

# **Rekonstitution der gekoppelten Fumarat-Atmung von *Wolinella succinogenes***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main

von Simone Biel  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2002

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Bruno Streit

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Soppa

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation:

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1996 bis Dezember 2002 im Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. Achim Kröger durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Biel, S., Simon, J., Groß, R., Ruiz, T., Ruitenbergh, M. & Kröger, A. (2002) Reconstitution of coupled fumarate respiration in liposomes by incorporating the electron transport enzymes isolated from *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1974-1983.

Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Groß, R., Uden, G. & Lancaster, C.R.D. (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics, and coupling mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 23-38.

Weitere Veröffentlichungen:

Simon, J., Eichler, R., Pisa, R., Biel, S. & Groß, R. (2002) Modification of heme *c* binding motifs in the small subunit (NrfH) of the *Wolinella succinogenes* cytochrome *c* nitrite reductase complex. *FEBS Lett.* **522**, 83-87.

Schnorpfel, M., Janausch, I.G., Biel, S., Kröger, A. & Uden, G. (2001) Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3069-3074.

Biel, S., Klimmek, O., Groß, R. & Kröger, A. (1996) Flavodoxin from *Wolinella succinogenes*. *Arch. Microbiol.* **166**, 122-127.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>9</b>
3.1 Zucht von <i>W. succinogenes</i>	9
3.2 Isolierung der Enzyme	9
3.2.1 Fumarat-Reduktase	9
3.2.2 Hydrogenase	10
3.2.3 Formiat-Dehydrogenase	10
3.3 Chinone	10
3.4 Phospholipide	11
3.5 Präparation von Schallliposomen	11
3.6 Präparation von Proteoliposomen	11
3.6.1 Einbau von Hydrogenase und Fumarat-Reduktase	11
3.6.2 Einbau von Formiat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase	12
3.7 Enzymaktivitäten	12
3.8 Cytochrom <i>b</i> -Differenzspektrum	13
3.9 Transmissionselektronenmikroskopie	13
3.10 Innenvolumenbestimmung der Proteoliposomen	14
3.11 Bestimmung des Protonenpermeabilitätskoeffizienten	15
3.12 Bestimmung von $\Delta\psi$	15
3.12.1 Bindungskonstanten	18
3.13 Bestimmung der $H^+/e^-$ -Quotienten	19
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>21</b>
4.1 Präparation und Charakterisierung der Proteoliposomen	21
4.1.1 Bestimmung des kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnisses	21
4.1.2 Orientierung der Enzymmoleküle in den Proteoliposomen	23
4.1.3 Transmissionselektronenmikroskopie	26

---

4.1.4	Größe der Proteoliposomen	28
4.1.5	Enzymaktivitäten vor und nach Einbau der Proteine in die Liposomen	29
4.1.6	Reduktion von Cytochrom <i>b</i>	30
4.1.7	Gelfiltration der Proteoliposomen	32
4.1.8	Protonenpermeabilität der Proteoliposomenmembran	34
4.2	Bestimmung von $\Delta\psi$	37
4.2.1	Verteilung von lipophilen Ionen über der Proteoliposomenmembran	37
4.2.2	$\Delta\psi$ in Abhängigkeit des eingebauten Chinons	40
4.3	Bestimmung der $H^+/e^-$ -Quotienten	42
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
5.1	Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen	48
5.2	Energetische Betrachtung der Fumarat-Atmung	51
5.3	Mechanismus der $\Delta p$ -Entstehung	52
5.4	Die Bindungsstelle für Menachinol in der Fumarat-Reduktase	55
5.5	Die Succinat-Dehydrogenase von <i>Bacillus subtilis</i>	56
5.6	„E-Weg“-Hypothese	58
5.7	Chinon-Spezifität der Fumarat-Atmung	60
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

B	interne Pufferkapazität (in $\mu\text{mol H}^+ \cdot (\text{g Phospholipid})^{-1} \cdot \text{pH}^{-1}$ )
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMN	2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinon
DMNH <sub>2</sub>	2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Redoxpotential (in Volt, V)
E <sub>0</sub> '	Standardredoxpotential bei pH 7 (in Volt, V)
F	Faraday-Konstante (96485 Coulomb·mol <sup>-1</sup> )
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCCP	Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyphenylhydrazon
Fdh	Formiat-Dehydrogenase von <i>W. succinogenes</i>
Fdn	Formiat-Dehydrogenase von <i>E. coli</i>
Fl	Fluoreszenzintensität
Frd	Fumarat-Reduktase von <i>W. succinogenes</i>
G <sub>0</sub> '	freie Standardenergie bei pH 7 (in Joule, J)
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HQNO	2-(Heptyl)-4-hydroxychinolin-N-oxid
Hyd	Hydrogenase von <i>W. succinogenes</i>
J <sub>H</sub>	Protonenfluß über die Membranoberfläche (in mol H <sup>+</sup> ·cm <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )
K <sub>T</sub>	Bindungskonstante für TPP <sup>+</sup> oder TPB <sup>-</sup> (in ml·g <sup>-1</sup> )
MK	Menachinon
MKH <sub>2</sub>	Menachinol
MLV	multilamellar vesicle
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht (in Dalton, Da)
MV	Methylviologen
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

---

NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
O	spezifische Membranoberfläche (in $\text{cm}^2 \cdot (\text{g Phospholipid})^{-1}$ )
$P_H$	Protonenpermeabilitätskoeffizient (in $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Pyranin	8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure
$R$	Gaskonstante ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )
Sdh	Succinat-Dehydrogenase von <i>B. subtilis</i>
SUV	small unilamellar vesicle
$T$	Temperatur (in Kelvin, K)
TAME	<i>N</i> - $\alpha$ -Tosyl-L-arginyl- <i>O</i> -methylester
TPB <sup>-</sup>	Tetraphenylboranat
TPP <sup>+</sup>	Tetraphenylphosphonium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (in $2 \mu\text{mol Elektronen} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$V_i$	Innenvolumen der Liposomen (in $\text{ml} \cdot (\text{g Phospholipid})^{-1}$ )
$\Delta p$	transmembranes elektrochemisches Protonenpotential (in Volt, V)
$\Delta \text{pH}$	transmembrane pH-Differenz
$\Delta \psi$	transmembranes elektrisches Protonenpotential (in Volt, V)
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient (in $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

# 1 Zusammenfassung

*Wolinella succinogenes* reduziert Fumarat mit  $H_2$  oder Formiat als Elektronendonator. Der Elektronentransport wird von der membranständigen Hydrogenase oder Formiat-Dehydrogenase und der Fumarat-Reduktase katalysiert. Redoxmediator zwischen beiden Enzymen ist Menachinon. Der Elektronentransport ist mit der Erzeugung eines elektrochemischen Protonenpotentials ( $\Delta p$ ) gekoppelt. Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der  $\Delta p$ -Entstehung durch Rekonstitution der gekoppelten Fumarat-Atmung in Liposomen aufzuklären.

Aus *Wolinella succinogenes* isolierte Hydrogenase und Fumarat-Reduktase wurden in Liposomen eingebaut, die Menachinon enthielten. Die resultierenden Proteoliposomen katalysierten die Reduktion von Fumarat mit  $H_2$ . Die Wechselzahl der Enzyme im Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat war etwa 10 % von der in Bakterien.

In den Proteoliposomen waren sowohl Hydrogenase als auch Fumarat-Reduktase ausschließlich nach außen orientiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Proteoliposomen sphärische Vesikel mit einem mittleren Außendurchmesser von 88 nm waren. Die Proteoliposomen enthielten statistisch 8,4 Hydrogenasemoleküle und 72 Fumarat-Reduktasemoleküle. Alle aktiven Enzymmoleküle waren in der Proteoliposomenmembran zufällig verteilt eingebaut und nahmen am Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat teil. Der aus dem Protonenpermeabilitätskoeffizienten ( $P_H = 8,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) berechnete unspezifische Protonenfluß über die Proteoliposomenmembran war etwa 20mal langsamer als der durch den Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat katalysierte Protonenfluß.

Während der Fumarat-Reduktion mit  $H_2$  entstand ein elektrisches Protonenpotential über der Proteoliposomenmembran ( $\Delta \psi = -0,19 \text{ V}$ ; innen negativ), das die gleiche Richtung und Größe hatte wie das  $\Delta \psi$  während der Fumarat-Atmung in Zellen von *W. succinogenes*. Der  $H^+/e^-$ -Quotient für die Fumarat-Reduktion mit  $H_2$  war in Proteoliposomen in Gegenwart von Valinomycin und externem  $K^+$  etwa 1. Das gleiche  $\Delta \psi$  und der gleiche  $H^+/e^-$ -Quotient waren mit der Reduktion von 2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinon (DMN) durch  $H_2$  verbunden, wenn die Proteoliposomen Menachinon und Hydrogenase mit oder ohne Fumarat-Reduktase enthielten. Proteoliposomen, die Menachinon und Fumarat-Reduktase mit oder ohne Hydrogenase enthielten, katalysierten die Reduktion von Fumarat durch  $DMNH_2$ , die aber nicht mit der Entstehung von  $\Delta p$  gekoppelt war.

Proteoliposomen, die Formiat-Dehydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase enthielten, katalysierten die Reduktion von Fumarat oder DMN durch Formiat. Beide Reaktionen erzeugten über der Proteoliposomenmembran ein  $\Delta \psi$  von  $-0,13 \text{ V}$  (innen negativ). Der  $H^+/e^-$ -Quotient der Formiat-Oxidation durch Menachinon oder DMN war nahezu 1.

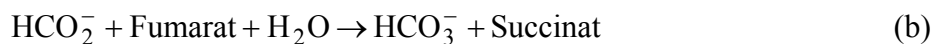


Die Entstehung von  $\Delta\psi$  war von der Art des in die Proteoliposomen eingebauten Chinons abhängig. Während der Reduktion von DMN durch  $H_2$  entstand ein  $\Delta\psi$ , wenn die Proteoliposomenmembran Menachinon, Vitamin  $K_2$  oder das aus *W. succinogenes* isolierte Methylmenachinon enthielt. Proteoliposomen ohne Chinon oder mit Vitamin  $K_1$  erzeugten kein  $\Delta\psi$  während der DMN-Reduktion mit  $H_2$ . Die Fumarat-Atmung mit  $H_2$  war nur in Gegenwart von Menachinon oder Vitamin  $K_2$  mit der Entstehung von  $\Delta\psi$  gekoppelt.

In dieser Arbeit wurde erstmals die gekoppelte Fumarat-Atmung mit aus *W. succinogenes* isolierten Elektronentransportenzymen in Liposomen rekonstituiert. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass das durch die Fumarat-Atmung erzeugte  $\Delta p$  ausschließlich durch die Menachinon-Reduktion mit  $H_2$  oder Formiat entsteht, während die Menachinol-Oxidation mit Fumarat ein elektroneutraler Prozeß ist.

## 2 Einleitung

*Wolinella succinogenes* wächst auf Kosten der anaeroben Atmung mit Fumarat als terminalem Elektronenakzeptor und H<sub>2</sub> (Reaktion a) oder Formiat (Reaktion b) als Elektronendonator. Beide Reaktionen werden von membranständigen Elektronentransportketten katalysiert, die aus Fumarat-Reduktase, Menachinon und entweder Hydrogenase oder Formiat-Dehydrogenase bestehen (Abb. 2.1).



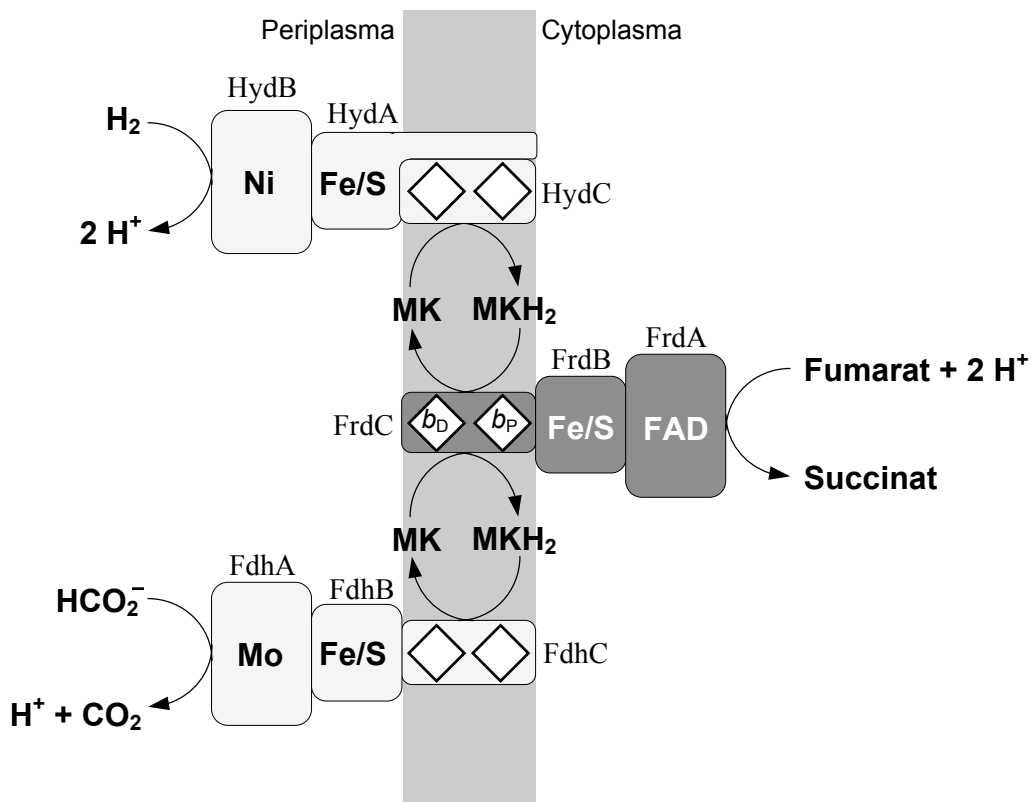
Die Enzyme wurden isoliert und die entsprechenden Gene sequenziert (Kröger et al. 2002, Kröger et al. 1992). Die Enzyme bestehen jeweils aus zwei hydrophilen Untereinheiten und einem membranständigen Dihäm-Cytochrom *b* (Lancaster et al. 1999, Körtner et al. 1990, Uden et al. 1980, Droß et al. 1992, Bokranz et al. 1991). Die Eisen/Schwefel-Proteine der Dehydrogenasen (HydA, FdhB) übertragen Elektronen von ihren katalytischen Untereinheiten (HydB, FdhA) auf ihr Cytochrom *b* (HydC, FdhC). An HydC bzw. FdhC wird Menachinon reduziert. Menachinol wird am Cytochrom *b* der Fumarat-Reduktase (FrdC) oxidiert, das die Elektronen über die Eisen/Schwefel-Zentren von FrdB auf die katalytische Untereinheit (FrdA) überträgt. Hydrogenase und Formiat-Dehydrogenase katalysieren die Reduktion des wasserlöslichen Menachinonanalogs 2,3-Dimethyl-1,4-naphthochinon (DMN) mit H<sub>2</sub> bzw. Formiat (Reaktion c und d). Die DMN-Reduktion durch Hydrogenase findet an HydC statt. Die Fumarat-Reduktase katalysiert die Oxidation von DMNH<sub>2</sub> mit Fumarat (Reaktion e). Die DMNH<sub>2</sub>-Oxidation findet an FrdC statt.



Die Substratzentren von Hydrogenase und Formiat-Dehydrogenase sind periplasmatisch orientiert und das Substratzentrum der Fumarat-Reduktase cytoplasmatisch (Abb. 2.1) (Groß et al. 1998a, Kröger et al. 1980). Aus der Kristallstruktur der Fumarat-Reduktase von *W. succinogenes* konnte der Mechanismus der Fumarat-Reduktion am katalytischen Zentrum

von FrdA abgeleitet werden (Lancaster et al. 2001). Danach werden bei der Fumarat-Reduktion zwei Protonen aus dem Cytoplasma aufgenommen.

Die Protonen, die bei der Oxidation von  $H_2$  an HydB entstehen, werden wahrscheinlich in das Periplasma abgegeben. Das zeigt der Vergleich mit den periplasmatischen Ni-Hydrogenasen von *Desulfovibrio gigas* und *Desulfovibrio vulgaris*. Diese bestehen aus zwei hydrophilen Untereinheiten, die homolog zu HydA und HydB von *W. succinogenes* sind. Die Kristallstrukturen der Ni-Hydrogenasen von *D. gigas* und *D. vulgaris* ergaben, dass  $H_2$  im aktiven Ni/Fe-Zentrum in Protonen und Elektronen gespalten wird (Volbeda et al. 1995, Higuchi et al. 1997). Die Protonen gelangen über einen Protonenkanal an die Oberfläche der katalytischen Untereinheit und werden dort freigesetzt. Die Elektronen werden über die Eisen/Schwefel-Untereinheit auf ein Cytochrom *c* übertragen. Das Cytochrom *c* ist bei der *W. succinogenes* Hydrogenase durch das Cytochrom *b* HydC ersetzt, das eine Untereinheit des Enzyms ist.



**Abb. 2.1. Zusammensetzung und Orientierung der an der Fumarat-Atmung von *W. succinogenes* beteiligten Enzyme.** Hydrogenase (Hyd) und Fumarat-Reduktase (Frd) katalysieren Reaktion (a). Hyd wird in Reaktion (b) durch die Formiat-Dehydrogenase (Fdh) ersetzt. MK ( $MKH_2$ ), Menachinon (Menachinol); Ni, aktives Zentrum der Hydrogenase; Mo, Molybdän, koordiniert durch Molybdopteringuanidinukleotid; Fe/S, Eisen/Schwefel-Zentren; Rauten stellen Häm *b* dar; *b<sub>D</sub>*, distales Häm; *b<sub>P</sub>*, proximales Häm.

Die Formiat-Dehydrogenase von *W. succinogenes* ist ähnlich der Formiat-Dehydrogenase-N von *Escherichia coli* (Berks et al. 1995, Berg et al. 1991). Beide Enzyme sind gleich in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten. Die Kristallstruktur der *E. coli* Formiat-Dehydrogenase-N zeigt in der katalytischen Untereinheit (FdhA) eine Spalte, die von der Oberfläche bis zum Molybdän reicht (Jormakka et al. 2002). Die Elektronen werden von Formiat vermutlich auf das Molybdän übertragen und die Produkte  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}^+$  über die Spalte in das Periplasma abgegeben. Der gleiche Mechanismus wird für die Formiat-Dehydrogenase von *W. succinogenes* angenommen.

Zellen von *W. succinogenes* erzeugen während der Fumarat-Atmung mit  $\text{H}_2$  (Reaktion a) oder Formiat (Reaktion b) ein elektrisches Protonenpotential ( $\Delta\psi$ ) von -0,16 V bzw. -0,14 V (innen negativ) über der Membran (Mell et al. 1986, Geisler et al. 1994). Die entsprechende pH-Differenz über der Membran ( $\Delta\text{pH}$ ) war vernachlässigbar klein. Ein  $\Delta\psi$  gleicher Größe wurde für die Reduktion von DMN mit  $\text{H}_2$  (Reaktion c) oder Formiat (Reaktion d) mit Bakterien bestimmt. Die Oxidation von DMNH<sub>2</sub> mit Fumarat (Reaktion e) erzeugte dagegen kein  $\Delta\psi$  über der Membran. Invertierte Membranvesikel von *W. succinogenes* erzeugten ein  $\Delta\psi = 0,18$  V (innen positiv) während der Fumarat-Atmung mit  $\text{H}_2$ . Der  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Quotient dieser Reaktion wurde zu etwa 1 bestimmt. Aus diesen Ergebnissen wurde der in Abb. 2.2 A dargestellte hypothetische Mechanismus der Protonenbewegungen während der Fumarat-Atmung aufgestellt (Kröger et al. 2002). Danach entsteht ein  $\Delta\text{p}$  nur bei der Menachinon-Reduktion mit  $\text{H}_2$  (oder Formiat), während die Oxidation von Menachinol durch Fumarat elektroneutral ist.

Aus der Kristallstruktur der Fumarat-Reduktase wurde dagegen abgeleitet, dass die Protonen während der Oxidation von Menachinol an FrdC vermutlich in das Periplasma freigesetzt werden (Lancaster et al. 2000). In der Kristallstruktur wurde eine Kavität in FrdC gefunden, die sich von der hydrophoben Phase der Membran nahe dem distalen Häm  $b_D$  (Abb. 2.1) bis zur hydrophilen periplasmatischen Phase erstreckt und die ein Menachinolmolekül aufnehmen könnte. An dieser Kavität befindet sich ein Glutamat-Rest (Glu C66), der eines der bei der Menachinol-Oxidation frei werdenden Protonen aufnehmen und in das Periplasma weiterleiten könnte. Wenn Glu C66 durch Glutamin ersetzt wird, ist die Menachinol-Oxidation durch Fumarat blockiert. Danach sollte auch bei der Fumarat-Reduktion durch Menachinol ein  $\Delta\text{p}$  entstehen und der  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Quotient während der Fumarat-Atmung mit  $\text{H}_2$  sollte 2 sein (Abb. 2.2 B).

Die Frage, ob die Fumarat-Reduktion durch Menachinol elektrogen ist oder nicht, läßt sich anhand von Proteoliposomen beantworten, in denen sowohl Fumarat-Reduktase als auch Hydrogenase nach außen orientiert sind. Wenn die Menachinol-Oxidation durch Fumarat ein elektroneutraler Prozeß ist, sollte ein  $\Delta\text{p}$  während der Fumarat-Atmung mit  $\text{H}_2$  entstehen und der  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Quotient 1 sein (Abb. 2.2 C). Ist die Menachinol-Oxidation dagegen ein elektro-

gener Prozeß, sollte kein  $\Delta p$  während der Fumarat-Atmung mit  $H_2$  entstehen und der  $H^+/e^-$ -Quotient 0 sein (Abb. 2.2 D).

In dieser Arbeit wurde isolierte Hydrogenase (Formiat-Dehydrogenase) und Fumarat-Reduktase mit Menachinon aus *W. succinogenes* in Liposomen eingebaut und die Orientierung der Enzyme in der Membran bestimmt. Durch Messung von  $\Delta\psi$  und der  $H^+/e^-$ -Quotienten sollte der Mechanismus der  $\Delta p$ -Erzeugung während der Fumarat-Atmung geklärt werden.

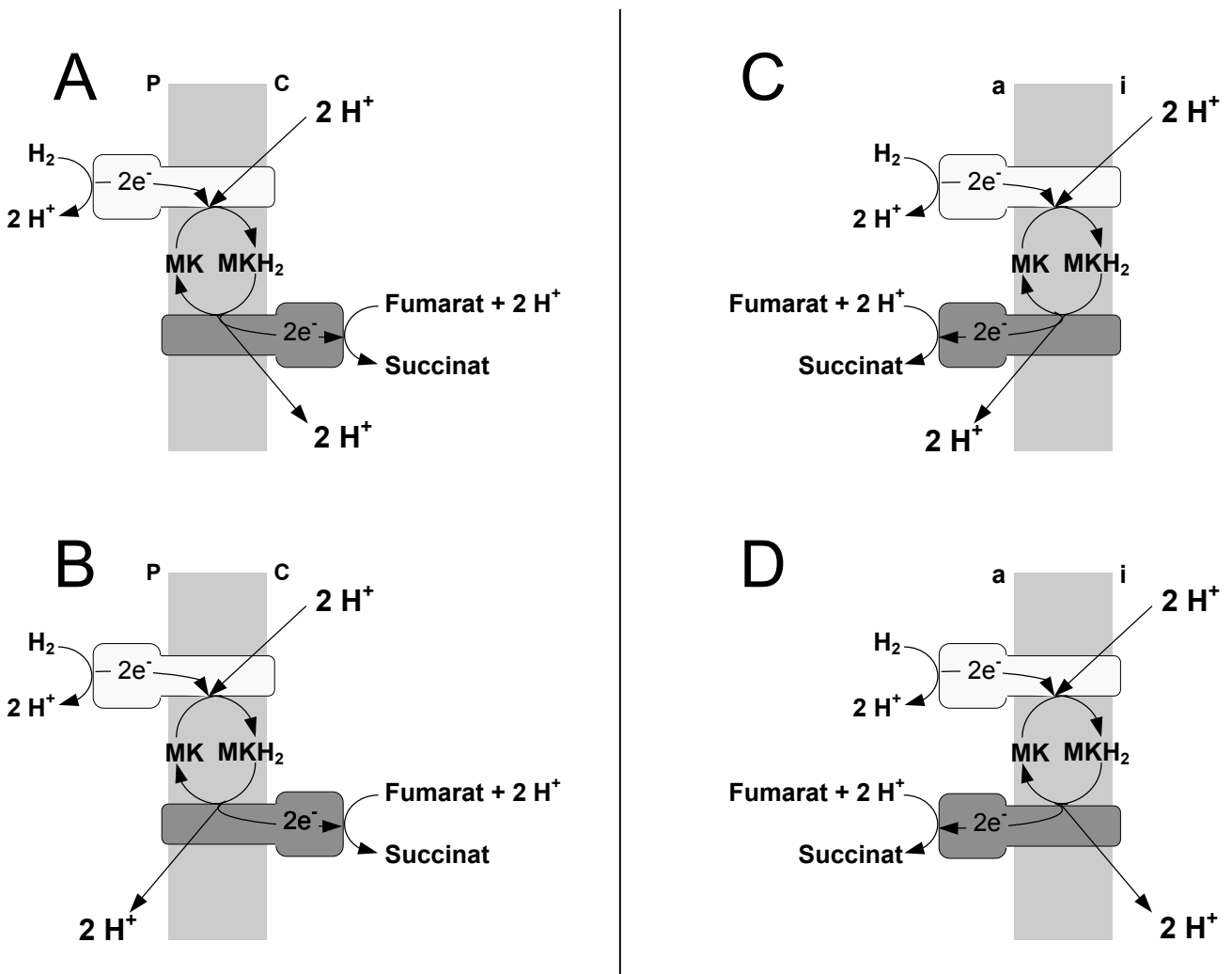


Abb. 2.2. Hypothetische Mechanismen der  $\Delta p$ -Entstehung in Zellen von *W. succinogenes* (A und B) und in Proteoliposomen (C und D). Die gleichen Mechanismen werden auch für die Fumarat-Atmung mit Formiat als Elektronendonator angenommen. P, Periplasma; C, Cytoplasma; a, außen; i, innen.

## 3 Methoden

### 3.1 Zucht von *W. succinogenes*

*W. succinogenes* (Wildtyp) wurde wie bei Bronder et al. (1982) beschrieben mit Formiat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor gezogen. Die Bakterien wurden in der späten exponentiellen Phase durch Zentrifugation geerntet (20 min bei 10000 x g). Die Feuchtzellen wurden für die Isolierung von Fumarat-Reduktase, Hydrogenase und Formiat-Dehydrogenase und für die Extraktion von Menachinon und Methylmenachinon bei -70°C aufbewahrt.

### 3.2 Isolierung der Enzyme

Alle Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 4°C mit N<sub>2</sub> durchgasten Puffern durchgeführt.

#### 3.2.1 Fumarat-Reduktase

Zellen von *W. succinogenes* (ca. 60 g) wurden in 250 ml Puffer I (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM Malonat; 1 mM DTT; 1 mM Azid) suspendiert und mit der French-Press aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wurde durch Zentrifugation (40 min bei 150000 x g) in lösliche Zellfraktion und Membranfraktion getrennt. Die Membranfraktion wurde in 100 ml Puffer I resuspendiert und nach Zugabe von Triton X-100 (1 g/g Membranprotein) 0,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das erhaltene Tritonhomogenat wurde 40 min bei 150000 x g zentrifugiert und der Überstand (Tritonextrakt) für die weitere Enzymreinigung verwendet.

Der Tritonextrakt wurde an DEAE-Sepharose CL6B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) chromatographiert. Die Säule hatte ein Volumen (SV) von 350 ml und war mit Puffer II (Puffer I mit 0,05 % Triton X-100) äquilibriert. Nach Auftragen des Tritonextrakts wurde die Säule mit 2 SV Puffer II gespült. Der Durchlauf mit den nicht an die Säulenmatrix gebundenen Proteinen wurde aufgefangen und für die Isolierung der Hydrogenase weiterverwendet (Kapitel 3.2.2). Die gebundenen Proteine wurden mit einem steigenden linearen NaCl-Gradienten (0 bis 300 mM in Puffer II) eluiert. Die Fraktionen mit den höchsten Fumarat-Reduktase-Aktivitäten (DMNH<sub>2</sub> → Fumarat) wurden vereinigt, durch Druckfiltration konzentriert und gegen Puffer II dialysiert. Die Fumarat-Reduktase-Präparation wurde portioniert in flüssigen N<sub>2</sub> eingefroren und bis zum Gebrauch bei -70°C aufbewahrt.

### 3.2.2 Hydrogenase

Zur Isolierung der Hydrogenase wurde der während der Fumarat-Reduktase-Reinigung (Kapitel 3.2.1) erhaltene Durchlauf mit den nicht an DEAE-Sepharose CL6B gebundenen Proteinen durch Druckfiltration konzentriert und gegen Puffer III (25 mM Tris/Acetat pH 8,3; 1 mM DTT; 0,05 % Triton X-100) dialysiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde auf eine Chromatofokussierungssäule (PBE 94 (Amersham Pharmacia Biotech), 88 ml SV) aufgetragen, die mit Puffer III äquilibriert war. Nach Spülen mit 2 SV Puffer III wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen pH-Gradienten (pH 8,3 bis pH 6) eluiert. Dazu wurde die Säule mit 10 SV Polybuffer (PB 96 (Amersham Pharmacia Biotech) 1:13 (v/v)/Acetat pH 6,0; 1 mM DTT; 0,05 % Triton X-100) gespült und das Eluat fraktioniert gesammelt. Die Fraktionen mit den höchsten Hydrogenase-Aktivitäten ( $H_2 \rightarrow DMN$ ) wurden vereinigt, durch Druckfiltration konzentriert und gegen Puffer III dialysiert. Die Hydrogenase-Präparation wurde portioniert in flüssigen  $N_2$  eingefroren und bis zum Gebrauch bei  $-70^\circ C$  aufbewahrt.

### 3.2.3 Formiat-Dehydrogenase

Zellen von *W. succinogenes* (ca. 25 g) wurden in 100 ml Puffer IV (30 mM Kaliumphosphat/pH 7,4; 1 mM DTT; 1 mM Azid; 10 % Ethylenglykol) suspendiert. Die Membranfraktion wurde wie für die Fumarat-Reduktase-Reinigung beschrieben (Kapitel 3.2.1) erhalten und in 50 ml Puffer IV resuspendiert. Die Membranproteine wurden mit Triton X-100 ebenfalls wie für die Fumarat-Reduktase-Reinigung beschrieben aus der Membran extrahiert. Der erhaltene Tritonextrakt wurde auf eine DEAE-Sepharose CL6B-Säule (120 ml SV) aufgetragen, die zuvor mit Puffer V (Puffer IV mit 0,05 % Triton X-100) äquilibriert war. Die Säule wurde mit 1 SV Puffer V gespült und der Durchlauf anschließend auf eine Hydroxylapatit-Säule (45 ml SV; äquilibriert mit Puffer V) gegeben. Danach wurde die Säule mit 2 SV Puffer V gespült und die Formiat-Dehydrogenase mit einem linearen Phosphatgradienten (30 bis 300 mM in Puffer V) eluiert. Die Fraktionen mit den höchsten Formiat-Dehydrogenase-Aktivitäten (Formiat  $\rightarrow$  DMN) wurden vereinigt, durch Druckfiltration konzentriert und gegen Puffer V dialysiert. Die Formiat-Dehydrogenase-Präparation wurde portioniert in flüssigen  $N_2$  eingefroren und bis zum Gebrauch bei  $-70^\circ C$  aufbewahrt.

### 3.3 Chinone

Menachinon und Methylmenachinon wurden zusammen wie bei Unden (1988) beschrieben aus der Membranfraktion von *W. succinogenes* extrahiert und über HPLC voneinander getrennt. Die Konzentrationen der getrennten Chinone wurden über HPLC mit Vitamin  $K_2$  als Standard bestimmt (Unden 1988). Vitamin  $K_1$  und Vitamin  $K_2$  wurden bei Sigma (Taufkirchen) erworben.

### 3.4 Phospholipide

Phosphatidylcholin wurde aus frischem Hühner-Eigelb nach Singleton et al. (1965) extrahiert. Phosphatidat (1,2-Dipalmitoyl- $\alpha$ -phosphatidsäure Mononatriumsalz) wurde von Fluka (Taufkirchen) erworben.

### 3.5 Präparation von Schallliposomen

50 mg extrahiertes Phosphatidylcholin und 5 mg Phosphatidat wurden in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1, v/v) gelöst. Nach Zugabe von Menachinon (10  $\mu$ mol/g Phospholipid), Methylmenachinon (10  $\mu$ mol/g Phospholipid), Vitamin K<sub>1</sub> (20  $\mu$ mol/g Phospholipid) oder Vitamin K<sub>2</sub> (20  $\mu$ mol/g Phospholipid), wurde das Lösungsmittel unter Vakuum vollständig verdampft. Der verbleibende Phospholipidfilm wurde wenn nicht anders angegeben in Hepes-Puffer (50 mM, mit KOH auf pH 7,5 eingestellt) mit einer Konzentration von 10 g Phospholipid/l suspendiert und anschließend durch alternierendes Evakuieren und Begasen mit N<sub>2</sub> anaerobisiert. In dieser Phospholipidsuspension bilden sich spontan sogenannte multilamellare Lipidvesikel (MLV, Rigaud et al. 1995). Man erhält kleine unilamellare Vesikel (SUV, small unilamellar vesicles), wenn man die MLV's mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde daher 20 Minuten bei 0°C beschallt (Branson Sonifer mit einem Microtip, 30 W, 40 % Zyklus). Durch diese Ultraschallbehandlung wurde die vorher trübe Phospholipidsuspension klar, was auf die Bildung von SUV's deutet. Die Schallliposomen wurden kurz vor der Proteoliposomenpräparation hergestellt, da sich aus SUV's nach einigen Tagen wieder MLV's bilden.

### 3.6 Präparation von Proteoliposomen

#### 3.6.1 Einbau von Hydrogenase und Fumarat-Reduktase

Proteoliposomen, die Hydrogenase und Fumarat-Reduktase enthalten, wurden nach der Methode von Lambert et al. (1998) präpariert. Alle Präparationsschritte wurden bei Raumtemperatur und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre durchgeführt. Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (0,8 g/g Phospholipid) wurde einer Schallliposomensuspension (1 g Phospholipid/l in 50 mM Hepes/KOH pH 7,5) zugesetzt und das Gemisch mindestens 3 Stunden gerührt. Nach Zugabe von isolierter Hydrogenase (0,02 g/g Phospholipid) und bzw. oder (wenn nur eines der beiden Enzyme eingebaut werden sollte) Fumarat-Reduktase (0,18 g/g Phospholipid) wurde das Phospholipid/Detergens/Protein-Gemisch eine weitere Stunde gerührt. Um das Detergens



wieder zu entfernen, wurden 240 mg Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad, München) pro ml Suspension zugegeben und eine Stunde gerührt.

### 3.6.2 Einbau von Formiat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase

Schallliposomen mit Menachinon wurden wie in Kapitel 3.5 beschrieben aber mit einer höheren Phospholipid-Konzentration (20 g/l) und in 95 mM Hepes-Puffer (pH 7,3) präpariert. Formiat-Dehydrogenase (0,04 g/g Phospholipid) und Fumarat-Reduktase (0,18 g/g Phospholipid) wurden einer Schallliposomensuspension (10 g Phospholipid/l in 95 mM Hepes/KOH pH 7,3) zugesetzt, die Mischung in flüssigen N<sub>2</sub> gefroren und anschließend wieder bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Frieren/Tauen-Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Detergens (Triton X-100), das durch die Enzympräparationen eingebracht wurde, wurde durch die Zugabe von Bio-Beads SM-2 (500 mg/ml Suspension) und einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur entfernt. Durch die mehrfache Frieren/Tauen-Prozedur werden Formiat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase in die Membran eingebaut (Unden et al. 1983), gleichzeitig aggregieren aber die SUV's teilweise wieder zu MLV's (Rigaud et al. 1995). Daher wurde die Proteoliposomensuspension vor Gebrauch für 20 s bei 0°C beschallt (Branson Sonifier, 30 W, 40 % Zyklus). Die Enzymaktivitäten der Formiat-Dehydrogenase (Formiat → DMN) und der Fumarat-Reduktase (DMNH<sub>2</sub> → Fumarat) wurden durch die Ultraschallbehandlung nicht beeinträchtigt.

### 3.7 Enzymaktivitäten

Alle Enzymaktivitäten wurden, wenn nicht anders angegeben, in Hepes-Puffer (50 mM/KOH pH 7,5; 37°C) und in gasdicht verschlossenen Küvetten (Schichtdicke 0,5 cm) mit dem Diodenarray-Spectrophotometer (HP 8453, Hewlett Packard, Waldbronn) bestimmt. Puffer und Küvetten wurden mit H<sub>2</sub> gesättigt, wenn H<sub>2</sub> Elektronendonator war. Für die übrigen Tests wurden Puffer und Küvetten mit N<sub>2</sub> gesättigt.

Die Reduktion von Fumarat (2 mM) durch H<sub>2</sub> oder Formiat (10 mM) wurde als Differenz der Extinktionen bei 270 minus 290 nm ( $\Delta\epsilon = 0,45 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) in Hepes-Puffer bestimmt. Die Reduktion von DMN (0,2 mM) durch H<sub>2</sub> oder Formiat (10 mM) und die Oxidation von DMNH<sub>2</sub> (0,2 mM) durch Fumarat (1 mM) wurde ebenfalls bei 270-290 nm ( $\Delta\epsilon = 15,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) in Hepes-Puffer gemessen. DMNH<sub>2</sub> wurde vor Zugabe von Fumarat und Protein durch Reduktion von DMN mit KBH<sub>4</sub> erhalten. Die Reduktion von Methylviologen (1 mM) durch H<sub>2</sub> wurde bei 578 nm ( $\epsilon = 9,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) in Glycin-Puffer (150 mM; pH 9,5) gemessen. Die Reduktion von Fumarat (1 mM) mit Methylviologenradikal (1 mM) wurde in Hepes-Puffer bestimmt. Methylviologen wurde durch Zusatz von Natriumdithionit

vollständig reduziert, bevor die Reaktion durch Zugabe von Protein und Fumarat gestartet wurde.

1 Unit Enzymaktivität entspricht bei allen Enzymtesten dem Elektronentransfer von 2  $\mu\text{mol}$  Elektronen pro Minute.

Um die spezifischen Enzymaktivitäten zu berechnen, wurde der Proteingehalt der Enzympräparationen nach der Biuret-Methode mit KCN bestimmt (Bode et al. 1968).

### 3.8 Cytochrom *b*-Differenzspektrum

Das Cytochrom *b*-Differenzspektrum einer Proteoliposomensuspension wurde aus der Differenz des reduzierten und des oxidierten Cytochrom *b*-Extinktionsspektrums ermittelt. Die einzelnen Spektren wurden mit dem Diodenarray-Spectrophotometer (HP 8453, Hewlett Packard) aufgenommen. Für das oxidierte Spektrum wurden die Proteoliposomen mit einer Konzentration von 1 g Phospholipid/l in einem aeroben Puffer (50 mM Hepes/KOH pH 7,5) suspendiert und die Extinktionen der Wellenlängen 500 bis 600 nm bei einer optischen Schichtdicke von 0,5 cm registriert. Das reduzierte Extinktionsspektrum wurde nach Sättigung der Proteoliposomensuspension mit  $\text{H}_2$  oder nach Zugabe von kristallinem Natriumdithionit aufgenommen.

Anhand der Differenzspektren wurden die Häm *b*-Gehalte aus der Extinktionsdifferenz von 565 minus 575 nm ( $\Delta\epsilon = 23,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Kröger und Innerhofer 1976) berechnet.

### 3.9 Transmissionselektronenmikroskopie

Ein dünner Kohlefilm (Fullam, USA) wurde mit einer Edwards Vakuumanlage (Modell 306 Turbo, England) auf eine saubere Glimmoberfläche (Plano, Wetzlar) aufgedampft. Der Kohlefilm wurde anschließend auf ein Objektträgernetzchen (Grid) aus Kupfer mit 400 Maschen (SPI, USA), übertragen. Um eine hydrophile Oberfläche zu erhalten, wurde für 15 Sekunden eine Glimmerentladung mit einem „plasma cleaner“ (Harrick, USA) durchgeführt. Schallliposomen (2 g Phospholipid/l), Proteoliposomen (1 g Phospholipid/l) oder Phospholipid/Detergens/Protein-Gemisch (1 g Phospholipid/l) wurden auf die Kohle beschichteten Grids aufgebracht und überschüssige Flüssigkeit nach 10 Sekunden mit einem Filterpapier entfernt. Danach wurden die Proben mit mehreren Tropfen einer 2 %igen Vanadat-Lösung (pH 7,5) negativ kontrastiert. Die so erhaltenen Grids wurden mit einem EM208 Philips Elektronenmikroskop (FEI, Holland) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV unter-

sucht. Die Bilder wurden mit einer 1024x1024 CCD Kamera (TVIPS, Gauting) bei verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen.

### 3.10 Innenvolumenbestimmung der Proteoliposomen

Zur Bestimmung des mittleren Innenvolumens der Proteoliposomen wurden Hydrogenase und Fumarat-Reduktase wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben in Schallliposomen mit Menachinon eingebaut. Die Phospholipidkonzentration des Präparationsansatzes wurde geändert (10 g/l) aber das Protein/Phospholipid-Verhältnis beibehalten (0,02 g Hydrogenase/g Phospholipid und 0,18 g Fumarat-Reduktase/g Phospholipid). Der Präparationspuffer enthielt zusätzlich 50 mM Phosphat. Nach der Präparation wurden die Proteoliposomen über eine Sephacryl S-1000 SF-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) mit phosphatfreiem Hepes-Puffer filtriert, um externes Phosphat von in den Proteoliposomen eingeschlossenem Phosphat zu trennen. In der Proteoliposomenfraktion nach Gelfiltration wurde die Menge des eingeschlossenen Phosphats nach Lyse mit SDS und der Phospholipidgehalt wie bei Spillecke (1986) beschrieben bestimmt. Das mittlere Innenvolumen der Proteoliposomen ( $V_i$  in ml/g Phospholipid) wurde aus der eingeschlossenen Phosphatmenge ( $x$   $\mu\text{mol}$  Phosphat) und der eingesetzten Phosphatkonzentration (50 mM) bezogen auf den Phospholipidgehalt ( $x$  g Phospholipid) nach Gleichung (1) berechnet.

$$V_i = \frac{x \mu\text{mol Phosphat}}{50 \text{ mM Phosphat} \cdot x \text{ g Phospholipid}} \quad (1)$$

Unter der Annahme einer Kugelgestalt der Proteoliposomen kann aus  $V_i$  und der spezifischen Oberfläche der Phospholipidmembran ( $O = 2,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{g Phospholipid}$ , Brune et al. 1987) der mittlere innere Radius ( $r$ ) bzw. innere Durchmesser ( $d = 2 r$ ) der Proteoliposomen berechnet werden (Gleichung 2). Für den äußeren Durchmesser muß berücksichtigt werden, dass die Phospholipidmembran der Liposomen eine Dicke von 3,7 nm besitzt (Nagle und Tristram-Nagle 2000).

$$\frac{V_i}{O} = \frac{\frac{4}{3} \pi r^3}{4 \pi r^2} \quad (2)$$

### 3.11 Bestimmung des Protonenpermeabilitätskoeffizienten

Der Protonenpermeabilitätskoeffizient ( $P_H$ ) wurde für die Schallliposomenmembran und die Proteoliposomenmembran nach Brune et al. (1987) bestimmt. Dazu wurden Schallliposomen (20 g Phospholipid/l) mit Menachinon wie beschrieben (Kapitel 3.5) in Hepes-Puffer (50 mM/KOH pH 7,5) präpariert, der zusätzlich den fluoreszierenden pH-Indikator Pyranin (50  $\mu$ M) enthält. Hydrogenase (0,02 g/g Phospholipid) und Fumarat-Reduktase (0,18 g/g Phospholipid) wurden nach der „Frieren/Tauen“-Methode (Kapitel 3.6.2) in die Schallliposomen (10 g Phospholipid/l in Puffer mit 50 mM Hepes/KOH pH 7,5 und 50  $\mu$ M Pyranin) eingebaut. Die weitere Versuchsdurchführung gilt sowohl für Schallliposomen als auch für Proteoliposomen.

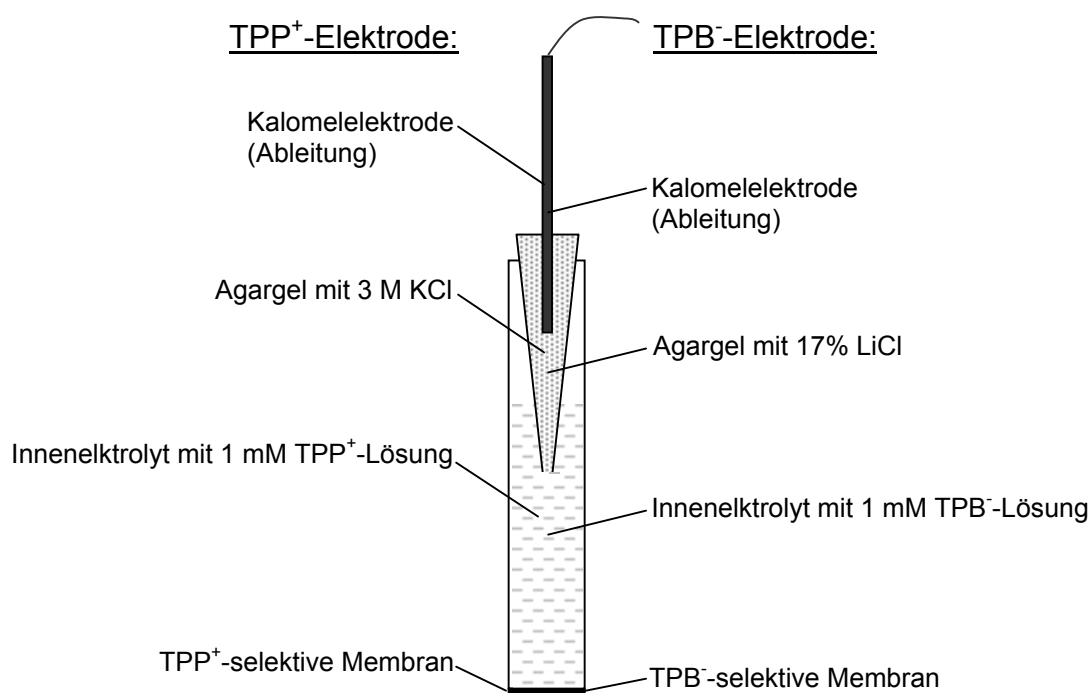
Die Liposomen enthalten nach ihrer Präparation eingeschlossenes Pyranin. Das in der Liposomensuspension vorhandene externe Pyranin muß entfernt werden, da sonst das Fluoreszenzsignal des internen pH-Indikators überlagert wird. Dazu wurden die Liposomen über eine Sephadex G-25 Superfine-Säule (HiTrap Desalting column, Amersham Pharmacia Biotech) mit pyraninfreiem Hepes-Puffer filtriert. Während die Liposomen mit dem Ausschlußvolumen der Säule eluierten, verblieb fast alles externe Pyranin an der Säule.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Liposomen in Hepes-Puffer (50 mM/KOH pH 7,5) mit einer Konzentration von 1 g Phospholipid/l und einem Endvolumen von 0,5 ml in einer Glasküvette (Schichtdicke 1 cm) suspendiert. Nach Zugabe von 2,5  $\mu$ l einer 0,1 mM Valinomycinlösung (in DMSO gelöst) wurde die Liposomensuspension für 10 min bei 25°C inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Fluoreszenzsignal des Pyranins kontinuierlich bei 25°C mit dem Fluoreszenzspektralphotometer Hitachi F-4500 registriert [Anregungswellenlänge 467 nm, Messung der Emission bei 510 nm (Clement und Gould 1981, Kano und Fendler 1978)]. Um einen externen pH-Sprung zu initiieren, wurden 4  $\mu$ l einer 4 M NaOH-Lösung in die Küvette gemischt. Das maximale Fluoreszenzsignal wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l FCCP (Stammlösung: 10 mM in DMSO gelöst) und 4  $\mu$ l NaOH bestimmt. Das minimale Fluoreszenzsignal wurde anschließend durch Zugabe von 25  $\mu$ l HCl (Stammlösung: 6 M) bestimmt. Eine typische Fluoreszenzmessung ist im Ergebnisteil (Abb. 4.7) dargestellt.

### 3.12 Bestimmung von $\Delta\psi$

Die Größe und Richtung von  $\Delta\psi$  wurde anhand der Verteilung von Tetraphenylphosphonium ( $TPP^+$ ) bzw. Tetraphenylboranat ( $TPB^-$ ) über der Proteoliposomenmembran bestimmt. Die Konzentration von  $TPP^+$  bzw.  $TPB^-$  im externen Medium einer Proteoliposomensuspension wurde mit entsprechenden ionenselektiven Elektroden bestimmt, die kommerziell nicht erhältlich sind. Eine  $TPP^+$ -selektive Elektrode wurde nach Vorschrift von Kamo et al. (1979)

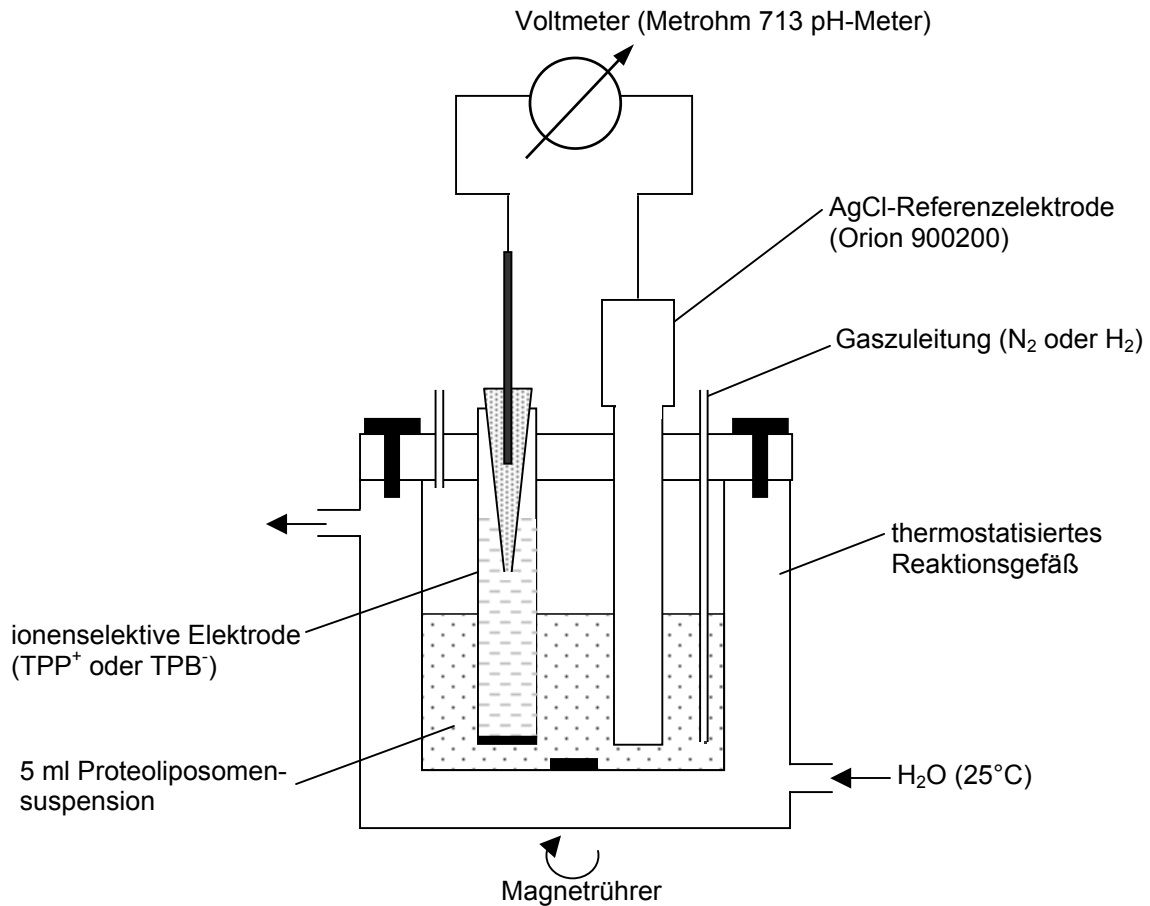
konstruiert und eine TPB<sup>-</sup>-selektive Elektrode nach Vorschrift von Karlovsky und Dadak (1982). Der Aufbau der Elektroden ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt. Die ionenselektive Membran besteht aus einer PVC-Matrix, die im Fall der TPP<sup>+</sup>-Elektrode Teträphenylboranat als Kationenaustauscher (Gegenion) enthält. Das Gegenion der TPB<sup>-</sup>-selektiven Membran ist Hexadecyltrimethylammoniumbromid.



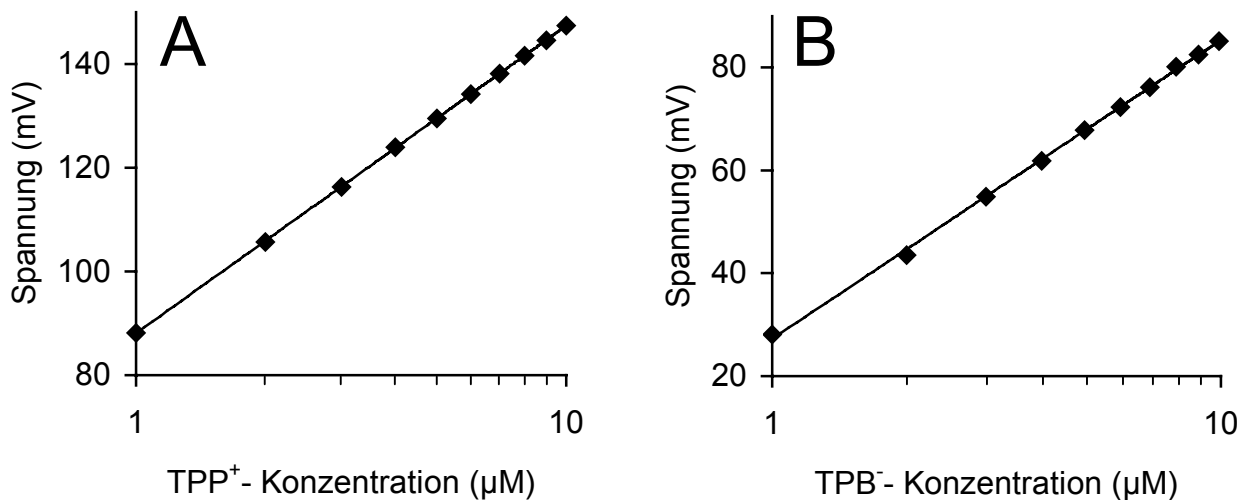
**Abb. 3.1. Schematischer Aufbau der TPP<sup>+</sup>- und TPB<sup>-</sup>-selektiven Elektrode.** Die ionenselektive PVC-Membran der TPP<sup>+</sup>-Elektrode (Beschriftung links) bzw. der TPB<sup>-</sup>-Elektrode (Beschriftung rechts) wurde an einen Silikonschlauch geklebt, in den der jeweilige Innenelektrolyt gefüllt wurde. Die Ableitelektrode ist über eine Salzbrücke mit dem Innenelektrolyt verbunden.

Zur Konditionierung wurde die TPP<sup>+</sup>-Elektrode (TPB<sup>-</sup>-Elektrode) mehrere Stunden in eine 1 mM TPP<sup>+</sup>-Lösung (1 mM TPB<sup>-</sup>-Lösung) getaucht und anschließend in die Versuchsanordnung eingebaut (Abb. 3.2). Die Funktionstüchtigkeit der Elektroden wurde vor den Messungen durch einen Kalibrierungsversuch überprüft (Abb. 3.3). Dazu wurde Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 25°C) in das Reaktionsgefäß gegeben, schrittweise die TPP<sup>+</sup>-Konzentration (Abb. 3.3 A) bzw. TPB<sup>-</sup>-Konzentration (Abb. 3.3 B) erhöht und die daraus resultierende Spannungsänderungen registriert. Im getesteten Konzentrationsbereich zeigten beide Elektroden eine lineare Abhängigkeit der Zellspannung vom Logarithmus der entsprechenden Ionenkonzentration. Die Elektrodensteilheit entsprach in beiden Fällen der theoretischen nach der Nernst-Gleichung berechneten (Gleichung 3), die 59,1 mV bei einer 10fachen Konzentrationserhöhung und bei 25°C beträgt.

$$\Delta E = \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{c_1}{c_2} \quad (3)$$



**Abb. 3.2. Versuchsapparatur zur Messung der TPP<sup>+</sup>- oder TPP<sup>-</sup>-Konzentration.** Für den Kalibrierungsversuch wurden 5 ml Hepes-Puffer (50 mM; pH 7,5) statt Proteoliposomensuspension in das Reaktionsgefäß gegeben.



**Abb. 3.3. Abhängigkeit der Zellspannung von der eingesetzten Meßionen-Konzentration.** Aus der Steigung der Geraden wurde eine Elektrodensteilheit von 59,3 mV für die TPP<sup>+</sup>-Elektrode (A) und 58,1 mV für die TPB<sup>-</sup>-Elektrode (B) bestimmt.

Für die Bestimmungen der TPP<sup>+</sup>-Konzentration in Proteoliposomensuspensionen wurden Proteoliposomen mit einer Konzentration von 0,4 g Phospholipid/l in anaerobisierten Hepes-Puffer (50 mM/KOH pH 7,5; 25°C) suspendiert und im Reaktionsgefäß 15 min inkubiert. Die TPP<sup>+</sup>-Elektrode wurde durch schrittweise Zugabe bekannter Mengen TPP<sup>+</sup> zu der Proteoliposomensuspension kalibriert und anschließend der Elektronentransport durch Zugabe der jeweiligen Substrate (siehe Ergebnisteil) gestartet. Die Spannungsänderung während des Elektronentransports wurde kontinuierlich mit einem xt-Schreiber registriert. Aus der Spannungsänderung wurde die Abnahme der externen TPP<sup>+</sup>-Konzentration berechnet. Die Berechnung von  $\Delta\psi$  aus der TPP<sup>+</sup>-Verteilung während des Elektronentransports ist in Kapitel 4.2.1 ausführlich dargestellt. Messungen mit der TPB<sup>-</sup>-Elektrode wurden analog zu den TPP<sup>+</sup>-Messungen durchgeführt.

### 3.12.1 Bindungskonstanten

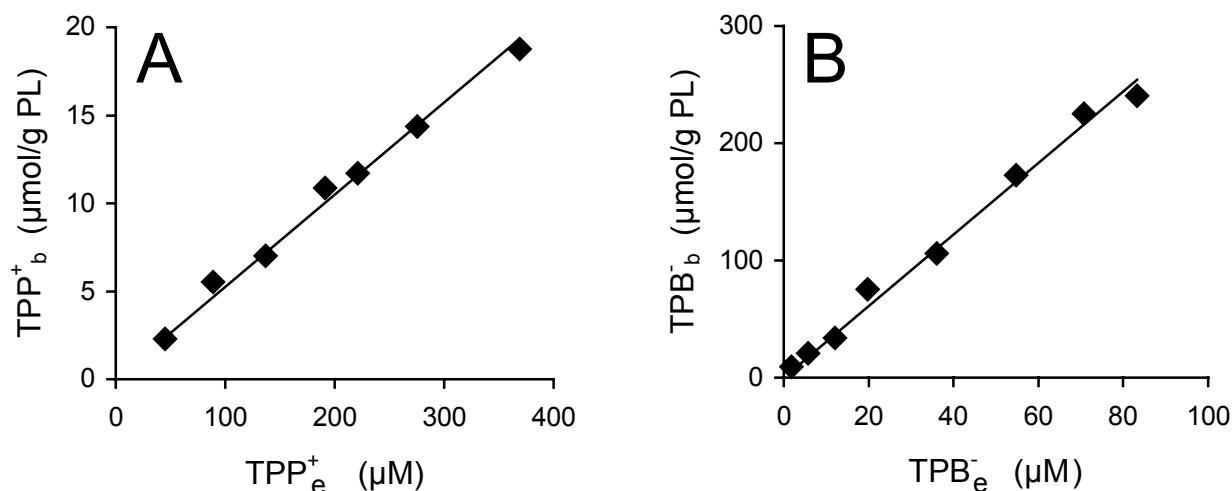
Bei  $\Delta\psi = 0$  ist in Proteoliposomen die interne TPP<sup>+</sup>- bzw. TPB<sup>-</sup>-Konzentration gleich der externen. Unter diesen Bedingungen kann die  $\Delta\psi$ -unabhängige aber TPP<sup>+</sup>- bzw. TPB<sup>-</sup>-konzentrationsabhängige Bindung der lipophilen Ionen an die Liposomenmembran bestimmt werden (Lolkema et al. 1983). Dazu wurden wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben Proteoliposomen präpariert, die Hydrogenase, Fumarat-Reduktase und Menachinon enthielten. Die Phospholipidkonzentration des Präparationsansatzes wurde geändert (10 g/l) aber das Protein/Phospholipid-Verhältnis beibehalten (0,02 g Hydrogenase/g Phospholipid und 0,18 g Fumarat-Reduktase/g Phospholipid).

Zur Deenergetisierung der Membran wurden die Proteoliposomen mehrere Tage bei 4°C gealtert. Nach 3 Tagen konnte keine  $\Delta\psi$ -abhängige TPP<sup>+</sup>-Aufnahme während des Elektronentransports mehr gemessen werden. Deenergetisierte Proteoliposomen wurden jeweils zu verschiedenen TPP<sup>+</sup>-Konzentrationen ( $T_0$ ) gegeben. Die TPP<sup>+</sup>-Konzentration im externen Medium ( $T_e$ ) nahm nach Zugabe der Proteoliposomen ab und wurde mit der TPP<sup>+</sup>-Elektrode bestimmt. Das an die Phospholipidmembran gebundene TPP<sup>+</sup> ( $T_b$ ) wurde nach Gleichung (4) berechnet. Dabei wurde das im Innenvolumen der Proteoliposomen angereicherte TPP<sup>+</sup> ( $T_i$ ) berücksichtigt.  $T_i$  wurde nach Gleichung (5) mit dem Innenvolumen der Proteoliposomen ( $V_i = 3,5$  ml/g Phospholipid) berechnet.

$$T_b = \frac{T_0 - T_e - T_i}{c_{PL}} \quad (4)$$

$$T_i = T_e \cdot V_i \cdot c_{PL} \quad (5)$$

$T_b$  stieg proportional zu  $T_e$  im Bereich der getesteten  $TPP^+$ -Konzentrationen (Abb. 3.4 A). Aus der Steigung der Geraden wurde die Bindungskonstante  $K_T = 52 \text{ ml/g}$  von  $TPP^+$  für die Proteoliposomenmembran ermittelt. Experimente zur Bestimmung der Bindungskonstante für  $TPB^-$  wurden analog den oben dargestellten durchgeführt (Abb 3.4 B).  $TPB^-$  wird mit einer wesentlich höheren Bindungskonstante ( $K_T = 3050 \text{ ml/g}$ ) an die Proteoliposomenmembran gebunden.



**Abb. 3.4. Bestimmung der Bindung von  $TPP^+$  (A) und  $TPB^-$  (B) an die Proteoliposomenmembran in Abhängigkeit der externen Konzentration.** Deenergetisierte Proteoliposomen (2,5 mg Phospholipid) wurden zu 5 ml Hepes-Puffer (50 mM/KOH pH 7,5) mit steigenden Konzentrationen  $TPP^+$  ( $TPB^-$ ) gegeben.

### 3.13 Bestimmung der $H^+/e^-$ -Quotienten

Proteoliposomen, die Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase enthalten, wurden wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben präpariert. Der Präparationspuffer enthielt jedoch 95 mM Hepes (mit KOH auf pH 7,30 eingestellt). Die Proteoliposomensuspension (10 ml) wurde 14 h gegen 10 l Puffer A (50 µM Hepes, 45 mM KCl und 50 mM Sucrose; pH 7,30) dialysiert, der mit  $H_2$  gesättigt war. Nach Zugabe von Valinomycin (0,5 µmol/g Phospholipid) und Phenolrot (60 µM) wurde die Suspension mit Fumarat (5 mM in  $H_2$ -gesättigten Puffer A) oder DMN (50-100 µM in  $H_2$ -gesättigten Puffer A) bei 25°C gemischt. Für das Mischen wurde ein Stopped-Flow-Photometer (Hi-Tech Scientific SF-61 DXZ) verwendet (Kannt et al. 1998). Es wurden immer zehn Teile Proteoliposomensuspension mit einem Teil Substrat gemischt. pH-Änderungen nach dem Mischen wurden als Extinktionsänderung von Phenolrot bei 550 nm registriert. Kontrollexperimente ergaben, dass sich die Extinktion bei 550 nm in Abwesenheit von Phenolrot nicht ändert. Zur Bestimmung der pH-Änderung während der



Fumarat-Reduktion durch  $\text{DMNH}_2$  war die Proteoliposomensuspension mit  $\text{N}_2$  gesättigt und enthielt zusätzlich 0,2 mM  $\text{DMNH}_2$ .

Proteoliposomen, die Formiat-Dehydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase enthalten, wurden wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben präpariert. Der externe Puffer wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Superfine-Säule (HiTrap Desalting column, Amersham Pharmacia Biotech), die mit  $\text{N}_2$ -gesättigten Puffer A äquilibriert war, ausgetauscht. Nach Zugabe von Valinomycin und Phenolrot (siehe oben) wurde die Proteoliposomensuspension (1 g Phospholipid/l) mit entweder Formiat (100 mM) und DMN (50-100  $\mu\text{M}$ ) oder nur mit Formiat (100 mM) wie oben beschrieben gemischt. Die Substrate waren ebenfalls in Puffer A gelöst.

Die Extinktionsänderung von Phenolrot bei 550 nm wurde durch tryptische Hydrolyse von *N*- $\alpha$ -Tosyl-L-arginyl-*O*-methylester (TAME) kalibriert (Sarti et al. 1985). In dieser Reaktion wird ein Proton pro zugegebenem TAME frei. Die Proteoliposomensuspension, die Valinomycin, Phenolrot und zusätzlich 5  $\mu\text{M}$  Trypsin enthielt, wurde wie oben beschrieben mit TAME (100-200 mM in Puffer A) gemischt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Präparation und Charakterisierung der Proteoliposomen

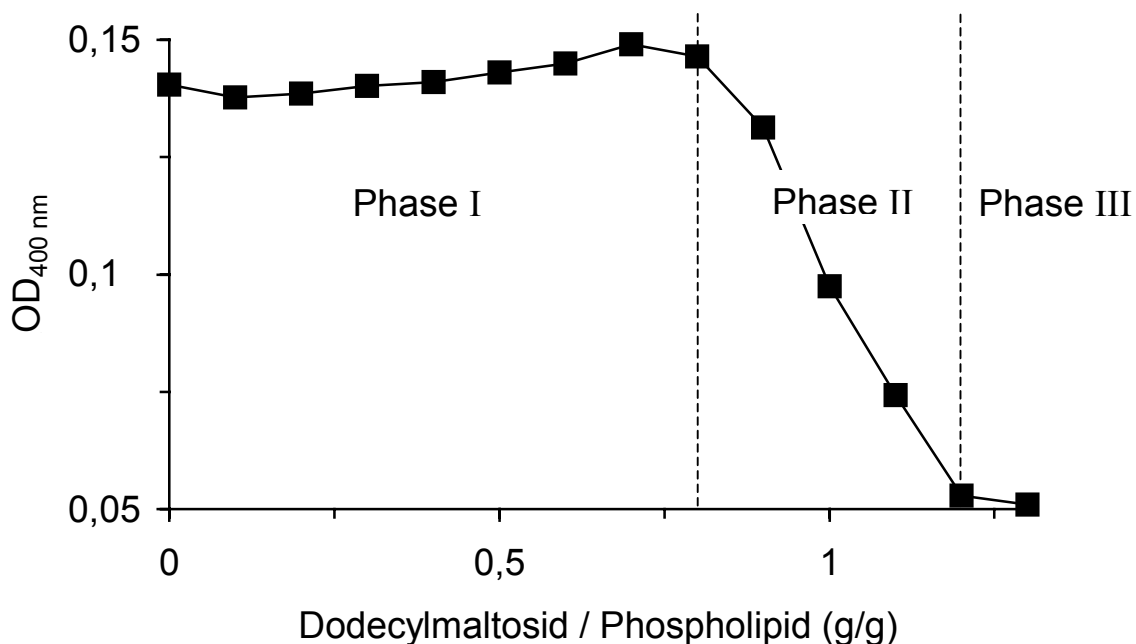
Der Einbau von Hydrogenase und Fumarat-Reduktase in Liposomen erfolgte nach der von Lambert et al. (1998) beschriebenen Methode. Dort wurde Bacteriorhodopsin in Liposomen eingebaut, die zuvor mit Dodecylmaltosid behandelt wurden. Dodecylmaltosid wurde nach Zugabe von Bacteriorhodopsin durch Adsorption an ein Polystyrolharz (Bio-Beads SM-2) wieder entfernt. Die Autoren zeigten, dass die Vesikelstruktur der Liposomen bis zu einem kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis erhalten blieb und die Liposomen bei höheren Verhältnissen lysierten. Das durch Licht induzierte  $\Delta p$  war maximal, wenn Bacteriorhodopsin in Liposomen eingebaut wurde, die mit dem kritischen Verhältnis behandelt wurden. Nur noch die Hälfte des maximalen  $\Delta p$  wurde gemessen, wenn das zur Präparation verwendete Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis höher war. Die Größe von  $\Delta p$  war wahrscheinlich abhängig von der Orientierung der Bacteriorhodopsinmoleküle in der Proteoliposomenmembran. Bacteriorhodopsin wird mit einheitlicher Orientierung eingebaut, wenn die Vesikelstruktur der Liposomen während der Präparation erhalten bleibt (Rigaud et al. 1995). In lysierte Liposomen wird Bacteriorhodopsin dagegen unterschiedlich orientiert eingebaut.

Die Substratzentren aller Hydrogenase- und Fumarat-Reduktasemoleküle müssen in den Proteoliposomen ebenfalls gleich (nach außen) orientiert sein, um zwischen den beiden vorgeschlagenen Mechanismen (Abb. 2.1 C und D) unterscheiden zu können. Daher wurde zunächst das kritische Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis der verwendeten Liposomen bestimmt. Für den anschließenden Einbau der Enzyme wurden 0,02 g Hydrogenase und 0,18 g Fumarat-Reduktase pro g Phospholipid eingesetzt. Das entspricht 0,16  $\mu\text{mol}$  Hydrogenase ( $M_r = 124 \text{ kDa}$ ) und 1,3  $\mu\text{mol}$  Fumarat-Reduktase ( $M_r = 135 \text{ kDa}$ ) pro g Phospholipid. Das molare Verhältnis der Enzyme in den Proteoliposomen wurde so gewählt, dass es etwa dem der Bakterienmembran entsprach (Unden et al. 1983).

#### 4.1.1 Bestimmung des kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnisses

Schallliposomen wurden aus einem Gemisch von Ei-Phosphatidylcholin und Ei-Phosphatidat hergestellt und mit steigenden Mengen Dodecylmaltosid versetzt. Abb. 4.1 zeigt die Trübungsänderung der Liposomensuspensionen in Abhängigkeit der zugesetzten Dodecylmaltosidmenge. Die Trübung der Suspensionen wurde anhand ihrer optischen Dichte bei 400 nm bestimmt. Bis zu einem Verhältnis von 0,8 g Dodecylmaltosid/g Phospholipid blieb die optische Dichte annähernd konstant. Nach weiterer Zugabe von Dodecylmaltosid nahm

die optische Dichte bis 1,2 g Dodecylmaltosid/g Phospholipid stark ab und änderte sich dann nicht mehr. Vergleichende Untersuchungen mit Lichtstreuung,  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie (Goñi und Alonso 2000, Almgren 2000) zeigten, dass die Trübungsänderung den Solubilisierungsprozeß der Liposomen beschreibt. Zunächst wird Dodecylmaltosid in die Liposomenmembran eingebaut, ohne diese zu lysieren (Phase I in Abb. 4.1). Am Ende von Phase I ist die Liposomenmembran mit Dodecylmaltosid „gesättigt“. Weitere Zugabe von Dodecylmaltosid führt zunehmend zur Lyse der Liposomen (Phase II), bis alle Liposomen solubilisiert sind und nur noch gemischte Micellen aus Phospholipid und Detergens vorliegen (Phase III). Aus den Trübungsänderungen wurde geschlossen, dass die untersuchten Schallliposomen bei dem kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis von 0,8 g/g noch nicht lysiert und beim Verhältnis von 1,2 Dodecylmaltosid/g Phospholipid vollständig solubilisiert waren. Mit Liposomen ähnlicher Phospholipidzusammensetzung wurde ein kritisches Verhältnis von 0,6 g Dodecylmaltosid/g Phospholipid und ein Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis von 1,0 g/g für die vollständige Solubilisierung bestimmt (Lambert et al. 1998).



**Abb. 4.1. Trübung von Liposomensuspensionen nach Zugabe steigender Dodecylmaltosidmengen.** Schallliposomen wurden mit einer Konzentration von 1 g Phospholipid/l in 50 mM Hepes-Puffer (pH 7,5) suspendiert und mit verschiedenen Mengen Dodecylmaltosid versetzt. Die einzelnen Suspensionen wurden 3 h bei 20°C gerührt und anschließend die optische Dichte (OD) bei 400 nm bestimmt.

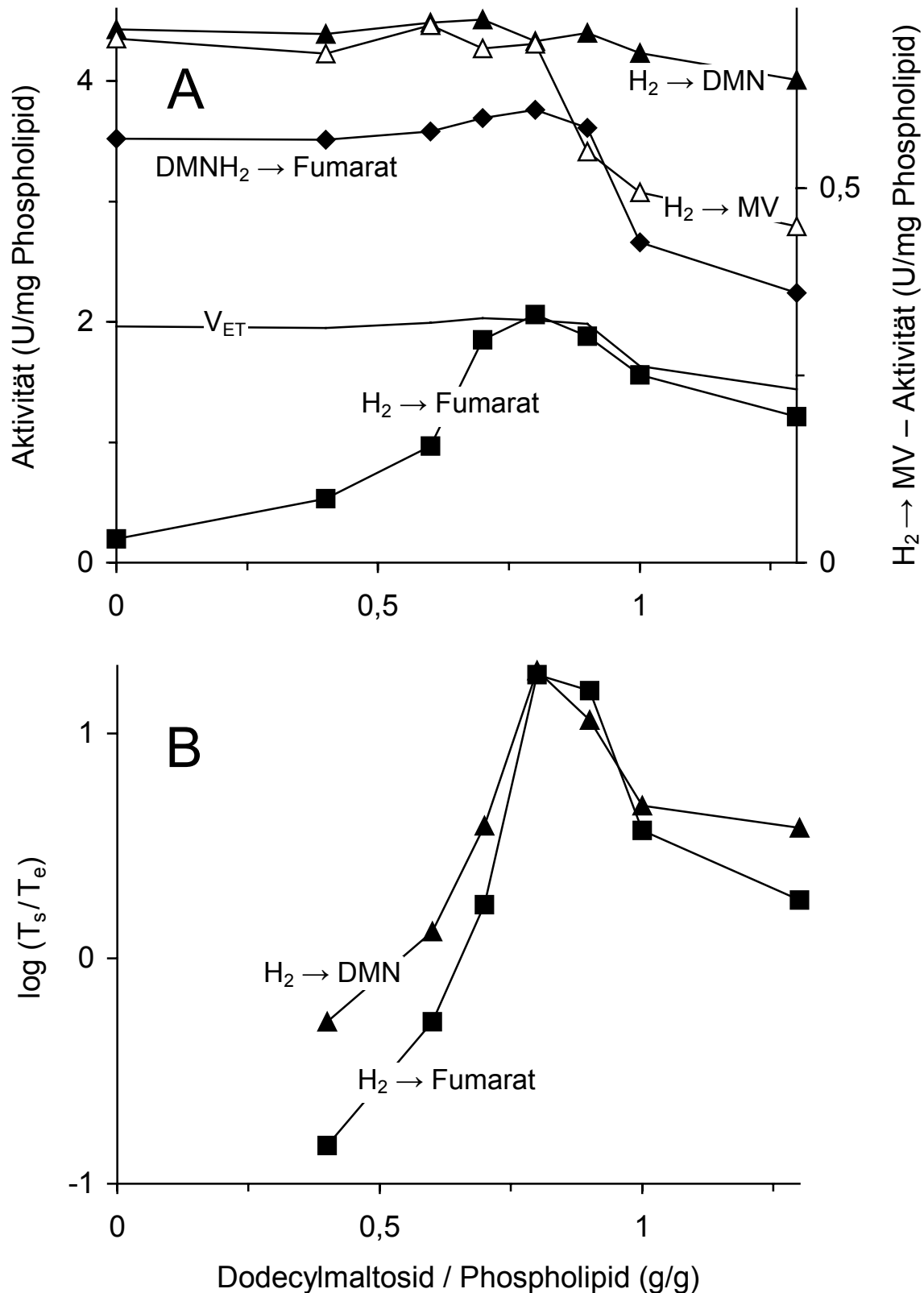
#### 4.1.2 Orientierung der Enzymmoleküle in den Proteoliposomen

Um die Präparationsbedingung zu finden, bei der alle Hydrogenase- und Fumarat-Reduktasemoleküle in der Liposomenmembran nach außen orientiert eingebaut werden, wurde das in Abb. 4.2 dargestellte Experiment durchgeführt. Schallliposomen, die Menachinon enthielten, wurden wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben mit zunehmenden Mengen Dodecylmaltosid behandelt. Nach Zugabe der Enzyme wurde Dodecylmaltosid durch Adsorption an Bio-Beads SM-2 wieder entfernt. Anschließend wurde die Elektronentransportaktivität von  $H_2$  zu Fumarat in den erhaltenen Proteoliposomenpräparationen bestimmt (Abb. 4.2 A,  $H_2 \rightarrow \text{Fumarat}$ ). Die Aktivität nahm zunächst mit steigender Detergengkonzentration zu und war maximal beim kritischen Verhältnis (0,8 g Dodecylmaltosid/g Phospholipid). Bei höheren Verhältnissen war die Aktivität geringer. Die gemessenen Elektronentransportaktivitäten wurden mit den theoretisch erwarteten ( $V_{ET}$ ) verglichen.  $V_{ET}$  wurde aus den gemessenen Aktivitäten der Hydrogenase ( $H_2 \rightarrow \text{DMN}$ ,  $V_{Hyd}$ ) und der Fumarat-Reduktase ( $\text{DMNH}_2 \rightarrow \text{Fumarat}$ ,  $V_{Frd}$ ) nach Gleichung (6) berechnet (Unden und Kröger 1982, Kröger und Klingenberg 1973). Gleichung (6) gilt für ein System von zwei aufeinander folgenden Enzymen mit einem gemeinsamen Intermediat (Menachinol), das vom ersten Enzym gebildet und vom zweiten verbraucht wird.

$$V_{ET} = \frac{V_{Hyd} \cdot V_{Frd}}{V_{Hyd} + V_{Frd}} \quad (6)$$

Unterhalb des kritischen Verhältnisses war die gemessene Aktivität kleiner als  $V_{ET}$ . Vermutlich waren in diesen Präparationen nicht alle Enzymmoleküle in die Liposomenmembran eingebaut und somit nicht am Elektronentransport beteiligt. Vom kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis an stimmten die Elektronentransportaktivitäten mit  $V_{ET}$  überein, d. h. es waren wahrscheinlich alle Enzymmoleküle am Elektronentransport beteiligt.

Die Abnahme der Elektronentransportaktivität und auch der Fumarat-Reduktase-Aktivität (Abb. 4.2 A,  $\text{DMNH}_2 \rightarrow \text{Fumarat}$ ) in den beiden Präparationen, die mit den höchsten Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnissen erhalten wurden, lassen sich durch die Orientierung der Fumarat-Reduktase in der Proteoliposomenmembran erklären. Da extern zugesetztes Fumarat durch die Liposomenmembran etwa  $10^4$ mal langsamer diffundiert als im Elektronentransport umgesetzt wurde (Janausch et al. 2001), sind nur die nach außen orientierten Fumarat-Reduktasemoleküle an der Fumarat-Reduktion beteiligt.



**Abb. 4.2. Enzymaktivitäten (A) und  $TPP^+$ -Aufnahme (B) von Proteoliposomen in Abhängigkeit des zur Präparation verwendeten Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnisses.** Die Proteoliposomen enthielten Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase und wurden wie unter Methoden beschrieben aber mit verschiedenen Mengen Dodecylmaltosid präpariert. Die theoretische Elektronentransportaktivität ( $V_{ET}$ ) wurde nach Gleichung (6) berechnet. Die  $TPP^+$ -Aufnahme wurde wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben gemessen.  $T_s$  ist das von den Proteoliposomen aufgenommene  $TPP^+$  während des Elektronentransports von  $H_2$  zu DMN bzw. zu Fumarat und  $T_e$  die entsprechende  $TPP^+$ -Konzentrationen im Medium.

Die Zugänglichkeit der Fumarat-Reduktase für ihr Substrat wurde durch das in Tab. 4.1 dargestellte Experiment bestimmt. Proteoliposomen, die mit dem kritischen bzw. den beiden höchsten Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnissen präpariert waren, wurden mit Triton X-100 lysiert und die Aktivität der Fumarat-Reduktion mit reduziertem Methylviologen vor und nach Lyse bestimmt. Mit der kritischen Detergengkonzentration präparierte Proteoliposomen zeigten keine Stimulierung der Aktivität durch Lyse, d. h. alle Fumarat-Reduktasemoleküle waren bereits vor Lyse für Fumarat zugänglich und daher nach außen orientiert. Dagegen wurde die Aktivität der bei den höchsten Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnissen erhaltenen Proteoliposomen durch Lyse gesteigert. Aus dem Verhältnis der Aktivitäten vor und nach Lyse ist zu entnehmen, dass nur etwa 70 % der Fumarat-Reduktasemoleküle in diesen Proteoliposomen für externes Fumarat zugänglich, d. h. nach außen orientiert waren.

**Tab. 4.1. Fumarat-Reduktase-Aktivität mit reduziertem Methylviologen ( $MV_{red}$ ) vor und nach Lyse der Proteoliposomen.** Fumarat-Reduktase und Hydrogenase wurden mit verschiedenen Mengen Dodecylmaltosid in Liposomen, die Menachinon enthielten, eingebaut. Die Proteoliposomen wurden mit 1 g Triton X-100/g Phospholipid lysiert.

Dodecylmaltosid / Phospholipid (g/g)	Aktivität ( $MV_{red} \rightarrow$ Fumarat)	
	vor Lyse nach Lyse	nach Lyse (U/mg Phospholipid)
0,8	0,98	41
1,0	0,68	36
1,3	0,72	36

Die Orientierung der Hydrogenase in den verschiedenen Proteoliposomen entsprach wahrscheinlich der der Fumarat-Reduktase. Das ist ersichtlich aus der Hydrogenase-Aktivität mit Methylviologen als Elektronenakzeptor ( $H_2 \rightarrow MV$ , Abb. 4.2 A). Methylviologen kann die Membran nicht permeieren (Kröger et al. 1980, Jones und Garland 1977) und wird an den hydrophilen Untereinheiten der Hydrogenase (HydAB) reduziert (Groß et al. 1998b). Es können also nur die nach außen orientierten Hydrogenasemoleküle an der Reaktion beteiligt sein. Die Aktivität der Methylviologen-Reduktion durch  $H_2$  war in den Präparationen gleich, die mit dem kritischen oder niedrigeren Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnissen erhalten wurden, und betrug nur noch 70 % bzw. 65 % bei den zwei höchsten Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnissen. Im Gegensatz zu Methylviologen können  $H_2$  und DMN die Membran permeieren und reagieren daher auch mit den nach innen orientierten Hydrogenasemolekülen (Geisler et al. 1994). Da sich die Aktivität der DMN-Reduktion mit  $H_2$  in den Proteolipsomensuspensionen nicht unterschied ( $H_2 \rightarrow DMN$ , Abb. 4.2 A), war die Anzahl

aktiver Hydrogenasemoleküle in allen Präparationen etwa gleich. Aus dem Verhältnis der Hydrogenase-Aktivität mit Methylviologen und der mit DMN als Elektronenakzeptor ist zu schließen, dass alle Hydrogenasemoleküle nach außen orientiert waren, wenn die Proteoliposomen mit dem kritischen oder einem niedrigeren Verhältnis präpariert wurden. Dagegen waren 30 % bzw. 35 % der Hydrogenasemoleküle nach innen orientiert, wenn die Proteoliposomen mit den beiden höchsten Verhältnissen präpariert wurden.

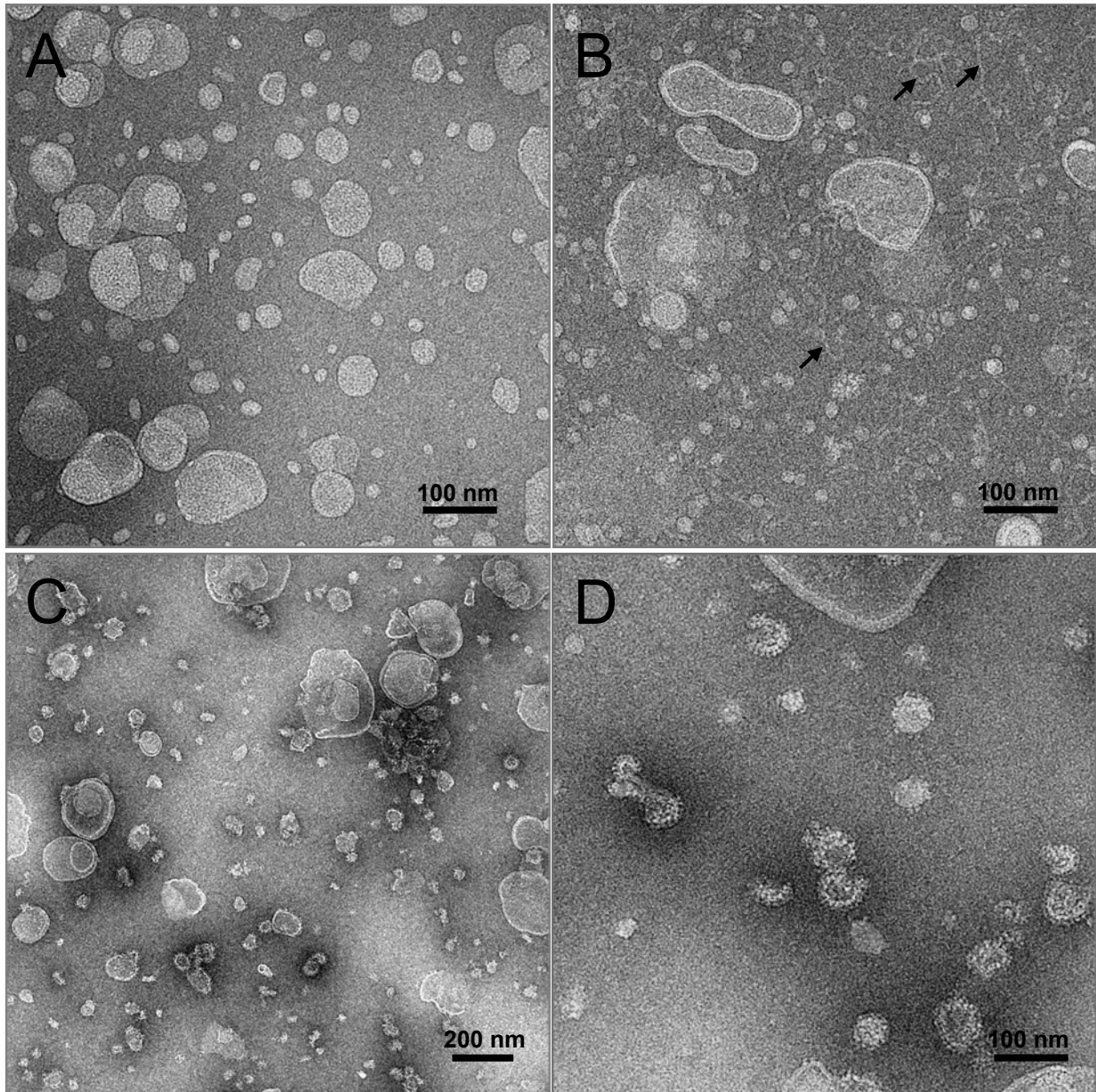
Tetraphenylphosphonium ( $\text{TPP}^+$ ) wird von den Proteoliposomen aufgenommen, wenn ein elektrisches Potential über der Membran ( $\Delta\psi$ , innen negativ) vorhanden ist. Die Bestimmung von  $\Delta\psi$  mit  $\text{TPP}^+$  wird in Kapitel 4.2 ausführlicher erklärt. Die  $\text{TPP}^+$ -Aufnahme während des Elektronentransports von  $\text{H}_2$  zu Fumarat oder von  $\text{H}_2$  zu DMN war am größten bei Proteoliposomen, die mit dem kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis präpariert wurden (Abb. 4.2 B). In dieser Präparation waren alle Enzymmoleküle am Elektronentransport beteiligt und in den Proteoliposomen nach außen orientiert. Die geringere  $\text{TPP}^+$ -Aufnahme durch die „überkritischen“ Proteoliposomen ist damit zu erklären, dass ein Teil der Hydrogenasemoleküle nach innen orientiert war (siehe Diskussion). Für die folgenden Untersuchungen wurden nur Proteoliposomen verwendet, die mit dem kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis präpariert wurden.

#### 4.1.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die strukturellen Eigenschaften der Schallliposomen und der Proteoliposomen wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) nach Negativ-Kontrastierung mit Vanadat untersucht. Abb. 4.3 A zeigt Schallliposomen, die für die Proteoliposomenpräparation verwendet wurden, als runde Vesikel. Der Durchmesser variierte von 20 bis 140 nm, was typisch für Liposomen ist, die durch Ultraschallbehandlung einer Phospholipidsuspension hergestellt werden (Rigaud et al. 1995). Der mittlere Durchmesser betrug etwa 40 nm.

Für den Einbau der Proteine wurde Dodecylmaltosid mit dem kritischen Verhältnis von 0,8 g Dodecylmaltosid/g Phospholipid und anschließend Hydrogenase und Fumarat-Reduktase in die Schallliposomensuspension gemischt. In diesem Phospholipid/Detergens/Protein-Gemisch waren immer noch runde Vesikel erkennbar (Abb. 4.2 B), von denen die meisten jetzt einen Durchmesser von 20 bis 30 nm besaßen. Nur wenige größere (bis 200 nm) waren zu beobachten. Außerdem sind lange Filamente zu sehen (durch Pfeile in Abb. 4.2 B gekennzeichnet), die einen ähnlichen Kontrast besitzen wie die Vesikelmembran. Diese Filamente stellen wahrscheinlich offene Membranfragmente dar (Lambert et al. 1998). Danach blieb die Vesikelstruktur nach der Detergens- und der Proteinzugabe nicht bei allen Liposomen erhalten. Nach Rigaud et al. (1995) werden viele Membranproteine in Liposomen nur dann einseitig orientiert eingebaut, wenn die Vesikelstruktur der Liposomen nicht zerstört wird. Für den Einbau von Hydrogenase und Fumarat-Reduktase war der verwendete

Solubilisierungszustand der Liposomen dennoch geeignet, um eine einseitige Orientierung der Enzyme zu erhalten (Kapitel 4.1.2). Ein geringeres Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis, bei dem die Vesikelstruktur der Liposomen vermutlich besser erhalten geblieben wäre, führte zum unvollständigen Einbau der Enzyme und wurde daher nicht verwendet.



**Abb. 4.3. TEM-Aufnahmen von Liposomen.** (A) Schallliposomen (2 g Phospholipid/l). (B) Schallliposomen (1 g Phospholipid/l) nach Zusatz von Dodecylmaltosid (0,8 g/g Phospholipid) und Hydrogenase und Fumarat-Reduktase, Pfeile kennzeichnen einige offene Membranfragmente (siehe Text). (C) und (D) wie (B) nach Detergensentfernung durch Bio-Beads SM-2. Alle Proben wurden mit Vanadat negativ kontrastiert und bei 80 kV mit einer Vergrößerung von 28000x (A, B und D) bzw. 11000x (C) untersucht.

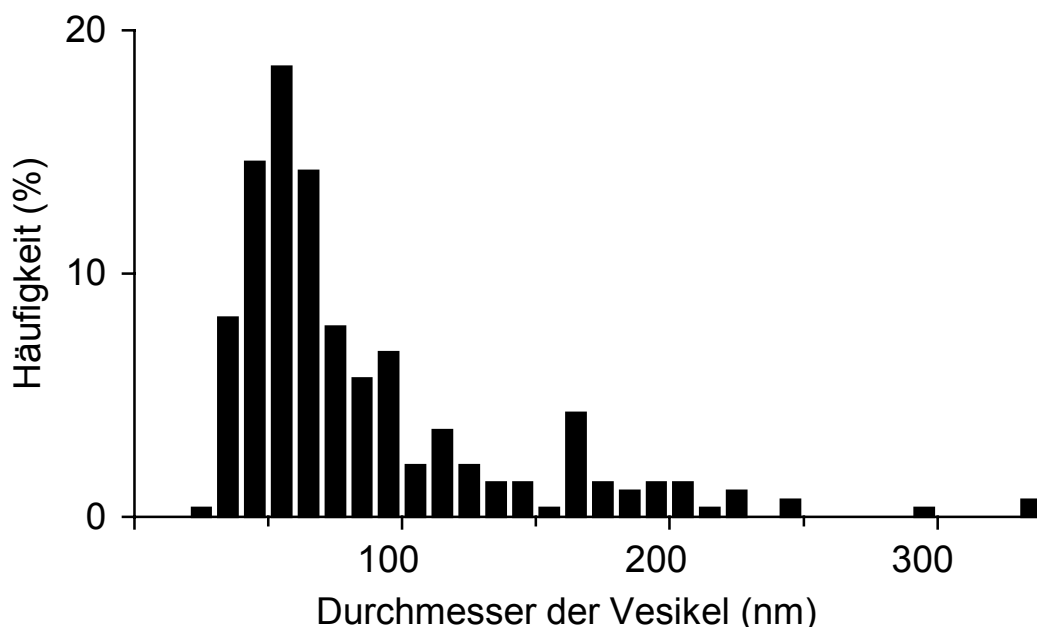
In Abb. 4.2 C und D sind die Proteoliposomen nach der Entfernung von Dodecylmaltosid dargestellt. Die Präparation enthielt Vesikel unterschiedlicher Größen (30 bis 350 nm), die vorwiegend einschalig waren. Die Membran der Vesikel (hauptsächlich der kleineren bis etwa



100 nm) war mit Partikeln besetzt, die in den Schallliposomen nicht beobachtet wurden. Partikel mit etwa gleicher Größe wurden auch von Unden et al. (1983) in Proteoliposomen gefunden, in denen Fumarat-Reduktase eingebaut war. Nach der Kristallstruktur ist die Fumarat-Reduktase ein Homodimer der jeweils drei Untereinheiten (FrdABC), dessen hydrophiler Kopf 13 nm breit ist und etwa 7,5 nm aus der Membran herausragt (Lancaster et al. 1999). Die Dimensionen der Hydrogenase sind nicht bekannt. Mit den TEM-Untersuchungen kann die Größe der Partikel nicht genau bestimmt werden, in ihrer Größenordnung stimmen sie aber mit der Größe der Fumarat-Reduktase überein. In den TEM-Aufnahmen sind keine zwei signifikant unterschiedlichen Partikelgrößen zu beobachten, d. h. Hydrogenasemoleküle sind von Fumarat-Reduktasemolekülen hier nicht zu unterscheiden.

#### 4.1.4 Größe der Proteoliposomen

Die Größe der Proteoliposomen mit Hydrogenase und Fumarat-Reduktase wurde anhand elektronenmikroskopischer Bilder bestimmt, die nach Negativ-Kontrastierung einer Proteoliposomenpräparation mit Vanadat mit dem Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen wurden. Von insgesamt 600 Vesikeln wurde der äußere Durchmesser ausgemessen und die Häufigkeiten bestimmt (Abb. 4.4). Die Durchmesser der Vesikel variierten von etwa 30 bis 350 nm. Am häufigsten waren Vesikel mit einem Durchmesser um 65 nm. Die Auswertung aller gemessenen Vesikel ergab einen mittleren äußeren Durchmesser von  $88 \pm 37$  nm.



**Abb. 4.4. Häufigkeitsverteilung der Vesikeldurchmesser einer Proteoliposomenpräparation.** Von einer Proteoliposomenpräparation wurden nach Negativ-Kontrastierung mit Vanadat mehrere Bilder mit dem TEM bei 11000facher Vergrößerung aufgenommen. Der äußere Durchmesser von insgesamt 600 Vesikeln wurde bestimmt und die Häufigkeit berechnet.

Die gleiche mittlere Größe wurde durch Bestimmung des Innenvolumens der Proteoliposomen erhalten. Dazu wurden Proteoliposomen in Phosphatpuffer präpariert und das externe Phosphat vollständig durch Gelfiltration abgetrennt. Aus dem Phosphatgehalt, das in den Proteoliposomen eingeschlossen war, und der Phospholipidkonzentration wurde ein mittleres Innenvolumen von 3,5 ml/g Phospholipid berechnet. Mit der Annahme einer kugelförmigen Gestalt der Proteoliposomen errechnet sich wie in den Methoden beschrieben aus dem Innenvolumen ein mittlerer Innendurchmesser von 81 nm (Kapitel 3.10). Die Lipiddoppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln besitzt eine Dicke von 3,7 nm (Nagle und Tristram-Nagle 2000). Somit ergibt sich ein mittlerer Außendurchmesser der Proteoliposomen von 88 nm.

Proteoliposomen mit einem äußeren Durchmesser von 88 nm und der verwendeten Enzymmenge enthalten statistisch 8,4 Hydrogenasemoleküle und 72 Fumarat-Reduktasemoleküle in ihrer monomeren Form (Tab. 4.2). Die TEM-Untersuchungen zeigten, dass die Enzymmoleküle hauptsächlich in Proteoliposomen mit einem Durchmesser von 30 bis 100 nm eingebaut waren (Kapitel 4.1.3). Aus Abb. 4.4 geht hervor, dass etwa 70 % der Vesikel in der Proteoliposomenpräparation diese Größe besitzen. Im Mittel verteilen sich dann 12 Hydrogenasemoleküle und 103 Fumarat-Reduktasemoleküle auf Proteoliposomen mit einer mittleren Größe von 65 nm, während die größeren Liposomen kein oder nur wenig Protein enthielten. Liposomen, in denen Protein eingebaut war, enthielten sowohl Hydrogenase als auch Fumarat-Reduktase, da alle aktiven Enzyme in dieser Proteoliposomenpräparation den Elektronentransport von H<sub>2</sub> zu Fumarat katalysierten (Kapitel 4.1.2).

**Tab. 4.2. Statistische Verteilung der Enzymmoleküle in den Proteoliposomen.** Die Anzahl der Liposomen/g Phospholipid errechnet sich aus der Gesamtfläche, die 1 g Phospholipid einnimmt, und der Oberfläche eines Vesikels ( $\pi d^2$ ). Aus dem Flächenbedarf eines Phosphatidylcholinmoleküls von 0,7 nm<sup>2</sup> (Nagle und Tristram-Nagle 2000), dem Molekulargewicht des Phospholipids (800 g/mol) und unter Berücksichtigung des doppelschichtigen Aufbaus der Lipidmembran ergibt sich eine Gesamtfläche von  $2,6 \cdot 10^6$  cm<sup>2</sup>/g Phospholipid. Es wurden 0,14  $\mu$ mol ( $8,4 \cdot 10^{16}$  Moleküle) Hydrogenase und 1,2  $\mu$ mol ( $72 \cdot 10^{16}$  Moleküle) Fumarat-Reduktase pro g Phospholipid eingesetzt.

mittlerer Durchmesser (nm)	Anzahl Liposomen g Phospholipid	Moleküle Hyd Liposom	Moleküle Frd Liposom
88	$1 \cdot 10^{16}$	8,4	72
65 <sup>1)</sup>	$0,7 \cdot 10^{16}$ <sup>2)</sup>	12	103

<sup>1)</sup> berechnet aus den Häufigkeiten der Vesikel mit einem Durchmesser von 30 bis 100 nm

<sup>2)</sup> unter Berücksichtigung, dass nur 70 % der Liposomen einen mittleren Durchmesser von 65 nm besitzen

#### 4.1.5 Enzymaktivitäten vor und nach Einbau der Proteine in die Liposomen

Um eine möglichst hohe Elektronentransportaktivität von H<sub>2</sub> zu Fumarat in den Proteoliposomenpräparationen zu erhalten, sollten Hydrogenase und Fumarat-Reduktase ohne Verlust

ihrer Enzymaktivitäten in die Liposomen eingebaut werden. Für den Einbau der Proteine wurden die isolierten Enzyme in eine Liposomensuspension, die Dodecylmaltosid enthielt, gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Die mit den isolierten Enzympräparationen gemessene spezifische Aktivitäten der Hydrogenase (H<sub>2</sub> → DMN, 300 U/mg Protein) und der Fumarat-Reduktase (DMNH<sub>2</sub> → Fumarat, 23 U/mg Protein) blieb während dieser Zeit erhalten (nicht gezeigt).

Anschließend wurde das Detergens aus dem Phospholipid/Dodecylmaltosid/Protein-Gemisch durch Zugabe von Bio-Beads SM-2 und einer Stunde Rühren wieder entfernt. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass alles Dodecylmaltosid aber kein Phospholipid und Protein adsorbiert wird (Lambert et al. 1998, Geisler 1993). Die Enzymaktivität der Fumarat-Reduktase (DMNH<sub>2</sub> → Fumarat) blieb auch nach der Behandlung mit Bio-Beads SM-2 erhalten (Tab 4.3). Die Hydrogenase-Aktivität (H<sub>2</sub> → DMN) wurde durch den Membraneinbau leicht stimuliert. Elektronentransport von H<sub>2</sub> zu Fumarat fand erst statt, wenn das Dodecylmaltosid entfernt war. Aus der Elektronentransportaktivität (H<sub>2</sub> → Fumarat) wurde die Wechselzahl von Fumarat-Reduktase und Hydrogenase im Elektronentransport zu 36 s<sup>-1</sup> bzw. 310 s<sup>-1</sup> berechnet, sie entsprach etwa 10% der Werte in den Bakterien. Die Elektronentransportaktivität wurde nicht durch den Menachinongehalt der Proteoliposomenmembran limitiert. Menachinon wurde in sättigender Konzentration eingebaut (10 µmol/g Phospholipid, Unden und Kröger 1986). Der Menachinongehalt der Proteoliposomen wurde durch Extraktion und Messung der extrahierten Menachinonmenge bestätigt (nicht gezeigt).

**Tab. 4.3. Enzymaktivitäten einer Proteoliposomensuspension vor und nach Detergensentfernung.** Die Proteoliposomensuspension vor Detergensentfernung enthielt 0,8 g Dodecylmaltosid, 0,02 g Hydrogenase und 0,18 g Fumarat-Reduktase pro g Phospholipid und wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dodecylmaltosid wurde durch Zusatz von 0,24 g Bio-Beads SM-2/g Phospholipid und einer Stunde Rühren (Raumtemperatur) entfernt.

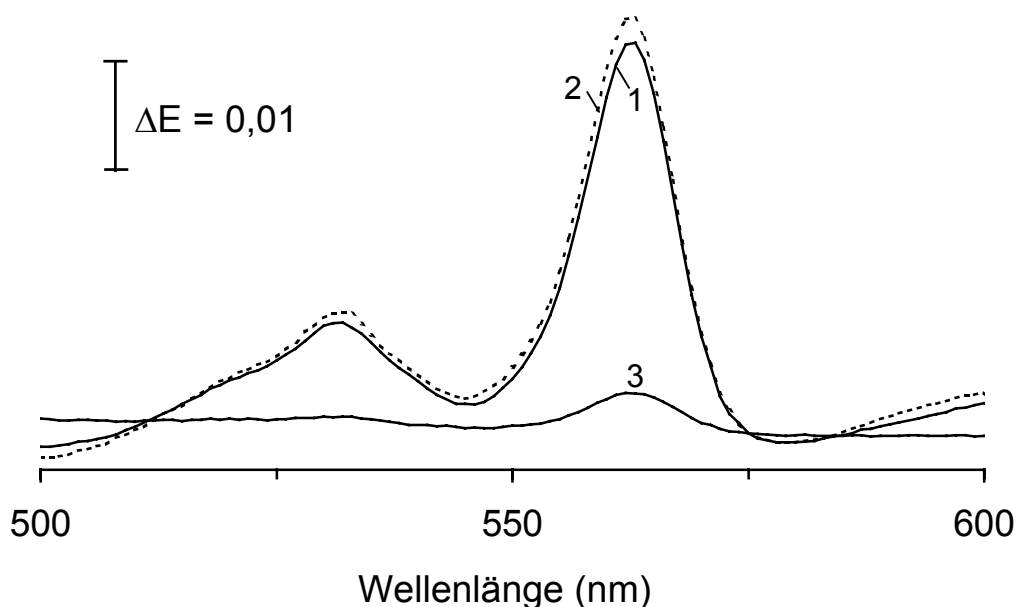
	H <sub>2</sub> → DMN	DMNH <sub>2</sub> → Fumarat	H <sub>2</sub> → Fumarat
	(U/mg Phospholipid)		
vor Detergensentfernung	6,0	4,1	≤ 0,05
nach Detergensentfernung	6,5	4,1	2,6

#### 4.1.6 Reduktion von Cytochrom *b*

Die membranständige Untereinheit der Hydrogenase (HydC) ist ein Dihäm-Cytochrom *b*. Beide Hämgruppen werden im isolierten Enzym durch H<sub>2</sub> reduziert (Groß et al. 1998). Wenn Hydrogenase und Fumarat-Reduktase gemeinsam in der Liposomenmembran eingebaut sind, sollte auch das Dihäm-Cytochrom *b* der Fumarat-Reduktase (FrdC) durch H<sub>2</sub> reduziert

werden, da die Elektronen von HydC über das in der Liposomenmembran enthaltene Menachinon auf FrdC übertragen werden können. Wenn alle Moleküle der Fumarat-Reduktase am Elektronentransport der Liposomen beteiligt sind, sollte sich alles in den Proteoliposomen vorhandene Cytochrom *b* durch H<sub>2</sub> reduzieren lassen. Die Menge des reduzierten Cytochrom *b* läßt sich aus dem Differenzspektrum (reduziert minus oxidiert) der Proteoliposomen-suspension errechnen (Kröger und Innerhofer 1976).

Für die in Abb. 4.5 dargestellten Differenzspektren wurden Hydrogenase und Fumarat-Reduktase in Liposomen mit Menachinon eingebaut. Nach Sättigung der Proteoliposomen-suspension mit H<sub>2</sub> wurden 2,6 µmol Häm *b*/g Phospholipid reduziert (Spektrum 1). Das entsprach 96 % des gesamten in der Präparation enthaltenem Häm *b*, das durch anschließende Zugabe von Natriumdithionit bestimmt wurde (2,7 µmol Häm *b*/g Phospholipid, Spektrum 2). Natriumdithionit reduziert beide Häm-Gruppen der Hydrogenase und der Fumarat-Reduktase. Der Häm *b*-Anteil der Hydrogenase in den Proteoliposomen wurde durch Reduktion mit H<sub>2</sub> vor Entfernen des Dodecylmaltosids zu 0,27 µmol Häm *b*/g Phospholipid bestimmt (Spektrum 3). In Gegenwart des verwendeten Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnisses können nur die Hämgruppen der Hydrogenase durch H<sub>2</sub> reduziert werden, da kein Elektronentransport von H<sub>2</sub> zu Fumarat statt findet (Kapitel 4.1.5), d. h. die Elektronen konnten nicht von HydC auf FrdC übertragen werden.



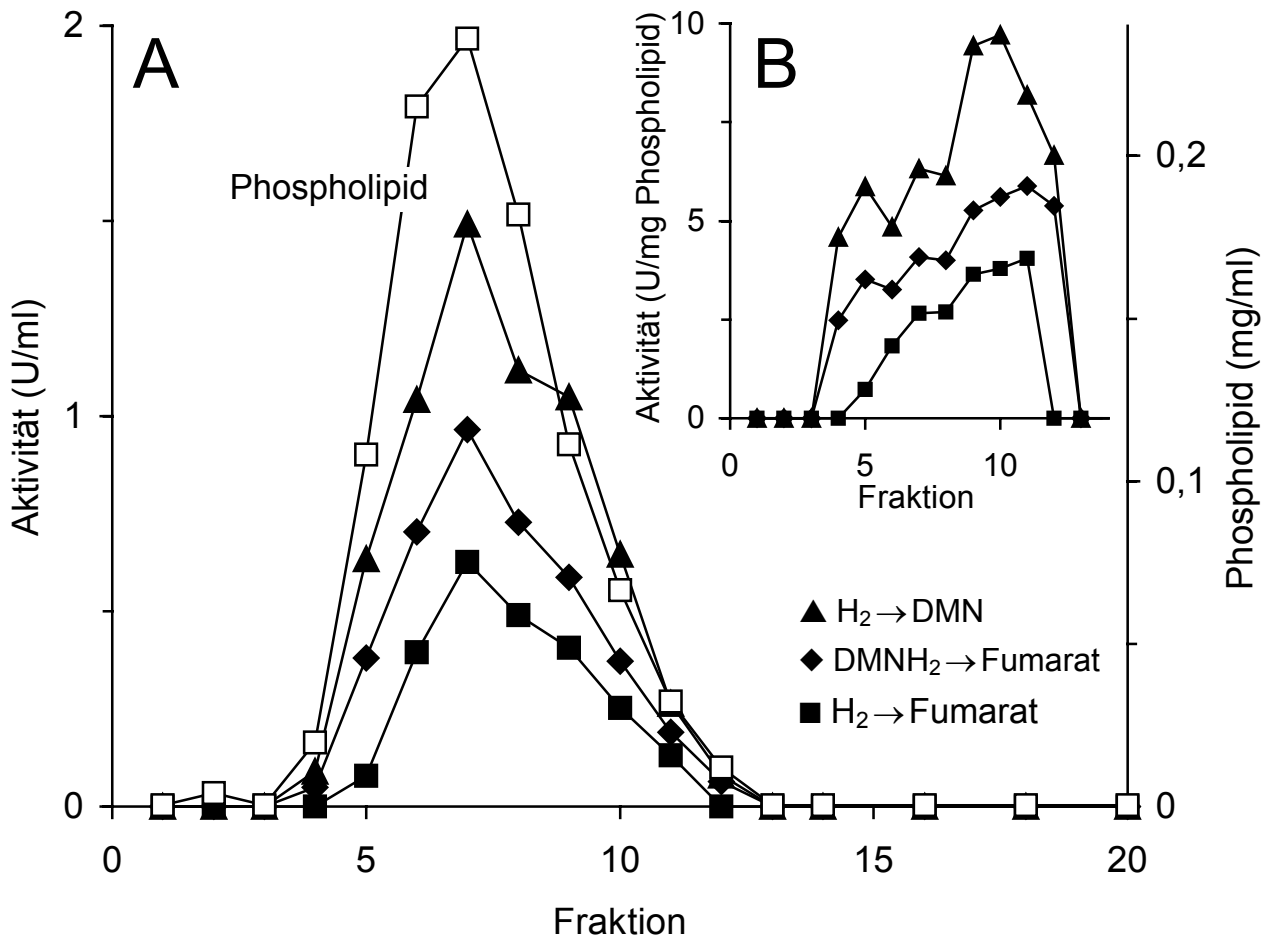
**Abb. 4.5. Cytochrom *b*-Differenzspektren einer Proteoliposomenpräparation.** Die Proteoliposomen enthielten Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase. Die Differenzspektren (reduziert minus oxidiert) wurden aufgenommen wie unter Methoden beschrieben. Spektrum 1: Die Proteoliposomen-suspension (1 g Phospholipid/l) wurde in einer Küvette alternierend evakuiert und mit H<sub>2</sub> begast. Spektrum 2: Proteoliposomen-suspension von Spektrum 1 nach Zugabe von Natriumdithionit. Spektrum 3: wie Spektrum 1, aber in Gegenwart von 0,8 g Dodecylmaltosid/g Phospholipid.

Aus den Häm *b*-Bestimmungen geht hervor, dass annähernd alle in der Proteoliposomenpräparation enthaltenen Hämgruppen der Fumarat-Reduktase (insgesamt 2,4  $\mu\text{mol}$  Häm *b*/g Phospholipid) durch  $\text{H}_2$  reduziert wurden. Daraus ist zu schließen, dass fast alle Vesikel, in denen Fumarat-Reduktase eingebaut war, auch Hydrogenase enthielten. Lediglich 4 % der eingesetzten Fumarat-Reduktasemoleküle waren entweder in Proteoliposomen ohne Hydrogenase oder überhaupt nicht eingebaut. Der Anteil nicht eingebauter oder ohne Fumarat-Reduktase eingebauter Hydrogenasemoleküle kann mit dem Experiment von Abb. 4.5 nicht bestimmt werden, da die Hämgruppen aller Hydrogenasemoleküle durch  $\text{H}_2$  reduziert werden.

Da Fumarat-Reduktase und Hydrogenase zwei Häm *b*-Moleküle pro FrdC bzw. HydC (Unden und Kröger 1981, Groß et al. 1998b) besitzen, enthielt die Proteoliposomenpräparation 1,2  $\mu\text{mol}$  Fumarat-Reduktase und 0,14  $\mu\text{mol}$  Hydrogenase pro g Phospholipid. Das entsprach etwa der eingesetzten Proteinmenge von 0,18 g isolierter Fumarat-Reduktase (1,3  $\mu\text{mol}$  mit  $M_r = 135$  kDa) und 0,02 g Hydrogenase (0,16  $\mu\text{mol}$  mit  $M_r = 124$  kDa) pro g Phospholipid. Das molare Verhältnis der Enzyme in den Proteoliposomen war ähnlich dem der Bakterienmembran (Unden et al. 1983). Der Enzymgehalt bezogen auf Phospholipid war etwa sechsmal höher als in der Bakterienmembran.

#### 4.1.7 Gelfiltration der Proteoliposomen

Der vollständige Einbau aller eingesetzten Hydrogenase- und Fumarat-Reduktasemoleküle in die Liposomenmembran wurde durch Gelfiltration der Proteoliposomen geprüft. Proteoliposomen mit Hydrogenase und Fumarat-Reduktase wurden über eine Sephacryl S-1000 SF Säule filtriert und das Eluat fraktioniert aufgefangen. In den einzelnen Fraktionen wurden die Elektronentransportaktivität ( $\text{H}_2 \rightarrow \text{Fumarat}$ ), Hydrogenase- ( $\text{H}_2 \rightarrow \text{DMN}$ ) und Fumarat-Reduktase-Aktivität ( $\text{DMNH}_2 \rightarrow \text{Fumarat}$ ) sowie der Phospholipidgehalt bestimmt (Abb. 4.6 A). Die gesamte auf die Säule aufgetragene Phospholipidmenge wurde in den Fraktionen 4 bis 12 wiedergefunden. Hydrogenase- und Fumarat-Reduktase-Aktivität wurde in allen Fraktionen gefunden, die auch Phospholipid enthielten. Die Summe der Hydrogenase- bzw. Fumarat-Reduktase-Aktivität der einzelnen Fraktionen entsprach den aufgetragenen Gesamtaktivitäten. Gelfiltration isolierter Hydrogenase und Fumarat-Reduktase unter den gleichen Bedingungen zeigte, dass die „freien“ Enzyme erst ab Fraktion 15 eluierten (nicht gezeigt). Daraus ist zu schließen, dass alle Hydrogenase- und Fumarat-Reduktasemoleküle in der Liposomenmembran eingebaut waren. Elektronentransport von  $\text{H}_2$  zu Fumarat wurde nur in den Fraktionen 5 bis 11 gemessen, aber nicht in Fraktion 4 und 12. Möglicherweise enthielten diese beiden Fraktionen Proteoliposomen mit getrennt eingebauten Hydrogenase- bzw. Fumarat-Reduktasemolekülen.



**Abb. 4.6. Gelfiltration von Proteoliposomen.** 0,2 ml der Proteoliposomenpräparation (0,2 mg Phospholipid) wurden über eine Sephacryl S-1000 SF Säule filtriert und in Fraktionen à 0,2 ml aufgefangen. Die Proteoliposomen enthielten Hydrogenase ( $H_2 \rightarrow DMN$ -Aktivität: 6,5 U/mg Phospholipid), Menachinon und Fumarat-Reduktase ( $DMNH_2 \rightarrow Fumarat$ -Aktivität: 4,1 U/mg Phospholipid). Die Elektronentransportaktivität von  $H_2$  zu Fumarat in der Präparation war 2,4 U/mg Phospholipid. Aus den Aktivitäten und den Phospholipid-Konzentrationen einer Fraktion, wurden die in B dargestellten spezifischen Aktivitäten pro mg Phospholipid berechnet.

In Abb. 4.6 B sind die Enzymaktivitäten bezogen auf die Phospholipidmenge der jeweiligen Fraktion dargestellt. Die Hydrogenase- und Fumarat-Reduktase-Aktivität pro Phospholipidmenge war teilweise in den Fraktionen 4 bis 8 nur die Hälfte von denen in den Fraktionen 9 bis 11. Mit der durchgeführten Gelfiltration können Proteoliposomen unterschiedlicher Größe zumindest teilweise getrennt werden. Größere Proteoliposomen eluierten zuerst und enthielten danach weniger Protein pro Phospholipid als kleinere. Die Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop zeigten bereits, dass größere Proteoliposomen mit einem Durchmesser um 200 nm nur wenig Protein und kleinere (bis etwa 100 nm) viel Protein enthielten (Kapitel 4.1.3).

#### 4.1.8 Protonenpermeabilität der Proteoliposomenmembran

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob während des Elektronentransports von  $H_2$  zu Fumarat ein  $\Delta p$  über der Proteoliposomenmembran entsteht. Für die Bestimmung von  $\Delta p$  muß die Membran möglichst undurchlässig für Protonen sein, d. h. die Geschwindigkeit der Protonentranslokation durch den Elektronentransport muß schneller sein als der entgegengesetzte „Leckfluß“ der Protonen durch die Membran. Daher wurde der Protonenpermeabilitätskoeffizient ( $P_H$ ) der Proteoliposomenmembran, die Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase enthielt, bestimmt.  $P_H$  berechnet sich nach Gleichung (7) aus dem Protonenfluß über die Membranoberfläche ( $J_H$ ), dessen Größe von der Differenz der internen und externen Protonenkonzentration ( $C_{H_i} - C_{H_e}$ ) abhängt. Wenn eine Protonenkonzentrationsdifferenz über der Liposomenmembran induziert wird, kann  $J_H$  aus der Geschwindigkeit der internen pH-Änderung ( $dpH_i/dt$ ), der internen Pufferkapazität ( $B = 91 \mu\text{mol } H^+ \cdot \text{g Phospholipid}^{-1} \cdot \text{pH}^{-1}$ , Brune et al. 1987) und der spezifischen Membranoberfläche ( $O = 2,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{g Phospholipid}^{-1}$ ) nach Gleichung (8) bestimmt werden.

$$J_H = P_H (C_{H_i} - C_{H_e}) \quad (7)$$

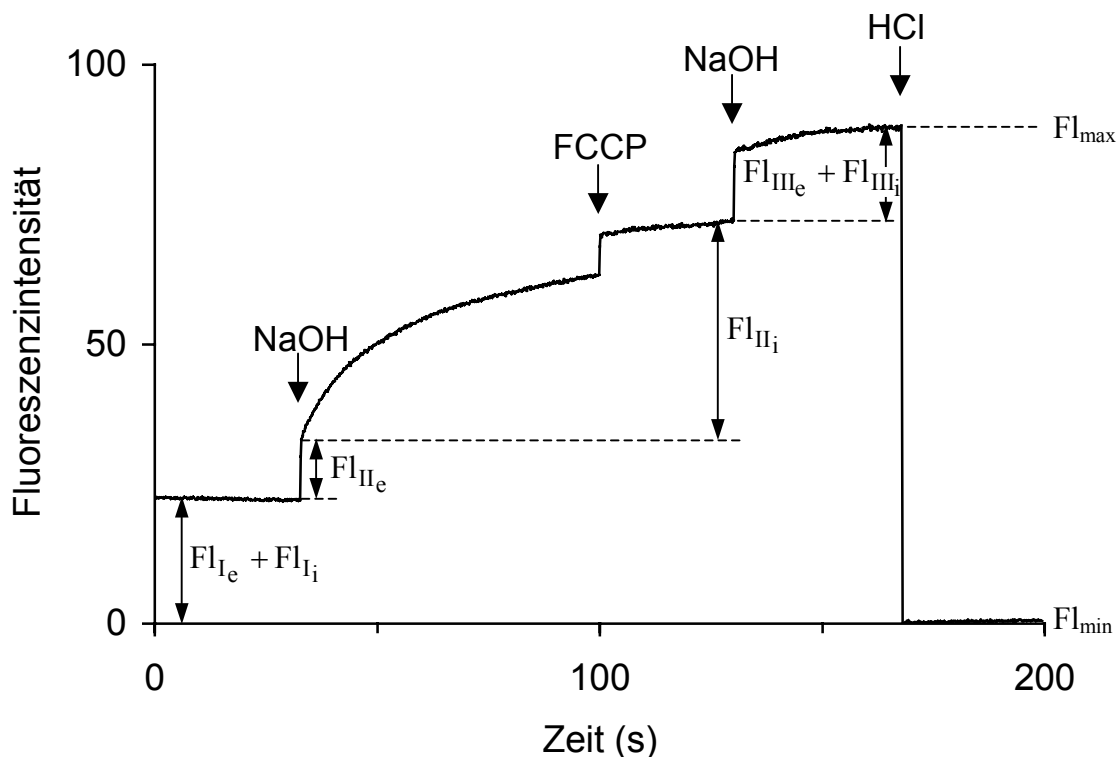
$$J_H = \frac{dpH_i}{dt} \frac{B}{O} \quad (8)$$

Um  $dpH_i/dt$  messen zu können, wurden die Proteoliposomen in Gegenwart des fluoreszierenden pH-Indikators Pyranin präpariert, das dadurch in die Proteoliposomen eingeschlossen wurde. Externes Pyranin wurde anschließend durch Gelfiltration entfernt. Pyranin fluoresziert maximal ( $Fl_{\max}$ ) bei einem  $pH > 10$ , wenn alle Pyraninmoleküle deprotoniert vorliegen. Bei  $pH < 5$  sind alle Pyraninmoleküle protoniert und die Fluoreszenzintensität ist minimal ( $Fl_{\min}$ ). Das Verhältnis von deprotonierten und protonierten Pyraninmolekülen ( $[A^-]/[HA]$ ) hängt nach Gleichung (9) von der beobachteten Fluoreszenz ( $Fl$ ) ab. Aus  $[A^-]/[HA]$  ergibt sich der interne pH nach Gleichung (10). Der pK-Wert für Pyranin wurde von Brune et al. (1987) zu 7,2 bestimmt.

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = \frac{Fl - Fl_{\min}}{Fl_{\max} - Fl} \quad (9)$$

$$pH = pK + \log \frac{Fl - Fl_{\min}}{Fl_{\max} - Fl} \quad (10)$$

In Abb. 4.7 ist die zeitliche Fluoreszenzänderung von Proteoliposomen mit eingeschlossenem Pyranin dargestellt, wenn der pH des externen Puffers sprunghaft erhöht wurde. Die Proteoliposomen waren zunächst in Puffer inkubiert, dessen pH dem internen entsprach. Der Puffer enthielt Valinomycin und  $K^+$ , um eine Polarisierung der Membran durch den Protonenfluß zu verhindern. Zum Zeitpunkt  $t_0$  fluoresziert das in den Liposomen eingeschlossene und das nicht abgetrennte externe Pyraninanion ( $Fl_{I_e} + Fl_{I_i}$ ). Nach pH-Erhöhung des externen Puffers durch Zugabe von NaOH nahm zunächst die Fluoreszenzintensität zeitlich nicht auflösbar zu ( $Fl_{II_e}$ ). Diese Fluoreszenzänderung ist abhängig von der schnellen Deprotonierung des restlichen externen Pyranins, das nicht vollständig durch die Gelfiltration abgetrennt werden konnte. Die Fluoreszenzintensität des eingeschlossenen Pyranins erhöhte sich anschließend mit langsamerer Geschwindigkeit, die durch Zugabe eines Protonophors (FCCP) beschleunigt wurde, bis der interne pH dem externem entsprach ( $Fl_{II_i}$ ). Nach erneuter NaOH-Zugabe nahm die Fluoreszenz um  $Fl_{III_e} + Fl_{III_i}$  zu und war maximal ( $Fl_{max}$ ). Die minimale Fluoreszenzintensität des Pyranins ( $Fl_{min}$ ) wurde nach HCl-Zugabe bestimmt.



**Abb. 4.7. Pyranin-Fluoreszenzänderung einer Proteoliposomensuspension nach pH-Sprung.** Pyranin wurde in Proteoliposomen eingeschlossen, die Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase enthielten. Die Proteoliposomen (1 g Phospholipid/l) wurden in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,5; 25°C) in Gegenwart von Valinomycin (0,5  $\mu\text{mol/g}$  Phospholipid) inkubiert. Der pH des externen Puffers wurde durch Zugabe von 32 mM NaOH erhöht. Die Fluoreszenzänderung wurde mit FCCP (20  $\mu\text{mol/g}$  Phospholipid) beschleunigt. Die maximale Fluoreszenzintensität ( $Fl_{max}$ ) wurde nach zweiter Zugabe von 32 mM NaOH (pH > 10) erreicht und die minimale ( $Fl_{min}$ ) nach Zugabe von 0,3 M HCl (pH < 5). Die einzelnen Fluoreszenzintensitäten sind im Text erklärt.



Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten (FI) wurde mit  $FI_{\max}$  und  $FI_{\min}$  der  $pH_i$  für alle Zeitpunkte (t) nach Gleichung (10) berechnet. Bei der Berechnung wurde der Fluoreszenzanteil des externen Pyranins ( $FI_{I_e}, FI_{II_e}, FI_{III_e}$ ) berücksichtigt und wie bei Geisler (1993) dargestellt abgezogen. Aus  $pH_i$  wurde die zeitabhängige interne pH-Änderung ( $dpH_i/dt$ ) und die zur Zeit t anliegende Protonenkonzentrationsdifferenz ( $C_{H_i} - C_{H_e}$ ) nach dem ersten pH-Sprung berechnet. Aus den erhaltenen Größen wurde für die Proteoliposomenmembran mit Gleichung (7) der Protonenpermeabilitätskoeffizient ( $P_H$ ) zu  $8,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  bestimmt.

Wie für die Proteoliposomen dargestellt wurde auch die Protonenpermeabilität von Schallliposomen, die Menachinon enthielten, bestimmt. Die Schallliposomenmembran war fast  $10^4$ mal weniger durchlässig für Protonen ( $P_H = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) als die Proteoliposomenmembran. Anscheinend nimmt die Protonenpermeabilität durch den Einbau der großen Proteinmenge (0,2 g Protein/g Phospholipid) stark zu. Die Protonenpermeabilität kann weiterhin durch nicht vollständig entferntes Detergens erhöht werden, das während der Proteoliposomenpräparation eingebracht wurde. Die Präparationsbedingungen wurden aber so gewählt, dass alles Detergens vollständig wieder entfernt sein sollte (Lambert et al. 1998).

Aus  $P_H = 8,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Proteoliposomenmembran kann nach der Nernst-Planck-Gleichung (Gleichung 11) der „Leckfluß“ der Protonen ( $J_H$ ) während eines elektrochemischen Protonenpotentials ( $\Delta\psi$ ) berechnet werden. Entsteht während des Elektronentransports von  $H_2$  zu Fumarat ein Potential über der Proteoliposomenmembran von  $\Delta\psi = -0,16 \text{ V}$  (innen negativ) und kein  $\Delta pH$  wie für Bakterien gezeigt (Mell et al. 1986), fließen bei pH 7,5 Protonen mit einer Geschwindigkeit von  $1,6 \cdot 10^{-12} \text{ mol H}^+ \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  nach innen.

$$J_H = P_H \frac{k \cdot \Delta\psi (C_{H_i} \cdot e^{k \cdot \Delta\psi} - C_{H_a})}{e^{k \cdot \Delta\psi} - 1} \quad \text{mit } k = \frac{F}{RT} \quad (11)$$

Die Proteoliposomen katalysierten den Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat mit 2,6 U/mg Phospholipid. Wenn der  $H^+/e^-$  - Quotient für die Fumarat-Atmung 1 beträgt wie in Abb. 2.2 C postuliert, werden über die Membran mit der spezifischen Oberfläche von  $2,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{g Phospholipid}^{-1}$  die Protonen mit einer Geschwindigkeit von  $3,3 \cdot 10^{-11} \text{ mol H}^+ \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  von innen nach außen transloziert. Die Protonen werden danach 20mal schneller außen freigesetzt als sie durch den „Leckfluß“ wieder nach innen fließen. Durch den „Leckfluß“ sollte das  $\Delta\psi$  nur unwesentlich verkleinert werden.

## 4.2 Bestimmung von $\Delta\psi$

Das elektrochemische Protonenpotential ( $\Delta p$ ) über einer Membran setzt sich aus dem transmembranen elektrischen Protonenpotential ( $\Delta\psi$ ) und dem transmembranen Protonengradienten ( $\Delta p\text{H}$ ) zusammen (Gleichung 12).

$$\Delta p = \Delta\psi - 2,3 \frac{RT}{F} \Delta p\text{H} \quad (12)$$

Die Bestimmung von  $\Delta\psi$  erfolgte anhand der Verteilung lipophiler Ionen über der Proteoliposomenmembran. Lipophile Ionen wie Tetraphenylphosphonium ( $\text{TPP}^+$ ) oder Tetraphenylboranat ( $\text{TPB}^-$ ) können die Membran permeieren und verteilen sich in Abhängigkeit von  $\Delta\psi$  nach der Nernst-Gleichung (Gleichung 13 und 14;  $T_i^+$ ,  $T_i^-$ , interne  $\text{TPP}^+$ - bzw.  $\text{TPB}^-$ -Konzentration;  $T_e^+$ ,  $T_e^-$ , externe  $\text{TPP}^+$ - bzw.  $\text{TPB}^-$ -Konzentration). Das Vorzeichen von  $\Delta\psi$  gibt die Ladung im Inneren der Proteoliposomen an.

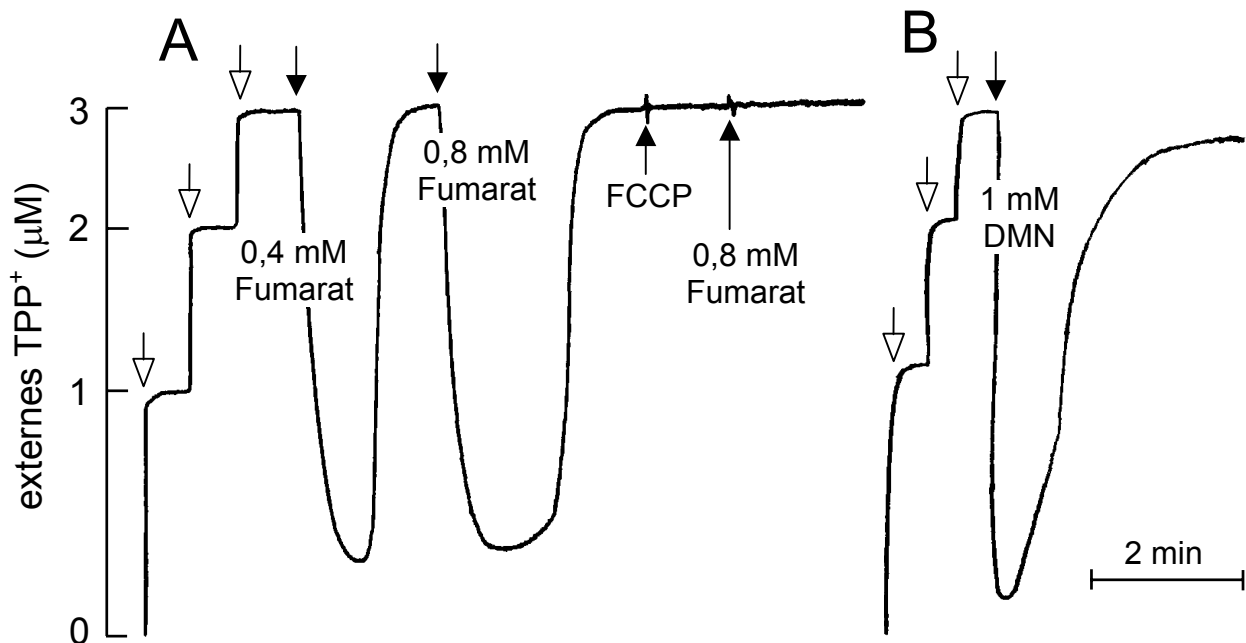
$$-\Delta\psi = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{T_i^+}{T_e^+} \quad (13)$$

$$\Delta\psi = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{T_i^-}{T_e^-} \quad (14)$$

### 4.2.1 Verteilung von lipophilen Ionen über der Proteoliposomenmembran

Für das in Abb. 4.8 A dargestellte Experiment waren Hydrogenase und Fumarat-Reduktase in Liposomen mit Menachinon so eingebaut, dass die Substratzentren beider Enzyme nach außen orientiert waren. Nach Inkubation der Proteoliposomensuspension unter  $\text{H}_2$ -gesättigten Bedingungen wurde  $\text{TPP}^+$  zugegeben und die externe  $\text{TPP}^+$ -Konzentration mit einer  $\text{TPP}^+$ -selektiven Elektrode registriert. Nach Start des Elektronentransports durch Zugabe von Fumarat wurde fast das gesamte externe  $\text{TPP}^+$  von den Proteoliposomen aufgenommen und erst nach Verbrauch des Fumarats wieder in das Medium freigesetzt. Die  $\text{TPP}^+$ -Aufnahme konnte durch eine zweite Fumaratzugabe erneut gestartet werden. In Gegenwart eines Protonophors (FCCP) oder eines Kaliumionophors ( $0,5 \mu\text{mol}$  Valinomycin/g Phospholipid, nicht gezeigt) fand keine  $\text{TPP}^+$ -Aufnahme mehr statt. Die Geschwindigkeit der Fumarat-Reduktion durch  $\text{H}_2$  in Gegenwart von FCCP oder Valinomycin wurde photometrisch bestimmt und war gleich der in Abwesenheit von Entkoppler. Während der Reduktion von DMN durch  $\text{H}_2$  wurde ebenfalls

fast alles externe  $\text{TPP}^+$  von den Proteoliposomen aufgenommen (Abb. 4.8 B). Die  $\text{TPP}^+$ -Aufnahme während der DMN-Reduktion wurde wie für die Fumarat-Reduktion dargestellt in Gegenwart von FCCP oder Valinomycin verhindert (nicht gezeigt). Aus dem Experiment ist zu schließen, dass durch den Elektronentransport von  $\text{H}_2$  zu Fumarat und von  $\text{H}_2$  zu DMN ein  $\Delta\psi$  (innen negativ) über der Proteoliposomenmembran entstand.



**Abb. 4.8. Externe  $\text{TPP}^+$ -Konzentration in einer Proteoliposomensuspension während des Elektronentransports von  $\text{H}_2$  zu Fumarat (A) oder DMN (B).** Die Proteoliposomen enthielten Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase und wurden in  $\text{H}_2$ -gesättigtem Puffer (50 mM HEPES; pH 7,5;  $25^\circ\text{C}$ ) suspendiert (0,4 g Phospholipid/l). Die  $\text{TPP}^+$ -Elektrode wurde durch Zugabe von 3 mal  $1\ \mu\text{M}$   $\text{TPP}^+$  kalibriert. Der Elektronentransport wurde durch Zugabe von Fumarat (A) bzw. DMN (B) gestartet. FCCP wurde mit einer Konzentration von  $20\ \mu\text{mol/g}$  Phospholipid zugegeben. Geöffnete Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der  $\text{TPP}^+$ -Zugabe, geschlossene Pfeile den der Substrat- oder FCCP-Zugabe.

Zur Bestimmung der Größe von  $\Delta\psi$ , wurde die interne  $\text{TPP}^+$ -Konzentration ( $T_i$ ) aus der maximal aufgenommenen  $\text{TPP}^+$ -Menge ( $T_s$ ) nach der Methode von Zaritsky et al. (1981) berechnet (Gleichung 15). Diese Methode berücksichtigt, dass ein Teil des aufgenommenen  $\text{TPP}^+$   $\Delta\psi$ -unabhängig aber abhängig von  $T_i$  und der externen  $\text{TPP}^+$ -Konzentration ( $T_e$ ) an die Proteoliposomenmembran gebunden wird. Die Bindungskonstante ( $K_T$ ) von  $\text{TPP}^+$  für die Proteoliposomenmembran wurde wie in den Methoden beschrieben zu  $53\ \text{ml/g}$  Phospholipid bestimmt. Das Innenvolumen der Proteoliposomen ( $V_i$ ) wurde zuvor zu  $3,5\ \text{ml/g}$  Phospholipid bestimmt (Kapitel 4.1.4). Die interne  $\text{TPP}^+$ -Konzentration ( $T_i$ )<sub>n+1</sub> wurde durch Iteration mit einem angenommenen Wert für ( $T_i$ )<sub>1</sub> berechnet, bis ( $T_i$ )<sub>n+1</sub> gleich ( $T_i$ )<sub>n</sub> war.

$$(T_i)_{n+1} = T_e + \frac{T_s - V_i(T_i)_n}{K_T} \ln \frac{(T_i)_n}{T_e} \quad (15)$$

$T_i$  entsprach 33% von  $T_s$ , das während der Fumarat-Atmung mit  $H_2$  von den Proteoliposomen aufgenommen wurde. Aus  $T_i$  und dem im Medium verbleibendem  $T_e$  wurde nach Gleichung (13)  $\Delta\psi$  berechnet. Während der Fumarat-Atmung mit  $H_2$  entstand ein  $\Delta\psi$  von -191 mV über der Proteoliposomenmembran (Tab. 4.4). Für den Elektronentransport von  $H_2$  zu DMN wurde mit den gleichen Proteoliposomen ein  $\Delta\psi$  von -193 mV bestimmt. Proteoliposomen, die nur Hydrogenase und Menachinon enthielten, erzeugten ein  $\Delta\psi$  gleicher Größe und Richtung während der DMN-Reduktion durch  $H_2$  wie die Proteoliposomen, die beide Enzyme enthielten.

**Tab. 4.4. TPP<sup>+</sup>-Aufnahme der Proteoliposomen während des Elektronentransports.** Die Proteoliposomen enthielten Hydrogenase (Formiat-Dehydrogenase), Menachinon und Fumarat-Reduktase. Die von den Proteoliposomen maximal aufgenommene TPP<sup>+</sup>-Menge ( $T_s$ ) während der Reduktion der angegebenen Elektronenakzeptoren durch die entsprechenden Elektronendonoren wurde wie in Abb. 4.8 dargestellt gemessen. Wenn Formiat (1 mM) oder DMNH<sub>2</sub> (1 mM) als Elektronendonator verwendet wurde, war die Proteoliposomensuspension mit N<sub>2</sub> statt H<sub>2</sub> gesättigt. Die interne TPP<sup>+</sup>-Konzentration ( $T_i$ ) wurde nach Gleichung (15) berechnet.  $\Delta\psi$  wurde aus  $T_i$  und der entsprechenden externen TPP<sup>+</sup>-Konzentration ( $T_e$ ) nach Gleichung (13) berechnet.

Donor	Akzeptor	Aktivität	$T_s$	$T_i$	$T_e$	$\Delta\psi$
		U/mg Phospholipid	$\mu\text{mol/g Phospholipid}$	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M}$ )	(mV)
H <sub>2</sub>	Fumarat	2,6	7,1	666	0,39	-191
H <sub>2</sub>	DMN	6,5	4,8	456	0,25	-193
Formiat	Fumarat	1,4	3,4	240	1,7	-127
Formiat	DMN	3,6	2,4	171	1,2	-129
DMNH <sub>2</sub>	Fumarat	4,1	keine TPP <sup>+</sup> -Aufnahme			

Die Fumarat-Atmung mit Formiat als Elektronendonator erzeugte kein  $\Delta\psi$  in Proteoliposomen, wenn die Formiat-Dehydrogenase statt Hydrogenase nach der gleichen Methode eingebaut wurde. Für die gekoppelte Rekonstitution der Fumarat-Atmung mit Formiat wurde eine alternative Präparationsmethode („Frieren/Tauen“-Methode, siehe Kapitel 3.6.2) gefunden, mit der Formiat-Dehydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase in Liposomen eingebaut wurde. Diese Proteoliposomen erzeugten während des Elektronentransports von Formiat zu Fumarat bzw. DMN ein  $\Delta\psi$  von -127 mV bzw. -129 mV (Tab. 4.4).

Die Oxidation von DMNH<sub>2</sub> durch Fumarat war nicht mit der Aufnahme von TPP<sup>+</sup> gekoppelt (Tab. 4.4). Das wurde mit Proteoliposomen getestet, die Hydrogenase (Formiat-

Dehydrogenase) und Fumarat-Reduktase oder nur Fumarat-Reduktase enthielten. Wenn die Menachinol-Oxidation durch Fumarat ein elektrogener Prozeß ist, sollte in den Proteoliposomen ein innen positives  $\Delta\psi$  während der DMNH<sub>2</sub>-Oxidation durch Fumarat entstehen (Abb. 2.2 D).

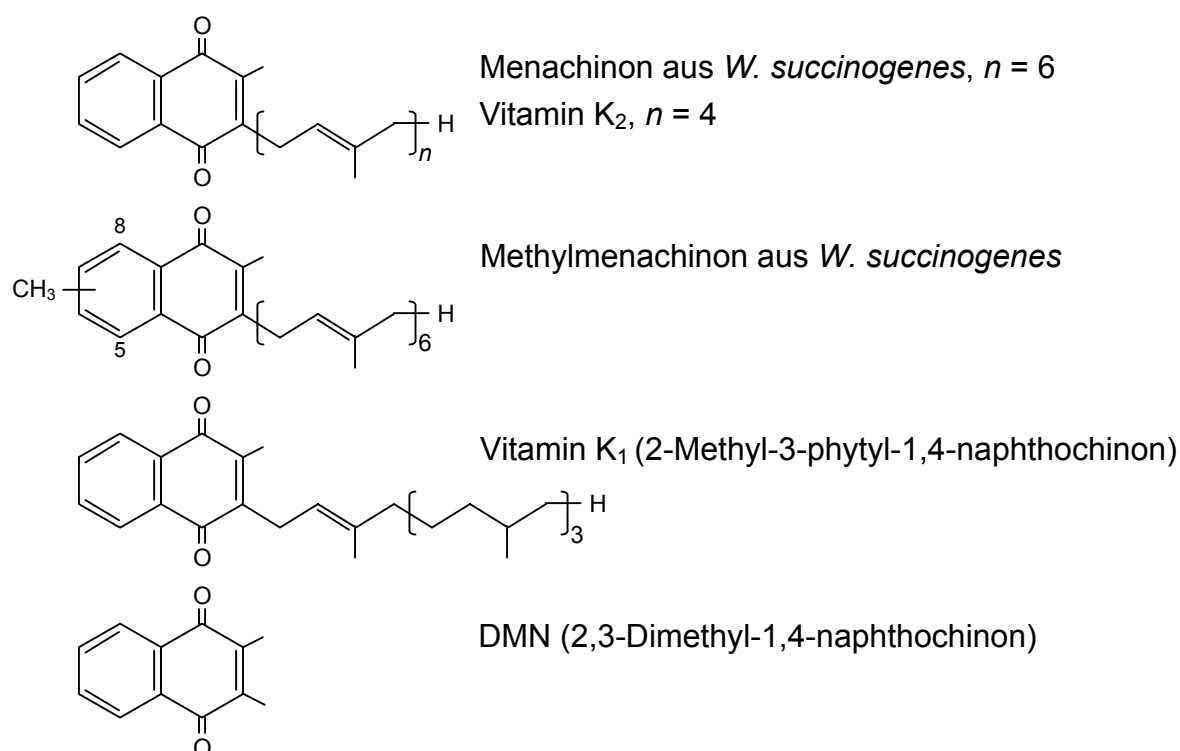
Die Entstehung von  $\Delta\psi > 0$  wurde anhand der Aufnahme von TPB<sup>-</sup> überprüft. Dazu wurden Proteoliposomen mit Fumarat-Reduktase und Hydrogenase präpariert wie für Abb. 4.8 beschrieben. Die TPB<sup>-</sup>-Aufnahme wurden analog dem in Abb. 4.8 beschriebenen Experiment aber mit der TPB<sup>-</sup>-Elektrode durchgeführt. Die Proteoliposomensuspension wurde unter N<sub>2</sub>-gesättigten Bedingungen inkubiert und anschließend schrittweise TPB<sup>-</sup> zugegeben (3 x 1  $\mu$ M). Nach Zugabe von Fumarat und DMNH<sub>2</sub> (jeweils 1 mM) fand keine Änderung der externen TPB<sup>-</sup>-Konzentration statt, d. h. die Proteoliposomen akkumulierten kein TPB<sup>-</sup> während der Reaktion. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn die Proteoliposomen nur Fumarat-Reduktase und Menachinon enthielten. Die DMNH<sub>2</sub>-Oxidation durch Fumarat war danach nicht mit der Entstehung von  $\Delta\psi > 0$  gekoppelt.

#### 4.2.2 $\Delta\psi$ in Abhängigkeit des eingebauten Chinons

Die Zellmembran von *W. succinogenes*, die mit H<sub>2</sub> oder Formiat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor vermehrt wurden, enthält außer Menachinon noch Methylmenachinon in gleichen Mengen von etwa je 3  $\mu$ mol pro g Phospholipid (Collins und Fernandez 1984). Die Methylgruppe im aromatischen Ring von Methylmenachinon sitzt an Position 5 oder 8 (Abb. 4.9). Beide Chinone besitzen 6 Isoprenreste in der Seitenkette. Menachinon und Methylmenachinon wurden aus der Bakterienmembran von *W. succinogenes* extrahiert und chromatographisch voneinander getrennt. Es sollte untersucht werden, ob die  $\Delta\psi$ -Entstehung während der Fumarat-Atmung von der Art des in die Proteoliposomen eingebauten Chinons abhängt. Außer den in *W. succinogenes* enthaltenen Chinonen wurden Vitamin K<sub>2</sub> und Vitamin K<sub>1</sub> getestet, die nur jeweils 4 Isoprenreste in der Seitenkette besitzen und bei Vitamin K<sub>1</sub> zum Teil hydriert sind (Abb. 4.9).

Zur Bestimmung der Chinonabhängigkeit wurden Hydrogenase und Fumarat-Reduktase in Schallliposomen eingebaut, die jeweils eines der zu testenden Chinone oder kein Chinon enthielten, und die Aktivität des Elektronentransports von H<sub>2</sub> zu Fumarat bestimmt (Tab. 4.5). Proteoliposomen, die Menachinon, Vitamin K<sub>2</sub> oder Vitamin K<sub>1</sub> enthielten, katalysierten die Fumarat-Reduktion mit H<sub>2</sub> um eine Größenordnung schneller als Proteoliposomen, die Methylmenachinon enthielten. Die Aktivität in den Methylmenachinon-Proteoliposomen entsprach der, die mit Proteoliposomen ohne Chinon gemessen wurde. Die „Restaktivität“ in den Proteoliposomen ohne Chinon und auch in denen mit Methylmenachinon ist auf die geringe Menachinonmenge zurückzuführen, die in den Enzympräparationen enthalten war. Die Mena-

chinonkonzentration wurde nach Extraktion aus den Proteoliposomen bestimmt und betrug 0,1  $\mu\text{mol}$  Menachinon/g Phospholipid.



**Abb. 4.9. Strukturformeln der verwendeten Chinone.** Die zweite Methylgruppe des Methylmenachinon von *W. succinogenes* sitzt in Position 5 oder 8.

$\Delta\psi$  wurde anhand der  $\text{TPP}^+$ -Aufnahme wie zuvor beschrieben bestimmt und entstand während der Fumarat-Reduktion mit  $\text{H}_2$  nur in den Proteoliposomen, die das aus *W. succinogenes* extrahierte Menachinon oder Vitamin K<sub>2</sub> enthielten (Tab. 4.5). In Proteoliposomen mit Vitamin K<sub>1</sub> dagegen war der Elektronentransport nicht mit der Entstehung von  $\Delta\psi$  gekoppelt. Wie aus den Elektronentransportaktivitäten zu erwarten, wurde kein  $\text{TPP}^+$  von den Proteoliposomen mit Methylmenachinon oder ohne Chinon aufgenommen, wenn sie mit  $\text{H}_2$  und Fumarat versetzt wurden. Die DMN-Reduktion mit  $\text{H}_2$  war nur mit der Entstehung von  $\Delta\psi$  gekoppelt, wenn Menachinon, Methylmenachinon oder Vitamin K<sub>2</sub> in die Proteoliposomen eingebaut wurden. Wenn Vitamin K<sub>1</sub> oder kein Chinon eingebaut war, katalysierten die Proteoliposomen die Reduktion von DMN durch  $\text{H}_2$ , es wurde aber kein  $\Delta\psi$  erzeugt.

Menachinon konnte als Elektronenüberträger in der gekoppelten Fumarat-Atmung nur durch Vitamin K<sub>2</sub> ersetzt werden. Methylmenachinon ist vermutlich nicht in der Fumarat-Atmung involviert, sondern dient als Elektronenmediator für die Polysulfid-Atmung von *W. succinogenes* (siehe Diskussion).

**Tab. 4.5. Enzymaktivitäten und  $\Delta\psi$  von Proteoliposomen mit verschiedenen Chinonen.** Schallliposomen wurden mit verschiedenen Chinonen bzw. ohne Chinon hergestellt und anschließend Hydrogenase und Fumarat-Reduktase eingebaut.  $\Delta\psi$  wurde anhand der TPP<sup>+</sup>-Aufnahme der Proteoliposomen während des Elektronentransports bestimmt. Menachinon und Methylmenachinon wurden aus Zellen von *W. succinogenes* isoliert und mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/g}$  Phospholipid eingesetzt. Vitamin K<sub>1</sub> und Vitamin K<sub>2</sub> wurden mit 20  $\mu\text{mol/g}$  Phospholipid in die Liposomen eingebaut.

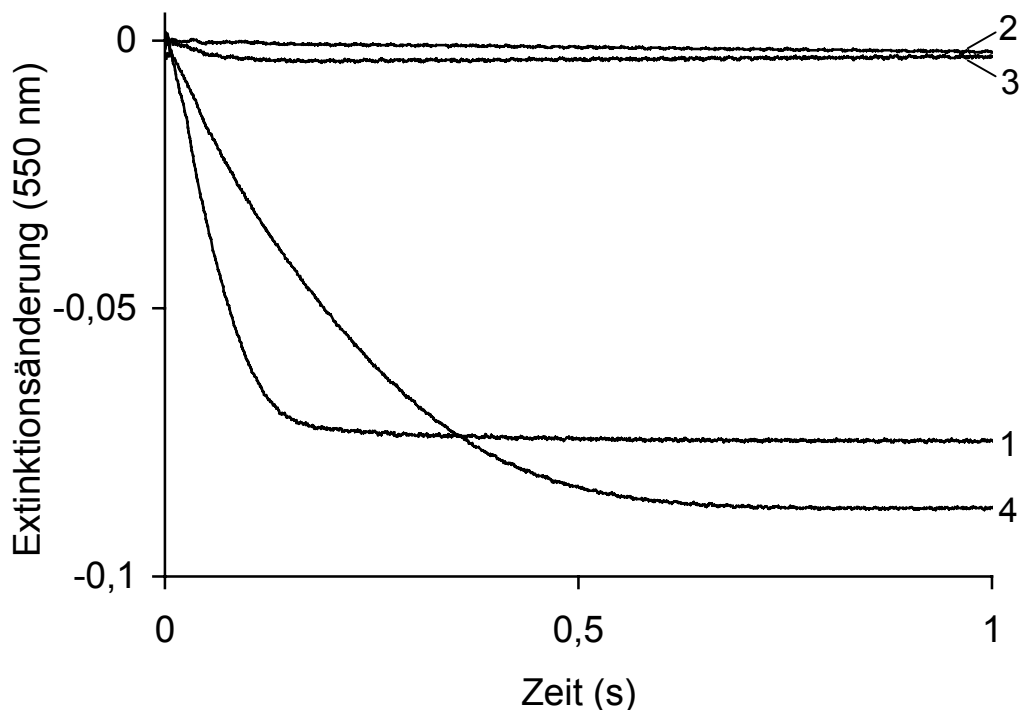
Chinon	Aktivität (U/mg Phospholipid)		$\Delta\psi$ (mV)	
	H <sub>2</sub> → Fumarat	H <sub>2</sub> → DMN	H <sub>2</sub> → Fumarat	H <sub>2</sub> → DMN
	ohne	0,08	3,3	0
Menachinon	1,1	4,8	-172	-178
Methylmenachinon	0,07	4,3	0	-179
Vitamin K <sub>2</sub>	0,85	4,1	-174	-177
Vitamin K <sub>1</sub>	1,0	4,1	0	0

### 4.3 Bestimmung der H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotienten

Die H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotienten der zu untersuchenden Reaktionen (a-e) wurden mit Proteoliposomen bestimmt, denen ein pH-Indikator (Phenolrot) extern zugesetzt wurde. Eine pH-Änderung während des Elektronentransports wurde anhand der Extinktionsänderung von Phenolrot bei 550 nm mit einem Stopped-Flow-Photometer bestimmt (Kannt et al. 1998). Um eine pH-Änderung messen zu können, wurden die Proteoliposomen in Puffer mit niedriger Pufferkapazität (50  $\mu\text{M}$  Hepes, 45 mM KCl und 50 mM Sucrose; pH 7,30) suspendiert und die Entstehung von  $\Delta\psi$  durch Zugabe von Valinomycin (0,5  $\mu\text{mol/g}$  Phospholipid) verhindert. Die zugegebene Valinomycinmenge wurde so gewählt, dass kein TPP<sup>+</sup> während der Reduktion von DMN bzw. Fumarat durch H<sub>2</sub> aufgenommen wird (Kapitel 4.2.1).

Im Experiment von Abb. 4.10 wurden Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase in Liposomen eingebaut und in H<sub>2</sub>-gesättigten Puffer suspendiert. Nach Behandlung mit Valinomycin und Zugabe von Phenolrot wurde der Elektronentransport durch Zugabe kleiner Mengen DMN (hier 7,8  $\mu\text{M}$ ) gestartet und eine Extinktionsabnahme registriert (Abb. 4.10, Kurve 1). Die Extinktionsänderung von Phenolrot wurde durch die tryptische Hydrolyse bekannter Mengen N- $\alpha$ -Tosyl-L-arginyl-O-methylester (TAME) kalibriert (Abb. 4.10, Kurve 4). Bei dieser Reaktion entsteht ein Mol H<sup>+</sup> pro Mol TAME (Sarti et al. 1985). Die maximale Extinktionsabnahme nach DMN-Zugabe entsprach danach der Freisetzung von 15,6  $\mu\text{M}$  H<sup>+</sup>. Aus den freigesetzten Protonen und dem zugegebenen DMN wurde in diesem

Experiment ein  $H^+/e^-$ -Quotient von 1,0 bestimmt. Eine Protonenfreisetzung wurde nicht beobachtet, wenn die Proteoliposomen vorher mit einem Protonophor (FCCP) behandelt waren (Abb. 4.10, Kurve 2). Nach Zugabe von  $DMNH_2$  und Fumarat zu den Proteoliposomen unter  $N_2$ -gesättigten Bedingungen, wurden weder Protonenfreisetzung noch Protonenaufnahme beobachtet (Abb. 4.10, Kurve 3). Proteoliposomen, die nur Fumarat-Reduktase und Menachinon enthielten, zeigten ebenfalls keine Protonenbewegung während der Fumarat-Reduktion durch  $DMNH_2$  (nicht gezeigt).

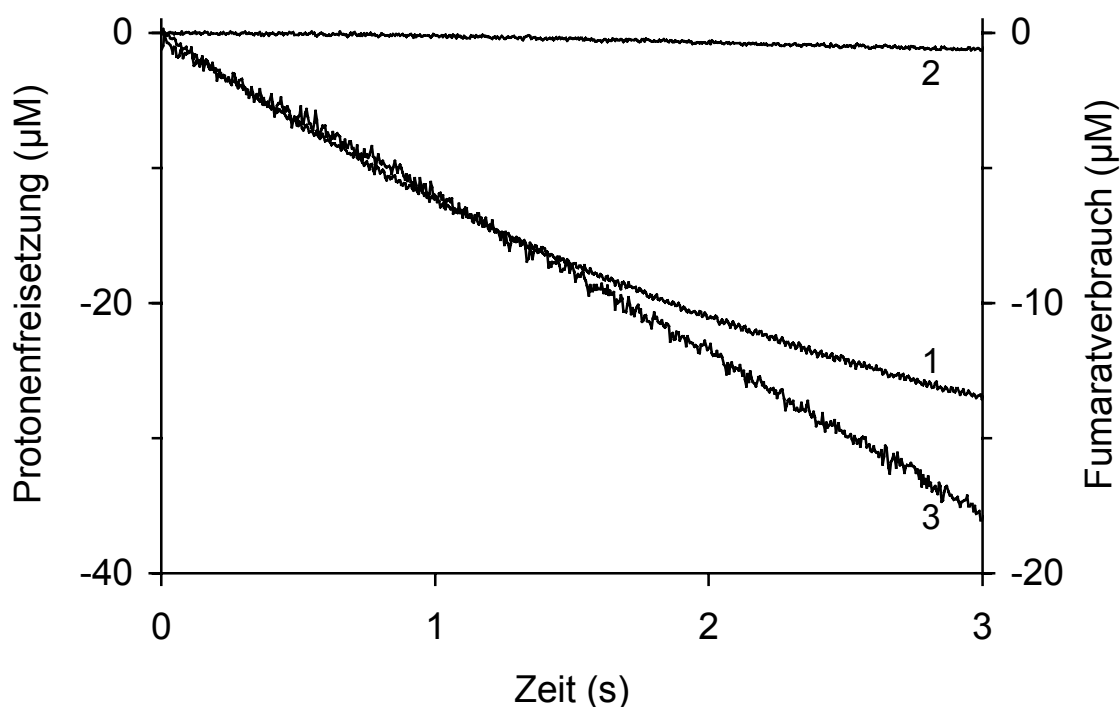


**Abb. 4.10. Protonenbewegung während der DMN-Reduktion durch  $H_2$  und der  $DMNH_2$ -Oxidation durch Fumarat.** Die Proteoliposomen enthielten Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase und wurden für die Messungen vorbereitet wie unter Methoden beschrieben. Die Extinktionsänderung von Phenolrot wurde mit dem Stopped-Flow-Photometer bei 550 nm registriert. Kurve 1: Zugabe von DMN ( $7,8 \mu M$ ) zu der  $H_2$ -gesättigten Proteoliposomensuspension ( $0,9 \text{ g Phospholipid/l}$ ). Kurve 2: wie Kurve 1 in Gegenwart von FCCP ( $20 \mu \text{mol/g Phospholipid}$ ). Kurve 3: Zugabe von Fumarat ( $0,45 \text{ mM}$ ) zu der  $N_2$ -gesättigten Proteoliposomensuspension, die  $0,2 \text{ mM } DMNH_2$  enthielt. Kurve 4: Kalibrierung der Extinktionsänderungen von Phenolrot durch Zugabe von TAME ( $18,2 \mu M$ ) zu der  $H_2$ -gesättigten Proteoliposomensuspension in Gegenwart von  $5 \mu M$  Trypsin.

Der  $H^+/e^-$ -Quotient der Fumarat-Reduktion durch  $H_2$  wurde mit Proteoliposomen bestimmt, die Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase enthielten und wie oben beschrieben behandelt waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fumarat statt DMN gestartet und die Protonenfreisetzung aus der Extinktionsänderung wie für Abb. 4.10 beschrieben bestimmt (Abb. 4.11, Kurve 1). Der Fumarat-Verbrauch wurde aus der Extinktionsabnahme bei 270 nm in einem separaten Versuch unter den gleichen Bedingungen aber in



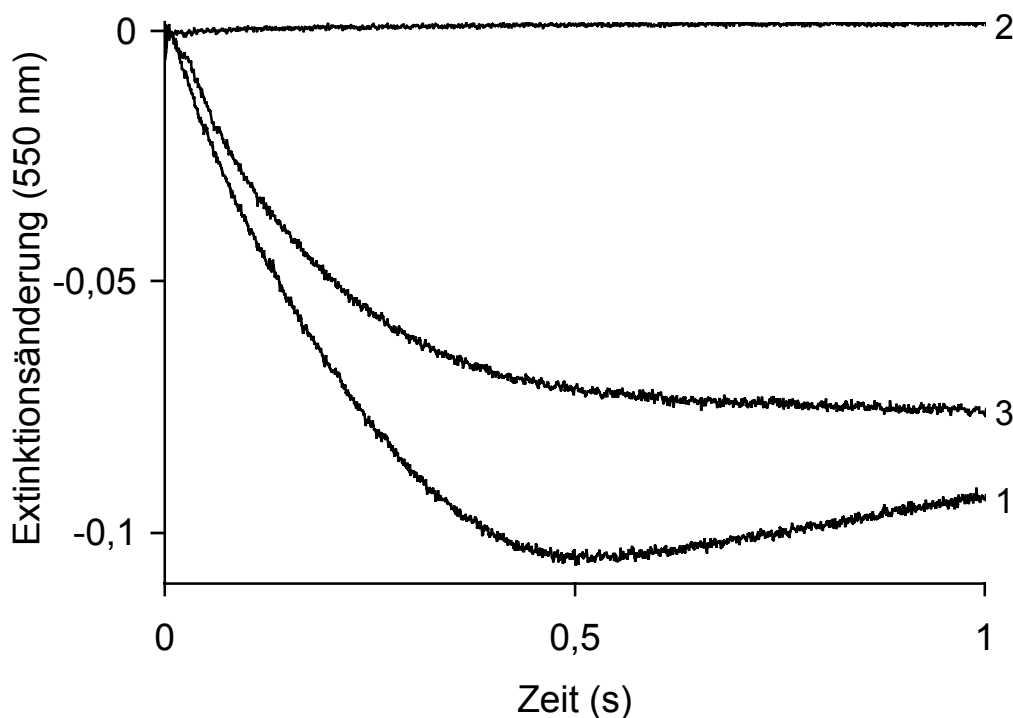
Abwesenheit von Phenolrot bestimmt (Abb. 4.11, Kurve 3). Der  $H^+/e^-$ -Quotient wurde aus dem Verhältnis der Geschwindigkeit der Protonenfreisetzung und des Fumarat-Verbrauchs berechnet. Während der ersten Sekunde war die Geschwindigkeit der Protonenfreisetzung doppelt so schnell wie der Fumarat-Verbrauch und wurde danach langsamer. Die Abnahme der Protonenfreisetzung ist wahrscheinlich mit dem Leckfluß der Protonen durch die Proteoliposomenmembran zu erklären. Der Leckfluß ist vom Protonenpermeabilitätskoeffizienten und dem  $\Delta pH$  über der Membran abhängig. Mit zunehmendem Fumarat-Verbrauch wird  $\Delta pH$  und somit die Geschwindigkeit zurückfließender Protonen größer. In Gegenwart von FCCP fand keine Protonenfreisetzung statt (Abb. 4.11, Kurve 2).



**Abb. 4.11. Protonenfreisetzung und Fumaratverbrauch während der Fumarat-Reduktion mit  $H_2$ .** Die in Abb. 4.11 beschriebenen Proteoliposomen wurden in  $H_2$ -gesättigten Puffer suspendiert (0,9 g Phospholipid/l). Nach Zugabe von 0,45 mM Fumarat zu der Proteoliposomensuspension wurde die Protonenfreisetzung wie in Abb. 4.11 beschrieben bestimmt (Kurve 1). Die Protonenbewegung in Gegenwart von FCCP (20  $\mu\text{mol/g}$  Phospholipid) ist in Kurve 2 dargestellt. Die Fumarat-Reduktion wurde in Abwesenheit von Phenolrot bei 270 nm bestimmt (Kurve 3,  $\epsilon = 0,55 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

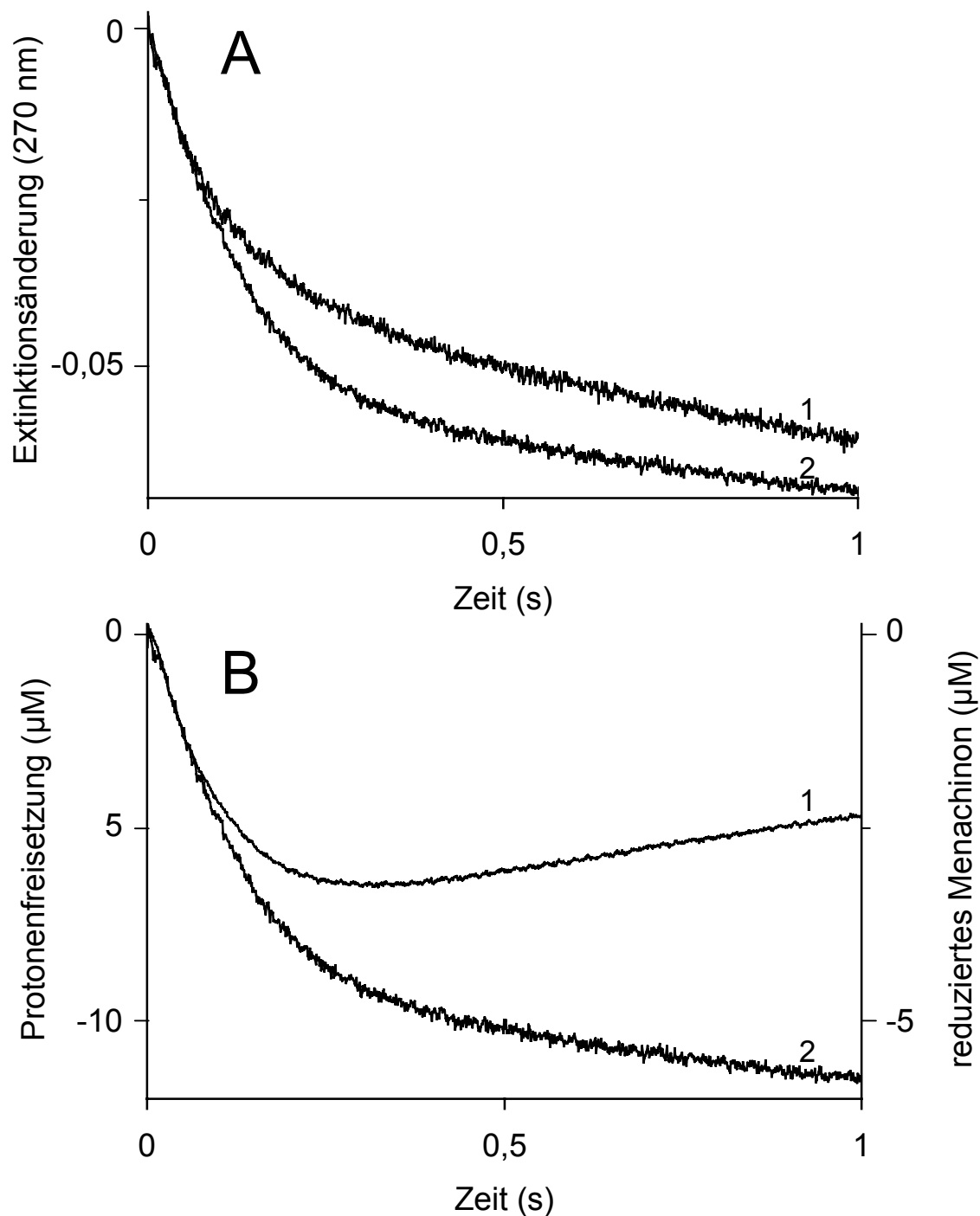
Der  $H^+/e^-$ -Quotient der DMN-Reduktion durch Formiat wurde bestimmt wie für die DMN-Reduktion durch  $H_2$  beschrieben. Die Proteoliposomen enthielten Formiat-Dehydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase und wurden in  $N_2$ -gesättigten Puffer suspendiert. Nach Zugabe von Formiat (im Überschuß) und 6,9  $\mu\text{M}$  DMN zu den Proteoliposomen wurden in diesem Experiment 13,1  $\mu\text{M}$  Protonen freigesetzt, was einem  $H^+/e^-$ -Quotient von 0,95

entspricht (Abb. 4.12, Kurve 1). Die Protonenfreisetzung wurde durch FCCP gehemmt (Abb. 4.12, Kurve 2).



**Abb. 4.12. Protonenbewegung während der DMN-Reduktion durch Formiat.** Die Proteoliposomen enthielten Formiat-Dehydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase und wurden für die Messungen vorbereitet wie unter Methoden beschrieben. Die Experimente wurden durchgeführt wie in Abb. 4.10 beschrieben aber unter  $N_2$ -Atmosphäre. Kurve 1: Extinktionsänderung von Phenolrot nach Zugabe von DMN ( $6,9 \mu M$ ) und Formiat ( $9,1 mM$ ). Kurve 2: wie Kurve 1 in Gegenwart von FCCP ( $20 \mu mol/g$  Phospholipid). Kurve 3: Kalibrierung der Extinktionsänderung von Phenolrot mit TAME ( $9,1 \mu M$ ) und Trypsin ( $5 \mu M$ ).

Der  $H^+/e^-$ -Quotient der Fumarat-Reduktion durch Formiat konnte nicht bestimmt werden. Wenn Formiat zu der Proteoliposomensuspension gegeben wurde, bevor der Elektronentransport durch Fumarat-Zugabe gestartet wurde, fand eine starke Inhibierung der Formiat-Dehydrogenase statt. Wenn die Substrate in umgekehrter Reihenfolge oder gleichzeitig in die Proteoliposomensuspension gemischt wurden, interferierte die Menachinon-Reduktion durch Formiat mit der Bestimmung des Fumarat-Verbrauchs (Abb 4.13 A, Kurve 1). Die Extinktionsänderung bei  $270 nm$  während der Menachinon-Reduktion durch Formiat in Abwesenheit von Fumarat ist in Kurve 2 (Abb 4.13 A) dargestellt. Der  $H^+/e^-$ -Quotient der Menachinon-Reduktion durch Formiat wurde aus der Geschwindigkeit der Menachinon-Reduktion und der entsprechenden Protonenfreisetzung berechnet (Abb 4.13 B). Die Protonenfreisetzung wurde wie oben beschrieben in Gegenwart von Phenolrot in einem separaten Experiment bestimmt.



**Abb. 4.13. Reduktion von Menachinon durch Formiat.** A: Die in Abb. 4.12 beschriebenen Proteoliposomen wurden unter  $N_2$ -Atmosphäre mit 9,1 mM Formiat und 0,45 mM Fumarat (Kurve 1) oder nur mit Formiat (Kurve 2) gemischt und die Extinktionsänderung bei 270 nm in Abwesenheit von Phenolrot registriert. B: Die Protonenfreisetzung nach Zugabe von Formiat (9,1 mM; Kurve 1) wurde bestimmt wie in Abb. 4.12 beschrieben. Die Reduktion von Menachinon (Kurve 2) wurde aus der entsprechenden Extinktionsänderung bei 270 nm (A, Kurve 2) berechnet ( $\Delta\epsilon = 12,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Aus Messungen mit verschiedenen Proteoliposomenpräparationen ergaben sich die in Tab. 4.6 aufgeführten  $H^+/e^-$ -Quotienten. Die durchschnittlichen  $H^+/e^-$ -Quotienten mit  $H_2$  oder Formiat als Elektronendonator und den getesteten Elektronenakzeptoren waren annähernd 1.

Die von der Fumarat-Reduktase katalysierte Fumarat-Reduktion durch  $\text{DMNH}_2$  war nicht mit einer Protonenbewegung gekoppelt.

**Tab. 4.6. Mit Proteoliposomen bestimmte  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Quotienten.** Die Proteoliposomenpräparation (A) enthielt Hydrogenase, Menachinon und Fumarat-Reduktase. In Präparation (B) wurde Hydrogenase durch Formiat-Dehydrogenase ersetzt. Die  $\text{H}^+/\text{e}^-$ -Quotienten wurden wie in den entsprechenden Abbildungen beschrieben bestimmt.  $n$  ist die Anzahl der Messungen mit verschiedenen Proteoliposomenpräparationen.

Präparation	Donor	Akzeptor	$\text{H}^+/\text{e}^-$ -Quotienten	$n$
A	$\text{H}_2$	Fumarat	$1,0 \pm 0,1$	6
A	$\text{H}_2$	DMN	$0,96 \pm 0,04$	10
A und B	$\text{DMNH}_2$	Fumarat	0,0	4
B	Formiat	DMN	$0,98 \pm 0,12$	9
B	Formiat	Menachinon	$0,95 \pm 0,12$	4

## 5 Diskussion

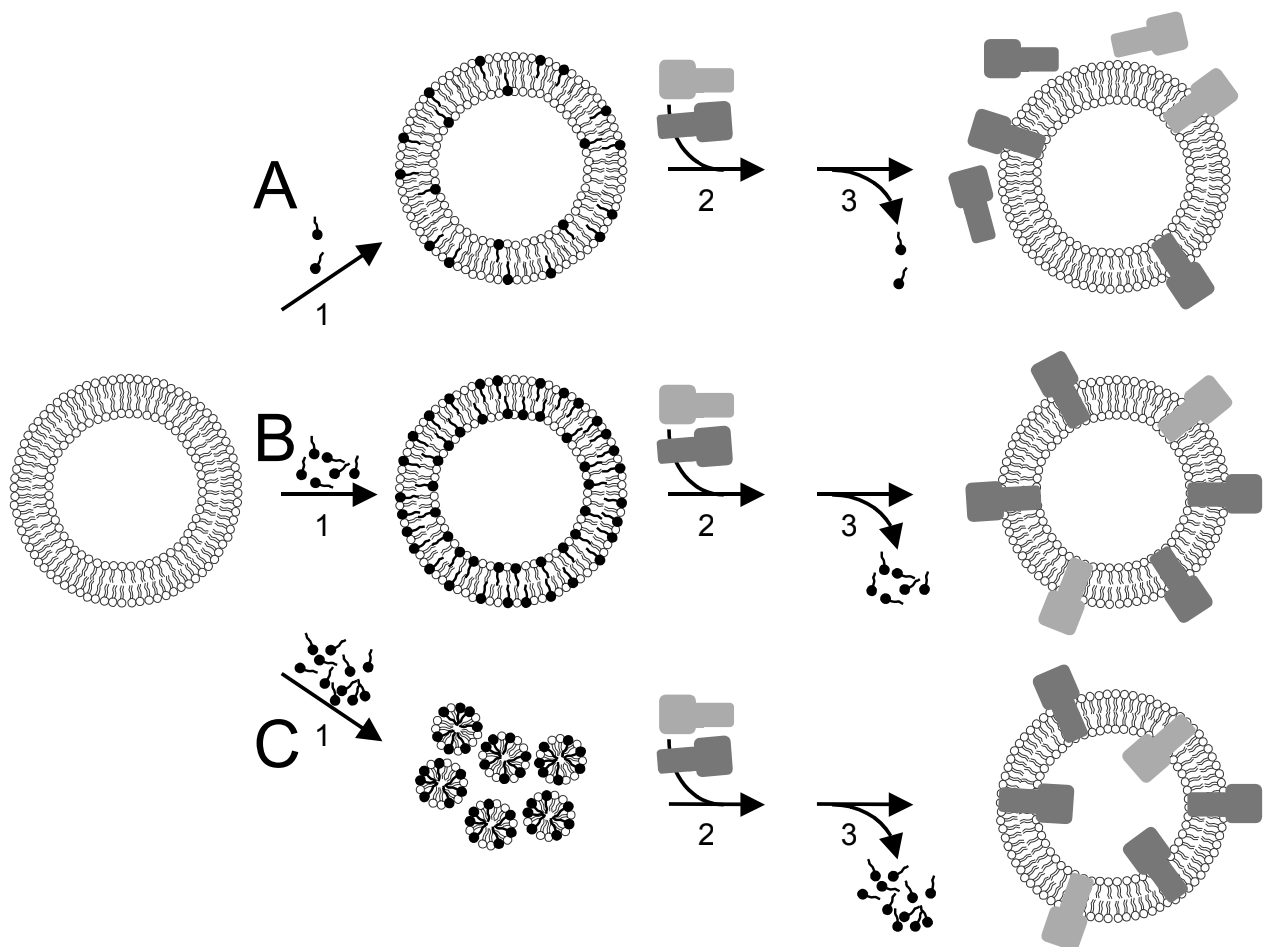
### 5.1 Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen

Die Komplexität von biologischen Membranen erlaubt oftmals keine spezifische funktionelle Analyse von Membranproteinen *in situ*. Die Isolierung und der anschließende Einbau in eine artifizielle Membran bietet daher eine gute Möglichkeit, die Funktion bestimmter Membranproteine zu untersuchen. Auch für die Aufklärung des Mechanismus der Fumarat-Atmung von *W. succinogenes* war es nötig, die beteiligten Enzyme zu isolieren und in Liposomen einzubauen. Frühere Untersuchungen mit Zellen oder invertierten Membranvesikeln konnten nicht ausschließen, dass z. B. der Transport von Fumarat über die Membran einen Einfluß auf die Bestimmung von  $\Delta p$  während der Fumarat-Atmung hatte. Wahrscheinlich ist im Energiestoffwechsel von *W. succinogenes* ein elektroneutraler Fumarat/Succinat-Antiporter für die Fumarat-Aufnahme zuständig (Ullmann et al. 2000), der die Messungen nicht beeinflussen sollte. Es wurden aber noch weitere Dicarboxylat-Transporter gefunden, die Fumarat vermutlich elektrogen über die Membran transportieren.

Einen schnellen Einbau von Membranproteinen in eine Phospholipidmembran erhält man durch die „Frieren/Tauen“-Methode (Kasahara und Hinkle 1977). Hierzu werden durch Ultraschallbehandlung erhaltene Liposomen mit dem Protein gemischt, schnell in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Durch das Frieren brechen wahrscheinlich die Phospholipidvesikel auf und fusionieren während des langsamen Auftauens zusammen mit den Proteinen zu größeren meist vielschichtigen Vesikeln (Pick 1981). Der Proteineinbau wird durch mehrfaches Frieren und Tauen begünstigt. Eine weitere kurze Ultraschallbehandlung führt schließlich zu einer Präparation mit wieder unilamellaren Proteoliposomen. Mit dieser Methode wurden schon in früheren Arbeiten aus *W. succinogenes* isolierte Formiat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase in Liposomen eingebaut (Unden et al. 1983, Unden und Kröger 1982). Dort wurden aber keine Untersuchungen zur  $\Delta p$ -Entstehung während der Fumarat-Atmung durchgeführt.

Der Nachteil der „Frieren/Tauen“-Methode ist, dass die Proteine nur zufällig orientiert in die Liposomen eingebaut werden. Um die in der Einleitung dargestellten hypothetischen Mechanismen zu überprüfen (Abb. 2.1), sind aber Proteoliposomen erforderlich, in denen nur die nach außen orientierten Enzyme an der Fumarat-Atmung teilnehmen. Die „Frieren/Tauen“-Methode konnte daher nur für die Rekonstitution der Fumarat-Atmung mit Formiat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase verwendet werden, da ihre außen zugegebenen Substrate nicht über die Membran diffundieren (Kröger et al. 1980). Die nach innen orientierten Enzyme sind somit nicht an den Reaktionen beteiligt.

Die Liposomenmembran stellt für  $H_2$  dagegen kein Hindernis dar. Für die Rekonstitution der Fumarat-Atmung mit  $H_2$  müssen daher alle Hydrogenasemoleküle in der Proteoliposomenmembran nach außen orientiert sein. Das wurde erreicht, indem Hydrogenase und Fumarat-Reduktase detergensvermittelt direkt in vorgeformte Vesikel (Schallliposomen) eingebaut werden (Rigaud et al. 1995). Die einzelnen Schritte der Rekonstitutionsprozedur sind in Abb. 5.1 dargestellt: (1) Schallliposomen werden zunächst mit einer bestimmten Detergenmenge (hier: Dodecylmaltosid) behandelt. (2) Proteine werden anschließend zu dem Phospholipid/Detergens-Gemisch gegeben. (3) Das Detergens wird schließlich vollständig durch Adsorption an Bio-Beads SM-2 wieder entfernt.



**Abb. 5.1. Detergensvermittelter Einbau von Membranproteinen in Liposomen.** Die Rekonstitutionsprozedur ist schematisch mit „unter-kritischen“ (A), kritischen (B) und „über-kritischen“ (C) Detergens/Phospholipid-Verhältnissen dargestellt. Die einzelnen Schritte (1 bis 3) sind im Text erklärt.

Entscheidend für einen unidirektionalen Einbau von Hydrogenase und Fumarat-Reduktase ist anscheinend das Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis, mit dem die Schallliposomen behandelt wurden. Der Mechanismus des unidirektionalen Proteineinbaus kann wie folgt erklärt werden. Bis zu einem bestimmten (kritischen) Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis behalten die Liposomen noch weitgehend ihre vesikuläre Struktur während der Präparation (Abb 5.1 A, B). In die Detergens enthaltene Liposomenmembran lagert sich bevorzugt der

hydrophobe Teil der Enzyme (HydC bzw. FrdC) an. Die großen hydrophilen Enzymbestandteile (HydAB bzw. FrdAB) gelangen jedoch nicht über die Membran in das Innere der intakten Vesikel. Wenn die Liposomen mit einem „über-kritischen“ Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis behandelt werden, lysieren die Vesikel (Abb 5.1 C). Es bilden sich Micellen aus Phospholipid und Detergens bzw. nach Proteinzugabe gemischte Phospholipid/Detergens/Protein-Micellen. Die anschließende Detergensentfernung führt zu Proteoliposomenvesikeln mit zufällig orientierten Proteinen. Dieser als Micellen-Vesikel-Transition bezeichnete Prozeß ist allerdings noch nicht eindeutig verstanden (Ollivon et al. 2000). Der Einfluß der Detergensbehandlung auf die Liposomenstruktur und die endgültige Protein-Orientierung wurde durch ausführliche Rekonstitutionsstudien mit Bacteriorhodopsin und verschiedenen ATP-Synthasen untersucht (Lambert et al. 1998, Pitard et al. 1996, Paternostre et al. 1988).

Um alle eingesetzten Enzymmoleküle einzubauen, mußten die Liposomen mindestens mit dem kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis gesättigt sein (Abb. 5.1 B). Geringere Dodecylmaltosidmengen konnten anscheinend den Einbau von Hydrogenase und Fumarat-Reduktase nicht ausreichend vermitteln (Abb. 5.1 A). Mit abnehmendem Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis waren immer weniger Proteine in die Liposomenmembran eingebaut, die dann nicht am Elektronentransport  $H_2$  zu Fumarat teilnehmen können. Wie zu erwarten, war in diesen „unter-kritischen“ Proteoliposomenpräparationen die Elektronentransportaktivität kleiner als in Proteoliposomen, die mit dem kritischen Dodecylmaltosid/Phospholipid-Verhältnis präpariert wurden.

Die  $TPP^+$ -Aufnahme durch die Proteoliposomen während des Elektronentransports von  $H_2$  zu Fumarat oder DMN ist ebenfalls von der Menge des eingebauten Proteins abhängig. Je weniger Enzymmoleküle eingebaut werden, desto größer ist vermutlich der Anteil von Liposomen, die weder Hydrogenase noch Fumarat-Reduktase enthalten und so nicht an der  $TPP^+$ -Aufnahme beteiligt sind. Am größten war die  $TPP^+$ -Aufnahme in Proteoliposomenpräparationen, die mit der kritischen Dodecylmaltosidmenge erhalten wurden (Abb. 5.1 B). Alle eingesetzten Enzymmoleküle waren in der Membran eingebaut und außerdem alle Substratzentren nach außen orientiert. Wenn alle Hydrogenasemoleküle zwar eingebaut aber zum Teil nach innen gerichtet waren (Abb. 5.1 C), war die  $TPP^+$ -Aufnahme wieder geringer als in den kritischen Proteoliposomenpräparationen. In diesen Proteoliposomen entsteht während der Menachinon-Reduktion mit  $H_2$  durch die nach außen orientierten Hydrogenasemoleküle ein  $\Delta\psi < 0$  (innen negativ). Die nach innen orientierten Hydrogenasemoleküle erzeugen wahrscheinlich gleichzeitig ein  $\Delta\psi$  entgegengesetzter Richtung, so dass der Betrag des gesamten  $\Delta\psi$  über der Membran erniedrigt wird. Wenn die Hälfte aller Hydrogenasemoleküle nach innen gerichtet wäre, sollte theoretisch  $\Delta\psi = 0$  sein und keine  $TPP^+$ -Aufnahme im steady state des Elektronentransports stattfinden.

## 5.2 Energetische Betrachtung der Fumarat-Atmung

Der Elektronentransport von H<sub>2</sub> oder Formiat zu Fumarat in der Bakterienmembran von *W. succinogenes* ist mit der Entstehung eines elektrochemischen Protonenpotentials ( $\Delta p$ ) gekoppelt (Geisler et al. 1994, Mell et al. 1986). Der H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient der apparenten Protonentranslokation kann nur bestimmt werden, wenn das elektrische Protonenpotential ( $\Delta\psi$ ) gegen 0 geht. Es wird generell angenommen, dass das gleiche Verhältnis von Protonen- und Elektronentransfer in Gegenwart und in Abwesenheit von  $\Delta\psi$  gültig ist. Die freie Energie, die durch die apparente Protonentranslokation über die Membran gespeichert wird, kann nicht größer sein als die Energie, die durch die treibende Redoxreaktion frei wird. Aus der Redoxpotentialdifferenz ( $\Delta E$ ) der Reaktion und  $\Delta p$  kann nach Gleichung (16) der H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient berechnet werden, wenn die energetische Effizienz ( $q$ ) des Prozesses bekannt ist (Kröger et al. 2002).

$$\frac{n \text{ H}^+}{n \text{ e}^-} = q \frac{\Delta E}{\Delta p} \quad (16)$$

Bei  $q = 1$  ist der theoretisch maximale H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient der Fumarat-Atmung mit H<sub>2</sub> gleich 2,6, wenn für die Berechnung das mit Bakterien bestimmte  $\Delta p = 0,17 \text{ V}$  und  $\Delta E = \Delta E_0' = 0,45 \text{ V}$  [aus  $E_0'(\text{H}^+/\text{H}_2) = -0,42 \text{ V}$  und  $E_0'(\text{Fumarat}/\text{Succinat}) = +0,03 \text{ V}$  (Thauer et al. 1977)] eingesetzt wird (Tab. 5.1). Wenn der tatsächliche H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient 1 oder 2 ist, wäre die energetische Effizienz der Fumarat-Atmung unter diesen Bedingungen 0,38 bzw. 0,76. Die gleichen Werte sind auch für die Fumarat-Atmung mit Formiat gültig [ $E_0'(\text{HCO}_2^-/\text{HCO}_3^-) = -0,42 \text{ V}$ ]. Für die aerobe Atmung mit NADH als Elektronendonator wurde in Mitochondrien eine energetische Effizienz von  $q = 0,57$  bestimmt (Hinkle et al. 1991). Welche Energieausbeute für die anaerobe Atmung mit H<sub>2</sub> (oder Formiat) und Fumarat im Vergleich zur mitochondrialen Atmung wahrscheinlicher ist, läßt sich nicht vorhersagen. Mit diesen theoretischen Überlegungen kann weder ein H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient von 1 noch von 2 ausgeschlossen werden kann.

Der theoretisch maximale H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient der Fumarat-Reduktion durch Menachinol in der Bakterienmembran berechnet sich zu 0,6 (Tab. 5.1). Dazu wurde angenommen, dass das Redoxpotential des Menachinon/Menachinol-Redoxpaares gleich seinem Standardredoxpotential in organischer Lösung ist [ $E_0'(\text{MK}/\text{MKH}_2) = -0,074 \text{ V}$  (Schnorf 1996)]. Diese Annahme stimmt mit dem Befund überein, dass das Menachinon/Menachinol-Verhältnis in der Membran von *W. succinogenes* während der Fumarat-Atmung nahe 1 ist (Kröger und Innerhofer 1976). Weiterhin wurde bestimmt, dass das Standardredoxpotential von Menachinon/Menachinol in der Bakterienmembran ähnlich dem in organischer Lösung ist (Liebl et al. 1992). Unter diesen Bedingungen wäre der tatsächliche H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient der Fumarat-



Reduktion durch Menachinol kleiner als 0,6. Für die Oxidation von  $H_2$  oder Formiat durch Menachinon ergibt sich aus den entsprechenden Standardredoxpotentialen und  $\Delta p = 0,17$  V ein maximaler  $H^+/e^-$ -Quotient von 2,0. Mit einer energetischen Effizienz von 0,5 könnten während dieser Redoxreaktion Protonen mit einem  $H^+/e^-$ -Quotient von 1 über die Membran transloziert werden.

**Tab. 5.1. Theoretische  $H^+/e^-$ -Quotienten der Fumarat-Atmung und ihrer Teilreaktionen.** Die maximalen  $H^+/e^-$ -Quotienten wurden nach Gleichung (16) mit  $\Delta p = 0,17$  V berechnet.  $q$  ist das Verhältnis des angenommenen zum maximalen  $H^+/e^-$ -Quotienten.

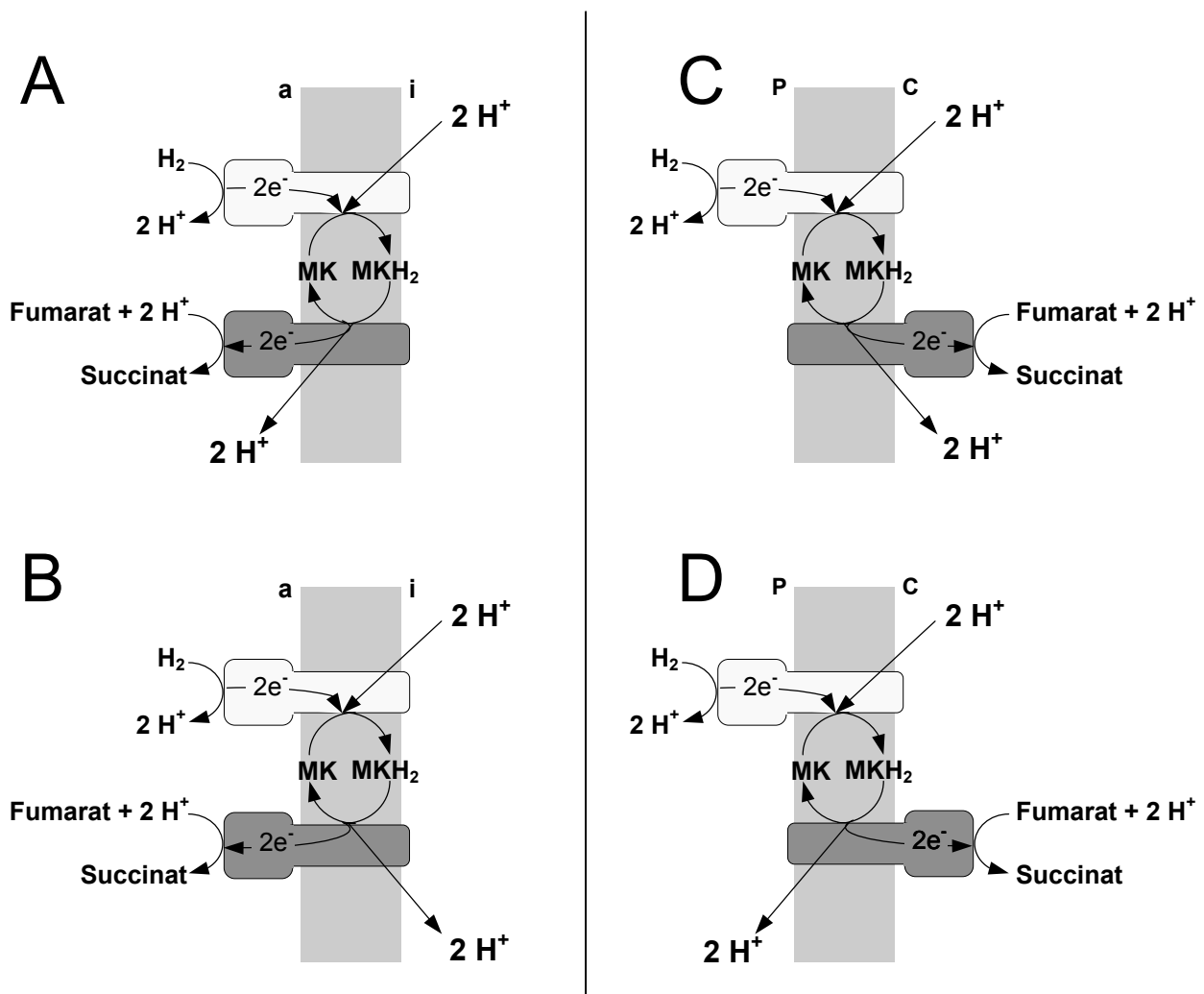
Redoxreaktion	$\Delta E_0'$ (V)	$H^+/e^-$		$q$
		maximal	angenommen	
$H_2 + \text{Fumarat} \rightarrow \text{Succinat}$	0,45	2,6	1	0,38
$HCO_2^- + \text{Fumarat} + H_2O \rightarrow HCO_3^- + \text{Succinat}$	0,45	2,6	1	0,37
$MKH_2 + \text{Fumarat} \rightarrow \text{MK} + \text{Succinat}$	0,104	0,6	0	0
$H_2 + \text{MK} \rightarrow MKH_2$	0,346	2,0	1	0,50
$HCO_2^- + \text{MK} + H_2O \rightarrow HCO_3^- + MKH_2$	0,346	2,0	1	0,50

### 5.3 Mechanismus der $\Delta p$ -Entstehung

Um den Mechanismus der  $\Delta p$ -Entstehung während der Fumarat-Atmung zu klären, wurden die beiden in Abb. 5.2 gezeigten Arbeitshypothesen aufgestellt. Abb. 5.2 A und B gelten für Proteoliposomen, die sowohl Hydrogenase als auch Fumarat-Reduktase ausschließlich nach außen orientiert enthalten. In beiden Mechanismen wird angenommen, dass die Oxidation von  $H_2$  durch Menachinon ein elektrogener Prozeß mit einem  $H^+/e^-$ -Quotient von 1 ist. Die für die Menachinon-Reduktion verbrauchten Protonen werden von der Innenseite der Proteoliposomen aufgenommen. Gleichzeitig werden Protonen durch die  $H_2$ -Oxidation außen frei. Die Oxidation von Menachinol durch Fumarat ist in Abb. 5.2 A als elektroneutraler und in Abb. 5.2 B dagegen als elektrogener Prozeß dargestellt. In Abb. 5.2 A werden die während der Menachinol-Oxidation frei werdenden Protonen außen abgegeben. Die gleiche Anzahl Protonen werden dort durch die Fumarat-Reduktion verbraucht. In diesem Modell ist der Elektronentransport von Menachinol zu Fumarat mit keiner Protonentranslokation über die Membran gekoppelt. Der  $H^+/e^-$ -Quotient der Fumarat-Reduktion durch  $H_2$  sollte daher wie bei der Menachinon-Reduktion durch  $H_2$  gleich 1 sein. Die Fumarat-Atmung mit  $H_2$  ist dagegen in Proteoliposomen ein elektroneutraler Prozeß, wenn die Menachinol-Oxidation durch

Fumarat elektrogen ist (Abb. 5.2 B). Auf beiden Seiten der Proteoliposomenmembran gleichen sich in diesem Modell frei werdende und verbrauchte Protonen aus. Der  $H^+/e^-$ -Quotient der Fumarat-Reduktion durch  $H_2$  wäre nach dieser Hypothese gleich 0.

Die Ergebnisse, die experimentell mit Proteoliposomen erhalten wurden, stimmen mit dem Mechanismus von Abb. 5.2 A überein und schließen den in Abb. 5.2 B dargestellten aus. Es wurde gezeigt, dass der Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat genau wie der von  $H_2$  zu DMN mit der Entstehung von  $\Delta p$  gekoppelt war. Der  $H^+/e^-$ -Quotient war sowohl für die Fumarat- als auch für die DMN-Reduktion durch  $H_2$  gleich 1. Daraus ergibt sich, dass die Menachinol-Oxidation durch Fumarat ein elektroneutraler Prozeß sein muss. Diese Folgerung wird durch das Ergebnis unterstützt, dass die Oxidation von  $DMNH_2$  durch Fumarat nicht mit der Aufnahme von  $TPP^+$  oder  $TPB^-$  durch die Proteoliposomen gekoppelt war. Weiterhin wurde während der von der Fumarat-Reduktase katalysierten Reaktion keine Protonenbewegung beobachtet, wenn die Proteoliposomen mit Valinomycin und  $K^+$  behandelt waren.

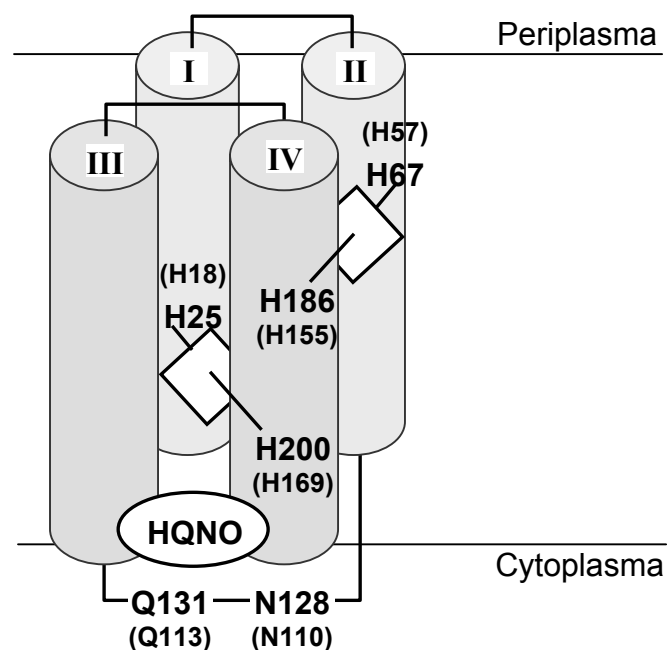


**Abb. 5.2. Hypothetische Mechanismen der Entstehung von  $\Delta p$  während der Fumarat-Atmung mit  $H_2$  in Proteoliposomen (A, B) und Zellen (C, D).** a, außen; i, innen; P, Periplasma; C, Cytoplasma. Die gleichen Mechanismen gelten auch für die Fumarat-Atmung mit Formiat.

In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass auch in Zellen und invertierten Membranvesikeln von *W. succinogenes* kein  $\Delta p$  während der Oxidation von DMNH<sub>2</sub> mit Fumarat entsteht (Geisler et al. 1994). Außerdem akkumulierten invertierte Membranvesikel während der Fumarat-Atmung mit H<sub>2</sub> SCN<sup>-</sup> und der H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient war nahe 1 (Mell et al. 1986). In diesen Vesikeln ist die Hydrogenase nach innen und die Fumarat-Reduktase nach außen orientiert. Wenn die Fumarat-Reduktion mit Menachinol ein elektrogener Prozeß ist, sollte im Gegensatz zu den experimentellen Daten mit invertierten Membranvesikeln oder Zellen ein H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient von 2 für die Fumarat-Reduktion mit H<sub>2</sub> bestimmt werden (Abb. 5.2 D). Der H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient für die Fumarat-Atmung ist aber offensichtlich unabhängig von der Orientierung der Enzyme zueinander und ist in invertierten Membranvesikeln und Proteoliposomen gleich. Die Ergebnisse bestätigen somit die Hypothese, dass die Fumarat-Reduktion durch Menachinol weder in der Bakterienmembran (Abb. 5.2 C) noch in der Proteoliposomenmembran (Abb. 5.2 A) mit einer Protonentranslokation über die Membran gekoppelt ist. Das  $\Delta p$  entsteht somit während der Fumarat-Atmung mit H<sub>2</sub> ausschließlich durch die von der Hydrogenase katalysierten Reaktion. Der gleiche Mechanismus wurde auch für die Fumarat-Atmung mit Formiat als Elektronendonator gefunden.

Die Ansicht, dass die bei der Reduktion von Menachinon verbrauchten Protonen von der Innenseite der Proteoliposomen (Abb. 5.2 A, B) bzw. aus dem Cytoplasma der Zellen von *W. succinogenes* (Abb. 5.2 C, D) aufgenommen werden, wird durch die Kristallstruktur des Komplexes aus Formiat-Dehydrogenase-N von *E. coli* und HQNO (2-(Heptyl)-4-hydroxychinolin-*N*-oxid) unterstützt (Jormakka et al. 2002). Die Formiat-Dehydrogenase-N besteht aus drei Untereinheiten (FdnGHI), die in Zusammensetzung und Aminosäuresequenzen ähnlich der *W. succinogenes*-Formiat-Dehydrogenase ist (Berg et al. 1991, Kröger et al. 2002). Beide Enzyme sind durch ein verwandtes Dihäm-Cytochrom *b* in die Membran integriert, an denen Menachinon reduziert wird. Die Cytochrom *b*-Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase-N (FdnI) ist auch dem Cytochrom *b* der Hydrogenase (HydC) ähnlich (Berks et al. 1995). Die Menachinon-Reduktion durch Formiat oder H<sub>2</sub> wird in *W. succinogenes* durch NQNO (2-*n*-Nonyl-4-hydroxychinolin-*N*-oxid) gehemmt (Kröger et al. 1979). NQNO ist wie HQNO ein Menasemichinon-Analogon. In der Kristallstruktur bindet HQNO an FdnI von *E. coli* nahe dem distalen Häm *b* und der cytoplasmatischen Membranoberfläche (Jormakka et al. 2002). HQNO liegt dort in unmittelbarer Nähe zu dem axialen Hämliganden (H169) in Helix IV und zu einem Asparagin (N110) und Glutamin (Q113) der Peptidkette, die Helix II und III verbindet (Abb. 5.3). Alle drei Reste sind in HydC (H200, N128, Q131) und in auch in FdhC von *W. succinogenes* konserviert (Berks et al. 1995). Der Austausch von N128 gegen Aspartat und Q131 gegen Leucin in HydC führte zu Mutanten, die nicht mit H<sub>2</sub> und Fumarat wachsen (Biel et al. 2002). Die mit Formiat und Fumarat vermehrten Mutanten enthielten aber membranständige Hydrogenase. Die spezifischen Aktivitäten der DMN-Reduktion durch H<sub>2</sub>, die mit der Membranfraktion der Mutanten gemessen wurden, waren maximal 6 % der Wildtyp-Aktivität. Die Reduktion von Benzylviologen durch H<sub>2</sub> blieb dage-

gen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Die Inhibierung der DMN-Reduktion, für die HydC essentiell ist (Groß et al. 1998b, Droß et al. 1992), war nicht vom Verlust einer oder beider Hämgruppen abhängig. Nach Extraktion der Membranfraktion der Mutanten mit Triton X-100 konnte die gleiche Menge Häm *b* durch H<sub>2</sub> reduziert werden (0,3 µmol/g Protein) wie für die Wildtyp-Membran gezeigt (Groß et al. 1998b). Der Austausch des nicht konservierten Restes H122 in der Helix II und III verbindenden Peptidkette führte dagegen in bezug auf Wachstum und Enzymaktivitäten zu Mutanten mit Wildtyp-Eigenschaften (Biel et al. 2002). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass N128 und Q131 zum aktiven Zentrum der Menachinon-Reduktion von HydC gehören, das vermutlich wie bei FdnI von *E. coli* an der cytoplasmatischen Membranoberfläche lokalisiert ist.



**Abb. 5.3. Hypothetische Struktur des Cytochroms *b* der Hydrogenase (HydC) von *W. succinogenes*.** Die Anordnung der axialen Liganden der Hämgruppen (Rauten) und die Lage des HQNO-Moleküls im Chinonzentrum ist der Kristallstruktur des Cytochroms *b* der Formiat-Dehydrogenase-N (FdnI) von *E. coli* (Jormakka et al. 2002) entsprechend gezeichnet. Die Nummerierung der Aminosäurereste entspricht HydC und ist für FdnI in Klammern angegeben.

#### 5.4 Die Bindungsstelle für Menachinol in der Fumarat-Reduktase

Die oben diskutierten experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die durch die Fumarat-Reduktase katalysierte Oxidation von Menachinol durch Fumarat ein elektroneutraler Prozess ist. Die während der Menachinol-Oxidation frei werdenden Protonen müssen nach diesem Modell in das Cytoplasma abgegeben werden, wo die gleiche Anzahl Protonen für die Fumarat-Reduktion verbraucht werden (Abb 5.2 C). Das aktive Zentrum der Menachinol-Oxidation ist in der Fumarat-Reduktase aber wahrscheinlich in der Nähe der periplasmatischen Membranoberfläche lokalisiert. Das wurde aus der Kristallstruktur eines Fumarat-

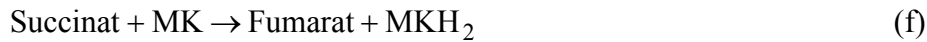
Reduktase/DMN- bzw. Fumarat-Reduktase/Vitamin K<sub>2</sub>-Komplexes abgeleitet. Dort befinden sich beide Naphthochinone jeweils in der Nähe der distalen, d. h. zum Periplasma gerichteten Hämgruppe in FrdC (Roy Lancaster, persönliche Mitteilung). Zwischen dieser möglichen Menachinol-Bindungsstelle und der periplasmatischen Membranoberfläche befindet sich ein Glutamat-Rest (E66), der wahrscheinlich an der Oxidation von Menachinol beteiligt ist (Lancaster et al. 2000). Nach Austausch von E66 durch Glutamin wurde eine Mutante (E66Q) erhalten, die nicht mehr die Oxidation von DMNH<sub>2</sub> durch Fumarat katalysiert. Die Aktivität der Fumarat-Reduktion durch reduziertes Benzylviologen blieb unbeeinflusst. Kristallographische Untersuchungen ergaben keine signifikanten strukturellen Änderungen des varianten Enzyms im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Obwohl die Mittelpunktpotentiale beider Hämgruppen durch den Austausch E66Q nicht verändert waren, konnte im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym kein Häm *b* durch DMNH<sub>2</sub> reduziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der Menachinol-Oxidation nur von der Abwesenheit der Carboxyl-Gruppe von E66 abhängig ist. Im Wildtyp-Enzym könnte E66 eines der bei der Menachinol-Oxidation frei werdenden Protonen aufnehmen und über eine sich bis zum Periplasma erstreckende Spalte freisetzen. Es gibt keine strukturellen Hinweise für einen Protonenkanal in FrdC, der die frei werdenden Protonen von der Menachinol-Bindungsstelle in das Cytoplasma leiten könnte. Das würde aber bedeuten, dass die Oxidation von Menachinol durch Fumarat in *W. succinogenes* ein elektrogener Prozess mit einem H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Quotient von 1 ist, was aber durch die experimentellen Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

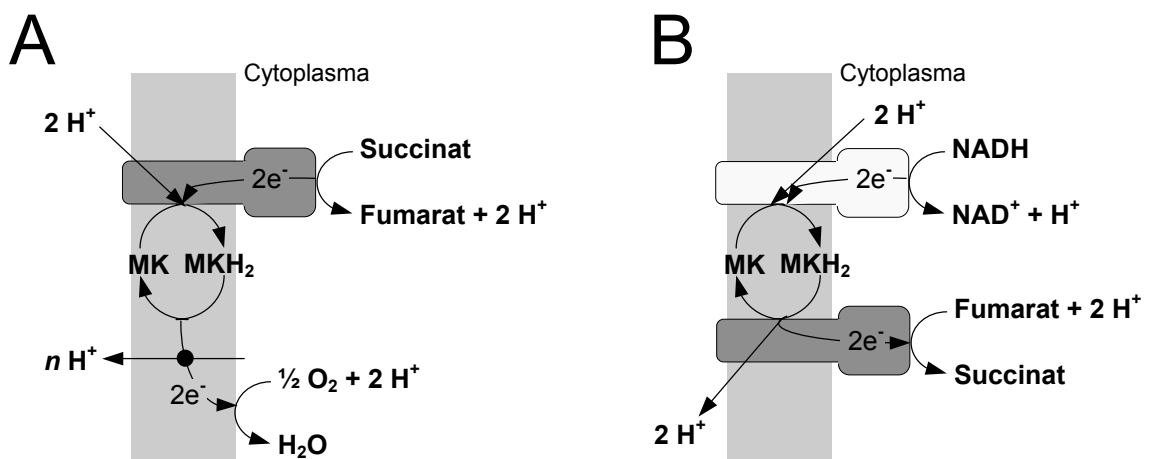
## 5.5 Die Succinat-Dehydrogenase von *Bacillus subtilis*

In der Zellmembran von *B. subtilis* ist die Succinat-Dehydrogenase (Sdh) ein Teil der aeroben Atmungskette und katalysiert dort die Oxidation von Succinat durch Menachinon (Reaktion (f), Hägerhäll 1997). Die stark endergone Reaktion ( $\Delta G_0' = +20$  kJ/mol Succinat) wird wahrscheinlich durch ein  $\Delta p$  über der Membran getrieben, so dass reverser Elektronentransport stattfinden kann (Schirawski und Unden 1998). Der hypothetische Mechanismus der Succinat-Oxidation durch Menachinon ist in Abb. 5.4 A dargestellt. Die Succinat-Oxidation ist mit der Protonenfreisetzung in das Cytoplasma und die Menachinon-Reduktion mit der Protonenaufnahme von außen gekoppelt. Das für den Vorgang benötigte  $\Delta p$  entsteht durch die Oxidation von Menachinol durch O<sub>2</sub>. Mit einer apparenten Protonentranslokation von 1 H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> während der Succinat-Oxidation durch Menachinon in Richtung des  $\Delta p$  und einem  $\Delta p = -0,17$  V über der Membran (innen negativ) wäre Reaktion (f) mit  $\Delta G_0' = -13$  kJ/mol Succinat exergon (Kröger et al. 2002). Mit diesem hypothetischen Mechanismus kann erklärt werden, dass die Aktivität der Succinat-Oxidation mit O<sub>2</sub> bzw. mit

Menachinon in Zellen von *B. subtilis* durch einen Protonophor gehemmt wird (Schirawski und Unden 1998).



Die Succinat-Dehydrogenase von *B. subtilis* katalysiert Reaktion (f) auch in umgekehrter Richtung. Die Wechselzahlen für die Fumarat-Reduktion mit verschiedenen Hydrochinonen (z. B. DMNH<sub>2</sub>) entsprechen denen der Fumarat-Reduktase von *W. succinogenes* (Lemma et al. 1991). Wenn Reaktion (f) durch  $\Delta p$  getrieben wird, sollte die umgekehrte Reaktion (Fumarat-Reduktion durch Menachinol) ein  $\Delta p$  erzeugen (Abb. 5.4 B). Tatsächlich wurde gefunden, dass in Zellen von *B. subtilis* die Fumarat-Reduktion durch NADH mit der Aufnahme von TPP<sup>+</sup> gekoppelt ist (Schnorpfeil et al. 2001). Aus der TPP<sup>+</sup>-Aufnahme wurde ein  $\Delta\psi = -132 \text{ mV}$  (innen negativ) berechnet. Die Oxidation von NADH durch Menachinon ist vermutlich nicht an der  $\Delta p$ -Entstehung beteiligt. Aus dem Genom geht hervor, dass *B. subtilis* nur eine NADH-Dehydrogenase besitzt, die der nicht-koppelnden NADH-Dehydrogenase (Ndh) von *E. coli* ähnlich ist. Mit Mutanten, denen entweder eine funktionale Succinat-Dehydrogenase oder Menachinon fehlte, wurde gezeigt, dass sowohl die Succinat-Dehydrogenase als auch Menachinon im Elektronentransport von NADH zu Fumarat involviert sind. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die Succinat-Dehydrogenase von *B. subtilis* im Gegensatz zu der Fumarat-Reduktase von *W. succinogenes* elektrogen arbeitet.



**Abb. 5.4. Hypothetischer Mechanismus der Succinat-Oxidation durch Menachinon (A) und der Fumarat-Reduktion durch NADH (B) in *B. subtilis*.** Die Oxidation von Menachinol durch O<sub>2</sub> ist mit der apparenten Translokation von  $n \text{ H}^+$  über die Membran gekoppelt (A).

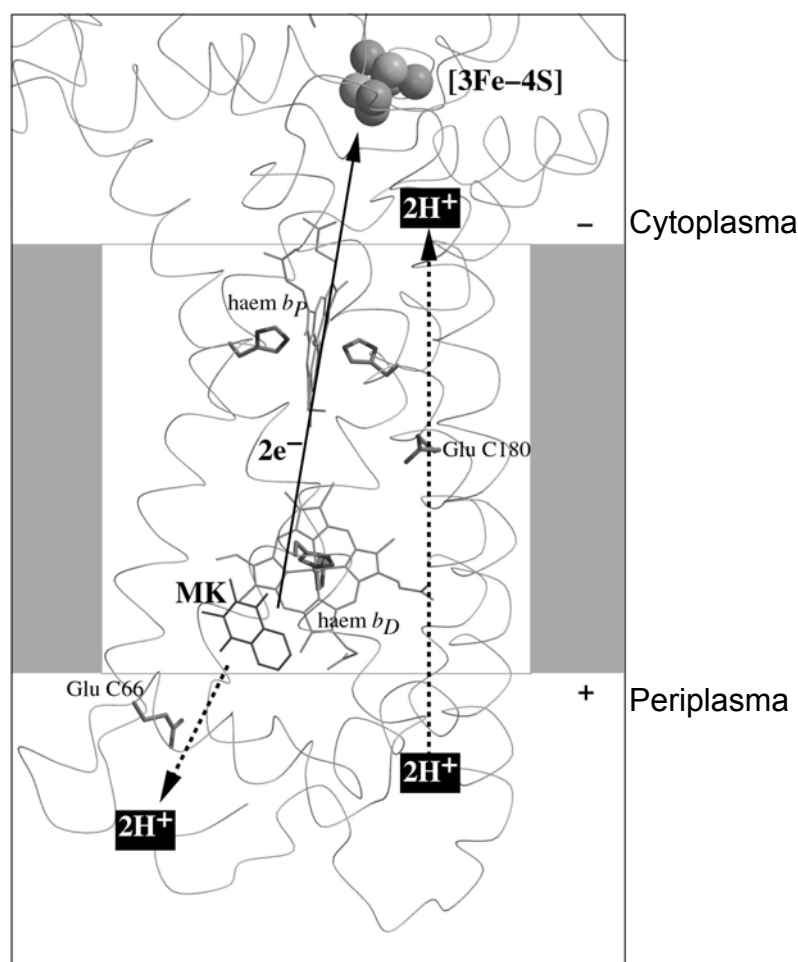
Der Unterschied zwischen Succinat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase ist überraschend, da beide Enzyme sich in ihren katalytischen Eigenschaften und Zusammensetzung der Untereinheiten ähnlich sind. Beide Enzyme bestehen jeweils aus einer katalytischen Untereinheit mit kovalent gebundenem FAD (SdhA/FrdA), einem Eisen/Schwefel-Protein (SdhB/FrdB) und einem in der Membran integrierten Dihäm-Cytochrom *b* (SdhC/FrdC). Die Hämliganden sind in beiden Enzymen konserviert, so dass die Strukturen von SdhC und FrdC ähnlich sein sollten. Wie für die Fumarat-Reduktase dargestellt (Kapitel 5.4) befindet sich das katalytische Zentrum für die Menachinon-Reduktion in SdhC vermutlich ebenfalls nahe der distalen Hämgruppe (Matsson et al. 2000), so dass eine Protonenaufnahme von außen während der Menachinon-Reduktion wahrscheinlich ist (Abb 5.4 A). Diese Annahme stimmt mit den oben beschriebenen Untersuchungen zum Mechanismus der Succinat-Oxidation durch Menachinon bzw. der Fumarat-Reduktion durch NADH (Schirawski und Unden 1998, Schnorpfeil et al. 2001) überein. Zu beachten ist aber, dass die Experimente mit Zellen von *B. subtilis* durchgeführt wurden. Da Succinat bzw. Fumarat auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran umgesetzt wird, ist nicht ausgeschlossen, dass die Ergebnisse durch den Transport der Substrate über die Membran verfälscht wurden. Daher soll die isolierte Succinat-Dehydrogenase ebenfalls in Liposomen eingebaut und geprüft werden, ob die Fumarat-Reduktion mit Menachinol auch in Proteoliposomen ein  $\Delta\psi$  über der Membran erzeugt.

## 5.6 „E-Weg“-Hypothese

Die elektroneutrale Arbeitsweise der Fumarat-Reduktase von *W. succinogenes* steht im Widerspruch zu den Ergebnissen für die Succinat-Dehydrogenase von *B. subtilis* (Kapitel 5.5) und den Daten für die Lokalisation der Menachinol-Bindungsstelle in FrdC (Kapitel 5.4). Zur Lösung dieses Widerspruchs wurde die „E-Weg“-Hypothese aufgestellt (Lancaster 2002). Nach dieser Hypothese werden die während der Menachinol-Oxidation frei werdenden Protonen in das Periplasma entlassen, gleichzeitig findet aber ein Kotransport von zwei Protonen über die Membran in das Cytoplasma statt (Abb. 5.5). Der Protonenweg ist in der Struktur der oxidierten Fumarat-Reduktase nicht durchgängig zu erkennen. Möglicherweise wird der Protonenweg erst während des katalytischen Zyklus vorübergehend eingerichtet. Eine Komponente dieses Protonenweges durch die Membran könnte ein Glutamat-Rest („E“180) der transmembranen Helix V von FrdC sein. Dieser Rest ist in *W. succinogenes*, *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni*, die alle zu den  $\epsilon$ -Proteobakterien gehören, aber nicht in *B. subtilis* (Gram-positive Bakterien) konserviert. Der Austausch von E180 durch Glutamin ergab ein variantes Enzym, dass die Oxidation von DMNH<sub>2</sub> durch Fumarat mit 11 % der Wildtyp-Aktivität katalysierte (Sauer 2001). Fumarat-Reduktase-Aktivitäten, an denen nur die hydrophilen Untereinheiten (FrdAB) beteiligt sind, wurden durch den Austausch dagegen

nicht beeinflusst. Das Mutantenzym unterschied sich außerdem nicht in seiner Kristallstruktur, den Redoxpotentialen beider Hämgruppen und der Michaeliskonstante für DMNH<sub>2</sub> (0,1 mM) vom Wildtyp-Enzym. Die Ergebnisse zeigen, dass E180 indirekt an der Oxidation von Menachinol durch Fumarat beteiligt ist. Anscheinend wird die Fumarat-Reduktase-Aktivität erhöht, wenn Protonen vom Periplasma in das Cytoplasma transportiert werden und so die Reaktion elektroneutral wird.

Die „E-Weg“-Hypothese würde erklären, warum kein  $\Delta p$  während der Menachinol-Oxidation mit Fumarat in Proteoliposomen, Zellen oder invertierten Membranvesikeln entsteht. Eine elektroneutrale Arbeitsweise der Fumarat-Reduktase würde weiterhin mit den energetischen Betrachtungen zur Fumarat-Atmung übereinstimmen, mit denen ein maximaler  $H^+/e^-$ -Quotient von 0,6 für die Menachinol-Oxidation mit Fumarat postuliert wurde (Kapitel 5.2).



**Abb. 5.5. Hypothetischer Koprotonen-Transport über den „E-Weg“.** Die Menachinol-Bindungsstelle wurde kristallographisch mit DMN (hier als „MK“ eingezeichnet) und Vitamin K<sub>2</sub> bestimmt. Die Abbildung ist mit freundlicher Genehmigung Lancaster (2002) entnommen.



## 5.7 Chinon-Spezifität der Fumarat-Atmung

Zellen von *W. succinogenes*, die mit Formiat (oder  $H_2$ ) und Fumarat vermehrt werden, enthalten in ihrer Membran außer Menachinon auch Methylmenachinon in äquimolaren Mengen (Collins und Fernandez 1984). Beide Chinone besitzen eine Seitenkette aus sechs Isopreneinheiten und unterscheiden sich nur in einer zusätzlichen Methylgruppe an Position 5 oder 8 des aromatischen Rings von Methylmenachinon (Abb 4.9). Die Rekonstitution der Fumarat-Atmung in Liposomen mit jeweils einem der aus *W. succinogenes* isolierten Chinone zeigte, dass Menachinon spezifisch im Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat beteiligt ist und nicht durch Methylmenachinon ersetzt werden kann.

Eine Funktion für Methylmenachinon wurde bisher nur in der Polysulfid-Atmung von *W. succinogenes* gefunden (Dietrich et al. 2002). *W. succinogenes* wächst dabei durch anaerobe Atmung mit Polysulfid als terminalen Elektronenakzeptor (Schauder und Kröger 1993, Macy et al. 1986). Elektronendonoren sind wie in der Fumarat-Atmung  $H_2$  oder Formiat. Die Elektronentransportkette der Polysulfid-Atmung besteht aus der Polysulfid-Reduktase sowie Hydrogenase oder Formiat-Dehydrogenase. Wenn Hydrogenase und Polysulfid-Reduktase in Liposomen mit Methylmenachinon eingebaut wurden, war die Elektronentransportaktivität um mehr als eine Größenordnung höher als in Liposomen, die Menachinon oder kein Chinon enthielten (Dietrich et al. 2002). Methylmenachinon ist danach eine spezifische Komponente im Elektronentransport von  $H_2$  (oder Formiat) zu Polysulfid und kann dort nicht durch Menachinon ersetzt werden. Die Spezifität für Methylmenachinon oder Menachinon in der Polysulfid- bzw. Fumarat-Atmung ist anscheinend nur abhängig von den terminalen Reduktasen und nicht von den Dehydrogenasen. Proteoliposomen, die Hydrogenase und jeweils eines der beiden Chinone enthielten, katalysierten die Reduktion von DMN durch  $H_2$  mit gleicher Aktivität und es entstand in beiden Fällen ein  $\Delta\psi$  von  $-0,18$  V. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Dehydrogenasen beider Atmungsketten identisch sind (Groß et al. 1998a).

Außer aus *W. succinogenes* isoliertes Menachinon und Methylmenachinon wurden Vitamin  $K_1$  und Vitamin  $K_2$  in Proteoliposomen mit Hydrogenase und Fumarat-Reduktase eingebaut. Vitamin  $K_1$  und Vitamin  $K_2$  unterscheiden sich vom *W. succinogenes*-Menachinon nur in ihrer Seitenkette, die aus 4 statt 6 Isopreneinheiten besteht und bei Vitamin  $K_1$  zum Teil hydriert ist (Abb. 4.9). Proteoliposomen mit Vitamin  $K_1$  oder Vitamin  $K_2$  katalysierten den Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat mit etwa gleicher bzw. 77 % der Geschwindigkeit, die mit Menachinon-Proteoliposomen bestimmt wurde. Auch die Geschwindigkeit der DMN-Reduktion mit  $H_2$  war in den verschiedenen Proteoliposomenpräparationen annähernd gleich. In Vitamin  $K_1$ -Proteoliposomen entstand dabei aber kein  $\Delta\psi$  während der Fumarat- oder DMN-Reduktion mit  $H_2$ . Dies ist bisher nicht verstanden, da man annehmen sollte, dass Vitamin  $K_1$  an der gleichen Stelle in HydC bindet wie die übrigen getesteten Chinone und so die Protonen für die Chinon-Reduktion ebenfalls aus dem Inneren der Proteoliposomen

aufgenommen werden sollten. Dieser Befund erklärt aber, dass in früheren Arbeiten der Elektronentransport von  $H_2$  zu Fumarat in Liposomen mit Vitamin  $K_1$  rekonstituiert werden konnte, dieser aber nie mit einer  $\Delta p$ -Entstehung gekoppelt war (Geisler et al. 1994).

## 6 Literaturverzeichnis

- Almgren, M. (2000) Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 146-163.
- Berg, B.L., Li, J., Heider J. & Stewart, V. (1991) Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the fdnGHI operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocysteine. *J. Biol. Chem.* **266**, 22380-22385.
- Berks, B.C., Page, M.D., Richardson, D.J., Reilly, A., Cavill, A., Outen, F. & Ferguson, S.J. (1995) Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop. *Arch. Microbiol.* **15**, 319-331.
- Biel, S., Simon, J., Groß, R., Ruiz, T., Ruitenber, M. & Kröger, A. (2002) Reconstitution of coupled fumarate respiration in liposomes by incorporating the electron transport enzymes isolated from *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1974-1983.
- Bode, C., Goebell, H. & Stahler, E. (1968) Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuret-Methode. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **6**, 418-422.
- Bokranz, M., Gutmann, M., Körtner, C., Kojro, E., Fahrenholz, F., Lauterbach, F. & Kröger, A. (1991) Cloning and nucleotide sequence of the structural genes encoding the formate dehydrogenase of *Wolinella succinogenes*. *Arch. Microbiol.* **156**, 119-128.
- Bronder, M., Mell, H., Stupperich, E. & Kröger, A. (1982) Biosynthetic pathways of *Vibrio succinogenes* growing with fumarate as terminal electron acceptor and sole carbon source. *Arch. Microbiol.* **131**, 216-223.
- Brune, A., Spillecke, J., & Kröger, A. (1987) Correlation of the turnover number of the ATP synthase in liposomes with the proton flux and the proton potential across the membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 499-507.
- Clement, N.R. & Gould, J.M. (1981) Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **20**, 1534-1538.
- Collins, M.D. & Fernandez, F. (1984) Menaquinone-6 and thermoplasma-quinone-6 in *Wolinella succinogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **22**, 273-276.

- Dietrich, W. & Klimmek, O. (2002) The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1086-1095.
- Droß, F., Geisler, V., Lenger, R., Theis, F., Krafft, T., Fahrenholz, F., Kojro, E., Duchêne, A., Tripier, D., Juvenal, K. & Kröger, A. (1992) The quinone-reactive Ni/Fe-hydrogenase of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **206**, 93-102.
- Geisler, V. (1993) Zum Mechanismus der Energieübertragung bei der Fumarat-Atmung von *Wolinella succinogenes*. *Dissertation*, Frankfurt/Main.
- Geisler, V., Ullmann, R. & Kröger, A. (1994) The direction of the proton exchange associated with the redox reactions of menaquinone during the electron transport in *Wolinella succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 219-226.
- Goñi, F.M. & Alonso, A. (2000) Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 51-68.
- Gross, R., Simon, J., Theis, F. & Kröger, A. (1998a) Two membrane anchors of *Wolinella succinogenes* hydrogenase and their function in fumarate and polysulfide respiration. *Arch. Microbiol.* **170**, 50-58.
- Groß, R., Simon, J., Lancaster, C.R.D. & Kröger, A. (1998b) Identification of histidine residues in *Wolinella succinogenes* hydrogenase that are essential for menaquinone reduction by H<sub>2</sub>. *Mol. Microbiol.* **30**, 639-646.
- Higuchi, Y., Tatsuhiko, Y. & Yasuoka, N. (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* **5**, 1671-1680.
- Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A. & Harris, D.L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576-3582.
- Janausch, I.G., Kim, O.B. & Uden G. (2001) DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers. *Arch. Microbiol.* **176**, 224-230.
- Jones, R.W. & Garland, P.B. (1977) Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **163**, 199-211.
- Jormakka, M., Törnroth, S., Byrne, B. & Iwata, S. (2002) Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science* **295**, 1863-1868.
- Kamo, N., Muratsugu, M. Hongoh, R. & Kobatake, Y. (1979) Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and

- relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membrane Biol.* **49**, 105-121.
- Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E. & Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba<sub>3</sub>*-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters* **434**, 17-22.
- Kano, K. & Fendler, J.H. (1978) Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **509**, 289-299.
- Karlovsky, P. & Dadak, V. (1982) Tetraphenylborate-sensitive electrode for measuring membrane potential. *Folia Microbiol (Praha)* **27**, 460-464.
- Kasahara, M. & Hinkle, P.C. (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **252**, 7384-7390.
- Körtner, C., Lauterbach, F., Tripier, D., Unden, G. & Kröger, A. (1990) *Wolinella succinogenes* fumarate reductase contains a diheme cytochrome *b*. *Molec. Microbiology* **4**, 855-860.
- Kröger, A. & Klingenberg, M. (1973) The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron transport activity in the respiratory chain. *Eur. J. Biochem.* **34**, 358-368.
- Kröger, A. & Innerhofer, A. (1976) The function of menaquinone, covalently bound FAD and iron-sulfur protein in the electron transport from formate to fumarate of *Vibrio succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **69**, 487-495.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G. & Lancaster, C.R.D. (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics, and coupling mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 23-38.
- Kröger, A., Dorrer, E. & Winkler, E. (1980) The orientation of the substrate sites of formate dehydrogenase and fumarate reductase in the membrane of *Vibrio succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* **589**, 118-136.
- Kröger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F. & Lenger, R. (1992) Bacterial fumarate respiration. *Arch. Microbiol.* **158**, 311-314.
- Kröger, A., Winkler, E., Innerhofer, A., Hackenberg, H. & Schägger, H. (1981) The formate dehydrogenase involved in electron transport from formate to fumarate in *Vibrio succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **94**, 465-475.
- Lambert, O., Levy, D., Ranck, J.-L., Leblanc, G. & Rigaud, J.-L. (1998) A new „gel-like“ phase in dodecyl maltoside-lipid mixtures: implications in solubilization and reconstitution studies. *Biophys. J.* **74**, 918-930.

- Lancaster, C.R.D. (2002) *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase – 2.2 Å resolution crystal structure and the E-pathway hypothesis of coupled transmembrane proton and electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1565**, 215-231.
- Lancaster, C.R.D., Gross, R. & Simon, J. (2001) A third crystal form of *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase reveals domain closure at the site of fumarate reduction. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1820-1827.
- Lancaster, C.R.D., Gross, R., Haas, A., Ritter, M., Mäntele, W., Simon, J. & Kröger, A. (2000) Essential role of Glu-66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 13051-56.
- Lancaster, C.R.D., Kröger, A., Auer, M. & Michel, H. (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* **402**, 377-385.
- Lemma, E., Hägerhäll, C., Geisler, V., Brandt, U., von Jagow, G. & Kröger, A. (1991) Reactivity of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex with quinones. *Biochim. Biophys. Acta* **1059**, 281-285.
- Liebl, U., Pezennec, S., Riedel, A., Kellner, E. & Nitschke, W. (1992) The Rieske Fe/S center from the gram-positive bacterium PS3 and its interaction with the menaquinone pool studied by EPR. *J. Biol. Chem.* **267**, 14068-14072.
- Lolkema, J.S., Abbing, A., Hellingwerf, K.J. & Konings, W.N. (1983) The transmembrane electrical potential in *Rhodospseudomonas sphaeroides* determined from the distribution of tetraphenylphosphonium after correction for its binding to cell components. *Eur. J. Biochem.* **130**, 287-292.
- Macy, J.M., Schröder, I., Thauer, R.K. & Kröger, A. (1986) Growth of *Wolinella succinogenes* on H<sub>2</sub>S plus fumarate and on formate plus sulfur as energy sources. *Arch. Microbiol.* **144**, 147-150.
- Matsson, M., Tolstoy, D., Aasa, R., Hederstedt, L. (2000) The distal heme center in *Bacillus subtilis* succinate:quinone reductase is crucial for electron transfer to menaquinone. *Biochemistry* **39**, 8617-8624.
- Mell, H., Wellnitz, C. & Kröger, A. (1986) The electrochemical proton potential and the proton/electron ratio of the electron transport with fumarate in *Wolinella succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* **852**, 212-221.
- Nagle, J.F. & Tristram-Nagle, S. (2000) Structure of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159-195.
- Ollivon, M., Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C & Paternostre, M. (2000) Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 34-50.

- Paternostre, M. T., Roux, M. & Rigaud, J.-L. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate. *Biochemistry* **27**, 2668-2677.
- Pick, U. (1981) Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 186-194.
- Pitard, B., Richard, P., Dunach, M., Girault, G., & Rigaud, J.-L. (1996) ATP synthesis by the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase from bacillus PS3 reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin. Factors defining the optimal reconstitution of ATP synthases with bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **235**, 769-778.
- Rigaud, J.-L., Pitard, B. & Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 223-246.
- Sarti, P., Malatesta, F., Antonini, G., Colosimo, A. & Brunori, M. (1985) A new method for the determination of the buffer power of artificial phospholipid vesicles by stopped-flow spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **809**, 39-43.
- Sauer, U. (2001) Gezielter Austausch von Aminosäuren im Bereich des proximalen Häms der Fumarat-Reduktase von *Wolinella succinogenes*. *Diplomarbeit*, Frankfurt/Main.
- Schauder, R. & Kröger, A. (1993) Bacterial sulphur respiration. *Arch. Microbiol.* **159**, 491-497.
- Schirawski, J., Unden, G. (1998) Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *Eur. J. Biochem.* **257**, 210-5.
- Schnorf, U. (1996) Der Einfluß von Substituenten auf Redoxpotential und Wuchseigenschaften von Chinonen. *Dissertation* **3871**, ETH Zürich.
- Schnorpfeil, M., Janausch, I.G., Biel, S., Kröger, A. & Unden, G. (2001) Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3069-3074.
- Singleton, W.S., Gray, M.S., Brown, M.L. & White, J.L. (1965) Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **42**, 53-56.
- Spillecke, J. (1986) Zur Rekonstitution der Fumaratatmung von *Wolinella succinogenes*. *Diplomarbeit*, Marburg/Lahn.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Reviews* **41**, 100-180.

- Ullmann, R., Groß, R., Simon, J., Uden, G. & Kröger, A. (2000) Transport of C<sub>4</sub>-Dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*. *J. Bacteriol.* **182**, 5757-5764.
- Uden, G. & Kröger, A. (1981) The function of the subunits of the fumarate reductase complex of *Vibrio succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **120**, 577-584.
- Uden, G. & Kröger, A. (1982) Reconstitution in liposomes of the electron transport chain catalyzing fumarate reduction by formate. *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 258-263.
- Uden, G. & Kröger, A. (1986) Reconstitution of a functional electron-transport chain from purified formate dehydrogenase and fumarate reductase complexes. *Methods in Enzymology* **126**, 387-399.
- Uden, G. (1988) Differential roles for menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic electron transport of *E. coli* and their *fnr*-independent expression. *Arch. Microbiol.* **150**, 499-503.
- Uden, G., Hackenberg, H. & Kröger, A. (1980) Isolation and functional aspects of the fumarate reductase involved in the phosphorylative electron transport of *Vibrio succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 275-288.
- Uden, G., Mörschel, E., Bokranz, M. & Kröger, A. (1983) Structural properties of the proteoliposomes catalyzing electron transport from formate to fumarate. *Biochim. Biophys. Acta* **725**, 41-48.
- Volbeda, A., Charon, M.-H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J.C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587.
- Zaritsky, A., Kihara, M. & Macnab, R.M. (1981) Measurement of membrane potential in *Bacillus subtilis*: a comparison of lipophilic cations, rubidium ion, and a cyanine dye as probes. *J. Membrane Biol.* **63**, 215-231.



## Dank

Ich danke vor allem Herrn Prof. Dr. Achim Kröger, der am 11. Juni 2002 gestorben ist, dass er mir das Thema überlassen hatte und mich in meiner Arbeit immer hilfreich unterstützte.

Oliver Schürmann (Institut für Mikrobiologie, Frankfurt am Main) danke ich für die Isolierung der Fumarat-Reduktase und der Chinone aus *W. succinogenes*.

Teresa Ruiz (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main) danke ich für die gemeinsamen Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop.

Maarten Ruitenberg (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main) danke ich für die Hilfe bei den Messungen mit dem Stopped-Flow-Photometer.

Jörg Simon, Roland Groß, Oliver Klimmek und allen anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Simone Biel

geboren am 24. Dezember 1967

in Frankfurt/Main

## **Schule:**

1974 – 1978

Gruneliuschule (Grundschule), Frankfurt/Main

1978 – 1984

Marienschule der Ursulinen (Gymnasium), Offenbach/Main

1984 – 1987

Friedrich-Ebert-Gymnasium, Mühlheim/Main,  
Schulabschluß: Abitur

## **Berufsausbildung und –tätigkeit:**

September 1987 – Februar 1990: Ausbildung zur Physikalaborantin bei der Hoechst AG in Frankfurt/Main

Februar 1990 – September 1990: Physikalaborantin bei der Hoechst AG (F+E, Faser und Faservorprodukte) in Frankfurt/Main

## **Universität:**

Oktober 1990 – März 1996: Studium der Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main

Juni 1995 – März 1996: Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main zum Thema: Das Flavodoxin von *Wolinella succinogenes*

April 1996: Beginn der Promotion am Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main zum Thema: Rekonstitution der gekoppelten Fumarat-Atmung von *Wolinella succinogenes*

Oktober 1996 – Juli 1997: Mutterschafts- und Erziehungsurlaub