lange C, Hunte C (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome *c*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2800-2805
36. Lesk AM (1995) NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Biol* **5**: 775-783
37. Lowry OH, Rosebrough NR, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
38. Luttk MAH, Overkamp KM, Kötter P, de Vries S, van Dijken P, Pronk JT (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* **273**: 24529-24534
39. Marres CAM, de Vries S, Grivell LA (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **195**: 857-862
40. Matsushita K, Ohnishi T, Kaback HR (1987) NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry* **26**: 7732-7737
41. Matsushita K, Otofujii A, Iwahashi M, Toyama H, Adachi O (2001) NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 271-276

42. Mattevi A, Obmolova G, Sokatch JR, Betzel C, Hol WGJ (1992) The refined crystal structure of *Pseudomonas putida* lipoamide dehydrogenase complexed with NAD⁺ at 2.45Å Resolution. *PROTEINS: Struct Funct Gen* **13**: 336-351
43. Mattevi A, Schierbeek AJ, Hol WGJ (1991) Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J Mol Biol* **220**: 975-994
44. McEwen RK, Young TW (1998) Secretion and pH-dependent Self-Processing of the Pro-Form of the *Yarrowia lipolytica* Acid Extracellular Protease. *Yeast* **14**: 1115-1125
45. Melo AM, Duarte M, Möllers IM, Prokisch H, Dolan PL, Pinto L, Nelson MA, Videira A (2001) The External Calcium-dependent NADPH Dehydrogenase from *Neurospora crassa* Mitochondria. *J Biol Chem* **276**: 3947-3951
46. Melo AM, Duarte M, Videira A (1999) Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1412**: 282-287
47. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148
48. Møller IM (2001) Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:561-591
49. Moore CS, Cook-Johnson RJ, Rhude C, Whelan J, Day DA, Wiskich JT, Soole KL (2003) Identification of AtNDI1, an Internal Non-Phosphorylating NAD(P)H Dehydrogenase in *Arabidopsis* Mitochondria. *Plant Physiol* **133**:1-11
50. Oettmeier W, Masson K, Soll M, Reil E (1994) Acridones and quinolones as inhibitors of ubiquinone functions in the mitochondrial respiratory chain. *Biochem Soc Trans* **22**: 213-216
51. Ogrydziak D (1993) Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol* **13**: 1-55
52. Ouali M, King RD (2000) Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* **9**:1162-1176

53. Pignede G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM (2000) Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **182**: 2802-2810
54. Rasmusson AG, Svensson AS, Knoop V, Grohmann L, Brennicke A (1999) Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J* **20**: 79-87
55. Ravanel P, Creuzet S, Tissut M (1990) Inhibitory Effect of Hydroxyflavones on the Exogenous NADH Dehydrogenase of Plant Mitochondrial Inner Membranes. *Phytochemistry* **29**:441-445
56. Reil E, Höfle G, Draber W, Oettmeier W (1997) Quinolones and their N-oxides as inhibitors of mitochondrial complexes I and III. *Biochim Biophys Acta* **1318**: 291-298
57. Rich PR, Fisher N (1999) Quinone-binding sites in membrane proteins: structure, function and applied aspects. *Biochem Soc Trans* **27**: 561-565
58. Roberts HT, Rasmusson AG, Møller IM (1996) Platanetin and 7-iodo-acridone-4-carboxylic acid are not specific inhibitors of respiratory NAD(P)H dehydrogenases in potato tuber mitochondria. *Physiol Plant* **96**:263-267
59. Schägger H (1994) A practical guide to membrane protein purification. *Academic Press, San Diego*, pp 23-57
60. Schägger H (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* **52**: 119-128
61. Schägger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1555**: 154-159
62. Schägger H, Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* **19**: 1777-1783
63. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton. *Anal Biochem* **166**: 368-379
64. Selker EU, Garrett PW (1988) DNA sequence duplications trigger gene inactivation in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6870-6874

65. Sled VD, Vinogradov AD (1993) Kinetics of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase interaction with hexammineruthenium(III). *Biochim Biophys Acta* **1141**: 262-268
66. Small WC, McAlister-Henn L (1998) Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **180**: 4051-4055
67. Velázquez I, Pardo JP (2001) Kinetic Characterization of the Rotenone-Insensitive Internal NADH: Ubiquinone Oxidoreductase of Mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **389**: 7-14
68. Wierenga RK, de Maeyer MCH, Hol WGJ (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* **24**: 1346-1357
69. Yue W-H, Zou Y-P, Yu L, Yu C-A (1991) Crystallization of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase. *Biochemistry* **30**: 2303-2306
70. Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotech* **8**: 172-173
71. 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 complex I. *J Biol Chem* **278**: 29072-29078

7 Anhang

7.1 NDH2 Gen (ACC. No. AJ006852)

GAGCTCGCACGGTTACAGTATTACCTCAATCTATGATTT	39
CGTTAGGCAGAATTATTGATTTTTTCGCCTGCCACCTACAGCTGACACTAACTGATGTCAT	99
ACCTCAACGTTATTGGTCAATGTTTTTCCGGGCTACTACTGTACATGTACTCTGCTTGT	159
AATTACATCTGTTACATGTCGAGATTTGCTGTGGTGTCTCGTCTTAACGTCAGGTATCGT	219
ACTCGTAGCTATACTGGTGCACCATTATGACGCCCTTCTCGGCTAGTAATACCGCCCGT	279
ATGAGACGCTAGTGGTGCAGGAGATTTAAAAGCGCCGCACACCCGGCACACCCGGTCTGTC	339
GTCCCTTCTCTCACATAATTACTTATACCCATGTATCTCCCGCTTATCATTTCGATTT	399
CCCTTCACCTTACATTACAACAGTACATTTGAGACTGCCGCTGCCTCTGCCTTGGTTCC	459
TCTCTCTGCACACTCGCATCAAAGCACCACCACCGAAGAAAAAACAAGCCTTT	519
AGAGCCAAGAGAGCCCCAAAAGCCTAACTTAAAGTTTACATTGCCTCGAGCTCTGTCATA	579
TCCCACCACAAGCGCATAGTCCCCATCATCCACACAATCGGACCTCTTCGACCCGCAAC	639
ATGCTCCGTCTCCGTCCAGCCGTCCGAGCGGTCTCCGTGGCTCGAAGCGTCCGCTCTGACT	699
MetLeuArgLeuArgProAlaValArgAlaValSerValAlaArgSerValAlaLeuThr	20
CGGTCATTGCACGTCTCCGTCCGCAAGTTCAACAAAATCGAGGGAACCGCCCCGCAGGT	759
ArgSerLeuHisValSerValAlaLysPheAsnLysIleGluGlyThrAlaProAlaGly	40
CTGCCCAAAGAGGTGAAGCAAACCGCTGGCCACCAGGGACACCACCAGGAGATCCCTAAG	819
LeuProLysGluValLysGlnThrAlaGlyHisGlnGlyHisHisGlnGluIleProLys	60
CCCGATGAGAACCACCCCGACGAAAGAAGTTTCACTTCTGGCGATCATTGTGGCGCCTG	879
ProAspGluAsnHisProArgArgLysLysPheHisPheTrpArgSerLeuTrpArgLeu	80
ACCTACCTTTCGGCCATTGCTTCTCTGGGATACATTGGCTACCGAATCTACGTCATTGCA	939
ThrTyrLeuSerAlaIleAlaSerLeuGlyTyrIleGlyTyrArgIleTyrValIleArg	100
AACCCCTCCGACCAGTTGCCCGCCGACCCCTCCAAGAAGACCTGGTGGTGTGGGTTCC	999
AsnProSerAspGlnLeuProAlaAspProSerLysLysThrLeuValValLeuGlySer	120
GGCTGGGGCTCCGTCTCCTTCTCAAGAAGCTCGATACTTCTAACTACAACGTCATTGTC	1059
GlyTrpGlySerValSerPheLeuLysLysLeuAspThrSerAsnTyrAsnValIleVal	140
GTCTCTCCCGAACTACTTCTGTTTACCCTCTACTGCCCTCTTGTCCCACCGGAACC	1119
ValSerProArgAsnTyrPheLeuPheThrProLeuLeuProSerCysProThrGlyThr	160
ATTGAGCACCGATCCATTATGGAGCCCATCCGAGGCATCATTGACACAAGCAGGCCGAA	1179
IleGluHisArgSerIleMetGluProIleArgGlyIleIleArgHisLysGlnAlaGlu	180
TGCCAGTACCTCGAGGCTGATGCTACCAAGATTGACCACGAGAAGCGAATTGTGACCATC	1239
CysGlnTyrLeuGluAlaAspAlaThrLysIleAspHisGluLysArgIleValThrIle	200
CGATCCGCCGTCTCTGAGAACTCCAAGGAGGAGGTCATCAAGGAGATCCCCTTCGACTAT	1299
ArgSerAlaValSerGluAsnSerLysGluGluValIleLysGluIleProPheAspTyr	220
CTTGTTGTGGTGTGGCGCCATGTCTCCACCTTTGGTATCCCCGGTGTCCAGGAGAAC	1359
LeuValValGlyValGlyAlaMetSerSerThrPheGlyIleProGlyValGlnGluAsn	240
GCTTGCTTCTCAAGGAGATCCCCGACGCCAGCAGATTGACGAACCCATGGATTGC	1419
AlaCysPheLeuLysGluIleProAspAlaGlnGlnIleArgArgThrLeuMetAspCys	260
ATTGAGAAGGCCAATTCGAGAAGGACCCTGAGGTCCGAAAGCGACTTCTGCACACTGTC	1479
IleGluLysAlaGlnPheGluLysAspProGluValArgLysArgLeuLeuHisThrVal	280
GTTGTTGGAGGTGGCCCTACCGGTGTGAGTTCGCTGCCGAGCTCCAGGACTTCTTCGAG	1539
ValValGlyGlyGlyProThrGlyValGluPheAlaAlaGluLeuGlnAspPhePheGlu	300
GACGATCTCCGAAAGTGGATCCCCGATATCCGAGACGATTTCAAGGTTACTCTGTGCGAG	1599
AspAspLeuArgLysTrpIleProAspIleArgAspAspPheLysValThrLeuValGlu	320
GCTCTCCCAACGTTCTGCCTCTTTCTCCAAGAAGCTCATTGACTACACCGAGAAAACC	1659
AlaLeuProAsnValLeuProSerPheSerLysLysLeuIleAspTyrThrGluLysThr	340

TTCTCTGACGAGAAGATCTCCATTCTGACCAAGACCATGGTTAAGTCTGTTGACGAGAAT	1719
PheSerAspGluLysIleSerIleLeuThrLysThrMetValLysSerValAspGluAsn	360
GTGATCCGAGCCGAGCAGACCAAGGGTGACGGTACTAAGGAAACCCCTTGAGATGCCTTAC	1779
ValIleArgAlaGluGlnThrLysGlyAspGlyThrLysGluThrLeuGluMetProTyr	380
GGAActCTTGTGTGGGCCACCGTAACACTGTGCGACCTGTTGTTGAGAGCTCATGTCC	1839
GlyThrLeuValTrpAlaThrGlyAsnThrValArgProValValArgGluLeuMetSer	400
AAGATCCCTGCTCAGAAGGGCTCCCAGCAGAGTCTTCTTGTCACGAGTACCTTGTGTGTT	1899
LysIleProAlaGlnLysGlySerArgArgGlyLeuLeuValAsnGluTyrLeuValVal	420
GAGGGTACCAGGGCATCTGGGCTCTTGGTGACTGTTCTGCCACCAAGTACGCACCCACT	1959
GluGlyThrGluGlyIleTrpAlaLeuGlyAspCysSerAlaThrLysTyrAlaProThr	440
GCCCAGGTTGCCTCCCAGGAGGGATCCTACCTTGCTAACCTGCTCAACGGCATTGCTAAG	2019
AlaGlnValAlaSerGlnGluGlySerTyrLeuAlaAsnLeuLeuAsnGlyIleAlaLys	460
ACCAGGACCTCAACAACGAGATCACCAACCTCGAGAAGCAGTCGGAGCACACCTTTGAC	2079
ThrGluAspLeuAsnAsnGluIleThrAsnLeuGluLysGlnSerGluHisThrPheAsp	480
GAGCAGGAGCGAAAGAACATCTTTGCTCAACTCGAGTCCAAGTCCCGAAAGCTGCGACGA	2139
GluGlnGluArgLysAsnIlePheAlaGlnLeuGluSerLysSerArgLysLeuArgArg	500
TCCAGAGCCATGCTGCCCTTCGAGTACTCTCACCAGGGTCTCTGGCCTACATTGGTTCC	2199
SerArgAlaMetLeuProPheGluTyrSerHisGlnGlySerLeuAlaTyrIleGlySer	520
GACCGAGCCGTTGCCGACCTGTCCTTCAACTTCTGGGGTATCATGAACTGGTCTTCCGGA	2259
AspArgAlaValAlaAspLeuSerPheAsnPheTrpGlyIleMetAsnTrpSerSerGly	540
GGAACCATGACCTACTACTTCTGGCGATCCGCCTACGTGTCCATGTGCTTCTCCATGCGA	2319
GlyThrMetThrTyrTyrPheTrpArgSerAlaTyrValSerMetCysPheSerMetArg	560
AAACAAGATTCTTGTGTTGCATTGATTGGATGAAGGTCCGAGTCTTCGGCCGTGATATCTCT	2379
AsnLysIleLeuValCysIleAspTrpMetLysValArgValPheGlyArgAspIleSer	580
CGAGAATAAGCGCATAAACCTATAACAATAAATTTTAGATTGACAGTACAACCTGAGGGCTG	2439
ArgGlu***	582
TAATGAGTAAGAGTGGTATCACTTGGTTGTATTTGACGGAACAGTTGTATACAATTATAA	2499
AGAGTTGCAGCTTCTCCATCTGCAGTATTGCTGTAAGCATGTTTGTGGAAGGTTTCATCC	2559
TGAACAGAATCCCTCGTATAAGTGAACCCCAAAGCCAATGTTTTAGAGGCATTGAGACAT	2619
AAGACTGCATGTTTCTTTTGGCTCATTTCACTTCTATATTTCTTTTGTGTCTGCCACT	2679
TCTGTATAATTCATTTCAATCAACACAATAGAGTTCATAAAGCGTGTGGTGATATTGT	2739
CAACTGTGGATACCTGTTCTGTAACAATACGTGAACATACTAACACACACCACAAATGATCA	2799
CGAAAAGGCTACTGCGGTTCTGCTGGGGCCTAGTTTTGCCACCAATGAGAATACAGAAA	2859
CAGAATCTCTGCTCTCAACCACGAATTGCTCAACGCCAAACACAAGATTCTCAACAGCT	2919
ATGGACGGTCTTCCCTGGAGGCCGAGAAGATTGTACCTCCTCCTACTTCAGCCGCTGATC	2979
TGGACGCTCTGCTTGATCCTGCCGAATCAAACGACTATGTCGACAAGTGGATGCGAGCCT	3039
GGAACTCGGTATTATCCCTGAGGGGATTGTTAGAGGTATAGAGATGATGGGCATGTGGC	3099
CCCTGGAGGTATCTTGGGCTAGATACCACACAATGGCAGATCCGGAGGACAAACATACT	3159
GGCAACTACTGAAGGGAACATCCACAGCGCAATCCGTTCCCGGATTTCATGGCTTCCC	3219
TGGCGCAGAGTATGGTGGAGGAAGCTATCTCAGACCAACCGGACGCAGGCTCGTATACGT	3279
GGGAGAACGGGACCATGGTCAAAAGCGAACACAAAATCAACATCATAAGCGTCTCAAGG	3339
GCAACCACACAATGGCTGAAATCATCCCCTTTGCCCTGAAACACTTCACGGCCTGCATCA	3399
TGTCATCCCCTTCTTCTACTACTCCTCCATGCAGATTTTGGGGGTGTACAACAACGTGC	3459
ACACCCCAACAACCTCGCCCTGGGGCCCGTCTATTGCCTGGCTGCAG	3506

▲ : Native N-terminale Prozessierungsstelle

■ : Artificieller N-Terminus der NDH₂; mit N101D

■ : Positionen der mutagenisierten Aminosäuren (▲ = Insertion)

7.2 Sequenz des NUAM Gens (ACC. No. AJ249781)

GTCGACGGTCTCTCCCAGGACACTCCTCTTCTCATGTCCATGTTTCATTGCTTCCACAAG	60
TGGGAGGCTGGAGAAGAAGAGCCCTCCAAGGAGGAGACCAAGGCTGCTCTTTTGGAGCGG	120
GTGTACAAGCAGATCGACGTGCGACTGGACCCCAACGAGGTTGGAATGCATTGGGTTGCA	180
AAGGTGTCTCCCAAGAAGGACATGTTTTGCATTTCTTTTCGAGCTGCCCAAGGAGGTTGCA	240
TGGGCCCTCAGGTTAACCAAGGAGTAAATGTATATATATGTATTATAATGGTAATGACGG	300
CGATGAATTTGCAGAAGTACTCAGGACAGTTCTTTTCGTGAGTGGGTGATTTTTCTTGATT	360
TTTTTCGATTTCTTGATTTTTTCGATTTCTTGATTTTTTCGATTTTCTTGATTTTCCATT	420
ATTCGATTTTCCCATTATTTCGATTTTCCCATTATTTCGATTTTTCATTTTTATGCCGAA	480
ATACGAGTATTGTACCCTGGCACCATAAAATACAAACCATTTCATGACTCCCACAGACCTG	540
GACCAAGAACATCGTACTTGTATCTGAATCAGACTTCATTATTGCTTGTACCCGTCC	600
TCATACTCTCCCTCCGTCCTCCCTCCACCATTACTAAGCAACAAGGGCCAATTGT	660
TCCGGAGCTTCTGTGACCAAACTCTCCCTCTTGCCAACCTCTCCAATCAAAAAGATG	720
ATTTTGCAGATGTCATTGCCAACACTAGCTTTTAGAGTTGGTCTGGAGGGCTACACAAC	780
ATCCGGTAGCGATGCATCCATGTCCGAAAATTTGTAGTGGATGGCGGTGATATTATTGCG	840
AGAATTTGCCAACCGCAGCTGAATCAGCCAATGAGGGGTTTCCGGCTCCACAGCTCTC	900
TGCCACGGCGGAGTTCAACCGACCCCAAACTCCGTACTGACATGTACTGTAGGCAGAC	960
CCAAAAAAGCTCTCCCAAGGTCGTAACCTCCAGCCAATGGTAGTGGACCAATTGTGGT	1020
GCGTCTGTGTAGTAGTGGTGGGTTAATCCATCTTTTGAGTATTCAATAGAGTGAAC	1080
AGACACATTTCTCAGAAGACAGTCTTAGAAAAGGTGAGTAAAATGAGGACATGTGGAGG	1140
ACAAATTTGGAGAGATATCAGCAGAGATGCAGCAGGATGAACACACAGACAGACACAACAG	1200
CAGGAACGACACAGATGGAACGGCAGACAACATCCAGGGAAGGACACTATCGCGGAA	1260
GGACACACGCAAAAGGACAGCTGAAAGGGATGGATGACAGCCGAGCCGACCGAAGACGG	1320
TGGCAAAACGAGATGCGACACAATACAGCTGAATCGACAGTTCGATTGTGTCTGGAAGT	1380
GGCCGTACGAGATCCAAGCAATACACGGGTTAGCTGTGCCCTTCAAAGAGCGGCAA	1440
TCCGTGCACGAAAAACATAGTCGTGCATCCCCGACAACGGTGGATATGTGGCTGCGTCCGT	1500
GTCATTTGCCCGTGTATCCAGTTCAGTTTTCTGCAAAGAATATCTCACATCGTTACCT	1560
CTTATCTCCAAACCATGCCAATCCACCCAGCTACTAACATAGATGCTCTCGAGAAACCTC	1620
MetLeuSerArgAsnLeu	6
AGCAAGTTTGCTCGAGCCGGTCTCATCCGGCCAGCAACCACATCCACACACACCCGACTA	1680
SerLysPheAlaArgAlaGlyLeuIleArgProAlaThrThrSerThrHisThrArgLeu	26
TTCAGCGTCTCCGCCGACGTCCTCGCCGAGATTGAACTCACTATCGATGGTCACAAGGTG	1740
PheSerValSerAlaArgArgLeuAlaGluIleGluLeuThrIleAspGlyHisLysVal	46
TCTATCGAGGCCGGTTCCGCCCTTATCCAGGCCTGCGAGAAGGCCGGTGTACCCGTCCCC	1800
SerIleGluAlaGlySerAlaLeuIleGlnAlaCysGluLysAlaGlyValThrValPro	66
CGATACTGCTACCACGACAAGCTGGCCATTGCCGGTAACCTGTGCAATGTGTCTGGTCGAC	1860
ArgTyrCysTyrHisAspLysLeuAlaIleAlaGlyAsnCysArgMetCysLeuValAsp	86
GTTGAGCGAGCCCCAAGCCCGTGGCTTCTTGTGCCTACCCTGTTGCTCCCGCATGGTT	1920
ValGluArgAlaProLysProValAlaSerCysAlaTyrProValAlaProGlyMetVal	106
GTGCGAACCGACACCGAGCGAGTCAAGCAGGCCCGAGAGAATGTCATGGAGATGATGCTG	1980
ValArgThrAspThrGluArgValLysGlnAlaArgGluAsnValMetGluMetMetLeu	126
CAGAACCACCTCTCGACTGTCCCGTGTGTGACCAGGGAGGAGTGTGATCTGCAGGAC	2040
GlnAsnHisProLeuAspCysProValCysAspGlnGlyGlyGluCysAspLeuGlnAsp	146
CAGAGCATGCGATACGGCCGAGACCGAGGTCGATTACCGGAAATTACCGAAAGCGATCC	2100
GlnSerMetArgTyrGlyArgAspArgGlyArgPheThrGluIleThrGlyLysArgSer	166
ACCGAGGACAAAAACATTGGCCCCCTGGTCAAGACCTCCATGAACCGATGCATCCACTGT	2160
ThrGluAspLysAsnIleGlyProLeuValLysThrSerMetAsnArgCysIleHisCys	186
ACCCGATGCGTCCGGTTTGCTAACGATATTGCTGGCGCCCCGAGCTGGGTTCCAGTGGC	2220
ThrArgCysValArgPheAlaAsnAspIleAlaGlyAlaProGluLeuGlySerSerGly	206
CGAGGAAACGACATGCAGATTGGTACTTACCTGGAGAAGAACCTCAACACCGAGCTGTCTG	2280
ArgGlyAsnAspMetGlnIleGlyThrTyrLeuGluLysAsnLeuAsnThrGluLeuSer	226
GGTAACGTGATTGATCTGTGTCCCGTCCGTGCCCTGACCAACAAGCCCTACGCCTTCCGA	2340
GlyAsnValIleAspLeuCysProValGlyAlaLeuThrAsnLysProTyrAlaPheArg	246
GCCCGACCATGGGAGCTCAAGAAGACCGAGTCTATCGATGTTATGGATGCCGTTGGCTCC	2400
AlaArgProTrpGluLeuLysLysThrGluSerIleAspValMetAspAlaValGlySer	266

AACATCCGAATTGACTCCAAGGGTGTGCGAGGTGATGCGAGTCATCCCCGAGTCCACGAG AsnIleArgIleAspSerLysGlyValGluValMetArgValIleProArgValHisGlu	2460 286
GACGTTAACGAGGAGTGGATCAACGACAAGTCTCGATTGCGCTGTGACGGTCTCAAGACC AspValAsnGluGluTrpIleAsnAspLysSerArgPheAlaCysAspGlyLeuLysThr	2520 306
CAGCGACTGACCACTCCTCTCATCCGAGTGGGCGACAAGTTCGTC AACGCCACCTGGGAC GlnArgLeuThrThrProLeuIleArgValGlyAspLysPheValAsnAlaThrTrpAsp	2580 326
GATGCCCTTAGCACCATTGCCAAGGCATACCAGCAGAAGGCCCAAGGGTGACGAGTTC AspAlaLeuSerThrIleAlaLysAlaTyrGlnGlnLysAlaProLysGlyAspGluPhe	2640 346
AAGGCCGTGGCTGGTGTCTGGTTGAGGTGCAATCCATGGTTGCTCTCAAGGACATGACC LysAlaValAlaGlyAlaLeuValGluValGluSerMetValAlaLeuLysAspMetThr	2700 366
AACGCCCTTGGTTCCGAGAACACCACCACCGACACCCCAACGGCAACTCCGCCCCGCC AsnAlaLeuGlySerGluAsnThrThrThrAspThrProAsnGlyAsnSerAlaProAla	2760 386
CACGGCATCACTTTAGATCCAACCTACCTGTTCAACTCTTCCATTGCTGGTATTGAGGAT HisGlyIleThrPheArgSerAsnTyrLeuPheAsnSerSerIleAlaGlyIleGluAsp	2820 406
GCCGACGCCATTCTGCTTGTGCGTACTAACCTCGACGAGAGGCCGCTGTCATGAACGCG AlaAspAlaIleLeuLeuValGlyThrAsnProArgArgGluAlaAlaValMetAsnAla	2880 426
CGAATCCGAAAGGCCTGGCTTCGACAGGAGCTCGAGATTGCCTCCGTTGGCCCCACTCTC ArgIleArgLysAlaTrpLeuArgGlnGluLeuGluIleAlaSerValGlyProThrLeu	2940 446
GATGCTACCTTTGACGTTGCTGAGCTCGGTAACACCCACGCCGATCTCGAGAAGGCTCTG AspAlaThrPheAspValAlaGluLeuGlyAsnThrHisAlaAspLeuGluLysAlaLeu	3000 466
TCCGGCGAGTTTGGTGAGTTCTCAAGAACGCCAAGAACCCTCTGATCATTGTTGGTTCC SerGlyGluPheGlyGluValLeuLysAsnAlaLysAsnProLeuIleIleValGlySer	3060 486
GGTATCACTGACCGAGAGGACGCCGGTGCCTTCTTTAACACCATTGGCAAGTTTGTCGAG GlyIleThrAspArgGluAspAlaGlyAlaPhePheAsnThrIleGlyLysPheValGlu	3120 506
TCCACTCCCTCCGTTCTCAATGAGAAGTGAACGGTTACAACGTTcTGCAGCGATCTGCT SerThrProSerValLeuAsnGluAsnTrpAsnGlyTyrAsnValLeuGlnArgSerAla	3180 526
TCTCGAGCAGGTGCCTACGACATTGGCTTCACACCCTCCGACGAGGCCTCTAAGACCACC SerArgAlaGlyAlaTyrAspIleGlyPheThrProSerAspGluAlaSerLysThrThr	3240 546
CCCAAGATGGTCTGGCTGCTTGGCGCCGACGAGGTTGCCGCTCCGATATCCCTGCCGAC ProLysMetValTrpLeuLeuGlyAlaAspGluValAlaAlaSerAspIleProAlaAsp	3300 566
GCCTTTGTCGCTACCAGGGCCACAACGGTGACGTCGGAGCTCAGTTTGCCGACGTTGTT AlaPheValValTyrGlnGlyHisAsnGlyAspValGlyAlaGlnPheAlaAspValVal	3360 586
CTGCCCGGTGCTGCcTACACTGAGAAGGCCGGTACCTACGTTAACTGAGGGTCGATCA LeuProGlyAlaAlaTyrThrGluLysAlaGlyThrTyrValAsnThrGluGlyArgSer	3420 606
CAGATTTCCCGAGCCGCCACTGGCCCTCCCGCGGTGCTCGAGAGGACTGGAAGATTCTG GlnIleSerArgAlaAlaThrGlyProProGlyGlyAlaArgGluAspTrpLysIleLeu	3480 626
CGAGCCGTTTCCGAGTACCTCGGCGTTGCTCTGCCATACGAGGACGCCTACGAGGTGCGA ArgAlaValSerGluTyrLeuGlyValAlaLeuProTyrGluAspAlaTyrGluValArg	3540 646
GACCGACTTGCCGAGATCTCTCTTCGCTGGTTTCGATACGATCTGGTCGAGCCTACAGTC AspArgLeuAlaGluIleSerProSerLeuValArgTyrAspLeuValGluProThrVal	3600 666
TTTGGTGATGTTGCCGTTACGACTCTCTGGTTGGTCCCAACGGCTCTGTCACCCCTCT PheGlyAspValAlaValGlnHisSerLeuValGlyProAsnGlySerValThrProSer	3660 686
TCTGCTCCTCTGACTGAGACTATCGAGAAGTCTACATGACAGACTCCATTTCCCGAAGC SerAlaProLeuThrGluThrIleGluAsnPheTyrMetThrAspSerIleSerArgSer	3720 706
TCTCCCACCATGGCCAAGAGCAGCATTGCATTCAACAAAGACAACAAGAAAAACCAGGCT SerProThrMetAlaLysSerSerIleAlaPheAsnLysAspAsnLysLysAsnGlnAla	3780 726

```

TTTGCCTAATTAAGTAATCAATTAGATGTTATATGAAAACCCGAGTACAGCATGTACTGG 3840
PheAla*** 729

TAGAGGAGTAGGGATGATTTCGAGGATAGTGGAGCTATTGTGAAGTGACCGGGTGGGTAA 3900
CAAAAGTATGCTTTGAATTAGTTTTCAGCATATAGATGTATATGACTACTGTATGTACTT 3960
GTAGTTGCGAGCTCAGAACGAATGAGACAGAGCAGCTCAGCCATTTACAGTACAGTATGT 4020
GCTTGCTCATGGGCAGTTACAAGTTCCCTACTTGTAAATACGGAGTCTGGTTTTTCAGTTGA 4080
CATGGATTATACAACCTTAAGGCGCTCGAAAAGCGTTGTACCCTTTCTATCCACTAAGA 4140
TATGTTTGAACCAACCAGAGCTATCTACTTGTAGCTACACGGCTGACCACCAAACCTCTTG 4200
GTCAACTAATGTACCAGCAACAACCTGATGAACTCCAAAGGGTGAACCATAGACTCCACG 4260
CTGTGGAAGGATATGTAAATAAAGACAACCATAAAACAGAACTTCAGACACTTGGCAAGG 4320
AAAAAGATTACAGCACCTAGGATTCTCGTATGGTCTCCCACTACAATACTAACTAGGCTC 4380
TCTGGTGCCTGACTATGGCTGATCGGACGGGAAGCCGTATTTTCACCAGGATATGGCCGT 4440
AACCAAGACTCCGATACGGGAATCGAACCCTGGTCTCCACGGTTCTCAACATGAGAGCG 4500
TGATGTGATAGCCCCTACACTATATCGGAAATGTGCAAGACACGGTGTTTTTGGCGTCAC 4560
GCATCTGATTCGCCAAATAAGGTTAATTAATAAAGTTAACGAATATTAATAATAGTTAGAA 4620
TAAAAATAAATTTGTCAAGCGTTTGTATCGGCTCAAGAAAAGAAAATAAGGGAACCGGGG 4680
AGTGTGGAATTTTCAAACCTGTTTCGGAGAAAACCTATTACGGGCTATTGCACGAGATTTT 4740
TCCCTGTTTTATGGTCGTTTAGTTGCTGAGATGCATTGGGCAAGAATCACAAAATAAAT 4800
GACTCGTGAATGCGCACAAATGCGACCTTAATGCACGTTTAGCCAGTAGTGTGCATGATA 4860
ATCCACATACAAAGTTAAGATCCGATGTTAGCCTACGTGTATTTACTATAGCTGAAATGT 4920
CTACCTGTACTCATTTAGTGCAGAAAATTTAACCACCTTAGCGCCCGGCTTGTGCATG 4980
TCTTGGCTCATGTACATGAGATGAGAGTGTATGTGATCTGACGGAAGTGGGCACATACAC 5040
GCTGATAACATTTAGGTCGCTTCTGCGGTTGATATCACAAAGCATCTCCGAGCACACGA 5100
AAATGAGATGGTATGCTGAAGTCTCCACCTTAGTTCGAC 5139

```

▲: Spaltstelle für die Präsequenz

7.3 „Multiple Cloning site“ des Expressionsvektors pRSETA

```

GGAGATATACATATGCGGGTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACT
MetArgGlySerHisHisHisHisHisHisGlyMetAlaSerMetThr

GGTGGACAGCAAATGGGTCTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCGATGGGGATCC
GlyGlyGlnGlnMetGlyArgAspLeuTyrAspAspAspAspLysAspArgTrpGlySer

GAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATGGAATTCGAAGCTTG
GluLeuGluIleCysSerTrpTyrHisGlyIleArgSerLeu

```

Die Schnittstellen für *Xho*I und *Eco*RI, die bei der heterologen Expression von YLNDH2 in *E. coli* zur Klonierung des NDH2-PCR-Produkts verwendet wurden (siehe 3.2.1), sind unterstrichen.

7.4 Verwendete Oligonukleotide

Tab. 7.1 Oligonukleotide zur Sequenzierung des *NDH2* Gens

Name	Sequenz	Bindungsstelle
YL NDH2 SK 1	5'-GCC CCC TCC GAC CAG TTG C- 3'	942-958
NDH2 rev 2	5'-GTG CTC AAT GGT TCC GGT G- 3'	1128-1109
AE seq 1	5'-CCA GCA GAT TCG ACG AAC C- 3'	1389-1408
AE seq 2	5'-GAG CTC ATG TCC AAG ATC C- 3'	1827-1846
vortag	5'-CCT GTC CTT CAA CTT CTG G- 3'	2217-2235

Tab. 7.2 Oligonukleotide zur Herstellung des N-terminalen NDH2 His-tag Stammes

Name	Sequenz	Bindungsstelle
AE1f	5'-CGT GAT ATC TCT CGA GAA TGA TTC GAG GAT AG- 3'	2368 (in <i>NDH2</i>)- 3868 (in <i>NUAM</i>)
AE1r	5'-CTA TCC TCG AAT CAT TCT CGA GAG ATA TCA CG- 3'	2368 (in <i>NDH2</i>)- 3868 (in <i>NUAM</i>)
AEHtf	5'-CAT CAT CAT CCC TCC GAC CAG TTG C-3'	943-957 (in <i>NDH2</i>)
AEHtr	5'-ATG ATG ATG GGC GAG ACG TCG GGC GGA GAC- 3'	1687-1707 (in <i>NUAM</i>)

Tab. 7.3 Oligonukleotide zur Herstellung des C-terminalen NDH2 His-tag Stammes (Dr. Stefan Kerscher)

Name	Sequenz	Bindungsstelle
CtermHtf	5'-CAT CAT CAT TAG AGT TGC AGC TTC TCC ATC- 3'	2500-2520
CtermHtr	5'-ATG ATG ATG AGA GAT ATC ACG GCC GAA G- 3'	2379-2360

Tab. 7.4 Oligonukleotide zur Herstellung des NDH2-PCR-Produkts für die heterologe Expression von NDH2 in *E. coli*

Name	Sequenz	Bindungsstelle
YLNDH2- <i>Sall</i>	5'-CAT TGT CGA CCC CTC CGA CCA GTT GC- 3'	933-958
YLNDH2- <i>EcoRI</i>	5'-CAA GAA TTC AGA TGG AGA AGC TGC AAC- 3'	2529-2503

7.5 Beginn eines Protokolls zur Isolierung von NDH2 aus *Y. lipolytica* mittels Affinitätschromatographie

Für eine schnelle und effektive Isolierung der alternativen Dehydrogenase aus *Y. lipolytica* wurden zwei Stämme hergestellt, die N- bzw. C-terminal eine Affinitätsmarkierung in Form eines Sechsfach-Histidin-tags trugen. Die Enzyme sollten mit Hilfe von immobilisierter Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) und anschließender Gelfiltration gereinigt werden. Das Reinigungsprotokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen. Es war jedoch möglich, den nativen N-Terminus von YLNDH2 durch Sequenzierung einer Bande aus einer teilgereinigten Fraktion zu bestimmen.

7.5.1 Herstellung eines Konstrukts zur Expression von NDH2 mit N-terminalem His-tag als internes Enzym

Das Ausgangsplasmid zur Herstellung eines *NDH2* Konstrukts mit N-terminalem His-tag war das pSK⁻ Derivat pUB5. Auf diesem Vektor ist ein verkürzter offener Leserahmen von *NDH2* mit der N-terminalen Präsequenz der Komplex I Untereinheit *NUAM* fusioniert, um eine interne Expression des Enzyms zu erreichen [Kerscher *et al.*, 2001; siehe 1.2.1]. Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, dass das verkürzte interne Enzym das Überleben von Komplex I Deletionsmutanten gewährleistete [Kerscher *et al.*, 2001], das interne Enzym also funktionstüchtig war. Die *NUAM* Präsequenz ist 34 Aminosäuren lang; die *NDH2* Sequenz beginnt ab Aminosäure 101, die von Asparagin zu Aspartat umgewandelt wurde (Abb. 7.1 und Gensequenzen).

Im ersten Mutageneseschritt wurde zunächst der native C-Terminus der alternativen Dehydrogenase wiederhergestellt, der bei der Fusion verändert worden war (Abb. 7.1; Primer AE1f und AE1r siehe Tab. 7.2). Das neue Konstrukt bekam den Namen pUB5.1. Dann wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Histidincodons mittels inverser PCR am Anfang der *NDH2* Sequenz an den kodierenden Strang (Primer AEHtf) und am Ende der *NUAM* Präsequenz an den nicht kodierenden Strang (Primer AEHtr) angefügt (Sequenzen und genaue Position der Primer siehe Tab. 7.2). Die PCR Produkte wurde phosphoryliert und über glatte Enden selbstligiert. Die Spaltstelle für die Präsequenz befindet sich im *NUAM* Gen zwischen Leucin 34 und Alanin 35. In dem entstandenen Konstrukt blieb das Alanin 35 erhalten und war dem His-tag vorgeschaltet (Abb. 7.1) Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung des offenen Leserahmens überprüft und als *SalI* Fragment in den *E. coli/Y. lipolytica* „Shuttle“-Vektor pUB4 kloniert. Der Vektor wurde pAE2 genannt.

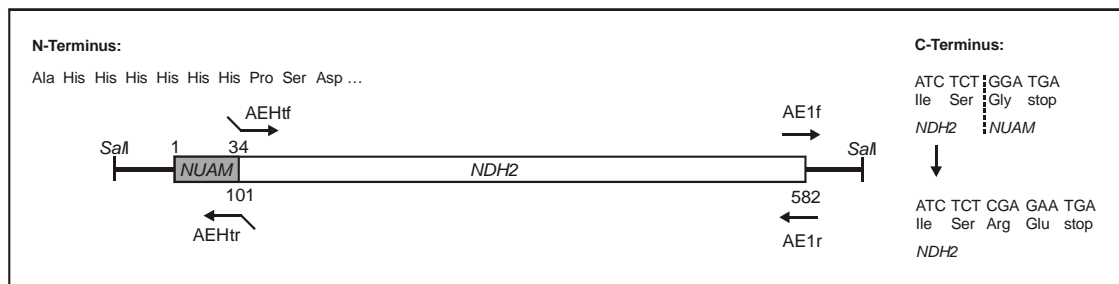


Abb. 7.1 Schematische Darstellung des Konstrukts für NDH2_i mit N-terminalem His-tag im Expressionsvektor pAE2.

7.5.1.1 Der C-Terminus von NDH2 ist essentiell für die messbare Aktivität des Enzyms

SalI Fragmente der beiden Plasmide pUB5 und pUB5.1 wurden in den *E. coli/Y. lipolytica* „Shuttle“-Vektor pUB4 umkloniert und in den $\Delta ndh2$ Deletionsstamm GB 5.2 transformiert. Die Konstrukte waren bis auf den veränderten C-Terminus identisch (siehe Abb. 7.1). Es zeigte sich jedoch, dass mitochondriale Membranen des Stammes mit dem pUB5-Fragment keine messbare NADH:DBQ Aktivität in Gegenwart von DQA hatten (Tab. 7.5).

Tab. 7.5 Membranaktivitäten in Stämmen, deren NDH2 sich nur bezüglich des C-Terminus unterscheidet. Aus pUB5 und pUB5.1 in pUB4 umklonierte *SalI* Fragmente wurden in den $\Delta ndh2$ Deletionsstamm GB 5.2 transformiert. Die Aktivitäten wurden mit je 35 $\mu\text{g/ml}$ Membranprotein gemessen.

Umklonierte <i>SalI</i> Fragmente aus	NADH:DBQ Aktivität [U/mg]		NADH:HAR Aktivität [U/mg]
	-DQA	+DQA	
pUB5 (veränderter C-Term)	0.62	0.00	2.0
pUB5.1 (nativer C-Term)	1.10	0.65	2.3

Dies Ergebnis war sehr verblüffend, denn das *SalI* Fragment von pUB5 entspricht genau dem in Plasmid pUB7, welches als interne Variante von NDH2 standardmäßig in Komplex I Deletionsstämmen vorhanden ist, um deren Überleben zu sichern. Es war jedoch bereits aufgefallen, dass NDH2_i im Stamm $\Delta nuam$ pUB7 im Western Blot ein viel schwächeres Signal lieferte als die native externe Version (siehe Abb. 3.15). Nach Rückmutation des C-Terminus in seine native Form war das Blotsignal gleich stark dem externen Enzym (Vgl. Stamm GB 5.2 pAE2 in Abb. 7.3). Dies bedeutet, dass die Veränderung des nativen C-Terminus der NDH2 einen großen Einfluss auf die Expression des Enzyms hat und eigentlich

in die Ergebnisse der Mutagenese-Studie eingereicht werden könnte. Offenbar hatte die in pUB5 codierte Variante der internen alternativen Dehydrogenase mit modifiziertem C-Terminus noch genügend hohe NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Aktivität, um den Komplex I zu ersetzen, jedoch zu geringe, um in Aktivitätstests mit mitochondrialen Membranen nachweisbar zu sein.

7.5.2 Herstellung eines Konstrukts zur Expression von YLNDH2 mit C-terminalem His-tag

Ein Stamm mit NDH2 mit C-terminalem His-tag wurde von Dr. Stefan Kerscher hergestellt. Ausgangsplasmid war der genomische Klon pE8. Im Gegensatz zur internen N-terminal affinitätsmarkierten Variante von NDH2 lag der C-terminal markierten Form ein Klon des nativen externen Enzyms zugrunde. Der offene Leserahmen von NDH2 wurde zunächst als *SalI* Fragment in den *E. coli/Y. lipolytica* „Shuttle“-Vektor pUB4 kloniert, dann wurden nach der gleichen Strategie wie in 7.5.1 beschrieben, drei aufeinanderfolgende Histidincodons mittels inverser PCR an den C-Terminus angehängt (Abb. 7.2). Die PCR Produkte wurden phosphoryliert und selbstligiert, und der Vektor durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzen und Bindungsstellen der Primer CtermHtf und CtermHtr ist in Tab. 7.3 angegeben.

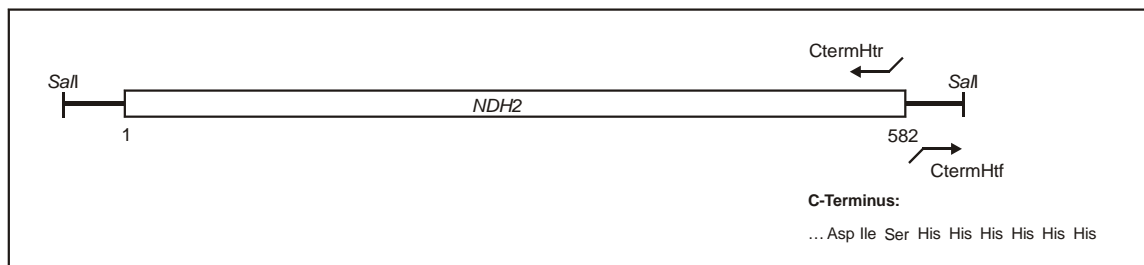


Abb. 7.2 Schematische Darstellung des Konstrukts für NDH2 mit C-terminalem His-tag.

7.5.3 Darstellung der beiden Stämme mit His-tag tragender NDH2

Die beiden Plasmide pAE2 und pCtermHt wurden mit der PLATE Methode in den haploiden *NDH2* Deletionsstamm GB 5.2 transformiert. Die Zellen wurden auf YDP-HygomycinB selektiert und angezogen. Tab. 7.6 zeigt die NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivitäten in Gegenwart von DQA im Vergleich zum *NDH2* Wildtypstamm PIPO. Membranen des Stammes mit N-terminalem His-tag waren 45% aktiver als der Wildtyp, während Membranen des Stammes mit C-terminalem His-tag nur 70% der wildtypischen alternativen Aktivität zeigten.

Tab. 7.6 Vergleich von Aktivitäten der His-tag tragenden Stämme mit dem Wildtyp.

Die Membranen wurden aus Zellen präpariert, die in großem Maßstab im Fermenter gezogen worden waren. Die Aktivitäten wurden mit 100 μM NADH und 60 μM DBQ gemessen. Es wurden jeweils drei typische Präparationen gemittelt

NADH:DBQ+DQA Aktivität [U/mg]		
N-term His (intern)	C-term His (extern)	PIPO (extern)
0.52 ± 0.07	0.25 ± 0.02	0.36 ± 0.04

Der Größenunterschied zwischen der gekürzten internen Variante des Enzyms mit N-terminalem His-tag (ca. 45 kD) und der externen Variante mit C-terminalem His-tag (ca. 60 kD) war im Western Blot mit dem polyklonalen α -NDH2 Antiserum deutlich zu sehen (Abb. 7.3). NDH2 mit C-terminalem His-tag (Spur 1) war geringer exprimiert als das native Enzym, was die geringere Aktivität in Membranen erklären würde. Aktivität und Expression des C-terminalen His-tag Stammes waren ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass der C-Terminus offenbar für das Funktionieren der NDH2 eine große Rolle spielt (siehe 7.5.1.1). Man beachte auch, dass auf diesem Blot die 45 kD Bande der NDH2_i von $\Delta nuam$ pUB7 (Spur 2) gar nicht zu sehen ist, weil nur 10 μg Protein pro Spur aufgetragen worden waren (zum Vergleich siehe Blot in Abb. 3.15 mit jeweils 20 μg).

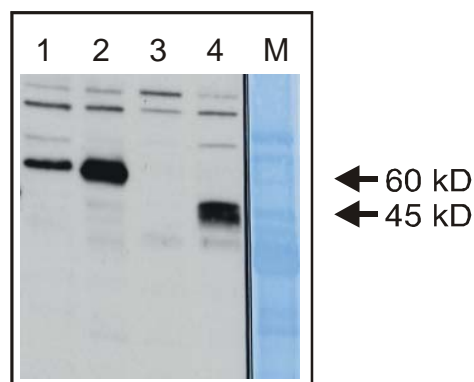


Abb. 7.3 Detektion der beiden His-tag Varianten der NDH2 im Western Blot.

Es wurden jeweils 10 μg Membranprotein der Stämme GB 5.2 pCtermHt (1) und GB 5.2 pAE2 (4) aufgetragen. Als Kontrollen dienten Membranen von $\Delta nuam$ pUB7 (2) und GB 5.2 (4). Da für diesen Blot nur 10 μg Protein pro Spur aufgetragen wurden, ist die 45 kD große Bande der NDH2_i in $\Delta nuam$ pUB7 (2) nicht zu sehen (zum Vergleich siehe Abb. 3.15). Als Marker wurde gereinigter bc_1 Komplex aus Rind aufgetragen.

7.5.4 Extraktion der His-tag tragenden NDH2 aus Membranen

Mit Membranen des Stammes GB 5.2 pAE2 wurden zunächst in Vorversuchen diejenigen Detergenz- und Salzkonzentration ausgetestet, die nötig war, um NDH2 optimal aus den Membranen zu extrahieren. Als Detergenz wurde Laurylmaltosid verwendet. Da es sich bei der alternativen Dehydrogenase um ein peripheres Membranprotein handelt, sollte das Enzym bei einer möglichst geringen Detergenzmenge aus der Membran gelöst und im Überstand angereichert werden.

Alle Arbeitsschritte fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Mitochondriale Membranen wurden in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 in Gegenwart von 2 mM des Proteaseinhibitors PMSF auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml eingestellt. Aliquots von je 3 ml wurden in Gegenwart von entweder 50 oder 200 mM NaCl mit verschiedenen Detergenzmengen versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend eine Stunde lang bei 100.000×g zentrifugiert. Vor und nach der Zentrifugation wurden NADH:DBQ+DQA Aktivitäten und Proteinkonzentrationen der Membranen bzw. der Überstände bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Überstände in [U/mg] wurden als % ihres jeweiligen Wertes vor der Zentrifugation angegeben (Abb. 7.4). Für weitere Versuche wurden 0,4 g LM pro g Membranprotein als optimale Detergenzkonzentration und 50 mM NaCl zur Extraktion des Enzyms gewählt. Mit dieser Konzentration konnte bereits eine 1,7fache Anreicherung im Überstand erzielt werden.

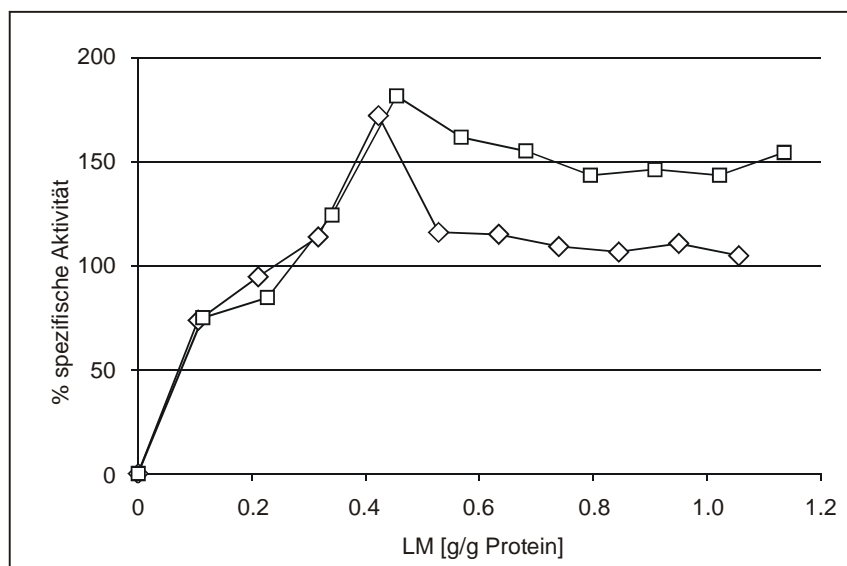


Abb. 7.4 Relative spezifische Aktivitäten von NDH2 in Überständen von Solubilisierungsreihen.

Membranen des Stammes GB 5.2 pAE2 (15 mg/ml) wurden in Gegenwart von 50 (□) und 200 mM (◇) NaCl mit verschiedenen Detergenzmengen solubilisiert. Die relativen spezifischen NADH:DBQ+DQA Aktivitäten in den Überständen wurden bezüglich ihrer Aktivität vor der Ultrazentrifugation angegeben.

7.5.5 Affinitätschromatographie und anschließende Reinigungsschritte des internen Konstrukts mit N-terminalem His-tag

Solubilisierter Überstand von Membranen des Stammes GB 5.2 pAE2 wurde auf 400 mM NaCl und 1 mM MgCl₂ eingestellt, mit weiteren 0,5% Laurylmaltosid versetzt und auf eine Sepharose Fast Flow Säule (Econo Column® mit Flow Adapter) aufgetragen, die laut Angaben des Herstellers mit Ni²⁺-Ionen beladen und mit 20 mM Natriumphosphat pH 7 und 400 mM NaCl äquilibriert worden war. Um zunächst geeignete Imidazol-Konzentrationen für die Bindung und Elution der affinitätsmarkierten NDH2 herauszufinden, wurde der Überstand ohne Imidazol aufgetragen und mit einem Stufengradienten eluiert. Leider hatte das Enzym unter diesen Bedingungen insgesamt schlechte Bindungseigenschaften, was sich in sehr breiten Elutionspeaks zeigte. Es war nicht möglich, definierte Imidazolkonzentrationen für eine stabile Bindung und Elution des Enzyms zu bestimmen und zu reproduzieren. Nach mehreren Versuchen wurden Imidazolkonzentrationen zum Äquilibrieren, Waschen und Eluieren auf 100, 150 und 500 mM festgelegt. Abb. 7.5 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil einer Ni²⁺ Sepharose-Säule unter diesen Bedingungen. Die Säule wurde mit ca. 50 mg Gesamtprotein/ml Säulenmaterial beladen. Die Detektion der NDH2 war nur mittels Western Blot Analyse mit dem polyklonalen α -NDH2 Antiserum möglich, da weder im Durchlauf, noch in den Elutionsfraktionen NADH:DBQ Aktivität in Gegenwart von DQA messbar war. Die ca. 45 kD große Bande der internen His-tag NDH2 wurde in nahezu allen Säulenuaten detektiert. Die Zunahme der Stärke des Signals in den Fraktionen 24-26 zu Beginn der Elution (Abb. 7.5 unten) korrespondierte mit dem Abwaschen der Hauptmenge des gesamten gebundenen Proteins von der Säule (Abb. 7.5 oben).

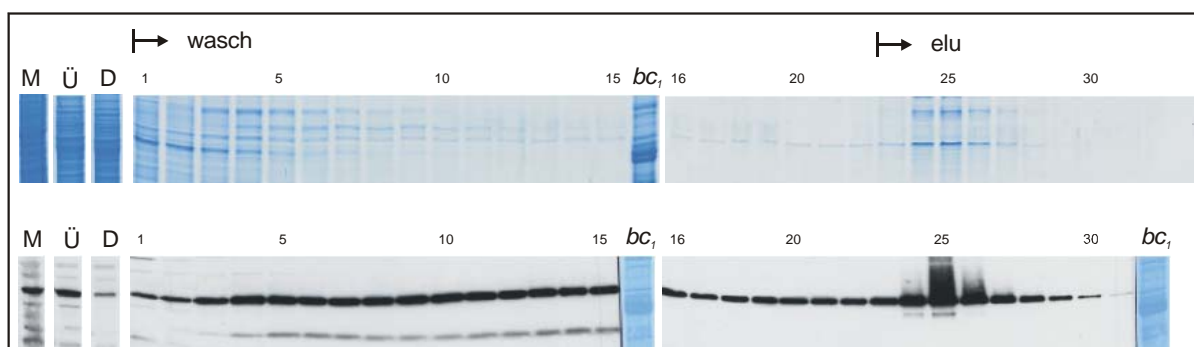


Abb. 7.5 Elutionsprofil einer Ni²⁺ Sepharose-Säule zur Reinigung der N-terminal affinitätsmarkierten internen NDH2. SDS Gel (oben) und Western Blot mit dem polyklonalen α -NDH2 Antiserum (unten) der Membranen (M), des solubilisierten Überstandes (Ü), des Durchlaufs (D) und der Fraktionen 1-31. Es wurden insgesamt 50 mg Protein/ml Säulenmaterial aufgetragen. (Die der NDH2 entsprechende Bande hat eine Größe von ca. 45 kD.)

Die Fraktionen 23-26 (je 4 ml) wurden vereinigt, durch Zentrifugation in Centricons 30000 MWCO Konzentratoren (Vivascience) ca. 16fach aufkonzentriert und auf eine TSK G3000SW Gelfiltrationssäule aufgetragen. Der Laufpuffer enthielt 20 mM Natriumphosphat pH 7, 100 mM NaCl und 0,025 % LM. Auch von dieser Säule eluierte das Enzym unspezifisch und ohne erkennbare Anreicherung (Abb. 7.6). Die Reinigungsversuche mit diesem Stamm wurde nicht weiter fortgesetzt.

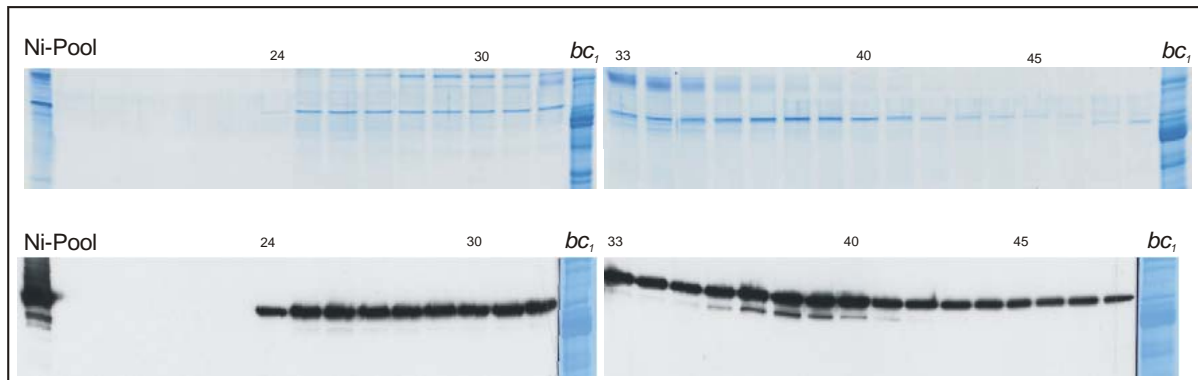


Abb. 7.6 Elutionsprofil einer TSK G3000SW Gelfiltrationssäule zur Reinigung der N-terminal affinitätsmarkierten internen NDH2. SDS Gel (oben) und Western Blot mit dem polyklonalen α -NDH2 Antiserum (unten) des ca. 16fach konzentrierten Nickel pools und der Elutionsfraktionen 23-26 aus Abb. 7.5.

7.5.6 Affinitätschromatographie und anschließende Reinigungsschritte des externen Konstrukts mit C-terminalem His-tag

Die Bedingungen der Extraktion von mitochondrialen Membranen (siehe 7.5.4) und der in Abb. 7.5 gezeigten Ni^{2+} Sepharose-Säule wurden mit Membranen des Stammes GB 5.2 pCtermHt als Ausgangsmaterial wiederholt (Abb. 7.7). Diesmal wurde jedoch die doppelte Menge an Gesamtprotein (100 mg) pro ml Säulenmaterial aufgetragen und der Waschpuffer enthielt nur 100 mM statt 150 mM Imidazol. Die C-terminal affinitätsmarkierte externe alternative Dehydrogenase schien unter diesen Bedingungen besser zu binden als die interne N-terminal markierte. Das stärkste Blotsignal wurde wiederum in den ersten Elutionsfraktionen beobachtet, wenn praktisch das gesamte an die Säule gebundene Protein durch die hohe Imidazolkonzentration abgewaschen wurde. Die Anreicherung einer 60 kD großen Bande in den Fraktionen 24-26 (Abb. 7.7 oben) wurde zunächst für die externe NDH2 gehalten.

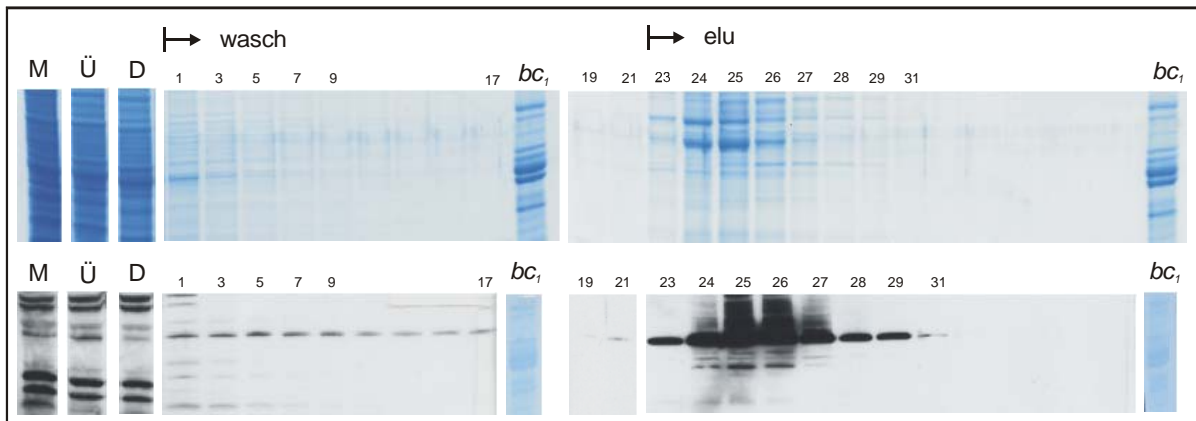


Abb. 7.7 Elutionsprofil einer Ni^{2+} Sepharose-Säule zur Reinigung der C-terminal affinitätsmarkierten externen NDH2. SDS Gel (oben) und Western Blot mit dem polyklonalen α -NDH2 Antiserum (unten) der Membranen (M), des solubilisierten Überstandes (Ü), des Durchlaufs (D) und der Wasch- und Elutionsfraktionen. Es wurden insgesamt 100 mg Protein/ml Säulenmaterial aufgetragen. (Die der NDH2 entsprechende Bande im Western Blot hat diesmal eine Größe von ca. 60 kD.)

Fraktionen 24 bis 27 wurden vereinigt, eingengt und erneut auf eine TSK G3000SW Gelfiltrationssäule aufgetragen. Der Laufpuffer enthielt diesmal 20 mM Natriumphosphat pH 7, 400 mM NaCl und 0,05 % LM. Eine weitere Anreicherung einer 60 kD Bande wurde in den Fraktionen 26-29 erzielt (Abb. 7.8 oben). Die Stärke des Western Blot Signals in diesen Fraktionen zeigte jedoch deutlich, dass es sich bei dieser Bande nicht ausschließlich um NDH2 handeln konnte (Abb. 7.8 unten)

Statt dessen wurde anhand des Western Blot Signals die umrandete Bande in Fraktion 18 (Abb. 7.8 oben) ausgeschnitten und zur N-terminalen Sequenzierung an die Firma Toplab (München) geschickt. Die Bande ergab die Aminosäuresequenz Asp Lys Ile Glu Gly Thr Ala, was exakt Position 31 des offenen Leserahmens der nativen YLNDH2 entsprach, wobei das N-terminale Asparagin zu Aspartat deaminiert war.

Auch mit diesem Stamm wurde die Reinigungsversuche der YLNDH2 an dieser Stelle abgebrochen.

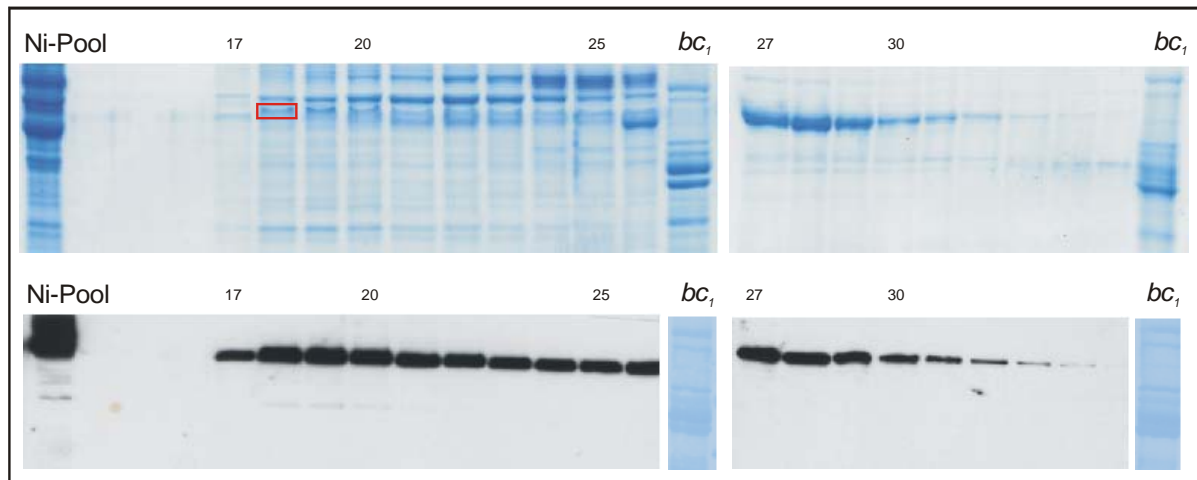
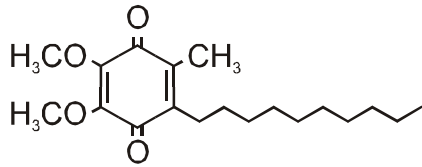


Abb. 7.8 Elutionsprofil der TSK G3000SW Gelfiltrationssäule zur Reinigung der C-terminal affinitätsmarkierten externen NDH2. SDS Gel (oben) und Western Blot mit dem polyklonalen α -NDH2 Antiserum (unten) des Nickel-pools (Fraktionen 24-27 in Abb. 7.7) und der Elutionsfraktionen. Die umrandete Bande in Fraktion 18 wurde N-terminal sequenziert.

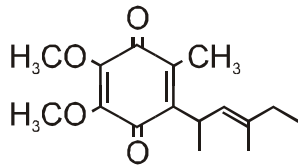
7.6 Verwendete Chinonanaloga

2,3 dimethoxy-5 methyl 6 decyl-1,4 benzochinon (DBQ)

$C_{19}H_{30}O_4$

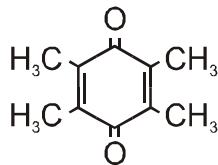


2,3 dimethoxy – 5 methyl 6 (3 methyl – 2 butenyl) 1,4 benzochinon (Q₁) $C_{14}H_{18}O_4$



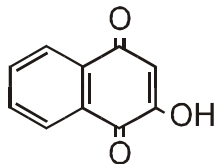
2,3,5,6 tetramethyl 1,4 bezochinon (Durochinon)

$C_{10}H_{12}O_2$



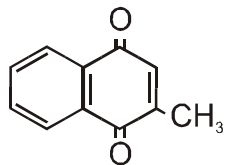
2 hydroxy 1,4 naphtochinon

$C_{10}H_6O_3$



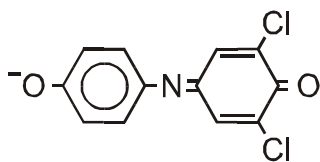
2 methyl 1,4 naphtochinon (Menadion)

$C_{11}H_8O_2$



2,6 dichlorophenol – indophenol (DCPIP), Na-Salz

$C_{12}H_6Cl_2NO_2$



7.7 Verzeichnis der Abkürzungen

ACC.No.	Accession number
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
μCi	Mikro-Curie=37.000 Becquerel
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DBH	n-Decylubihydrochinon
DBQ	n-Decylubichinon
DCPIP	2,6 dichlorophenol – indophenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNADH	Deamino- Nikotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
DQA	2-decyl-4-quinazolinylamin
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N' tetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid, oxidiert
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid, reduziert
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
HAR	Hexamminruthenium(III)-chlorid
HCl	Salzsäure
HDQ	1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolon
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
His-tag	Affinitätsmarker bestehend aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinen
I ₅₀	Inhibitorkonzentration, die 50 % der Anfangsrate hemmt
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumcyanid
kD	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten Konstante
KOH	Kaliumhydroxyd
LM	Laurylmaltosid

Mops	γ -Morpholino-propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P) ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (-phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (-phosphat), reduziert
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxyd
NaPi	Natriumdihydrogenphosphat
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylenddifluorid
Q _{1,2...}	Ubichinon-1, -2 usw.
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-tris[hydroxymethyl]methyglycerin
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
U/mg	Unit pro mg [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
UV	Ultraviolett
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit

7.8 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1 Sequenzvergleich hochkonservierter Bereiche von alternativen NADH:Ubichinon Oxidoreduktasen.....	7
Abb. 1.2 Die mitochondriale Atmungskette der obligat aeroben Hefe <i>Yarrowia lipolytica</i>	10
Abb. 3.1 Bestimmung des pH Optimums für die alternative NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität.....	29
Abb. 3.2 Abhängigkeit des apparenten K_M Wertes von YLNDH2 von der Membranmenge im Test.....	32
Abb. 3.3 Vergleich von Michaelis Menten Kurven, gemessen an verschiedenen Geräten.....	34
Abb. 3.4 Hanes Darstellung der DBQ-Kinetiken mit unterschiedlichen NADH-Konzentrationen.....	36
Abb. 3.5 Postuliertes Modell der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Reaktion der NDH2 aus <i>Y. lipolytica</i>	37
Abb. 3.6 Strukturformel, Hemmwirkung und Spektrum von 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)chinolon (HDQ)	38
Abb. 3.7 Hemmung der NADH:DBQ Oxidoreduktase Aktivität von NDH2 und Komplex I in mitochondrialen Membranen mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors HDQ – I_{50} Messung. ..	39
Abb. 3.8 Lineweaver Burk Darstellungen der HDQ Hemmkinetiken für die Substrate DBQ und NADH.	41
Abb. 3.9 Graphische Ermittlung der Hemmkonstanten K_i und K_{ij}	43
Abb. 3.10 Postuliertes Modell des Hemmmechanismus der NDH2 von <i>Y. lipolytica</i> durch den Inhibitor HDQ.....	44
Abb. 3.11 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pRSETA-YLNDH2.....	45
Abb. 3.12 SDS-Gel (A) und Western Blot (B) der induzierten <i>E. coli</i> Kultur.....	46
Abb. 3.13 Die Überexpression von YLNDH2 in <i>E. coli</i> führte zur Bildung von Einschlusskörpern.....	47
Abb. 3.14 Elutionsprofil der in <i>E. coli</i> überexprimierten YLNDH2 von der denaturierenden Ni^{2+} Säule...	47
Abb. 3.15 Detektion der externen NDH2 und der gekürzten internen Variante mit dem polyklonalen Antiserum.....	48
Abb. 3.16 Southern Blot Analyse von Sporen zur Überprüfung der Genloci für <i>NUIM</i> (A, Restriktion mit <i>XhoI</i>) und <i>NDH2</i> (B, Restriktion mit <i>BamHI</i>).....	51
Abb. 3.17 Positionen von zielgerichteten Mutationen im offenen Leserahmen von NDH2.....	53
Abb. 3.18 Chemilumineszenz von Wildtyp- und Mutantenmembranen.....	54
Abb. 3.19 Relative Darstellung der in Tab. 3.7 aufgelisteten Kinetik- und Chemilumineszenz Daten ausgewählter NDH2 Mutanten.	56
Abb. 3.20 Apparente K_M und V_{max} Werte von Mutantenmembranen und gemischten Wildtypmembranen stiegen linear proportional zueinander an.....	60
Abb. 3.21 Lineare Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten in gemischten Membranen von drei verschiedenen Präparationen des komplementierten Wildtyps und des Stammes PIPO.....	61
Abb. 3.22 Abhängigkeit zwischen apparenten K_M und V_{max} Werten von Komplex I in gemischten Membranen des komplementierten Wildtyps und des Stammes PIPO.....	62
Abb. 3.23 Abhängigkeit zwischen K_M und V_{max} Werten von Komplex III in gemischten Membranen.....	63
Abb. 4.1 Schematische Darstellung von externen und internen NADH Dehydrogenasen in Ascomyceten und deren Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran.....	66

Abb. 4.2 Schematisches Modell von YLNDH2 und seiner Reaktion mit dem hydrophoben Substrat Ubichinon	69
Abb. 4.3 Reaktion immobilisierter Enzyme [nach Bisswanger, 2000 S.141]	71
Abb. 4.4 Berechnung von h_Q und „wahrer“ K_M aus den Messdaten aus Abb. 3.21 (siehe Text).	72
Abb. 7.1 Schematische Darstellung des Konstrukts für NDH _{2i} mit N-terminalem His-tag im Expressionsvektor pAE2.	93
Abb. 7.2 Schematische Darstellung des Konstrukts für NDH2 mit C-terminalem His-tag.	94
Abb. 7.3 Detektion der beiden His-tag Varianten der NDH2 im Western Blot.	95
Abb. 7.4 Relative spezifische Aktivitäten von NDH2 in Überständen von Solubilisierungsreihen.	96
Abb. 7.5 Elutionsprofil einer Ni ²⁺ Sepharose-Säule zur Reinigung der N-terminal affinitätsmarkierten internen NDH2.	97
Abb. 7.6 Elutionsprofil einer TSK G3000SW Gelfiltrationssäule zur Reinigung der N-terminal affinitätsmarkierten internen NDH2.	98
Abb. 7.7 Elutionsprofil einer Ni ²⁺ Sepharose-Säule zur Reinigung der C-terminal affinitätsmarkierten externen NDH2.	99
Abb. 7.8 Elutionsprofil der TSK G3000SW Gelfiltrationssäule zur Reinigung der C-terminal affinitätsmarkierten externen NDH2.	100

7.9 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 2.1 <i>Y. lipolytica</i> Stämme.....	17
Tab. 2.2 <i>E. coli</i> Stämme	17
Tab. 2.3 <i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	17
Tab. 2.4 <i>E. coli</i> und <i>Y. lipolytica</i> Plasmide.....	17
Tab. 3.1 Aktivitäten von YLNDH2 und Komplex I mit verschiedenen Chinon-Substraten.	31
Tab. 3.2 Berechnete apparente K_M und V_{max} Werte der Kurven aus Abb. 3.3.	34
Tab. 3.3 Apparente K_M und V_{max} Werte für DBQ gemessen mit unterschiedlichen NADH-Konzentrationen	35
Tab. 3.4 Berechnete Michaelis Menten Parameter der HDQ Hemmkinetiken.....	40
Tab. 3.5 Steigungen (m) und Ordinatenabschnitte (b) der Lineweaver-Burk Plots aus Abb. 3.8.	43
Tab. 3.6 Übersicht über Aktivität und NDH2-Gehalt in Wildtyp- und Mutantenmembranen.	55
Tab. 3.7 Zusammenfassung detaillierter Kinetik- und Chemilumineszenz Daten ausgewählter NDH2 Mutanten.	57
Tab. 3.8 Michaelis Menten Parameter für DBQ und NADH mit verdünnten Wildtyp Membranen.	60
Tab. 7.1 Oligonukleotide zur Sequenzierung des <i>NDH2</i> Gens	91
Tab. 7.2 Oligonukleotide zur Herstellung des N-terminalen NDH2 His-tag Stammes	91
Tab. 7.3 Oligonukleotide zur Herstellung des C-terminalen NDH2 His-tag Stammes (Dr. Stefan Kerscher)	91
Tab. 7.4 Oligonukleotide zur Herstellung des NDH2-PCR-Produkts für die heterologe Expression von NDH2 in <i>E. coli</i>	91
Tab. 7.5 Membranaktivitäten in Stämmen, deren NDH2 sich nur bezüglich des C-Terminus unterscheidet.	93
Tab. 7.6 Vergleich von Aktivitäten der His-tag tragenden Stämme mit dem Wildtyp.....	95

Lebenslauf

Persönliche Daten

Andrea Eschemann
Alt Griesheim 17
65933 Frankfurt am Main
geb. am 02.10.1972 in Bremerhaven
Familienstand: ledig

Schulbildung

1979 - 1983 Grundschule
1983 - 1985 Orientierungsstufe
1985 - 1992 Gymnasium
07/92 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Grund- und Hauptstudium

10/93 – 07/99 Biologie (Diplom)
an der Carl von Ossietzky-Universität, Oldenburg
Schwerpunkte: Botanik, Mikrobiologie, Ökologie, Biochemie

Diplomarbeit

07/98 – 07/99 am Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM),
Universität Oldenburg, bei Prof. Heribert Cypionka
Thema: „Chemotaxis sulfatreduzierender Bakterien“

Promotionsstudium

seit 03/00 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Zentrum
der Biologischen Chemie des Universitäts-Klinikums Frankfurt
in der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Brandt im Rahmen des
SFB 472 „Molekulare Bioenergetik“, Teilprojekt 18.

Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Titel
„Charakterisierung der alternativen NADH:Ubichinon
Oxidoreduktase (NDH2) aus *Yarrowia lipolytica*“