

## CtaG

– Kupferchaperon und Assemblierungsfaktor  
für die Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase  
in *Paracoccus denitrificans*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann-Wolfgang-Goethe Universität,  
Frankfurt am Main

von Peter Greiner  
aus Würzburg

Frankfurt am Main 2009

(D30)

Vom Fachbereich 14 - Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: \_\_\_\_\_

Gutachter: \_\_\_\_\_

Datum der Disputation: \_\_\_\_\_

meiner Familie...

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, Peter Greiner, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den 4. April 2009

# Inhalt

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Metallionen in biologischen Systemen	1
1.2. Aufnahme und Verteilung von Kupferionen im Körper	3
1.3. Kupfertransportwege in der Zelle	4
1.4. Störungen der Kupferhomöostase	7
1.5. Die Cytochrom <i>c</i> Oxidase als Kupferakzeptor in den Mitochondrien	9
1.6. Biogenese der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	11
1.7. Assemblierungsfaktoren für die Kupferzentren der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	13
1.7.1. Cox17	13
1.7.2. Sco1	15
1.7.3. Cox11 bzw. CtaG	16
1.8. Prokaryotische Modellsysteme zur Untersuchung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	19
1.9. Zielsetzung der Arbeit	20
<b>II. MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>1. Materialien</b>	<b>21</b>
1.1. Chemikalien	21
1.2. Geräte	22
1.3. Verbrauchsmaterialien	23
1.4. Chromatographie Materialien	23
1.5. Proteine	24
1.5.1. Enzyme	24
1.5.2. Antikörper	24
1.6. Nukleinsäuren	25
1.6.1. Plasmide	25
1.6.2. Oligonucleotide	26
1.7. Mikroorganismen	27
1.7.1. Escherichia coli	27
1.7.2. Paracoccus denitrificans	27
1.8. Nährmedien und Antibiotika	28
<b>2. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>29</b>
2.1. Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)	29
2.2. Restriktion	30
2.3. Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	31
2.5. Ligation	31
2.6. Transformation	32
2.6.1. Transformation kompetenter Zellen	32
2.6.2. „rapid colony“-Transformation	32
2.7. PCR	33
2.7.1. Einfügen zusätzlicher Informationen mit Hilfe der PCR	34
2.8. Gerichtete Mutagenese	36
2.8.1. Primerdesign	37
2.8.2. Phosphorylierung mutagener Oligonukleotide	37
2.8.3. Mutageneseansatz	37

2.8.4. DpnI-Verdau	38
2.9. Sequenzierung	38
<b>3. Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>39</b>
3.1. Expression	39
3.1.1. Testexpressionen	39
3.1.2. Expression des löslichen Cta <sub>GLF</sub> -Fragments	40
3.1.3. Expression der UE I der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	40
3.2. Isolierung subzellulärer Kompartimente	41
3.2.1.1. Periplasma-Präparation	43
3.2.1.2. Membran- und Cytoplasma-Präparation	43
3.2.1.3. Aufreinigung von <i>inclusion bodies</i>	44
3.3. Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen mit His- <i>tag</i>	45
3.3.1. Ni-NTA-Aufreinigung von Cta <sub>GLF</sub>	45
3.3.2. Ni-NTA-Aufreinigung der UE I der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	46
3.4. Gelfiltration	47
3.5. Ultrafiltration	48
3.6. TEV-Verdau	49
3.7. Metallrekonstitution	50
3.8. Crosslinking	51
3.9. Lowry	51
3.10. Elektrophorese	52
3.10.1. Denaturierende Elektrophoresesysteme	53
3.10.1.1. Laemmli (Tris/Glycin)	53
3.10.1.2. Ahn	54
3.10.2. Nativ-Gele	55
3.10.2.1. BN-PAGE	55
3.10.3. Färbemethoden	56
3.10.3.1. Coomassie-Färbung	56
3.10.3.2. Silberfärbung	56
3.10.4. Densitometrie	57
3.11. Western Blot	58
3.11.1. Nass-Transfer	58
3.11.2. <i>semi dry</i> -Transfer	58
3.11.3. Blot-Entwicklung	59
3.12. Methoden zur Kupferbestimmung	60
3.12.1. BCA-Assay	60
3.12.2. Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS)	61
3.12.3. TXRF-Spektrometrie	62
3.12.4. ICP-MS	63
<b>III. ERGEBNISSE &amp; DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>1. Bioinformatische Analyse</b>	<b>65</b>
Diskussion	67
<b>2. Expression und Aufreinigung von CtaG</b>	<b>69</b>
2.1. Einleitung	69
2.2. pQE-basiertes CtaG-Expressionsplasmid	71
2.2.1. Planung und Klonierung des pQE-basierten Expressionsplasmids	71
2.2.2. Testexpression des pQE-basierten CtaG-Fragments	72
2.2.3. Diskussion	73
2.3. pET-basierte CtaG-Expressionsplasmide	74



---

2.3.1. Planung und Klonierung der pET-basierten Expressionsplasmide	75
2.3.2. Testexpression der pET-basierten CtaG <sub>LF</sub> -Fragmente	76
2.3.3. Diskussion	77
2.4. Expressionsbedingungen für CtaG <sub>LF</sub>	78
2.4.1. Löslichkeitsanalyse nach Expression bei 37 °C	78
Diskussion	80
2.4.2. Löslichkeitsanalyse nach Expression bei Raumtemperatur	80
Diskussion	81
2.5. Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls für CtaG <sub>LF</sub>	81
2.5.1. Aufreinigungsstrategie	81
2.5.2. Erste Aufreinigungsversuche	82
Diskussion	83
2.5.3. Gelfiltration	84
Diskussion	85
2.5.4. Finales Aufreinigungsprotokoll für CtaG <sub>LF</sub>	86
2.6. Zusammenfassung	88
<b>3. Kupferrekonstitution und Stöchiometrie der Metallbindung von CtaG<sub>LF</sub></b>	<b>89</b>
3.1. Einleitung	89
3.2. Kupferrekonstitution	89
3.3. Stöchiometrie der Kupferbindung	91
3.3.1. Gelfiltration	91
Diskussion	92
3.3.2. ICP-MS	93
3.3.3. Diskussion	95
3.4. Zusammenfassung	98
<b>4. Selektivität der Kupferbindung von CtaG<sub>LF</sub> – Konkurrenz verschiedener Metallionen</b>	<b>99</b>
4.1. Einleitung	99
4.2. Durchführung	99
4.3. Rekonstitutionen in Tris/Acetat pH 8	100
Diskussion	102
4.4. Weitere Konkurrenzexperimente	104
4.5. Effekt von Ag(I) auf die Kupferbindung von CtaG <sub>LF</sub>	105
Diskussion	105
4.6. Zusammenfassung	107
<b>5. Untersuchung der Kupferbindungsstelle mittels gerichteter Mutagenese</b>	<b>109</b>
5.1. Einleitung	109
5.2. Multiseq Analyse	109
Diskussion	111
5.3. Kupferbindung spezifischer Mutanten	112
Diskussion	115
5.4. Zusammenfassung	121
<b>6. Bestimmung der Affinität von CtaG<sub>LF</sub> für Cu(I)</b>	<b>122</b>
6.1. Einleitung	122
6.1.1. Wahl der geeigneten Methode für Bindungsstudien mit CtaG <sub>LF</sub>	123
6.2. Durchführung	125
6.3. BCA-Titration mit dem Wildtyp-Fragment CtaG <sub>LF</sub>	126
6.4. Vergleich der Affinitäten verschiedener CtaG <sub>LF</sub> -Mutanten	132
6.5. Zusammenfassung	138

---

<b>7. Spektroskopische Charakterisierung von Cu-CtaG<sub>LF</sub> – Identifikation eines kupferabhängigen UV/Vis-Signals</b>	<b>140</b>
7.1. Einleitung	140
7.2. UV/Vis-Signal von Cu-CtaG <sub>LF</sub>	141
7.3. Kupferabhängigkeit der 358 nm Bande – EDTA-Titrationsen	142
7.4. Sauerstoffabhängigkeit des Kupferentzugs durch EDTA	146
7.5. Diskussion möglicher Elektronenübergänge	149
7.6. Zusammenfassung	152
<b>8. Wechselwirkung und Kupfertransfer zwischen CtaG und der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase</b>	<b>153</b>
8.1. Einleitung	153
8.2. Bioinformatische Analyse der Wechselwirkung zwischen CtaG und Untereinheit I	156
8.3. Blau-Nativ Gele zum Nachweis möglicher Assemblierungskomplexe in <i>Paracoccus denitrificans</i>	159
8.4. Crosslinking-Versuche in <i>Paracoccus denitrificans</i>	162
8.5. Koaffinitätsaufreinigung mit solubilisierten <i>Paracoccus denitrificans</i> ST4 Membranen	166
8.6. Heterologe Expression und Aufreinigung der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase	168
8.7. Koexpression von CtaG und UE I in <i>E. coli</i>	171
8.8. <i>in vitro</i> Assay zur Untersuchung des Kupfertransfers zwischen CtaG und UE I	174
8.8.1. Kontrollversuche zu dem beobachteten Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I	176
8.9. Zusammenfassung	179
<b>IV. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>181</b>
<b>V. ANHANG</b>	<b>183</b>
<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>2. Konstrukte</b>	<b>184</b>
2.1. pGR10	184
2.2. pGR20	185
2.2.1. unprozessiert	185
<b>3. Theorie zur Bestimmung von Bindungskonstanten</b>	<b>187</b>
3.1. Einfache Gleichgewichtstitration	187
3.2. Kalorimetrie	190
3.3. Kompetitionstitration	191
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	<b>193</b>
<b>5. Curriculum vitae</b>	<b>199</b>
<b>6. Danksagung</b>	<b>202</b>

# I. Einleitung

## 1.1. Metallionen in biologischen Systemen

Metallionen machen zwar nur einen vergleichsweise geringen Anteil der Masse biologischer Systeme aus, sind für deren Funktion aber von entscheidender Bedeutung. Etwa die Hälfte aller heute bekannten Enzyme enthält *Metallionen als Kofaktoren* (Kaim und Schwederski 2004). Diese sind (1) für die *katalytische Aktivität* der Enzyme meist unabdingbar. Aber auch in nichtenzymatischen Proteinen sind Metallionen von großer Bedeutung: Beispielsweise (2) *als Sauerstoffträger* wie im Fall von Hämoglobin oder (3) *als Elektronentransporter* wie bei den Cytochromen. Darüberhinaus können Metallionen (4) *strukturegebende Funktionen* übernehmen - nicht nur als Biominerale wie Hydroxylapatit in Knochen und Zähnen, sondern auch als Strukturelemente von Proteinen oder Nukleinsäuren wie beispielsweise in den Zinkfingerdomänen einiger Transkriptionsfaktoren oder als Gegenionen des negativ geladenen DNA-Rückgrats. Auch für (5) die *Kommunikation* sind Metallionen von Bedeutung, etwa als Ladungsträger bei der Erregungsleitung in Neuronen ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) oder als Botenstoffe, wie im  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-System (Lippard und Berg 1995; Kaim und Schwederski 2004).

Die wohl wichtigste Eigenschaft der Metallionen, die sie für biologische Systeme so unabdingbar macht, ist ihre Fähigkeit Elektronen aufnehmen und abgeben zu können, bzw. ungepaarte Elektronen bereitzustellen. Sie eignen sich daher hervorragend als *Katalysatoren für Redoxreaktionen oder Lewis-Säure/Base-Reaktionen*. Als Kofaktoren von hydrolytischen Enzymen und Isomerasen sind sie beispielsweise am Auf- und Abbau von Proteinen, Kohlehydraten und Lipiden beteiligt. Beim Schutz vor oxidativem Stress dienen sie etwa in der Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD1) oder der Katalase zur Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies. Und eine besonders wichtige Rolle spielen Metallionen bei der Aktivierung kleiner, hochsymmetrischer Moleküle wie  $\text{O}_2$  oder  $\text{N}_2$  im Rahmen von Photosynthese, Stickstofffixierung und Zellatmung.

Im Zusammenhang mit der *Zellatmung* kommt den Metallionen von *Kupfer* und *Eisen* eine besondere Stellung zu. Nach Eisen ist Kupfer das häufigste Übergangsmetall in biologischen Systemen (Malmstrom und Leckner 1998) und die beiden Metalle dienen als Kofaktoren in den Komplexen der Atmungskette, sowie in Sauerstoff- und Elektronentransportierenden Proteinen. Zwischen den drei Elementen Eisen, Kupfer und Sauerstoff besteht eine evolutionsbiologisch bedeutende Verbindung: Durch die Verschiebung von einer reduzierenden zu einer oxidierenden Atmosphäre, die mit der Entstehung der Photosynthese vor etwa 2,4 bis 2,8 Milliarden Jahren einsetzte, kam es auch zu einer Verschiebung in der Verfügbarkeit löslicher Metallionen (Allègre und Schneider 1994). War die Konzentration an löslichen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen im Meereswasser unter

reduzierenden Bedingungen noch sehr hoch, so führte deren Oxidation zur Bildung der weniger löslichen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen welche beispielsweise in Form von Eisen(III)oxid präzipitierten und zu mächtigen Ablagerungen führten, die wir heute als Rotsandstein und ähnliche Sedimentgesteine kennen. Für Kupfer hingegen trat das entgegengesetzte Phänomen ein. Das unter reduzierenden Bedingungen als schwer lösliches Cu(I) vorliegende Element wurde erst durch die Oxidation zu Cu(II) löslich und in größerem Maße für biologische Systeme verfügbar. Während Eisenionen also durch die Entstehung der aeroben Atmosphäre knapper wurden, stieg die Verfügbarkeit und somit auch die biologische Bedeutung von Kupferionen. Aufgrund seines späteren Auftretens wird *Kupfer* daher auch als die "*Alternative zu biologischem Eisen*" bezeichnet (Kaim und Schwederski 2004).

In der Tat weisen Kupfer- und Eisenhaltige Proteine oftmals vergleichbare Funktionen auf. Das Kupferhaltige Hämocyanin, ein Sauerstofftransporter für Wirbellose wie Insekten, Spinnen oder Schnecken, hat beispielsweise dieselbe Funktion wie das Eisenhaltige Hämoglobin bei den Wirbeltieren. Ähnlich finden die Eisenhaltigen Cytochrome als Elektronentransporter ihre Entsprechung in dem bei der Photosynthese zum Einsatz kommenden blauen Kupferprotein Plastocyanin. Auch bei Antioxidationsfunktionen, der Nitrit-Reduktion und bei Oxidase-Aktivitäten finden sich korrespondierende Eisen- und Kupferproteine.

Die Eigenschaft der Metallionen Redoxreaktionen zu katalysieren macht sie für biologische Systeme einerseits extrem wichtig. Andererseits birgt diese Eigenschaft aber auch ein erhebliches Gefahrenpotential (Leary und Winge 2007). *Freie Kupferionen* sind schon in niedrigen Konzentrationen *toxisch*, denn sie tragen durch ihre katalytischen Eigenschaften zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei. Diese führen zur Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, was irreparable Schäden und Mutationen zur Folge hat. Aufgrund dieser Gefahren muss die Zelle dafür sorgen, dass die Konzentration freier intrazellulärer Kupferionen minimal ist. In *S. cerevisiae* liegen freie Kupferionen beispielsweise in einer Konzentration von unter  $10^{-18}$  M vor, was weniger als einem Kupferion pro Zelle entspricht (O'Halloran und Culotta 2000). Um diese niedrige Konzentration freier Kupferionen einerseits und ihre Verfügbarkeit als Kofaktoren für intrazelluläre Prozesse andererseits zu gewährleisten, hat sich ein *komplexes System aus Transportern und Kupferchaperonen* entwickelt, das die Aufnahme und den Transport von Kupferionen streng kontrolliert (Kim, Nevitt et al. 2008).

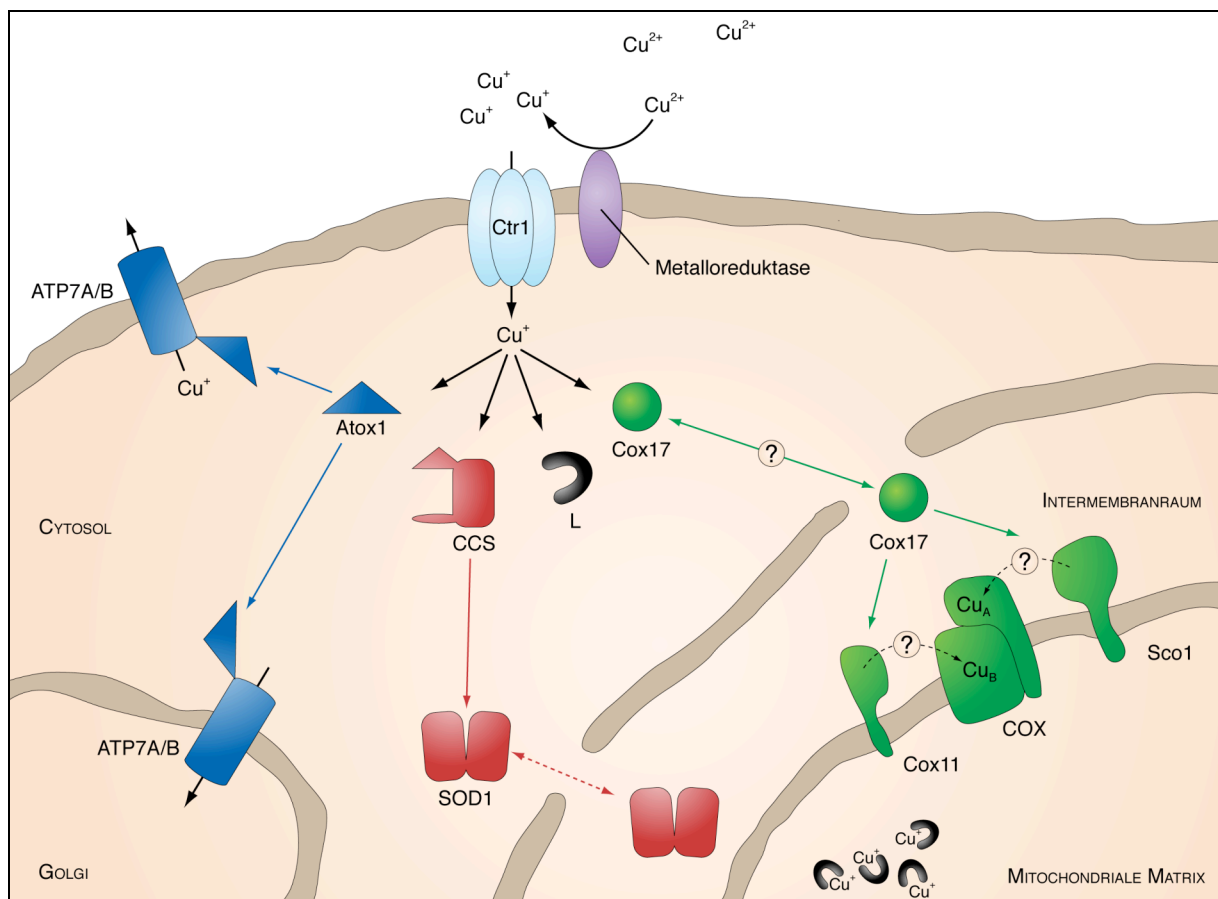
## 1.2. Aufnahme und Verteilung von Kupferionen im Körper

Im menschlichen Körper müssen Kupferionen zunächst von den Enterozyten der Darmwand aufgenommen werden und über die Pfortader (*Vena portae*) zur Leber gelangen. Die Hepatozyten importieren die Kupferionen dann aus dem Blut der Pfortader und leiten sie entweder über den erweiterten Blutkreislauf an periphere Gewebe weiter oder zur Exkretion in die Galle. Da Kupfer fast ausschließlich in seiner reduzierten Cu(I)-Form importiert werden kann, die gelösten Kupferionen aber oxidiert, d.h. als Cu(II)-Ionen vorliegen, müssen die Kupferionen vor dem Transport zunächst von *Metalloreduktasen* zu Cu(I) reduziert werden. In der Hefe wird diese Aufgabe von den membranständigen Ferroreduktase Fre1 und Fre2 übernommen, im Fall der duodenalen Enterozyten könnten dafür die Membranproteine der Steap-Familie verantwortlich sein (Ohgami, Campagna et al. 2006). Für den *Import* ist der *Kupfertransporter Ctr1* verantwortlich, welcher die Cu(I)-Ionen als Permease, d.h. ohne ATP-Verbrauch, transloziert (Nose, Kim et al. 2006).

Der *Export* hingegen läuft entweder durch die Sekretion kupferhaltiger Proteine oder über kupfertransportierende P-Typ ATPasen ab, welche Teil des sekretorischen Transportwegs sind und in zwei gewebespezifischen Varianten exprimiert werden: In den Enterozyten des Magen-Darm-Traktes ist die *P-Typ ATPase ATP7A*, die auch als MNK für Menkes Disease Protein bezeichnet wird, für den Export verantwortlich. In der Leber und in peripheren Geweben wird dagegen die homologe P-Type ATPase *ATP7B* exprimiert, welche auch WND für Wilsons Disease Protein genannt wird (Yatsunyk und Rosenzweig 2007). Im Blutkreislauf wird ein Teil der Kupferionen von Serumalbumin und Histidin ligandiert. Über 90 % der im Blut transportierten Kupferionen sind jedoch an das Serumprotein *Ceruloplasmin* gebunden, eine multikupfer Ferroxidase, die für die Beladung des seralen Eisentransportproteins Transferrin notwendig ist. Vermutlich dient das primär in der Leber synthetisierte Ceruloplasmin nicht nur zur Unterstützung des Eisentransports, sondern auch als Kupferlieferant für periphere Gewebe.

### 1.3. Kupfertransportwege in der Zelle

Innerhalb der Zelle gibt es *drei Hauptwege* über die Kupferionen an ihre Zielorte gelangen können: (1) den *sekretorischen Atox1-Weg*, (2) den *cytosolischen CCS-Weg* und (3) den *mitochondrialen Cox17-Weg* (siehe Abbildung 1). Darüberhinaus existieren weitere Liganden, wie beispielsweise die Metallothioneine oder Glutathione, die dafür sorgen, dass keine ungebundenen Kupferionen in der Zelle vorliegen. Interessanterweise können Kupferchaperone, die in einem Organismus deletiert wurden (Beispiel Hefe) oftmals durch Homologe aus anderen Organismen (Beispiel Bakterien, Pflanzen und Tiere, bis hin zu humanen Proteinen) ersetzt werden (Harrison, Jones et al. 1999). Dieser hohe Konservierungsgrad spricht für eine große Bedeutung der Kupferchaperone.



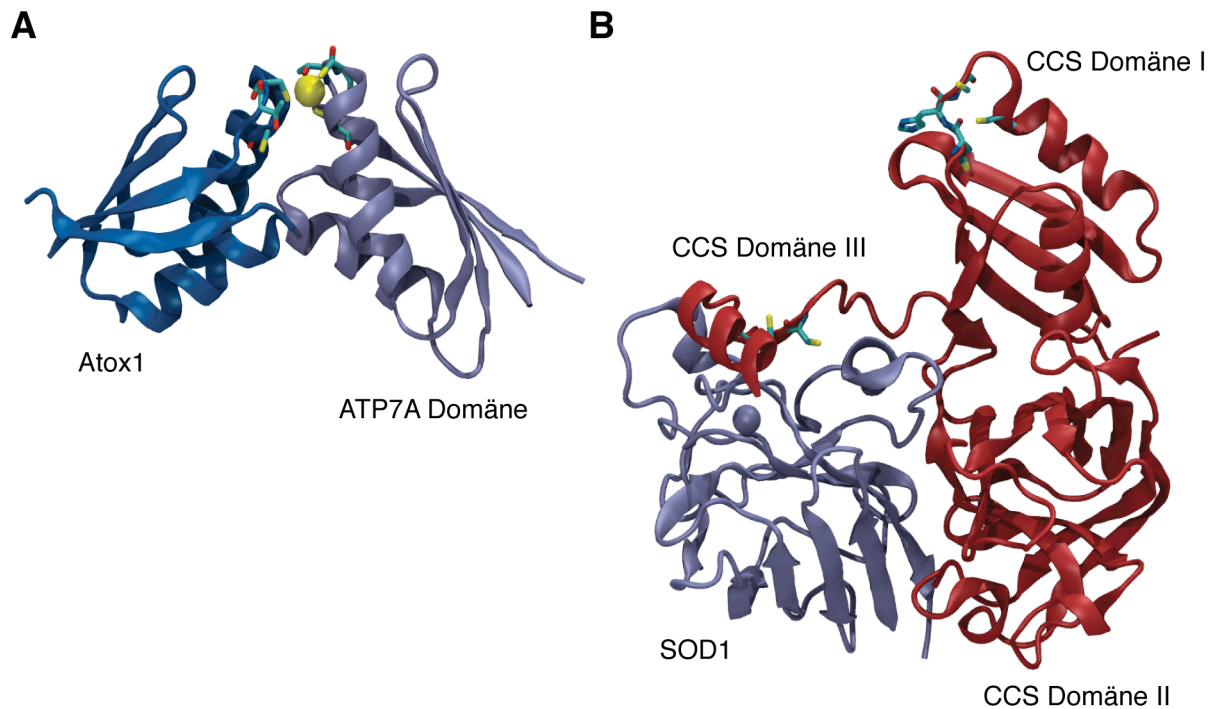
**Abbildung 1 - Kupfertransportwege in der Zelle**

Drei Hauptwege für den Transport von Kupferionen innerhalb der Zelle sind zur Zeit bekannt: **1. Atox1** beliefert die membranständige P-Typ ATPase ATP7A bzw. ATP7B, welche den Golgi-Apparat und somit sowohl sekretorische Proteine als auch Proteine der Cytoplasmamembran mit Kupfer versorgt. In einigen Zelltypen befindet sich diese Cu-ATPase auch in der Cytoplasmamembran, wo sie für den Export von Kupferionen in den Blutkreislauf oder in die Galle verantwortlich sein kann. **2. CCS** (*copper chaperone for SOD1*) beliefert die intrazelluläre und mitochondriale Cu/Zn-Superoxidismutase (SOD1), die als Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies dient. **3. Cox17** und weitere bislang unbekannte Liganden beliefern die Mitochondrien mit Kupferionen. Im Mitochondrium werden diese zum einen für die Biogenese der Cytochrom c Oxidase benötigt, zum anderen dient die mitochondriale Matrix als Kupferdepot für die Zelle. Zwei Proteine, die für den Einbau der Kupferionen in die Cytochrom c Oxidase von Bedeutung sind, sind die membranständigen Assemblierungsfaktoren Sco1 und Cox11. Cox11 heißt in einigen Prokaryoten auch CtaG und ist Thema dieser Arbeit.

Das Kupferchaperon Atox1 (Abbildung 1, blauer Transportweg), dessen Name von einer anfänglich vermuteten „antioxidativen“ Funktion herrührt, ist für den Transport von Kupferionen zum Golgi-Apparat verantwortlich. Ein ATP getriebener Kupfertransporter (ATP7A bzw. ATP7B im Menschen, Ccc2 in der Hefe) übernimmt die Metallionen von Atox1 und pumpt sie entweder in das Lumen des Golgi-Apparates oder, in einigen Zelltypen, wie Enterozyten und Hepatozyten, direkt über die Cytoplasmamembran in das Blut oder die Galle. In den Golgi-Apparat transportierte Kupferionen können in verschiedene Proteine eingebaut werden. Prominentester Vertreter ist hier die Multi-Kupfer-Ferroxidase Ceruloplasmin, welche durch Exocytose sezerniert wird und im Blutkreislauf für den Eisenhaushalt von Bedeutung ist (Kim, Nevitt et al. 2008).

Die Struktur von Atox1 ähnelt den Ferredoxinen und tritt bei Metalloproteinen häufiger auf: Eine  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Sekundärstrukturfolge lagert sich zu einer auch als *open-faced beta-sandwich* bezeichneten Konformation zusammen, die einem "Tablett" aus  $\beta$ -Faltblättern mit zwei darauf liegenden  $\alpha$ -Helices entspricht. Das Cu(I)-Ion wird von zwei Cysteinen koordiniert, die sich in einer hochkonservierten MXCXXC-Sequenz im Loop zwischen  $\beta_1$  und  $\alpha_1$  befinden. Die Rolle des konservierten Methionins ist dabei noch nicht verstanden. Interessanterweise trägt das Zielprotein von Atox1, die kupfertransportierende P-Typ-ATPase N-terminal mehrere kupferbindende Domänen, welche dieselbe *open-faced beta-sandwich* Faltung aufweisen. Durch die Verwendung von Cadmium-Ionen anstelle von Kupferionen konnte ein Kokomplex aus Atox1 und der N-terminalen Domäne von ATP7A kristallisiert werden (3CJK, Banci et al. *to be published*). Donor und Akzeptor ähneln sich in diesem System derart, dass die Kristallstruktur des Transferkomplexes an ein Homodimer erinnert, obwohl es sich um ein Heterodimer handelt (Abbildung 2A).

Auch das Kupferchaperon des zweiten Transportwegs weist strukturell starke Ähnlichkeiten mit seinem Akzeptor auf. Das Kupferchaperon CCS (*copper chaperone for SOD1*; Abbildung 1 roter Transportweg) beliefert die Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD1), welche zum Schutz vor freien Radikalen dient, indem sie die Disproportionierung von Superoxidradikalen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert (Culotta, Yang et al. 2006). CCS ist wesentlich größer als Atox1 und besteht aus drei Domänen: Domäne I dient der Kupferbindung und hat dieselbe *open-faced beta-sandwich* Struktur wie Atox1. Auch hier wird Cu(I) von den Cysteinresten des konservierten MXCXXC-Motivs koordiniert. Domäne II ist homolog zu SOD1 und dient der Erkennung und Bindung des Zielproteins, welches auch als Holoprotein als Dimer vorliegt. Eine SOD1 Mutante, die unfähig ist Cu(I) zu binden, konnte im Komplex mit CCS isoliert und kristallisiert werden (Lamb, Torres et al. 2001).



**Abbildung 2 - Atox1 und CCS binden Cu(I) über *open-faced beta-sandwich* Strukturen und beide Kupferchaperone weisen strukturelle Homologien zu ihren Zielproteinen auf.**

**A.** Atox1 (blau) hat die typische *open-faced beta-sandwich* Konformation der Ferredoxine: vier antiparallel verlaufende beta-Faltblätter bilden eine Grundfläche, auf der sich zwei alpha-Helices befinden. Das Metallion wird dabei von zwei Cysteinresten koordiniert, die sich in einem konservierten MXCXXC-Motiv zwischen  $\beta_1$  und  $\alpha_1$  befinden. Der Akzeptor von Atox1, hier die N-Terminale Domäne von ATP7A (eisblau), weist strukturell eine hohe Ähnlichkeit zu Atox1 auf, wodurch der Transferkomplex an ein Homodimer erinnert (3CJK). **B.** CCS (*copper chaperone for SOD1*, rot) besteht aus drei Domänen. Domäne I weist dieselbe *open-faced beta-sandwich* Struktur auf wie Atox1 und ist für die Kupferbindung verantwortlich. Domäne II ist homolog zu SOD1 (eisblau), dem Zielprotein, und dient der Erkennung und Bindung des Zielproteins. Analog zu Atox1 und ATP7A erinnert der Transferkomplex an ein Homodimer. Die dritte Domäne des Kupferchaperons CCS ist flexibel und enthält zwei Cysteinreste, die den Transfer des Kupferions von Domäne I auf SOD1 katalysieren (1JK9).

Die Struktur dieses Transferkomplexes ist in Abbildung 2B dargestellt. Die vergleichsweise kleine Domäne III des Kupferchaperons ist flexibel und enthält ein für die Funktion des Proteins essentielles CXC-Motiv. Diese Domäne katalysiert zum einen die Bildung einer internen Disulfidbrücke in SOD1 und zum anderen den Einbau des Kupferions.

Der dritte bisher bekannte Transportweg versorgt die Cytochrom c Oxidase, welche in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, über Cox17 und weitere Liganden mit Kupferionen. Dieser Transportweg wird im Abschnitt "Biogenese der Cytochrom c Oxidase" ausführlich behandelt und unterscheidet sich stark von den bereits beschriebenen und besser erforschten Atx1- und CCS-Transportwegen: (1) Zum einen sind neben Cox17 noch weitere Chaperone, wie Sco1 und Cox11, am Transport und Einbau der Kupferionen beteiligt. (2) Zum anderen weist keines der hier involvierten Chaperone die bei Atox1 und CCS beobachtete *open-faced beta-sandwich* Struktur auf. (3) Und darüberhinaus zeigt keines dieser Kupferchaperone strukturelle Homologien zu seinem Zielprotein. Bislang konnte auch noch kein Kokomplex aus einem der



Kupferchaperone und seinem Akzeptor isoliert werden, d.h. NMR- oder Kristallstrukturen von Transferkomplexen existieren nicht. Der Transportweg für die Cytochrom c Oxidase und die Biogenese dieses Atmungskettenkomplexes werden gegenwärtig intensiv untersucht und die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu diesem Gebiet liefern.

#### **1.4. Störungen der Kupferhomöostase**

Störungen im Kupferhaushalt können eine ganze Reihe von verschiedenen Erkrankungen auslösen (Rossi, Lombardo et al. 2004). Beispielsweise können die Akzeptoren des Atox1-Transportweges, die kupfertransportierenden P-Typ ATPasen ATP7A und ATP7B durch Mutationen inaktiviert oder stark inhibiert werden. Je nachdem welche der gewebespezifisch exprimierten Cu-ATPasen mutiert ist, kann dies zu einem Kupfermangel oder -überschuss in bestimmten Gewebetypen führen. Ist der Atox1-Rezeptor ATP7A betroffen, so resultiert dies in einem Kupfermangel. Kupferionen können zwar von Ctr1 über die apikale Membran der Enterozyten aus dem Darm aufgenommen werden, der Transport über die basolaterale Membran in das Blut der Pfortader ist aber gestört. Diese Unterversorgung äußert sich in dem sogenannten Menkes-Syndrom, einer im 1.-2. Lebensjahr fatal endenden Erbkrankheit: kupferabhängige Enzyme wie Tyrosinase, Lysyloxidase, Angiogenin und die Gerinnungsfaktoren V und VIII funktionieren nicht mehr und es kommt zu Störungen in der Pigmentbildung, der Vernetzung von Kollagen und Elastin im Bindegewebe, Minderwuchs und Störungen bei der Blutgerinnung (Pena, Lee et al. 1999). Ist hingegen der vorwiegend in der Leber und in Neuronen exprimierte ATP7B-Transporter defekt, kommt es zu einem Überschuss von Kupferionen in Leber und Gehirn. Die vorwiegend in der Leber synthetisierte und über den sekretorischen Transportweg in das Blut abgegebene multikupfer Ferroxidase Ceruloplasmin, kann nicht mehr mit Kupfer versorgt werden, da der Transport in den Golgi-Apparat unterbrochen ist. Somit ist die Versorgung der peripheren Gewebe mit Kupfer und Eisen nicht mehr gewährleistet. Dieser auch als Wilsonsche Krankheit bezeichnete Defekt führt zu motorischen und neuronalen Störungen, kann aber zumindest teilweise behandelt werden.

Störungen im Kupfertransportweg für die SOD1 können eine Form der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) hervorrufen. Diese in fataler Paralyse endende neurodegenerative Erkrankung ist auf ein massives Absterben von Neuronen zurückzuführen, und im Fall der Familiären Amyotrophen Lateralsklerose ist die Ursache des neuronalen Zelltods eine Mutationen der Cu/Zn-Superoxiddismutase. Einige Mutationen können zu einer Fehlfaltung oder zur Inhibition des Kupfereinbaus in die SOD1 führen. Es kommt einerseits zu einem mangelnden Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies und andererseits zur Aggregation und Ablagerung fehlgefalteter SOD1-Moleküle, was langfristig den Tod der Zelle zur Folge hat (Culotta, Yang et al. 2006).

<i>Enzym</i>	<i>Funktion</i>	<i>Konsequenz im Fall eines Defekts</i>
Lyslyoxidase	Quervernetzung von Kollagen und Elastin	Bindegewebschwäche, Gefäßstörungen
Tyrosinase	Melanin Biosynthese	Depigmentierung
Angiogenin	Induktion der Blutgefäßbildung	Eingeschränkte Gefäßbildung
Gerinnungsfaktor V, VIII	Blutgerinnung	Blutungstendenz
Ceruloplasmin	Ferroxidase, Kupfertransporter im Blut	Anämie
Dopamin $\beta$ -hydroxylase	Oxygenase, konvertiert Dopamin in Norepinephrin	Störung des Hypothalamus: Hypothermie, Hypotonie, Dehydrierung, Somnolenz
APP	neuronale Entwicklung, evtl. Kupfertransport?	Nach Spaltung zu A <sub>beta</sub> Bildung von Amyloid-Plaques in der Alzheimer Demenz
$\alpha$ -Synuklein	unbekannt, "nativ ungefaltet"	Aggregation zu Lewy-Körpern (Parkinson)
PrP	unbekannt, evtl. Kupfertransport an der Synapse	Kupferinduzierte Konformationsänderung und dadurch Aggregation (Prion Krankheiten)
SOD1	Schutz vor Reaktiven Sauerstoffspezies	Oxidativer Stress und Ablagerung von SOD1-Aggregaten (familiäre ALS)
Cytochrom c Oxidase	Finaler Schritt der mitochondrialen Elektronentransportkette	ATP-Defizienz: Myopathien, Koordinationsstörungen
ATP7A/ATP7B	ATP getriebener Kupfertransport über Membranen	Wilsonsche Krankheit/Menkes-Syndrom Störungen sämtlicher Kupferproteine

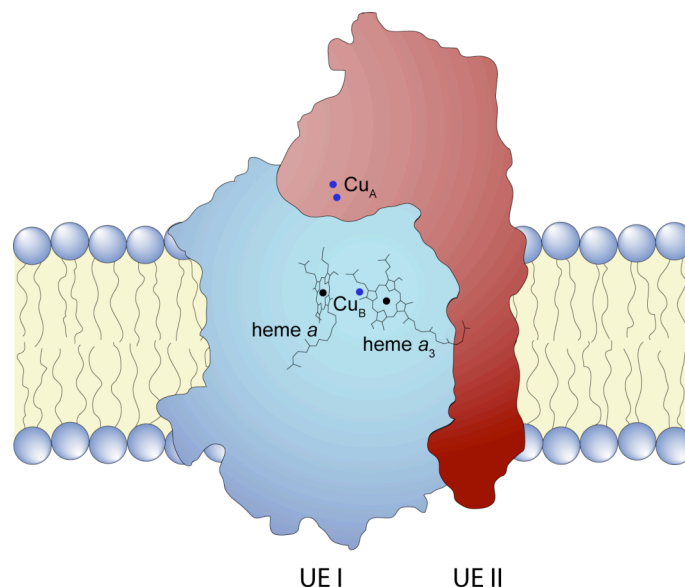
**Tabelle 1 - Kupferbindene Proteine und Konsequenzen im Fall von Defekten**  
(Pena, Lee et al. 1999; Rossi, Lombardo et al. 2004; Kim, Nevitt et al. 2008)

Neben diesen auf molekularer Ebene bereits relativ gut verstandenen Erkrankungen scheint Kupfer noch bei einer Reihe von weiteren Krankheiten eine Rolle zu spielen. Hier sind insbesondere durch pathologische Ablagerungen gekennzeichneten neurodegenerativen Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz, Parkinson und die Prionen-Krankheiten zu nennen. Bezüglich der Alzheimer-Demenz wurde beobachtet, dass Kupferionen die Quervernetzung von A<sub>beta</sub>-Fibrillen induzieren, was zur Bildung der für die Alzheimer-Demenz charakteristischen Amyloid-Plaques führt (White, Du et al. 2006) und darüberhinaus wurde ein Zusammenhang zwischen der A<sub>beta</sub>-Produktion und dem Kupferstatus der Zelle beobachtet (Bellingham, Lahiri et al. 2004). Auch die Bildung der für die Parkinson-Krankheit typischen Lewy-Körper, d.h. die Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein wird durch Kupferionen verstärkt und es konnte nachgewiesen werden, dass der Liquor von Parkinson Patienten einen erhöhten Kupferspiegel aufweist (Rasia, Bertoncini et al. 2005). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für das Prion-Protein PrP gemacht, welches, ebenso wie APP, über eine konservierte Kupferbindungsstelle verfügt und dessen Aggregation durch die Bindung von Kupferionen induziert wird (Treiber, Simons et al. 2006).

Aufgrund der Vielzahl von Erkrankungen an deren Entstehung Kupferionen beteiligt sind, ist es wichtig, ein besseres Verständnis für die Rolle von Kupfer in der Biologie und für die molekularen Ursachen und Auswirkungen von Störungen in der Kupferhomöostase zu entwickeln.

### 1.5. Die Cytochrom c Oxidase als Kupferakzeptor in den Mitochondrien

Die Cytochrom c Oxidase ist der einzige Komplex der mitochondrialen Atmungskette, der Kupferionen enthält und stellt somit das Hauptziel des mitochondrialen Kupfertransportwegs dar (siehe Abbildung 1, grüner Transportweg). Sie katalysiert den letzten Schritt des Elektronentransports, die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (Richter und Ludwig 2003; Hosler, Ferguson-Miller *et al.* 2006). 95 % des vom Menschen eingeatmeten Sauerstoffs werden hier verbraucht und um die Entstehung von Zwischenprodukten zu vermeiden, katalysiert die Cytochrom c Oxidase diese Reaktion in einem konzertierten Vier-Elektronen-Reduktionsschritt. Hierfür werden zunächst vier Elektronen von dem Ein-Elektronen-Donor Cytochrom c übernommen, über die redoxaktiven Metallzentren der Oxidase transportiert und im aktiven Zentrum gespeichert, bevor sie auf den finalen Akzeptor Sauerstoff übertragen werden. Während eines Reaktionszyklus werden vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix aufgenommen und über die innere Membran transloziert. Weitere vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix werden bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser konsumiert. Insgesamt acht Protonen der mitochondrialen Matrix tragen also zur Entstehung des Protonengradienten bei, der letztlich die ATP-Produktion durch die  $F_1F_0$ -ATP Synthase antreibt.



**Abbildung 3 - Die Cytochrom c Oxidase enthält fünf redoxaktive Kofaktoren**

Die ersten beiden Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase enthalten sämtliche redoxaktive Kofaktoren und sind für die Aktivität des Komplexes verantwortlich. Das aus zwei Kupferionen bestehende  $Cu_A$ -Zentrum übernimmt die Elektronen von Cytochrom c und überträgt sie auf das Häm a Zentrum. Von dort gelangen sie in das aktive Zentrum des Enzyms, das binukleäre  $Cu_B$  : Häm  $a_3$ -Zentrum, in dem die kontrollierte Reduktion von Sauerstoff zu Wasser stattfindet.

Die mitochondriale Cytochrom *c* Oxidase besteht aus insgesamt 13 Untereinheiten und enthält fünf redoxaktive Kofaktoren. Diese befinden sich ausschließlich in den ersten beiden Untereinheiten, UE I und UE II, welche auch ohne die weiteren Untereinheiten einen aktiven Komplex bilden können (Abbildung 3). Zwei Kupferionen bilden das Cu<sub>A</sub>-Zentrum, welches sich in der Lösungsmittlexponierten Domäne der Untereinheit II befindet und als primärer Akzeptor der Elektronen von Cytochrom *c* dient. Von hier werden die Elektronen auf das eigentliche Herz des Komplexes, die Untereinheit I übertragen. Über einen Häm *a* Kofaktor gelangen sie in das aktive Zentrum des Enzyms, das binukleäre Häm *a*<sub>3</sub> : Cu<sub>B</sub>-Zentrum, das die finale Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert.

Obwohl seit über 80 Jahren an der Cytochrom *c* Oxidase geforscht wird (Warburg 1928) und in dieser Zeit große Fortschritte erzielt wurden, sind noch immer einige Fragen offen: Der genaue Mechanismus der Sauerstoffreduktion ist noch nicht abschließend geklärt. Auch für die Kopplung von Elektronentransfer und Protonentranslokation gibt es einige Modelle, deren Gültigkeit nach wie vor ungesichert ist (Michel 1998; Hosler, Ferguson-Miller *et al.* 2006; Belevich und Verkhovsky 2008). Die Frage ob und wie die Oxidase in Form von Superkomplexen mit weiteren Atmungskettenkomplexen assoziiert, wird ebenfalls kontrovers diskutiert (Stroh, Anderka *et al.* 2004). Seit einigen Jahren richtet sich die Aufmerksamkeit einiger Gruppen auf eine weitere Frage: Wie wird dieser für das Leben der Zelle so essentielle Komplex überhaupt gebildet?

## 1.6. Biogenese der Cytochrom c Oxidase

Im Rahmen der Synthese der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase überwindet die Zelle einige Hürden. Zum einen müssen 10 der insgesamt 13 Untereinheiten aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien transportiert werden, da sie im Gegensatz zu den Untereinheiten I bis III nicht mitochondrial sondern kernkodiert sind. Die Synthese und der Transport der kernkodierten Untereinheiten muss also auf die Menge und die Lokalisation der mitochondrialen Untereinheiten abgestimmt werden. Zum anderen muss die Assemblierung der einzelnen Untereinheiten zum vollständigen Komplex koordiniert und gesteuert werden, um die Assoziation unfertiger Untereinheiten und somit die Entstehung inaktiver Oxidasekomplexe zu vermeiden. Und ein weiterer entscheidender Schritt in der Biogenese der Cytochrom c Oxidase ist der Einbau der Kofaktoren. Zwei  $\alpha$ -Typ Häme und drei Kupferionen müssen zum richtigen Zeitpunkt in die Untereinheiten I und II inseriert werden. Dabei muss sichergestellt werden, dass die Kofaktoren keine ungewünschten Nebenreaktionen katalysieren. Die prosthetischen Gruppen müssen also aufgenommen oder synthetisiert werden, an den Ort der Oxidase-Assemblierung geleitet und in die jeweilige Untereinheit eingebaut werden, ohne dabei ungewollt mit potentiellen Reaktionspartnern in Berührung zu kommen. Und auch nach der Insertion in das jeweilige Apoprotein muss sichergestellt sein, dass keine ungewünschten Reaktionen katalysiert werden bevor der vollständige Holokomplex zusammengesetzt wird.

Eine Vielzahl von sogenannten Assemblierungsfaktoren, d.h. akzessorischen Proteinen, welche keinen Bestandteil des finalen Komplexes bilden, ist an diesem Prozess beteiligt (Carr und Winge 2003; Herrmann und Funes 2005; Khalimonchuk und Rödel 2005). Ein großer Teil dieser Assemblierungsfaktoren wurde durch einen systematischen Ansatz in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert: per zufälliger Mutagenese wurden Hefe-Stämme erzeugt, die eine Cytochrom c Oxidase Defizienz aufwiesen und die entsprechend mutierten Proteine konnten durch Komplementationsversuche identifiziert werden (McEwen, Ko et al. 1986). Mittlerweile sind über 30 verschiedene Assemblierungsfaktoren bekannt, und ihre Funktionen reichen von regulatorischen Aufgaben während Transkription und Translation über Transport und Membraninsertion der Proteine, Koordinations- und Prozessierungsschritte bis hin zu Biosynthese, Transport und Insertion der Kofaktoren (Tabelle 2). Im folgenden werden einige der Assemblierungsfaktoren näher beschrieben, die speziell für den Transport und die Insertion der Kupferionen von Bedeutung sind.

<b>Protein<sup>1</sup></b>	<b>Funktion</b>
<b>Transkription und Translation</b>	
Cox14	Bindet frisch synthetisierte Untereinheit I und reguliert deren Translation gemeinsam mit Mss51
Mss51	Aktiviert die Translation von Untereinheit I und stabilisiert sie nach der Insertion in die Membran
Pet111	Translationsaktivator der mRNA für Untereinheit II
Pet122	Translationsaktivator der mRNA für Untereinheit III (mit Pet54 und Pet494)
Pet309	Stabilisiert und aktiviert die Translation der mRNA für Untereinheit I
Pet494	Translationsaktivator der mRNA für Untereinheit III (mit Pet54 und Pet122)
Pet54	Translationsaktivator der mRNA für Untereinheit III (gemeinsam mit Pet122 and Pet494) Splicen der mRNA für Untereinheit I
<b>Membraninsertion und Prozessierung</b>	
Cox18	Translokase der IMM <sup>2</sup> (Oxa2), Insertion der C-terminalen Domäne der Untereinheit II in die Membran, interagiert mit Pnt1 und Mss2, gehört zur YidC/Oxa1/Alb3 Familie
Cox20	Geleitet Untereinheit II durch die proteolytische Prozessierung
Mba1	Teil eines Oxa1-unabhängigen Translationsapparats. An der Insertion von mitochondrialen und kernkodierten Untereinheiten beteiligt.
Mss2	Unterstützt die Translokation der C-terminalen Domäne von Untereinheit II
Oxa1	An der Insertion mitochondrialer Untereinheiten beteiligte Translokase der inneren mitochondrialen Membran
Pnt1	Protein der IMM, beteiligt am Export von Proteinen der mitochondrialen Matrix
<b>Kupferinsertion</b>	
Cox11	Kupferbindendes Protein, das an der Insertion des Cu <sub>B</sub> -Ions beteiligt ist
Cox17	<i>twin</i> Cx <sub>9</sub> C Protein, das am Kupfertransport in den Intermembranraum beteiligt ist
Sco1/Sco2	Sco1: Kupferbindendes Protein, das an der Insertion der Cu <sub>A</sub> -Ionen beteiligt ist Sco1/2: zusätzliche Funktion in der Regulation der Kupferhomöostase
<b>Häm a Biosynthese und Insertion</b>	
Arh1	Ferredoxinreduktase (Häm a Biosynthese)
Cox10	Farnesyltransferase (Häm a Biosynthese)
Cox15	Häm a Synthase
Shy1	Teil eines frühen Assemblierungskomplexes (in Hefe mit Mss51 and Cox14) Funktion bei der Insertion von Häm a in die Untereinheit I
Yah1	Ferredoxin (Häm a Biosynthese)
Yfh1	Frataxin, mitochondriale Eisenhomöostase, Biogenese von Fe/S-Clustern, Häm-Biosynthese
<b>Koordination der Assemblierung</b>	
Pet100	Unterstützt die Assemblierung der Untereinheiten Cox7p, Cox8p and Cox9p in den Gesamtkomplex
<b>Genauere Funktion unbekannt</b>	
Cmc1	<i>twin</i> Cx <sub>9</sub> C Protein des Intermembranraums, Genaue Funktion unbekannt
Coa1	Genaue Funktion unbekannt, früherer Schritt in der Assemblierung, interagiert mit Mss51, Shy1 und Cox14
Coa2	Genaue Funktion unbekannt
Cox16	Genaue Funktion unbekannt
Cox19	<i>twin</i> Cx <sub>9</sub> C Protein des Intermembranraums, möglicherweise am Metalltransport beteiligt
Cox23	<i>twin</i> Cx <sub>9</sub> C Protein des Intermembranraums, möglicherweise am Metalltransport beteiligt
Mia40	Protein des mitochondrialen Intermembranraums, Import und Assemblierung von <i>twin</i> Cx <sub>9</sub> C Proteinen
Pet117	Genaue Funktion unbekannt
Pet191	An der Aufrechterhaltung der <i>twin</i> Cx <sub>9</sub> C Proteine Cox17, Cox19 and Cox23 im Intermembranraum beteiligt

**Tabelle 2 - Assemblierungsfaktoren der Cytochrom c Oxidase**

<sup>1</sup>Hefe-Nomenklatur; <sup>2</sup>IMM: Innere mitochondriale Membran.

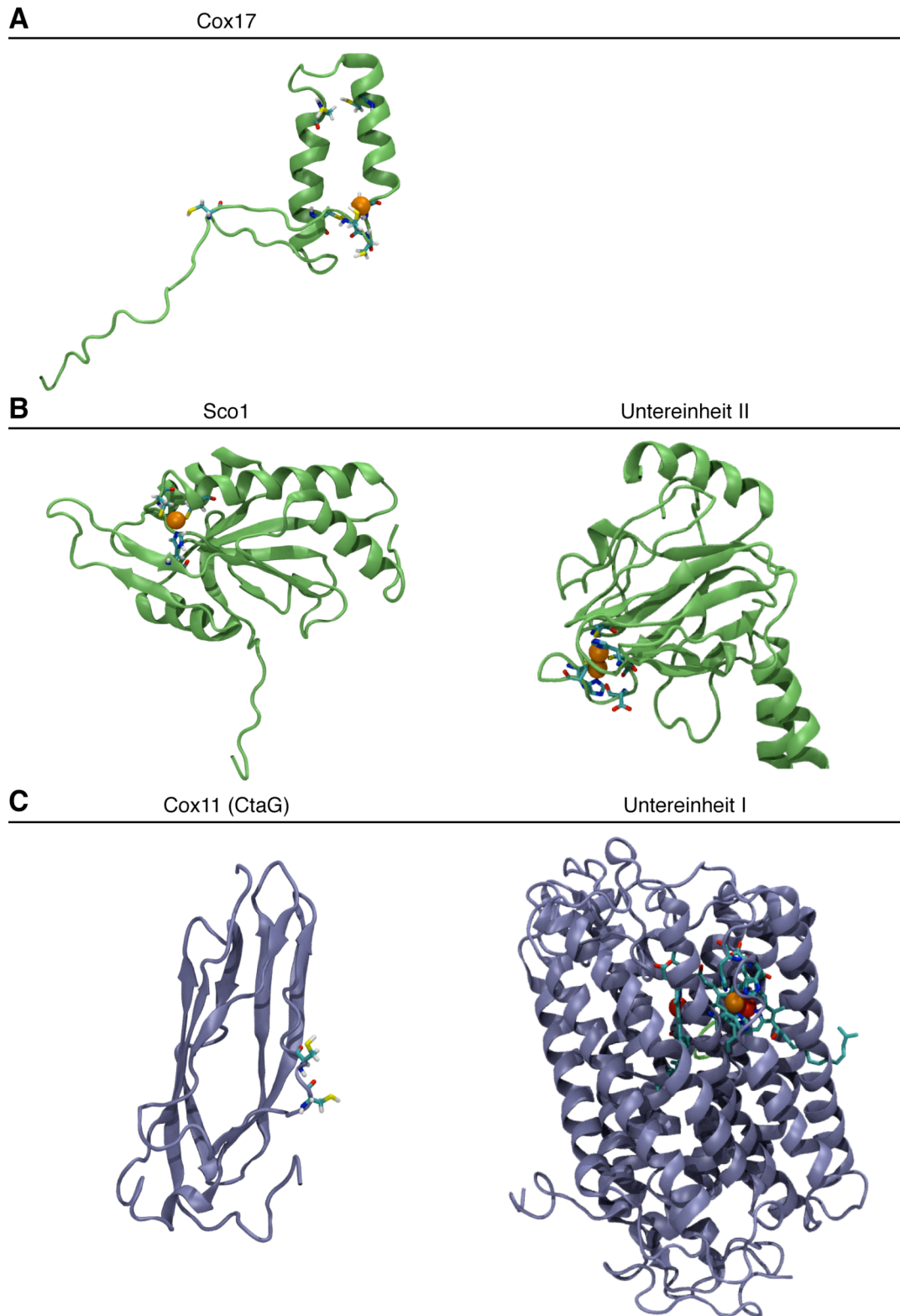
(Herrmann und Funes 2005; Khalimonchuk und Rödel 2005; Zee und Glerum 2006)

## 1.7. Assemblierungsfaktoren für die Kupferzentren der Cytochrom c Oxidase

### 1.7.1. Cox17

Die meisten Assemblierungsfaktoren der Cytochrom c Oxidase sind Bestandteil der inneren mitochondrialen Membran oder des mitochondrialen Intermembranraums. Eine Ausnahme stellt hier das 8 kDa große löslich Cox17 dar, welches im Gegensatz zu den meisten anderen Assemblierungsfaktoren zu großen Teilen in der Zytoplasmafraction vorliegt (Glerum, Shtanko et al. 1996). Dieses Protein verfügt über sechs hochkonservierte Cysteinreste, von denen vier ein sogenanntes *twin-Cx<sub>9</sub>C* Motiv bilden. Da sich die Oxidase-Defizienz bei einer Cox17-Deletion durch Zugabe von Kupferionen unterdrücken lässt und da Cox17 sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vorliegt, wurde postuliert, dass Cox17 für den Transport von Kupferionen in die Mitochondrien verantwortlich ist (Glerum, Shtanko et al. 1996). Diese Hypothese wurde durch die Tatsache untermauert, dass Cox17 ein kupferbindendes Protein ist (Beers, Glerum et al. 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cox17 seine Kupferionen selektiv auf die beiden membranständigen Proteine Sco1 und Cox11 übertragen kann, welche ebenfalls an der Biogenese der Cu<sub>A</sub>- und Cu<sub>B</sub>-Zentren beteiligt sind (Hornig, Cobine et al. 2004). Man geht daher zur Zeit davon aus, dass Cox17 die Kupferionen aus dem Zytoplasma in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert und sie dort an Sco1 und Cox11 abgibt, welche die Metallionen anschließend in die Untereinheiten II und I der Cytochrom c Oxidase inserieren (siehe Abbildung 5). Interessanterweise tritt Cox17 lediglich in eukaryotischen Zellen auf, was mit der postulierten Rolle als Kupferlieferant für Mitochondrien gut zusammenpasst.

Die Versorgung der Cytochrom c Oxidase mit Kupferionen ist allerdings auch dann noch gewährleistet, wenn Cox17 künstlich in der inneren mitochondrialen Membran verankert wird und nicht mehr als Transporter zwischen Zytoplasma und Mitochondrium dienen kann (Maxfield, Heaton et al. 2004). Dies spricht dafür, dass weitere Liganden Kupferionen in den mitochondrialen Intermembranraum transportieren. Möglicherweise wird Cox17 durch homologe Proteine mit überlappenden Funktionen, wie beispielsweise Cox19 und Cox23, unterstützt.



**Abbildung 4 - Cox17, Sco1 und Cox11 sind an der Biogenese der Kupferzentren beteiligt**

Weder Cox17 noch Sco1 oder Cox11 verfügen über eine *open-faced beta-sandwich* Struktur, die für andere Kupferchaperone und Metalloproteine charakteristisch ist (siehe Atox1 und Ccs, Abbildung 2). Desweiteren unterscheiden sich die Strukturen der Kupferchaperone deutlich von ihren jeweils diskutierten Akzeptoren, was ebenfalls ein Unterschied zu den klassischen Kupferchaperonen Atox1 und Ccs ist (siehe Abbildung 2). **A.** Cox17 überträgt Kupferionen auf Sco1 und Cox11. **B.** Sco1 ist an der Entstehung des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums in Untereinheit II beteiligt. **C.** Cox11, dessen prokaryotisches Homolog CtaG Thema der vorliegenden Arbeit ist, spielt eine Rolle bei der Biogenese des  $\text{Cu}_B$ -Zentrums in der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase. (PDB-Codes: Cox17: 1U96; Sco1: 2GQM; Cox11: 1SP0; Cytochrom c Oxidase: 1QLE)



### 1.7.2. Sco1

Der Cox17 bedingte Defekt im Kupfertransfer zur Cytochrom c Oxidase lässt sich nicht nur durch Zugabe von Kupferionen kompensieren, sondern auch durch die Überexpression eines weiteren Assemblierungsfaktors, des mitochondrialen Membranproteins Sco1 (Glerum, Shtanko et al. 1996). Umgekehrt kann die Deletion von Sco1 jedoch nicht durch Überexpression von Cox17 kompensiert werden, was dafür spricht, dass Sco1 an einem späteren Schritt in der Biogenese beteiligt ist. Da Sco1 mit der Untereinheit II der Oxidase wechselwirkt (Lode, Kuschel et al. 2000) und ein kupferbindendes Protein ist (Nittis, George et al. 2001) wurde zunächst angenommen, dass es die Kupferionen für das  $Cu_A$ -Zentrum der Untereinheit II liefert. *In vitro* Versuche zeigten außerdem, dass Cox17 einen Teil seiner Kupferionen auf Sco1 übertragen kann (Hornig, Cobine et al. 2004). Daher sieht ein Szenario für die Assemblierung der Cytochrom c Oxidase vor, dass Cox17 Kupferionen aus dem Zytosol in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert und sie dort auf Sco1 und ein weiteres membranständiges Kupferchaperon (Cox11) überträgt, welche sie letztlich in die Oxidase inserieren (siehe Abbildung 1, S. 4).

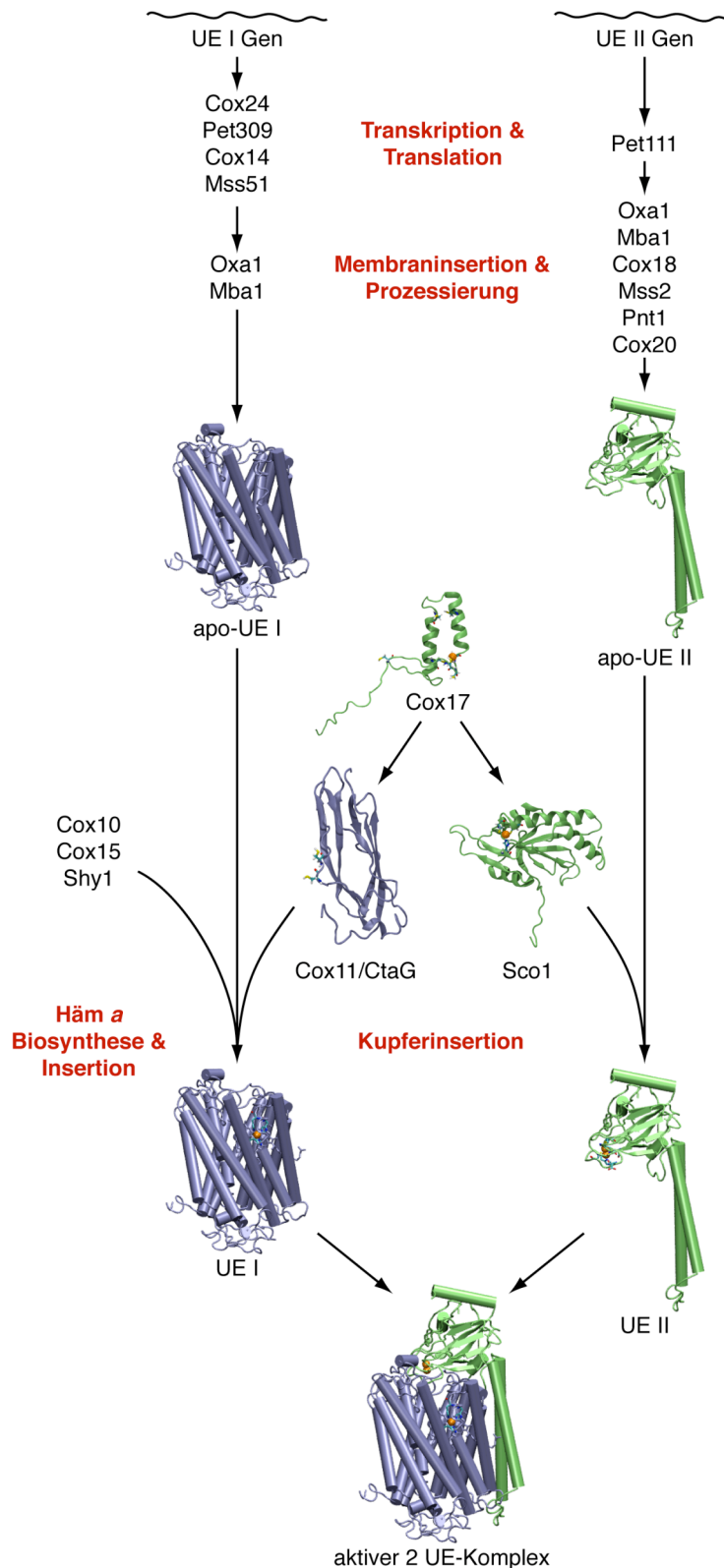
Die Sequenz und Struktur von Sco1 erinnert jedoch an die Familie der Thioredoxine, welche die Bildung und Spaltung von Disulfidbrücken katalysieren können (Balatri, Banci et al. 2003; Abajian und Rosenzweig 2006). Daher wird eine alternative Funktion von Sco1 diskutiert: Als Thioreduktase könnte Sco1 für die Reduktion der Cysteine des  $Cu_A$ -Bindemotivs  $Hx_nCxExCGx_2Hx_2M$  verantwortlich sein und somit eine vorbereitende Rolle bei der Insertion der Kofaktoren spielen (Chinenov 2000). Tatsächlich wurde für eine bakterielle Oxidase beobachtet, dass Sco1 für die Reduktion der Cysteine benötigt wird, die Kupferionen aber nicht von Sco1, sondern von einem weiteren Kupferchaperon (PCuAC, *periplasmic Cu<sub>A</sub> chaperone*) inseriert werden. Da PCuAC nur in Bakterien existiert, gilt dieser Mechanismus jedoch nicht für die Biogenese der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase (Abriata, Banci et al. 2008). Eukaryotische Sco-Proteine weisen aber eine höhere Affinität für Cu(I) auf, als ihre prokaryotischen Homologe, weshalb Sco1 in Eukaryoten gleichzeitig als Thioreduktase und Kupferdonor dienen könnte.

### 1.7.3. Cox11 bzw. CtaG

Cox11 ist das eukaryotische Homolog von CtaG, dem in dieser Arbeit untersuchten potentiellen Assemblierungsfaktor für die Cytochrom c Oxidase. In der Hefe *S. cerevisiae* liegt Cox11 als 28 kDa großes integrales Protein der inneren mitochondrialen Membran vor. Wie Sco1, Cox17 und andere Assemblierungsfaktoren ist Cox11 für die Aktivität der Cytochrom c Oxidase von essentieller Bedeutung, ohne jedoch Bestandteil des finalen Komplexes zu sein. Ihm wurde zunächst eine koordinierende Rolle bei der Assemblierung zugeschrieben (Tzagoloff, Capitanio et al. 1990). Die Phänotypen einer Cox11-Deletion sind von Organismus zu Organismus unterschiedlich stark ausgeprägt. In höheren Eukaryoten, die auf aerobe Atmung angewiesen sind, ist ein Defekt der Cox11-Funktion höchstwahrscheinlich bereits in einem frühen Entwicklungsstadium lethal. Mehrere Cox11 Deletionsversuche in *C. elegans* führten zumindest zu diesem Ergebnis. Darüberhinaus ist im Gegensatz zu anderen Assemblierungsfaktoren keine Erkrankung beim Menschen bekannt, die auf einem Cox11-Defekt beruht. Vermutlich ist funktionales Cox11 für das menschliche Überleben unabdingbar.

Organismen, die auf aerobe Atmung verzichten können, oder über alternative terminale Oxidasen verfügen sind auf die Aktivität der Cytochrom c Oxidase nicht zwingend angewiesen und können auch bei Cox11-Deletionen überleben. In der Hefe *S. cerevisiae* geht die Deletion von Cox11 mit einem Verlust der Oxidaseaktivität und dem Abbau der Untereinheit I einher (Tzagoloff, Capitanio et al. 1990). In dem prokaryotischen Modellsystem *Paracoccus denitrificans* führt die Deletion des Homologs CtaG ebenfalls zu einem Verlust der Oxidaseaktivität. Die Cytochrom c Oxidase wird jedoch weniger stark abgebaut und kann aufgereinigt und näher untersucht werden. Die aufgereinigte Oxidase zeigt einen verringerten Kupfer- und Eisengehalt, sowie eine spektrale Verschiebung der Häm-Absorptionen. Dies deutet auf eine Rolle von CtaG, bzw. Cox11 bei der Insertion der Häm- und Kupfer-Kofaktoren hin (Pfitzner 2000).

In *Rhodobacter sphaeroides* lässt sich der Effekt der CtaG-Deletion weiter eingrenzen: Hier führt die Deletion speziell zu einem Verlust des  $\text{Cu}_B$ -Ions. Dieser äußert sich in einem Häm  $a_3$ -spezifischen EPR-Signal, welches in der wildtyp-Oxidase aufgrund von Spin-Kopplungen zwischen  $\text{Cu}_B$  und dem Häm  $a_3$ -Eisenion nicht auftritt. Sowohl die  $\text{Cu}_A$ -Ionen als auch die beiden Häm  $a$ -Kofaktoren bleiben in *R. sphaeroides* erhalten (Hiser, Di Valentin et al. 2000). Untersuchungen an isoliertem *S. cerevisiae* Cox11 zeigten weiter, dass es sich bei Cox11 um ein Cu(I)-bindendes Protein handelt (Carr, George et al. 2002). Für *S. cerevisiae* konnte außerdem gezeigt werden, dass Cox11 einen Teil der Kupferionen spezifisch von Cox17 übernimmt (Hornig, Cobine et al. 2004).



**Abbildung 5 - Aktuelle Vorstellung zur Assemblierung der Cytochrom c Oxidase in *S. cerevisiae***

Gegenwärtig geht man davon aus, dass Kupferionen über *Cox17* in den Intermembranraum gelangen und auf die membranständigen Assemblierungsfaktoren *Cox11* und *Sco1* übertragen werden. Während *Sco1* an der Assemblierung des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums in Untereinheit II beteiligt ist, spielt *Cox11* eine wichtige Rolle bei der Entstehung des  $\text{Cu}_B$ -Zentrums. Der Faltungszustand der kofaktorfreien Untereinheiten (apo-UE I und apo-UE II) ist ungewiss. (Nijtmans, Taanman *et al.* 1998; Herrmann und Funes 2005; Khalimonchuk und Rödel 2005; Zee und Glerum 2006)

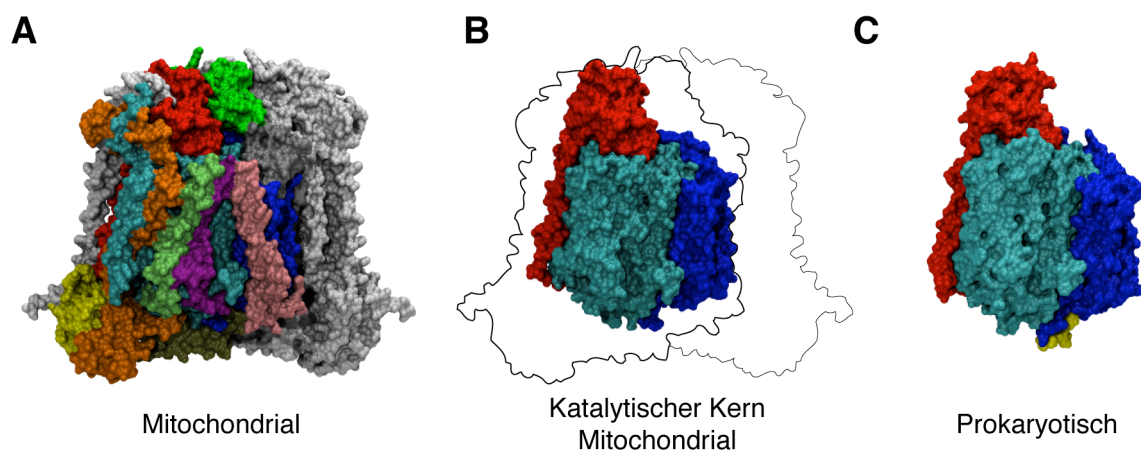
Cox11 besteht aus einer C-terminalen, löslichen Domäne, einer einzelnen Transmembranhelix und einer kurzen N-terminalen Sequenz. Die C-terminale lösliche Domäne macht den größten Teil des Proteins aus und ragt in den Intermembranraum. In dieser Domäne befindet sich ein hochkonserviertes CFCF-Motiv, das für die Bindung der Metallionen verantwortlich sein könnte. Ein dritter hochkonservierter Cysteinrest, der für die Funktion des Proteins von Bedeutung sein könnte, liegt ebenfalls in dieser Domäne und befindet sich nahe der Transmembranhelix. Die kürzere N-terminale Domäne ist für die Funktion des Proteins nicht essentiell und fehlt in einigen Organismen fast vollständig. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten *Paracoccus* Homolog, ist sie mit ca. 10 Aminosäuren beispielsweise vernachlässigbar klein. Bei einem CtaG-Homolog aus *Shizosaccharomyces pombe* ist die N-terminale Domäne mit über 500 Aminosäuren hingegen zwei bis dreimal so groß wie Cox11 in den meisten Organismen. Diese N-terminale Domäne des *S. pombe* Cox11 weist Homologien zu dem mitochondrialen Protein Rsm22 auf. Gleichzeitig gab es Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Cox11 und Ribosomen in *S. cerevisiae* (Khalimonchuk, Ostermann et al. 2005). Es wurde eine Funktion der N-terminalen Domäne von Cox11 bei einer Wechselwirkung mit Ribosomen diskutiert. Diese konnte jedoch nicht bestätigt werden (Carr, Maxfield et al. 2005). Diese Beobachtungen könnten jedoch auf eine kotranslationale stattfindende Aufgabe von Cox11 hindeuten.

Die Struktur des kupferfreien löslichen CtaG-Fragments aus *Sinorhizobium meliloti* wurde per NMR gelöst und unterscheidet sich stark von klassischen Kupferchaperonen wie Atox1 oder Ccs (Banci, Bertini et al. 2004). CtaG besteht ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblatt Elementen und ungeordneten Bereichen. Insgesamt zehn  $\beta$ -Stränge lagern sich parallel und antiparallel zusammen, um aus zwei  $\beta$ -Blättern ein nahezu zylindrisches  $\beta$ -barrel zu bilden (Abbildung 4C). Das hochkonservierte CFCF-Motiv befindet sich auf einer Längsseite des  $\beta$ -barrels und stellt einen Bereich mit besonders hoher struktureller Flexibilität dar. Vermutlich wird dieser Bereich erst durch die Bindung von Kupferionen stabilisiert. Interessanterweise zeigt keines der drei Proteine (Cox17, Sco1 und Cox11) des mitochondrialen Kupfertransportwegs ein *open-faced beta-sandwich* Strukturelement oder eine strukturelle Homologie zu seinem potentiellen Akzeptorprotein. Dadurch unterscheiden sich diese Assemblierungsfaktoren von den klassischen Kupferchaperonen Atox1 und Ccs (vergleiche Abbildung 2 und Abbildung 4).

Die drei Beobachtungen, dass (1) Cox11 ein kupferbindendes Protein ist, (2) die Deletion von Cox11 zu einem Verlust des  $\text{Cu}_B$ -Ions in der Cytochrom c Oxidase führt und (3) Cox17 Kupferionen auf Cox11 übertragen kann, bilden die Grundlage der aktuellen Vorstellung, dass Cox11 bzw. *CtaG* unmittelbar für die Insertion des  $\text{Cu}_B$ -Ions in die Cytochrom c Oxidase verantwortlich ist und diese von Cox17 übernimmt. Dieser Transfer konnte jedoch bisher weder direkt verfolgt werden, noch konnte eine Wechselwirkung zwischen Cox11 und der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase nachgewiesen werden.

### 1.8. Prokaryotische Modellsysteme zur Untersuchung der Cytochrom c Oxidase

Die mitochondriale Cytochrom c Oxidase ist ungleich komplexer aufgebaut und experimentell schwieriger zugänglich als ihre prokaryotischen Vorläufer. Im Zuge der Endosymbiontentheorie geht man davon aus, dass Mitochondrien aus endozytierten Prokaryoten hervorgegangen sind. Zehn von insgesamt 13 Untereinheiten der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase sind kernkodiert. Diese akzessorischen Untereinheiten wurden vermutlich im Laufe der Zeit durch den Wirt hinzugefügt, um die ursprünglich prokaryotische Oxidase zu stabilisieren und regulieren. Die Gene für die drei wichtigsten Untereinheiten (UE I, II und III) liegen hingegen auf dem mitochondrialen Genom. Diese drei Untereinheiten haben sich im Laufe der Evolution kaum verändert und bilden den katalytischen Kern der Cytochrom c Oxidase (siehe Abbildung 6).



#### Abbildung 6 - Vergleich einer mitochondrialen und einer prokaryotischen Cytochrom c Oxidase

Der katalytische Kern der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase besteht aus den Untereinheiten I bis III und hat sich im Laufe der Evolution kaum verändert. A. Vollständige Darstellung der dimeren eukaryotischen Cytochrom c Oxidase; B. Auf die Untereinheiten I-III reduzierte Darstellung der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase; C. Vollständige Darstellung einer prokaryotischen Cytochrom c Oxidase. (PDB codes: 2OCC, 1QLE)

Nach bisherigen Erkenntnissen unterscheiden sich die grundlegenden Mechanismen und Funktionsweisen kaum zwischen mitochondrialen Oxidasen und ihren prokaryotischen Vorläufern. Die prokaryotischen Systeme sind jedoch experimentell besser zugänglich, da ihre Oxidasen weniger komplex aufgebaut sind, leichter aufgereinigt und genetisch

verändert werden können und da sie aufgrund alternativer terminaler Oxidasen auch lethale Mutationen überleben können. Dieselben Vorteile gelten auch für Untersuchungen zur Biogenese der Cytochrom c Oxidase. Aufgrund der geringeren Anzahl an Untereinheiten, ist ein einfacherer Assemblierungsprozess zu erwarten, an dem entsprechend weniger Assemblierungsfaktoren beteiligt sein sollten (siehe auch Ergebnisse & Diskussion Kapitel 1 "Bioinformatische Analyse"). Die essentiellen Abläufe während der Biogenese sollten jedoch identisch, bzw. sehr ähnlich sein.

Phylogenetisch sind die  $\alpha$ -Proteobakterien, wie zum Beispiel *Paracoccus denitrificans* und *Rhodobacter sphaeroides* die nächsten Verwandten der Mitochondrien (Castresana, Lübben et al. 1994). Diese Organismen gelten daher als gute Modellsysteme zur Untersuchung der mitochondrialen Atmungskette.

### 1.9. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Biogenese der Cytochrom c Oxidase liefern. Der Fokus liegt dabei speziell auf der Biogenese des Cu<sub>B</sub>-Zentrums.

Das *Paracoccus denitrificans* Protein CtaG, ein Homolog des potentiellen Kupferchaperons Cox11 aus *S. cerevisiae*, soll heterolog in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und *in vitro* charakterisiert werden. Dabei soll zunächst überprüft werden, ob es sich bei CtaG um ein kupferbindendes Protein handelt. Und im Fall einer Kupferbindung soll weiterhin die Selektivität und Affinität für Kupfer untersucht sowie die Kupferbindungsstelle mit Hilfe von Mutagenesestudien charakterisiert werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen CtaG und Untereinheit I. Sollte CtaG tatsächlich unmittelbar für die Insertion des Cu<sub>B</sub>-Ions verantwortlich sein, so müsste sich eine Wechselwirkung zwischen CtaG und der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase nachweisen lassen. Diese Wechselwirkung soll zum einen *in vivo* und in heterologen Systemen untersucht werden, zum anderen soll mit Hilfe der aufgereinigten Komponenten *in vitro* überprüft werden, ob ein Transfer von Kupferionen zwischen CtaG und UE I stattfindet.

## II. Material & Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1. Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Acrylamid	AppliChem
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem
APS	Fluka
Bacto™ Yeast-Extract	Becton Dickinson
Bacto™-Tryptone	Becton Dickinson
BCIP	BioVectra
Bis-Acrylamid	AppliChem
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	BioRad
BSA	Biomol
Coomassie Brilliant Blue R250	AppliChem
DMF	Merck
Dodecylmaltosid	Biomol
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Folin-Ciocalteus-Reagenz	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Roth
Imidazol	AppliChem
IPTG	MBI-Fermentas
Kanamycinsulfat	Fluka
L-Asparaginsäure	AppliChem
L-Serin	AppliChem
NBT	Roth
NCS	Biochrom KG
Pefabloc SC	Biomol
Ponceau S	Merck
SDS	Roth
TCA	Merck
TEMED	Roth
Tris Ultra Qualität	Roth
Triton X-100	Roth
Tween 20	Merck-Schuchardt
BCA	Fluka

Tabelle 3 - verwendete Chemikalien

## 1.2. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Basic	Sartorius
Autoklav Bioklav	Schütt
BioPilot	Pharmacia
Brutschrank	Heraeus
Chromatographie-System Dialysepumpen	BioRad
Eismaschine	Ziegra
Fermenter Microferm	New Brunswick Scientific
FPLC/HPLC Anlage Äkta Purifier	GE-Healthcare Life Sciences
Gefriertruhen	Heraeus
Heizblock	Bachofer
Luftbadschüttler	New Brunswick Scientific
Manton-Gaulin-Pressen	APV Schröder
Mikrowelle	Hitachi
pH-Meter pH340i	WTW
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Proteinelektrophorese	Harnischmacher
Proteinelektrophorese Mini Protean II	BIORAD
Spannungsgeber	BioRad
Spannungsgeber Powerpac 300 Biomol	Biomol
Spektrophotometer U-3000	Hitachi
Spektrophotometer UVIKON	Kontron
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler	BioRad
Thermocycler OmniGen	Hybaid
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Trockenschrank	Memmert
Ultra-Thurax-Homogenisator T25	IKA Labortechnik
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson
Ultrazentrifuge L-70	Beckmann
Ultrazentrifuge table top	Beckmann
UV-Tisch	UVP
Videoprinter	Mitsubishi
Vortexer Reax 2000	Heidolph
Zentrifugen Sorvall RC 5B, RC 36	DuPont

**Tabelle 4 - verwendete Geräte**



### 1.3. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
1,5 ml Ultrazentrifugationsgefäße	Beckmann
15 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
50 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
Dialyseschläuche	Roth
Konzentratoren (20 ml, cutoff: 10.000 Da, 50.000 Da)	Millipore, ?
Nitrocellulosemembran BA 85	Schleicher & Schüll
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore
PCR-Tubes	Sarstedt
1,5 ml Spinfilter	Pall
3-Wege-Hähne	Braun
Spritzen	Braun
Kanülen	Braun
Skalpelle	Braun

Tabelle 5 - verwendete Verbrauchsmaterialien

### 1.4. Chromatographie Materialien

Säulenmaterial	Hersteller
Superdex 75	Amersham Biosciences
Superdex 200	Amersham Biosciences
NiNTA Agarose	Qiagen
NiNTA Superflow	Qiagen
Sephadex G25	Amersham Biosciences
Superose 6	GE Healthcare Life Sciences
DEAE CL6B	Amersham Biosciences

Tabelle 6 - Chromatographie Materialien

## 1.5. Proteine

### 1.5.1. Enzyme

Enzym	Hersteller
Ampligase	Epicentre
<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> (CIAP)	New England Biolabs
Lysozym	Biomol
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	Finzymes
Ribonuclease A (RNase)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-Polynucleotidkinase (PNK)	Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	NEB
TEV-Protease	diese Arbeit
verschiedene Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Fermentas

Tabelle 7 - Enzyme

### 1.5.2. Antikörper

Antikörper/Antiserum	Ursprungsorganismus	Hersteller
$\alpha$ -CtaG Antiserum	Kaninchen	Peter Greiner (+ Eurogentech)
His- <i>tag</i> monoclonal antibody	mouse	Novagen
$\alpha$ -UEI Antiserum, IgG-Fraktion (AH)	Kaninchen	Institut
$\alpha$ -UEI/UEII Antiserum, IgG-Fraktion (BG)	Kaninchen	Institut
$\alpha$ -C <sub>1</sub> Antiserum, IgG-Fraktion (??)	Kaninchen	Institut
$\alpha$ -C <sub>552</sub> Antiserum, IgG-Fraktion (??)	Kaninchen	Institut

Tabelle 8 - Antikörper

## 1.6. Nukleinsäuren

### 1.6.1. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft/Referenz
pAN9#2	pQE30 Derivat, mit TEV- <i>site</i> und NcoI-Schnittstelle hinter N-terminalem His <sub>6</sub> - <i>tag</i> (enthält über NcoI/HindIII ein Fragment des Rieske-Fe/S-Proteins aus dem <i>P. d. bc<sub>1</sub></i> -Komplex)	Amp	O. Anderka, 2005
pKM263	pET3b-Derivat mit N-terminalem His <sub>6</sub> +GST- <i>tag</i> , gefolgt von einer TEV- <i>site</i>	Amp	K. Melcher, 2000
pQE30	t5-Promotor, lac-Operator, N-terminaler His <sub>6</sub> - <i>tag</i>	Amp	Qiagen
pQE60	t5-Promotor, lac-Operator, C-terminaler His <sub>6</sub> - <i>tag</i>	Amp	Qiagen
pRep4	kodiert für den <i>lac</i> -Repressor und dient im pQE-System einer strikteren Kontrolle der Expression	Kan	Qiagen
pSeIN	BamHI-Fragment des <i>P. d.</i> -Genoms, welches das <i>cta</i> -Operon trägt in pAlter-1	Tet <sup>r</sup> , Amp <sup>s</sup>	Steinrücke, 1991
pGR3	CtaG <sub>SF</sub> NcoI/BamHI in pKM263 (GST-Fusion)	Amp	Greiner, 2003
pGR4	CtaG <sub>SF</sub> NcoI/HindIII in pAN9#2	Amp	Greiner, 2003
pGR5	CtaG <sub>full-length</sub> NcoI/HindIII in pAN9#2 (N-terminaler, TEV-spaltbarer His <sub>6</sub> - <i>tag</i> )	Amp	Greiner, 2003
pGR6	CtaG <sub>full-length</sub> NcoI/HindIII in pQE60 (C-terminaler, TEV-spaltbarer His <sub>6</sub> - <i>tag</i> )	Amp	Greiner, 2003
pGR10	CtaG <sub>LF</sub> NcoI/HindIII in pAN9#2 (N-terminaler TEV-spaltbarer His <sub>6</sub> - <i>tag</i> )	Amp	diese Arbeit
pGR19	CtaG <sub>LF</sub> NcoI/BamHI in pKM263 (N-terminaler TEV-spaltbarer His <sub>6</sub> -GST- <i>tag</i> )	Amp	diese Arbeit
pGR20	CtaG <sub>LF</sub> NcoI/HindIII in pET21d (C-terminaler TEV-spaltbarer His <sub>6</sub> - <i>tag</i> )	Amp	diese Arbeit
pGR20-M1	C38S Mutante von pGR20	Amp	diese Arbeit
pGR20-M2	C129S Mutante von pGR20	Amp	diese Arbeit
pGR20-M3	C131S Mutante von pGR20	Amp	diese Arbeit
pGR20-M4	C129S C131S Mutante von pGR20	Amp	diese Arbeit
pGR20-M5	F130A F132A Mutante von pGR20	Amp	diese Arbeit
pGR20-M7	C38S C129S C131S Mutante von pGR20	Amp	diese Arbeit
pGR21	CtaG <sub>LF</sub> NcoI/HindIII in pET22b (C-terminaler TEV-spaltbarer His <sub>6</sub> - <i>tag</i> + N-terminale <i>pe/B</i> -Signalsequenz für das Sec-Export-System)	Amp	diese Arbeit
pSL1	CtaDII XbaI/XhoI in pUC19 XbaI/SalI	Amp	Wikström/Raitio
pGR40	CtaDII BamHI/XhoI in pET24a (T7tag-UE I-linker-TEV-His10tag) (Cpol-Schnittstelle im GPGPG-linker)	Kan	diese Arbeit
pGR41	H276A H325A H326A Mutante von pGR40 (Cu <sub>B</sub> -Mutante der UE I)	Kan	diese Arbeit

Tabelle 9 - Plasmide

### 1.6.2. Oligonucleotide

Name	Sequenz	Herkunft
3F/4F	5'-ATATCCATGGCGTCGGACACGGTGCTG-3' 27 bp (NcoI-Schnittstelle vor AS53 von CtaG)	Biospring
5F/6F	TATATCCATGGGCGGCGGGAAGCCAAGG 28 bp (NcoI-Schnittstelle vor AS1 von CtaG)	Biospring
3R	CGCTGGATCCTCAGTTTACGGTCGGTTC 28 bp (BamHI-Schnittstelle nach <i>ctaG</i> -Stopcodon)	Biospring
4R/5R	GCGCAAGCTTTACAGTTTACGGTCGGTTC 27 bp (HindIII-Schnittstelle nach <i>ctaG</i> -Stopcodon)	Biospring
6R	GCGCAGATCTGGCGCCCTGAAAATAAAGA TTCTCGTTTACGGTCGGTTCGGTTTTTCG 56 bp (BglII-Schnittstelle nach AS194 von CtaG, TEV-Schnittstelle)	Biospring
10F	AATACCATGGCCTGGTTCTGCAAGGTAACCG (NcoI-Schnittstelle vor AS38 von CtaG)	Biospring
20R	GCGCAAGCTTGGCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCGTTTAC GGTCGGTTCCGTTTTTC ( <i>ctaG</i> - kein Stopcodon - TEV-site - HindIII-Schnittstelle)	Biospring
M1 (C38S)	ATTCCTGGTTCTCCAAGGTAACCGGTTTTGCCGGC (Mutageneseprimer für <i>ctaG</i> , neue AgeI-Schnittstelle)	Biospring
M2 (C129S)	CAAGATTGAAAGCTTCTGCTTTACC (Mutageneseprimer für <i>ctaG</i> , neue HindIII-Schnittstelle)	Biospring
M3 (C131S)	TCAACAAGATTGAGTGCTTACGCTTTACCGAGC (Mutageneseprimer für <i>ctaG</i> , BsmI-Schnittstelle deletiert)	Biospring
M4 (C129S/C131S)	AACAAGATTGAAAGCTTACGCTTTACCGAGCAGAC (Mutageneseprimer für <i>ctaG</i> , neue HindIII-Schnittstelle)	Biospring
M5 (F130A/F132A)	AAGATTGAATGTGCCTGCGCTACCGAGCAGACC (Mutageneseprimer für <i>ctaG</i> , BsmI-Schnittstelle deletiert)	Biospring
AH1F	TATTAAGGATCCATGGCAGACGCAGCCGTTTC (BamHI Schnittstelle vor AS1 der Untereinheit I (CtaDII))	Biospring
40R	TATTAECTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGA TGGTGGCCCTGAAAATAAAGATTCTCACCCGGACCGGGA CCATGCGCGTGTGCGCGATCC (GPGPG-Linker, TEV-site, His10-tag, stop codon und XhoI Schnittstelle nach der Untereinheit I (CtaDII))	Biospring
UE I_H276A	CTGTGGTTCTTCGGAGCTCCCGAGGTCTATATC (Mutageneseprimer für <i>ctaDII</i> , neue SacI Schnittstelle)	Biospring
UE I_H325A H326A	GCTTCGTCGTCTGGGCGGCCCATGTACACGGCC (Mutageneseprimer für <i>ctaDII</i> , neue NotI Schnittstelle)	Biospring

Tabelle 10 - Oligonukleotide

## 1.7. Mikroorganismen

### 1.7.1. Escherichia coli

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>relA1, supE44, λ<sup>-</sup>, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proA+B+, lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Hanahan, 1985
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi<sup>-</sup>1, relA1</i>	Hanahan, 1983 Bethesda Res. Lab., 1986
BL21 (DE3) M15	<i>F, ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm, gal, λ(DE3) NaIS, StrS, RifS, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup></i>	Studier <i>et al.</i> , 1990 Qiagen
SG13009	<i>NaIS, StrS, RifS, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup></i>	Gottesman <i>et al.</i> , 1981
Walker C41	BL21-Derivat für die Expression von Membranproteinen	Walker und Miroux 1996

Tabelle 11 - verwendete *E. coli* Stämme

*E. coli* Flüssigkulturen werden für gewöhnlich bei 37 °C und 240 rpm in LB-Medium angezogen. Große Volumina werden bei 140 rpm geschüttelt. Bei Bedarf können auch andere Temperaturen und Medien verwendet werden. Beispielsweise bietet sich zur Vermeidung von inclusion bodies oder zur Unterstützung der Faltung und Integration von überexprimierten Membranproteinen eine Senkung der Expressionstemperatur an.

Die Lagerung von *E. coli* auf Agar-Platten erfolgt bei 4 °C. Nach einem Lagerungszeitraum von 4-6 Wochen sollten die Klone auf frische Platten überstrichen werden.

Für eine langfristige Lagerung empfiehlt sich das Anlegen von Gefrierkulturen. Hierfür werden Zellen aus einer Übernacht-Kultur abzentrifugiert (~5000 rpm, 5 min, 4 °C) und steril in 2x TY-Medium mit 15 % Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 1.7.2. Paracoccus denitrificans

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
Pd1222	<i>Spc<sup>R</sup>, Rif<sup>R</sup>, „enhanced mating frequency“</i>	De Vries <i>et al.</i> , 1989

Tabelle 12 - verwendete *Paracoccus denitrificans* Stämme

Die Anzucht von *P. denitrificans* erfolgt üblicherweise bei 32 °C und 240 rpm in LB- oder Succinat-Medium. Gelagert werden *Paracoccus*-Platten bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 4-8 Wochen. Zur langfristigen Lagerung sollten auch hier Gefrierkulturen angelegt werden (siehe Abschnitt 1.7.1).

### 1.8. Nährmedien und Antibiotika

LB-Medium (1 Liter)	10 g	Bacto™ Tryptone
	5 g	Bacto™ Yeast Extract
	5 g	NaCl
2x TY-Medium (1 Liter)	16 g	Select Pepton 140
	10 g	Bacto™ Yeast Extract
	5 g	NaCl

Antibiotikum	Stammlösung
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in 50% (v/v) Glycerin
Kanamycin (Km).	25 mg/ml in 50% (v/v) Glycerin
Rifampicin	15 mg/ml in Methanol
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol

**Tabelle 13 - verwendete Antibiotika**

Wässrige Stammlösungen werden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Jedes Aliquot wird nach dem Anbrechen bei -20 °C gelagert, und vier bis sechs Wochen verwendet. In Kultur werden Rifampicin 1:250, alle anderen Antibiotika 1:1000 verdünnt. Rifampicin ist lichtempfindlich.

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1. Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)

TEG	25 mM 10 mM 50 mM	Tris EDTA Glucose ad pH 8 (HCl)
NaOH/SDS	0,2 M 1 % (w/v)	NaOH SDS
K-Acetat-Lösung	3 M	KCl ad pH 5 (Eisessig)
Phenol-Lösung		neutralisiertes Phenol in TE-Puffer
Chloroform/Isoamylalkohol	96 % (v/v) 4 % (v/v)	Chloroform Isoamylalkohol

1,5 ml einer 2 ml Übernacht-Kultur werden in ein Eppendorfggefäß überführt und abzentrifugiert (Heraeus Microfuge, 13.000 rpm, 2 min, RT). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl TEG-Puffer oder H<sub>2</sub>O resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl NaOH/SDS werden die Zellen lysiert. Die Lösung wird durch mehrmaliges Invertieren (~5x) vorsichtig gemischt.

Die entstandenen SDS-Protein-Komplexe werden mit 150 µl KAc gefällt. Nach dessen Zugabe wird das Eppendorfggefäß geschlossen und ca. 10 sec mit niedriger Intensität gevortext. Für ein besseres Durchmischen der Lösungen empfiehlt es sich das Eppendorfggefäß invertiert zu vortexen. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis werden die gefällten Komplexe abzentrifugiert (Heraeus Microfuge, 13.000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand wird in einem frischen Gefäß mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Anschließend wird kurz zentrifugiert (Heraeus Microfuge, 13.000 rpm, 5 min, RT) und die wässrige Phase (oben) wird in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (wie zuvor) wird der Überstand in einem frischen Eppendorfggefäß mit 2 Volumina Ethanol (100%, eiskalt) versetzt.

Das Gemisch wird zur DNA-Fällung 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (Heraeus Microfuge, 13.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Verdunsten des restlichen Ethanols wird die Plasmid-DNA in 50-100 µl RNase-haltigem H<sub>2</sub>O/TE-Puffer (20 µg/ml RNase) resuspendiert. Ein 30-minütiger RNase-Verdau bei 37 °C entfernt störende RNA. Die so isolierte Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

## 2.2. Restriktion

Die Bedingungen und Puffer für die jeweiligen Restriktionsenzyme werden den Angaben der Hersteller MBI Fermentas und NEB entnommen. In den meisten Fällen erfolgt eine Restriktion in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37 °C für 45-90 min. Diese 20 µl Gesamtvolumen setzen sich zusammen aus (1) sterilem, destilliertem Wasser, (2) der zu schneidenden DNA, (3) 2-4 µl 10x-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert/empfohlen) und (4) 2-3 *units* Restriktionsenzym (1 *unit* ist die Menge Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA in 1 h vollständig zu schneiden).

Für analytische Zwecke werden üblicherweise 100-200 ng Plasmid-DNA eingesetzt, für präparative Zwecke dagegen ca. 400 ng.

## 2.3. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer	5 % (v/v) 30 mM 0,02 % (w/v)	Glycerin EDTA Bromphenolblau in 1x TBE
10x TBE	89 mM 88 mM 20 mM	Tris (108 g/l) Borsäure (55 g/l) EDTA, pH 8
Agarosegel	0,7-1,5 % (w/v) 0,5 µg/ml	Agarose Ethidiumbromid in 1x TBE

Nukleinsäuren können elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt werden. Für besonders kleine DNA- oder RNA-Moleküle kommen in ausnahmefällen Polyacrylamidgele zum Einsatz, üblich ist jedoch die Verwendung von Agarosegelen. Diese werden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente mit 0,7 - 2 % (w/v) Agarose und 1x TBE-Puffer gegossen. Die Mischung aus Agarose und einem Teil des benötigten Puffers wird in einer Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt und sporadisch geschwenkt, bis die Agarose gelöst ist. Die Lösung wird durch Zugabe des restlichen Puffervolumens abgekühlt und zur Färbung der DNA mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Dieser Farbstoff interkaliert während des Gellaufs in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Er ist aufgrund der starken Bindung an die DNA hoch karzinogen. Das Gel wird in einer speziellen Gießapparatur gegossen und in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoreseapparatur mit den DNA-Proben bestückt. Zur besseren Handhabung wird den Proben vor dem Auftrag ein gefärbter und Glycerin-haltiger Puffer zugesetzt, der potentielle Nukleaseaktivitäten abstoppt, indem katalytische Metallionen wie  $Mg^{2+}$  durch EDTA gebunden werden (5 µl DNA-Probenpuffer auf 20 µl Probe). Durch die negative Ladung des Phosphatrückgrats wandert die DNA im elektrischen Feld (üblicherweise ca. 4 V/cm) zur positiv geladenen Anode. Neben den Proben wird ein Größenstandard mit DNA-



Fragmenten bekannter Größe und Konzentration auf das Gel aufgetragen, der zur Abschätzung von Konzentration und Größe der aufgetrennten Fragmente dient.

## 2.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Bei präparativen Arbeiten will man oftmals gezielt einzelne Fragmente aus einem Gel weiterverwenden. Diese können mit Hilfe der Phenol/Crush-Methode oder mit Hilfe verschiedener auf dem Markt erhältlicher Gel-Extraktions-Kits aus dem Gel isoliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gel-Extraktionen mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* oder mit ähnlichen Extraktionskits der Firmen PeqLab und Promega durchgeführt. Für die Extraktionen wurden eine Heraeus Tischzentrifuge verwendet und das dazugehörige Protokoll ist in dem vom Hersteller mitgelieferten *QIAquick® Spin Handbook (July 2002)* auf Seite 23 zu finden.

Unter langwelligem UV-Licht werden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das ausgeschnittene Gel-Stück wird bei 70°C in einem Puffer aufgelöst und die darin enthaltene DNA wird mit Hilfe einer Zentrifugations-Säule in mehreren Waschschritten aufgereinigt.

Die an die Säule gebundene DNA wurde meistens in 2 Zentrifugationsschritten mit je 25 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

## 2.5. Ligation

Ligationspuffer (10x)	660 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	EDTA
	5 mM	DTT
	2 mM	ATP

Zur Herstellung rekombinanter DNA werden einzelne Fragmente, die idealerweise komplementäre überhängende Enden („*sticky ends*“) haben, mit Hilfe einer Ligase kovalent miteinander verknüpft. Wenn sich bei einer Klonierung keine komplementären überhängenden Enden einführen lassen, kann auch eine sogenannte „*blunt end*“-Ligation durchgeführt werden.

Bei der gewöhnlichen („*sticky end*“) Ligation befinden sich in einem 10 µl Ligationsansatz (1) steriles, destilliertes Wasser, (2) äquimolare Mengen der zu verbindenden Fragmente (Legerski und Robberson 1985), (3) 1 µl 10x-Ligationspuffer und (4) 0,5 µl T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wird normalerweise 1 h bei 22 °C inkubiert, es können aber auch Übernacht-Ligationen durchgeführt werden.

## 2.6. Transformation

### 2.6.1. Transformation kompetenter Zellen

Um Plasmide zu amplifizieren oder für eine Expression zu verwenden, werden sie durch Transformation in Zellen eingeführt.

Bei den hier durchgeführten Transformationen wurden  $\text{RbCl}_2$ - oder  $\text{CaCl}_2$ -kompetente Zellen verwendet. Aufgrund einer Behandlung mit diesen Salzen ist die Plasmamembran der Zellen labiler als bei normalen Zellen, was zur Einführung von Fremd-DNA genutzt werden kann, indem man die Zellen einem Hitzeschock unterzieht.

Die kompetenten Zellen sind bei  $-80\text{ °C}$  in  $100\ \mu\text{l}$  Aliquots gelagert und werden vor der Transformation 30 min auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen gibt man 2-3  $\mu\text{l}$  (ca. 20 ng) des Ligationsansatzes/Plasmids zu den Zellen, mischt vorsichtig ohne zu vortexen(!) und inkubiert weitere 20 min auf Eis. Anschließend unterzieht man die Zellen einem 1-minütigen Hitzeschock (Wasserbad  $42\text{ °C}$ ) und inkubiert sie wieder auf Eis. Nach 2-3 Minuten überführt man die transformierten Zellen in  $900\ \mu\text{l}$  vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotikum) und inkubiert sie 5 Minuten bei  $37\text{ °C}$  in einem 10 ml-Kulturröhrchen ohne zu schütteln. Anschließend lässt man die Zellen 45-60 min bei 160 rpm schütteln. Da nicht bekannt ist, wie viele Zellen erfolgreich transformiert wurden, werden pro Transformation zwei Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum angelegt.

Auf eine Platte werden  $100\ \mu\text{l}$  des Transformationsansatzes ausplattiert, auf die andere  $300\ \mu\text{l}$ .

### 2.6.2. „rapid colony“-Transformation

TFB (Standard Transformation Buffer)	100 mM	KCl
für <i>rapid colony</i> -Transformation	45 mM	MnCl
	10 mM	$\text{CaCl}_2$
	3 mM	$\text{HACoCl}_3$
	10 mM	Kalium-MES (pH 6,2)

Eine 0,5 M MES-Lösung wird mit KOH auf pH 6,2 eingestellt. 20 ml dieser Lösung, werden mit dem saubersten vorhandenen  $\text{H}_2\text{O}$  auf 800 ml aufgefüllt. Die übrigen Salze werden als Feststoffe dazugegeben, mit  $\text{H}_2\text{O}$  wird auf 1l aufgefüllt und die Lösung wird durch eine  $0,2\ \mu\text{m}$  Membran filtriert. Der aliquotierte TFB-Puffer ist bei  $4\text{ °C}$  über ein Jahr stabil.

Sind keine kompetenten Zellen vorhanden, kann eine Kolonie-Transformation durchgeführt werden. Diese empfiehlt sich aufgrund niedrigerer Transformationseffizienzen allerdings nicht für Ligationsansätze, sondern eher für bereits in großen Mengen vorhandene Plasmide.

Für die „*rapid colony*“-Transformation (Miller 1992) benötigt man eine Platte mit den zu transformierenden Zellen, TFB-Puffer und LB-Medium.

Mit einer sterilen Impföse oder einem Zahnstocher wird eine Kolonie gepickt, die dann durch vortexen oder pipettieren in 200 µl gekühltem TFB-Puffer resuspendiert werden. Die Zellsuspension wird 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wird die zu transformierende DNA (10-1000 ng) in einem Volumen von weniger als 20 µl zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen und erneuter 10-minütiger Inkubation auf Eis, werden die Zellen einem 90 sec Hitzeschock bei 42 °C unterzogen.

Es folgt die Zugabe von 400-800 µl LB-Medium, anschließend werden die Zellen 20-60 min bei 37°C inkubiert und dann in verschiedenen Mengen (z.B. 100 und 300 µl) auf den geeigneten Platten ausplattiert.

## 2.7. PCR

Reaktionspuffer <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	200 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
	100 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1 % (v/v)	Triton X-100
	100 mM	KCl
	20 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,1 mg/ml	BSA
Verdünnungspuffer <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (10x)	100 mM	Tris/HCl (pH 8,3)
	500 mM	KCl
	1 % (v/v)	Triton X-100
Reaktionspuffer <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	100 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
	500 mM	KCl
	15 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 % (v/v)	Triton X-100

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase-chain-reaction*, PCR) dient zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten. Grundlegendes Element dieser Methode ist eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, wie z.B. die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*.

Weiterhin benötigt man einen geeigneten Puffer, ca. 2 ng der zu amplifizierenden DNA (*Template*-DNA) und zwei Primer (*forward*- und *reverse*-Primer), d.h. man muss wenigstens die Enden (15-20 bp) der zu amplifizierenden Sequenz kennen.

Es werden mehrere, meist ca. 30, Zyklen durchgeführt, in denen immer wieder dieselben drei Schritte wiederholt werden: Denaturierung, Primer-Bindung und Primer-Verlängerung.

Im ersten Schritt wird die doppelsträngige *Template*-DNA bei 95°C zu zwei Einzelsträngen aufgeschmolzen. Anschließend lagern sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen auf der *Template*-DNA, wobei die optimale Bindungstemperatur von der Basenzusammensetzung der Primer abhängt und mit Hilfe

von Computerprogrammen berechnet werden kann. Eine einfache Formel, die zum Abschätzen der Temperatur aber vollkommen ausreicht, ist folgende:



Die angelagerten Primer dienen dann als Startpunkte für die Polymerase. Da deren optimale Arbeitstemperatur bei 72 °C liegt, wird die Polymerisation oder Primer-Verlängerung bei dieser Temperatur durchgeführt. Die Dauer der Polymerisation hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und von der verwendeten Polymerase ab. Für die *Taq*-Polymerase gilt als Faustregel: 1 min für 1000 bp.

Die *Pfu*-Polymerase trägt im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine Korrekturlesefunktion und gilt damit allgemein als „genauer“. Für sie gilt die Regel: 1 min für 500 bp

Um vor dem Beginn der 30 Zyklen eine vollständige Denaturierung des *Templates* zu gewährleisten, wird eine *hot start*-PCR durchgeführt. Bevor die Polymerase zu dem Reaktionsgemisch gegeben wird, wird die DNA 3 min lang bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe der Polymerase wird gevortext und die 30 Zyklen werden mit dem ersten Denaturierungsschritt gestartet.

Um zu vermeiden, dass am Ende unvollständige Polymeraseprodukte übrigbleiben, wird nach dem letzten Zyklus ein längerer Polymerisationsschritt angehängt, die *final extension*.

Das hier verwendete PCR-Programm sah meist folgendermaßen aus:

<i>hot start</i>	3 min, 95 °C
	Zugabe der Polymerase
30 Zyklen	30 sec, 95 °C (Denaturierung)
	30 sec, 47 °C (Primer- <i>Annealing</i> )
	1 min, 72 °C (Primer- <i>Extension</i> )
final extension	9 min, 72 °C

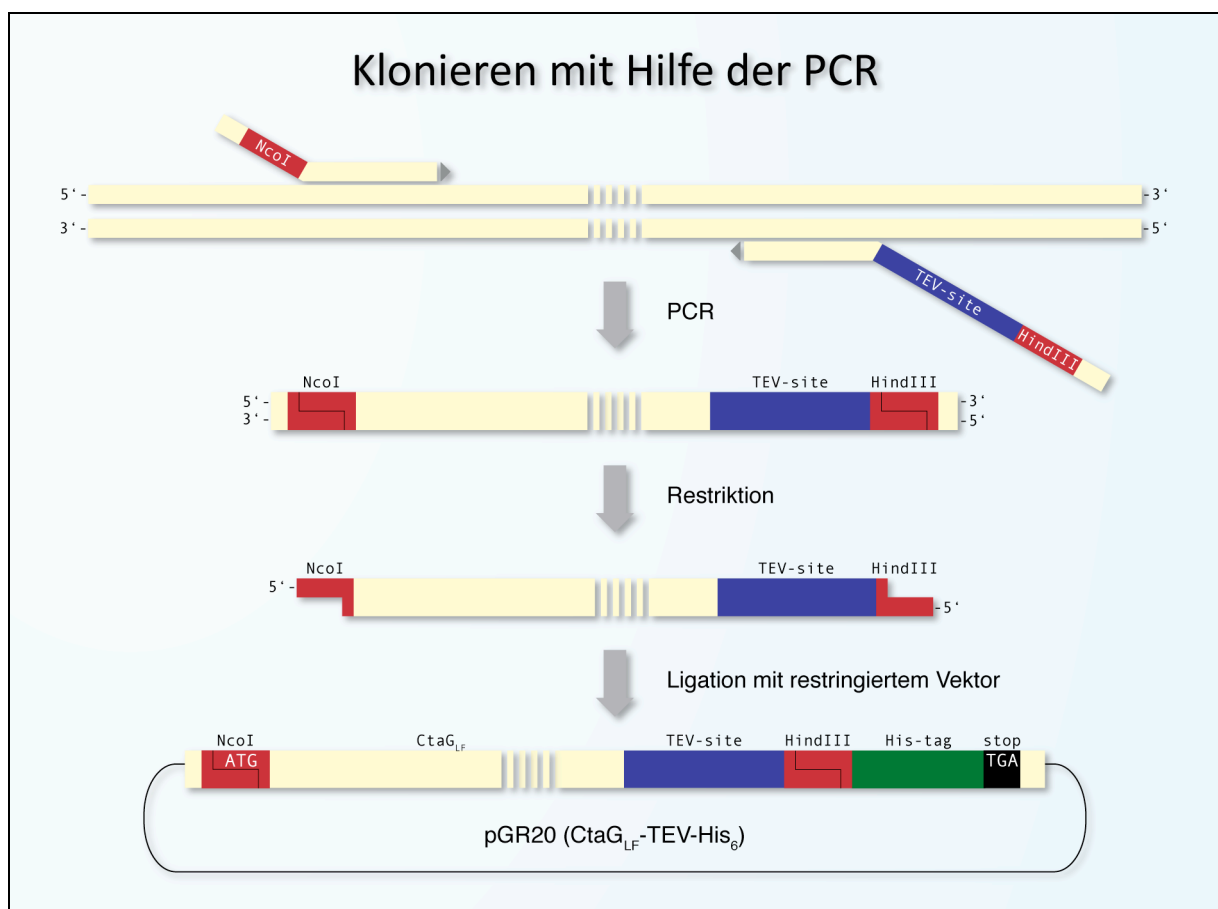
In einem 100 µl PCR-Ansatz befinden sich üblicherweise (1) steriles, destilliertes Wasser, (2) 1-2 ng *Template*-DNA, (3) je 50 pmol der beiden Primer, (4) 10 µl Puffer (10x-Konzentrat), (5) dNTPs in einer Endkonzentration von 0,2 mM und (6) 1 µl *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase.

### 2.7.1. Einfügen zusätzlicher Informationen mit Hilfe der PCR

Um ein PCR-Produkt gerichtet und im gewünschten Leseraster in einen Expressionsvektor klonieren zu können oder um das Zielprotein mit zusätzlichen Eigenschaften zu versehen, ist es meist hilfreich, die PCR-Primer so zu modifizieren, dass sie neben der *template*-

spezifischen Sequenz noch zusätzliche Informationen tragen. Anhand des in dieser Arbeit vorwiegend verwendeten Konstrukts pGR20, soll die zugrundeliegende Methode kurz erläutert werden:

Das CtaG-Fragment CtaG<sub>LF</sub> soll zur vereinfachten Isolierung C-terminal einen His<sub>6</sub>-tag tragen. Der Vektor pET21d ist für die Konstruktion eines solchen Fusionsproteins gut geeignet, da er nach der MCS für sechs aufeinanderfolgende Histidine kodiert, deren Triplets von einem Stoppcodon gefolgt werden. Da die Anwesenheit einer Polyhisitindsequenz unter Umständen Einfluss auf die Kupferbindung des Proteins haben kann, muss der *tag* spaltbar sein. Zu diesem Zweck soll eine Erkennungssequenz für die *tobacco etch virus* (TEV)-Protease zwischen CtaG und His<sub>6</sub>-tag eingefügt werden.



**Abbildung 7 - Klonieren mit Hilfe der PCR**

Mit Hilfe der Primer, können während einer PCR zusätzliche Restriktionsschnittstellen oder Sequenzen, die für bestimmte Aminosäuresequenzen wie *tags* oder Proteaseschnittstellen kodieren, an ein Gen fusioniert werden.

Der für die PCR eingesetzte *reverse* Primer (20R) enthält daher neben der terminalen *ctaG*-Sequenz noch 33 weitere Nukleotide, die für eine TEV-Proteaseschnittstelle und eine HindIII-Restriktionsschnittstelle kodieren. Desweiteren befinden sich am 5'-Ende des Primers vier sogenannte *dummy*-Basen, die für eine verbesserte Schneidbarkeit des PCR-Produkts sorgen, da manche Restriktionsenzyme in ihrer Eigenschaft als "Endo"nukleasen Probleme mit der Erkennung und Restriktion endständiger Sequenzen

aufweisen. Der *forward* Primer (10F) enthält vor der *ctaG*-Sequenz eine NcoI-Schnittstelle, deren intrinsisches ATG zugleich als Startcodon dient.

Die Amplifikation mit diesen Primern führt zu einem PCR-Produkt, das für ein CtaG-Fragment mit C-terminaler TEV-Proteaseschnittstelle kodiert und das mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden kann wie der Vektor pET21d. Nach Elektrophorese und Gelextraktion kann das restringierte Fragment gerichtet in den ebenfalls NcoI/HindIII geschnittenen Expressionsvektor ligiert werden. Das entstehende Expressionsplasmid kodiert somit für ein CtaG-Fragment mit C-terminalem TEV-spaltbarem His<sub>6</sub>-tag.

Mit Hilfe dieser Technik wurden die meisten in der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionsplasmide für CtaG und die Untereinheiten I und II der Cytochrom c Oxidase hergestellt.

### 2.8. Gerichtete Mutagenese

Die Einführung gerichteter Mutationen wurde in Anlehnung an das QuikChange™ - *site directed mutagenesis* Protokoll der Firma Stratagene durchgeführt: ein mutagener Primer bindet an das durch Hitzedenaturierung einzelsträngige *template*-Plasmid und dient als Ausgangspunkt für eine thermostabile DNA-Polymerase. Diese synthetisiert den kompletten, zum *template*-Plasmid komplementären, Einzelstrang und eine thermostabile Ligase verknüpft dessen 3'-Ende mit dem 5'-Ende des Primers, wodurch es zum Ringschluss kommt. Dieses Verfahren wird ähnlich der PCR in mehreren Zyklen durchgeführt, die jeweils die Schritte Denaturierung, Primer-Anlagerung und Polymerisation umfassen. Da jedoch nur ein Strang synthetisiert wird, ist die Amplifikation im Gegensatz zur PCR nicht exponentiell, sondern linear. Aus demselben Grund liegen am Ende des Programms nicht nur doppelsträngige sondern auch einzelsträngige Plasmide vor. Die Verteilung zwischen mutierten und unveränderten DNA-Strängen ist dabei rein statistisch. Da die Polymerisation der mutierten Stränge jedoch *in vitro* stattgefunden hat und der Mutageneseansatz keine Methyltransferasen enthält, unterscheiden sich mutierte und unveränderte DNA-Stränge. Die *template*-Plasmide wurden *in vivo* repliziert und sind methyliert, sie können daher durch das Restriktionsenzym DpnI verdaut werden. Die mutierten Plasmide hingegen, werden von DpnI nicht erkannt und liegen nach dem Verdau im Überschuss vor. Nach einer Transformation in *E. coli*, sollten die erhaltenen Kolonien dann überwiegend das mutierte Plasmid enthalten.

### 2.8.1. Primerdesign

Die mutagenen Primer werden mit Hilfe des "*Primer Generators*" (Turchin und Lawler 1999) so entworfen, daß die jeweilige Mutation wenn irgend möglich die Entstehung oder das Verschwinden einer Restriktionsschnittstelle hervorruft. Der Erfolg der Mutagenese lässt sich dann einfach anhand einer Restriktionsanalyse überprüfen. Beim Entwurf der Primer sollte darauf geachtet werden, dass auf beiden Seiten des *mismatches* mindestens 10 komplementäre Basen liegen. Ein typischer Mutageneseprimer sollte zwischen 25 und 45 Basen lang sein und eine Schmelztemperatur von  $\sim 75$  °C aufweisen.

Die Sequenzen der in dieser Arbeit konstruierten Primer sind in Tabelle 10 (Material & Methoden 1.6.2, S.26) aufgeführt.

### 2.8.2. Phosphorylierung mutagener Oligonukleotide

Chemisch synthetisierte Primer tragen an ihrem 5'-Ende keine Phosphatgruppe und können mit Hilfe von Ligasen nicht mit 3'-OH-Enden verknüpft werden. Um die interne Ligation und somit den Ringschluss des mutierten Plasmids zu ermöglichen, müssen die 5'-Enden der mutagenen Primer daher vor der eigentlichen Mutagenesereaktion phosphoryliert werden. Dazu wird folgender Ansatz zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 70 °C inaktiviert:

12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
4  $\mu$ l ATP (5 mM)  
2  $\mu$ l 10x Polynukleotid-Kinase-Puffer  
1  $\mu$ l Mutagener Primer (100 pmol/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l T4 Polynukleotid-Kinase (5 U/ $\mu$ l)

### 2.8.3. Mutageneseansatz

Für die eigentliche Mutagenesereaktion wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
5  $\mu$ l 5x-*Phusion*-Polymerasepuffer (HF)  
2,5  $\mu$ l dNTPs (je 2 mM)  
2,5  $\mu$ l NAD<sup>+</sup> (10 mM)  
1  $\mu$ l Matrizenstrang ( $\sim 50$  ng/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l Amp-Ligase (5 U/ $\mu$ l)  
0,25  $\mu$ l *Phusion*-Polymerase  
2  $\mu$ l phosphorylierter Primer (5 pmol/ $\mu$ l)

---

25  $\mu$ l Reaktionsgemisch  
+30  $\mu$ l Mineralöl (Überschichtung gegen Verdampfen)

Der Reaktionsansatz wird in einem Thermocycler (Hybaid, Omnigene) auf 98 °C erhitzt und zunächst für 30 sec bei dieser Temperatur inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu gewährleisten. Anschließend folgen 30 Zyklen bestehenden aus den Schritten Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation. In den meisten Fällen wurde mit folgendem Temperaturprotokoll gearbeitet:

1x 30 sec 98°C	(initiale Denaturierung)
30x 10 sec 98°C	(Denaturierung)
15 sec 55°C	(Primerbindung <sup>1</sup> )
75 sec 72°C	(Polymerisation <sup>2</sup> )
1x 5 min 72°C	(final extension)

<sup>1</sup> Die optimale *Annealing* Temperatur ist von der Sequenz des Primers abhängig und kann mit Hilfe der Formel  $4\text{ °C} \cdot G/C + 2\text{ °C} \cdot A/T - 5\text{ °C}$  grob abgeschätzt, bzw. mit Hilfe von Computerprogrammen (z.B. CloneManager) berechnet werden.

<sup>2</sup> Die Dauer der Polymerisation hängt von der *template*-Größe und von der verwendeten Polymerase ab. Die hier verwendete *Phusion*-Polymerase synthetisiert beispielsweise ~3,8 kb in einer Minute, während die ebenfalls gängige *Pfu*-Polymerase eine Geschwindigkeit von 0,5 kb/min aufweist.

### 2.8.4. DpnI-Verdau

Anschließend wird der Mutagenese-Ansatz mit 1 µl DpnI versetzt und bei 37 °C inkubiert. Bei der Verwendung anderer Polymerasen während der Mutagenese, muss darauf geachtet werden, dass DpnI mit den Pufferbedingungen der Polymerase kompatibel ist. Gegebenenfalls muss der Mutageneseansatz zunächst vorgereinigt werden. Nach zweistündigem DpnI-Verdau wird erneut 1 µl DpnI zupipettiert um einen möglichst vollständigen DpnI-Verdau zu gewährleisten. Nach insgesamt 4 h wird das Restriktionsenzym bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Anschließend werden 5-10 µl des Ansatzes für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt.

Die Plasmid-DNA aus fünf bis zehn Klonen wird isoliert (Material & Methoden 2.1, S.29) und der Erfolg der Mutagenese wird zunächst per Restriktionsanalyse verifiziert. Abschließend wird die Plasmid-DNA eines positiven Klons per Sequenzierung überprüft, um eventuelle Fehler der Polymerase auszuschließen.

## 2.9. Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit erwähnten Sequenzierungen wurden bei der Firma SRD (Scientific Research and Development) in Auftrag gegeben, die mit dem *cycle sequencing* Verfahren nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977) arbeitet.



### 3. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.1. Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde in erster Linie mit Expressionsvektoren des pET-Systems (Novagen) gearbeitet. Diese verfügen über einen T7-Promotor und den *lac*-Operator. Die verwendeten Expressionsstämme müssen daher zum einen über die T7-RNA-Polymerase verfügen, welche durch Integration des  $\lambda$ DE3-Phagen in das Bakteriengenom eingeführt wird. Zum anderen muss der *lac*-Repressor, welcher durch das *lacI*-Gen codiert wird, in den Zellen vorliegen, damit die Induzierbarkeit der Expression gewährleistet ist und keine basale Expression in Abwesenheit des Induktors IPTG stattfindet.

Desweiteren wurden Versuche mit dem pQE-System (Qiagen) durchgeführt, welches ebenfalls unter der Kontrolle des *lac*-Repressors steht, und somit durch IPTG induzierbar ist. Anders als das pET-System arbeiten die pQE-Vektoren mit dem stärkeren T5-Promotor, welcher von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird und somit die Koexpression einer gesonderten RNA-Polymerase überflüssig macht. Vektoren des pQE-Systems müssen daher nicht zwingend in gesonderte Expressionsstämme überführt werden, sondern können bereits in Klonierungsstämmen die über die *lacI<sup>q</sup>*-Mutation verfügen (z.B. JM109, TG1 oder XL1-Blue) induziert werden. In *E. coli*-Stämmen, die keine, durch die *lacI<sup>q</sup>*-Mutation bedingte, erhöhte Konzentration des *lac*-Repressors aufweisen, muss das pRep4-Plasmid kotransformiert werden, welches den *lac*-Repressor konstitutiv exprimiert.

Die konstitutive Expression wurde in dieser Arbeit auch genutzt, um während der heterologen Expression von *ctaDII* (UEI der *P.d.* Cytochrom *c* Oxidase) potentielle Reifungsfaktoren anzubieten. Dafür wurden Expressionsvektoren kloniert, die auf dem pACYC-Vektor basieren und daher den in *E. coli* konstitutiv abgelesenen Tet-Promotor tragen.

##### 3.1.1. Testexpressionen

Für erste Analysen auf Ganzzelebene werden Testexpressionen in kleinem Maßstab durchgeführt. Zellen aus einer ÜN-Kultur werden 1-2 %ig in 5-200 ml vorgewärmtes LB-Medium überimpft, wobei darauf zu achten ist, dass das Medium die benötigten Antibiotika enthält. Die Flüssigkultur wird üblicherweise bei 37 °C und 180-240 rpm inkubiert und das Wachstum wird photometrisch verfolgt, indem die optische Dichte (OD) bei 600 nm gegen reines LB-Medium gemessen wird. Bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,8 wird eine 2 ml-Probe abgenommen (Probe "NI" für "nicht induzierter Vergleich") und der Rest der Flüssigkultur mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Optional kann jede volle Stunde ein 1 ml-Aliquot abgenommen werden, um den Verlauf der Expression zu verfolgen und mit Hilfe der optischen Dichte ggf. eine Wachstumskurve

aufzunehmen. Nach vier Stunden wird erneut die Zelldichte gemessen ( $OD_{600}$ ) und eine 1 ml-Probe (Probe "4h") entnommen.

Soll neben einer ersten Expressionsanalyse auf Ganzzelebene eine Löslichkeitsanalyse durchgeführt werden, müssen wenigstens 100, besser 200 ml LB-Medium für die Testexpression eingesetzt werden. Die verbleibenden Zellen werden dann nach 4-stündiger Expression auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation (5000 g, 20 min, 4 °C) geerntet und für die Präparation der subzellulären Kompartimente eingesetzt (Abschnitt 3.2, S.41).

Die während der Expression abgenommenen Proben werden folgendermaßen für die Gelelektrophorese vorbereitet: Die Zellen aus den 1 ml-Proben werden abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C) und mit Hilfe der optischen Dichte auf gleiche Zellmengen normiert. Dafür wird das Zellpellet zunächst in  $OD_{600} \cdot 50 \mu\text{l H}_2\text{O}$  resuspendiert, um eine homogene Mischung zu gewährleisten, bevor die Zellen durch SDS lysiert werden. Anschließend wird die Zellsuspension mit demselben Volumen ( $OD_{600} \cdot 50 \mu\text{l}$ ) 2xSDS-Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Lyse für 5-10 min bei 90-100 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (13.000 rpm, RT) werden 10  $\mu\text{l}$  dieses Ganzzelllysats für die Elektrophorese eingesetzt und per Coomassie-Färbung und/oder Western Blot analysiert.

### **3.1.2. Expression des löslichen CtaG<sub>LF</sub>-Fragments**

Für die Expression des längeren löslichen CtaG-Fragments (CtaG<sub>LF</sub>, AS 38-194) wird üblicherweise eine 500 ml Vorkultur mit Ampicillin versetzt, mit einer 2 ml C43(pGR20)-Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180-240 rpm im Luftbadschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen werden 25 L (10 x 2,5 L) autoklaviertes und auf 32 °C vorgewärmtes LB Medium (+ Amp) 1-2 %ig mit der Übernacht-Kultur angeimpft und bei RT (24 °C) und 140 rpm geschüttelt. Die optische Dichte (600 nm) wird verfolgt und bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8 werden die Kulturen mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach 4-stündiger Expression werden die Zellen auf Eis abgekühlt, geerntet (Sorvall RC36, 20 min, 5000 rpm) und pro 100 g Feuchtgewicht in 300 ml Puffer (50 mM NaPi pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -ME) resuspendiert. Anschließend wird die lösliche Fraktion präpariert (Abschnitt 3.2.1.2, S.43) und für die affinitätschromatographische Aufreinigung eingesetzt.

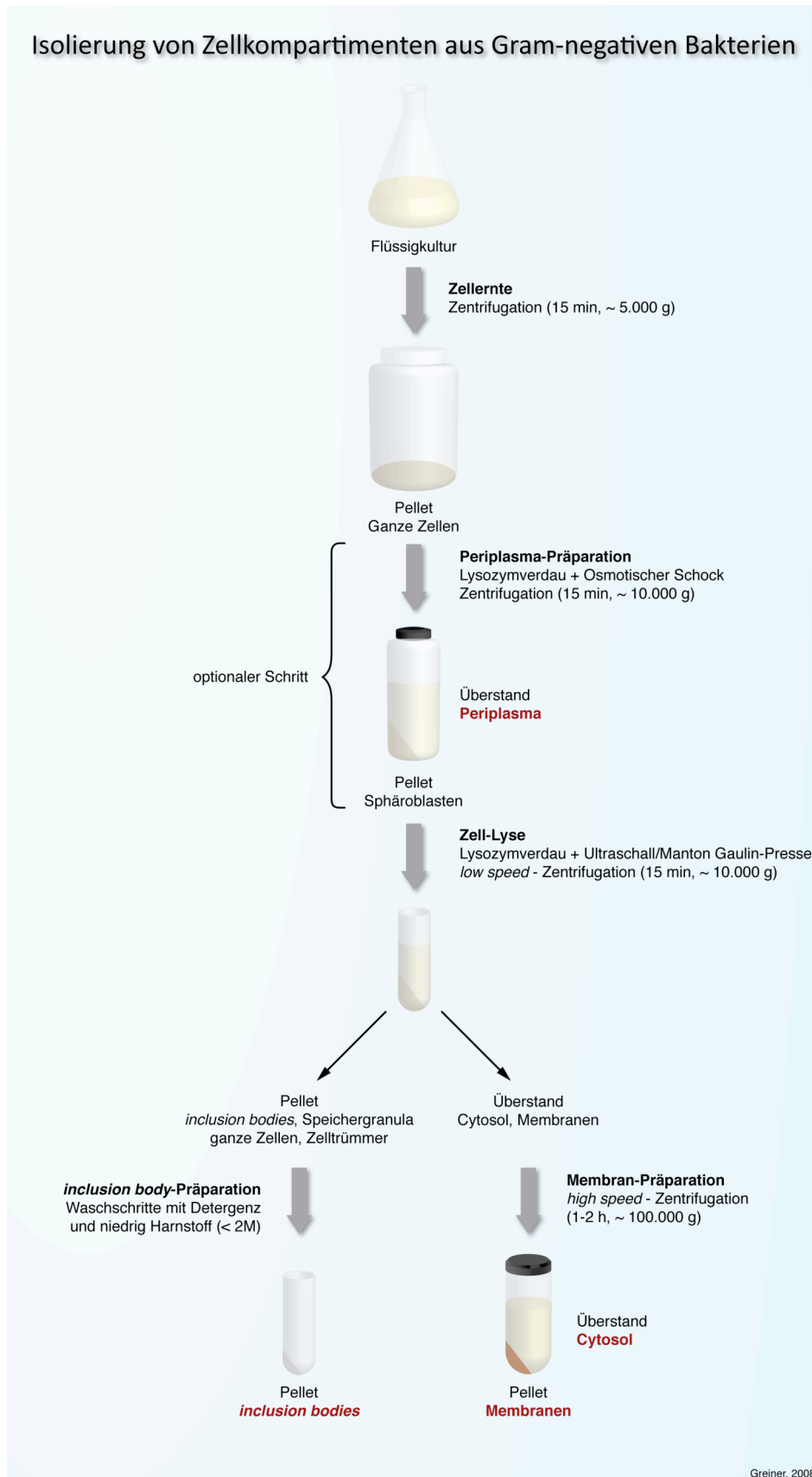
### **3.1.3. Expression der UE I der Cytochrom c Oxidase**

Für die heterologe Expression der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase wird üblicherweise eine 50 ml Kultur morgens mit einer 2 ml C43(pGR40)-Gefrierkultur in Gegenwart von Kanamycin angeimpft und den Tag über bei 37 °C und 180-240 rpm geschüttelt. 22,5 L (9 x 2,5 L) autoklaviertes LB-Medium werden auf 32 °C vorgewärmt. Am Abend wird die 50 ml C43(pGR40)-Kultur in 500 ml LB/Kan überimpft und über Nacht bei 37 °C und 180-240 rpm im Luftbadschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen werden

die 22,5 L des auf 32 °C vorgewärmten LB Mediums mit Kanamycin versetzt und 1-2 %ig mit der Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kolben werden dann in einem kühlbaren Luftbadschüttler, der zunächst eine Temperatur von 32 °C hat, bei 140 rpm geschüttelt. Während des Wachstums wird der Luftbadschüttler auf 16 °C heruntergekühlt. Die optische Dichte (600 nm) wird verfolgt und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 werden die Kulturen mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach 4-stündiger Expression werden die Zellen auf Eis abgekühlt, geerntet (Sorvall RC36, 20 min, 5000 rpm) und pro 100 g Feuchtgewicht in 300 ml Puffer (50 mM NaPi pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-ME) resuspendiert. Anschließend wird die Membranfraktion präpariert (Abschnitt 3.2.1.2, S.43) und deren Proteinkonzentration wird per Lowry bestimmt. Die Membranen können optional bei -80 °C gelagert werden. Für die affinitätschromatographische Aufreinigung werden die Membranen mit einem DM:Protein-Verhältnis von 2:1 solubilisiert und dabei auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml gebracht. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wird der Solubilisierungsansatz zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge, Ti 45 Rotor, 35.000 rpm, 60-120 min, 4 °C) und anschließend sofort für die affinitätschromatographische Aufreinigung eingesetzt.

### **3.2. Isolierung subzellulärer Kompartimente**

Um die subzelluläre Lokalisation eines Proteins zu bestimmen oder das Protein aus einem definierten Kompartiment zu isolieren, werden ganze Zellen mit Hilfe von enzymatischen und physikalischen Methoden behandelt und einzelne Kompartimente mittels differentieller Zentrifugation voneinander getrennt (Abbildung 8).



**Abbildung 8 - Isolierung subzellulärer Kompartimente**

Flussschema zum Ablauf der ersten Schritte einer Aufreinigung. Die durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennten Kompartimente können beispielsweise für eine Western Blot Analyse zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation eines Proteins eingesetzt werden oder als Ausgangsmaterial für dessen Aufreinigung dienen.

### 3.2.1.1. Periplasma-Präparation

Puffer I	100 mM 500 mM	NaPi pH 8 Sucrose pH 8
Lysozym-Stammlösung	100 mg/ml	Lysozym in H <sub>2</sub> O
Proteaseinhibitor	100 mM	Pefabloc SC in H <sub>2</sub> O

Typischerweise wird eine *E. coli* Kultur im 25 L Maßstab wie in Abschnitt 3.1 beschrieben angezogen. Nach der Ernte (Sorvall RC36, 20 min, 5000 rpm) werden die Zellen pro Gramm Feuchtgewicht in 3 ml Sucrosehaltigem Puffer resuspendiert, was bei einer typischen 25 L *E. coli*-Kultur einem Volumen von ca. 300 ml entspricht, und mit 100 µM Pefabloc SC sowie 0,1 mg/ml Lysozym versetzt. Die hohe Sucrosekonzentration führt durch den erhöhten osmotischen Druck zu einem Flüssigkeitsverlust der Zellen, der Turgor sinkt und die Zellen schrumpfen. Gleichzeitig wird das Proteoglykangerüst der äußeren Zellmembran durch Lysozym verdaut, wodurch die äußere Membran destabilisiert wird. Die Inkubation mit Lysozym und Sucrose erfolgt bei 4 °C für mindestens 1 h. Anschließend wird die Suspension mit 1 Vol H<sub>2</sub>O verdünnt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Verdünnung führt zu einer Umkehr des osmotischen Effekts, Wasser tritt in die Zellen ein und der Turgor steigt. Aufgrund der Destabilisierung des Proteoglykangerüsts reißt hierbei die äußere Zellmembran und das Periplasma kann in das Medium austreten. Durch einen Zentrifugationsschritt (20 min, 10.000 g, 4 °C) werden die entstandenen Sphäroblasten pelletiert und der Überstand kann als Periplasma-Fraktion für Folgeversuche eingesetzt werden. Die Sphäroblasten dienen als Ausgangsmaterial für die Präparation von Membranen, Cytosol und *inclusion bodies* oder werden verworfen.

### 3.2.1.2. Membran- und Cytoplasma-Präparation

Zur analytischen Aufreinigung von Membranen werden Zellen aus einer 200-500 ml Kultur eingesetzt, zur Aufreinigung im präparativen Maßstab Zellen aus 10-50 L Flüssigkultur. Die abzentrifugierten Zellen werden pro Gramm Feuchtgewicht in 3 ml eines geeigneten Puffers (z.B. 50 mM NaPi, 300 mM NaCl pH 8) resuspendiert, bei einer 25 L Anzucht entspricht dies üblicherweise einem Volumen von ca. 300 ml. Um die Zellen aufzuschließen, werden sie 30-90 min mit 0,1 mg/ml Lysozym auf Eis inkubiert. Die Lösung sollte nach dem Lysozymverdau viskos sein, da die innere Membran aufgrund des osmotischen Drucks reißen und genomische DNA aus den Zellen austreten kann. Optional kann vor dem Beschallen noch ein Gefrierschritt durchgeführt werden. Dabei werden die Zellen mehrmals abwechselnd in flüssigem Stickstoff schockgefroren und

wieder aufgetaut. Beschallt wird mit einem Branson Sonifier 250 (*duty cycle* 30 %, *output* 40 %). Aufgrund der starken Wärmeentwicklung während des Beschallens ist mit Hilfe eines Thermometers und eines Eisbades darauf zu achten, dass die Suspension eine Temperatur von maximal 15 °C nicht überschreitet. Die Dauer des Beschallens variiert zwischen 5 und insgesamt 30 min, wobei Intervalle von 10 min nicht überschritten werden und zwischenzeitlich 5-10 minütige Pausen zum Abkühlen der Suspension eingelegt werden sollten. Das Beschallen führt nicht nur zum Aufschluss der Zellen und zur Verkleinerung von großen Membranfragmenten oder -agglomeraten. Die durch den Ultraschall hervorgerufenen Scheerkräfte zerstören auch die genomische DNA. Eine ausreichend beschallte Probe erkennt man an der niedrigen Viskosität und der Transparenz der Probe. Sie wirkt üblicherweise wesentlich klarer/lichtdurchlässiger als die Ausgangssuspension.

Alternativ zu der Kombination aus Lysozymverdau und Ultraschall können die Zellen auch mit Hilfe einer Presse aufgeschlossen werden. Die hier verwendete Manton-Gaulin Presse eignet sich erst für Volumina über 600 ml, und kommt daher nur in seltenen Fällen zum Einsatz.

Nach dem Zellaufschluss wird zunächst eine *low speed*-Zentrifugation (Sorvall SS34, 13.500 rpm, 15-30 min, 4 °C) durchgeführt, bei der größere Fragmente und eventuell übriggebliebene ganze Zellen abzentrifugiert werden. Die im Überstand befindlichen löslichen Proteine und Membranen werden nun in einer *high speed*-Zentrifugation (Beckmann Ultrazentrifuge, Ti 70 Rotor, 35.000 rpm, 60 min, 4 °C) voneinander getrennt (Abbildung 8). Das rötlich braune, leicht glasige Membranpellet wird in 50 mM NaPi, 300 mM NaCl pH 8 resuspendiert und je nach Verwendungszweck gegebenenfalls durch erneute *high speed*-Zentrifugation und Resuspendieren gewaschen oder direkt für Folgeversuche eingesetzt, bzw. bei -80 °C gelagert. Da das Resuspendieren von Membranen mit der Pipette mühsam sein kann, wird in manchen Fällen mit Teflonstempel, Glas-Pistill oder einem Ultra-Thurrax homogenisiert. Verbleibende mit dem bloßen Auge meist nicht sichtbare Agglomerate können durch erneutes Beschallen aufgelöst werden.

Der Überstand der Ultrazentrifugation enthält sämtliche löslichen Proteine, sowie Ribosomen und DNA-Fragmente. Wurden Sphäroblasten für die Membranpräparation eingesetzt, handelt es sich um die Cytosol-Fraktion, bei Einsatz ganzer Zellen handelt es sich um die gesamte "lösliche Fraktion", bestehend aus Cytosol und Periplasma.

### **3.2.1.3. Aufreinigung von *inclusion bodies***

*Inclusion bodies* pelletieren bei der *low speed*-Zentrifugation nach dem Zellaufschluss (Abbildung 8). Durch mehrere Waschstschritte, bestehend aus Resuspension in Triton- oder Triton/Harnstoff-haltigem Puffer (2 % (v/v) Triton X-100, optional bis zu 2 M

Harnstoff) und anschließender Zentrifugation (SS 34, 13.000 rpm, 1 h, 4 °C), werden die *inclusion bodies* von ganzen Zellen und Zellwandkomponenten befreit (Abschnitt 6.3 in „Current Protocols in Protein Science“, John Wiley & Sons 1995). Ist der Überstand vollkommen klar und die Pelletgröße zwischen zwei Waschschrritten unverändert, kann das Pellet als reine *inclusion body* Fraktion angesehen werden. Diese unlösliche Fraktion wird durch chaotrope Salze, meist Harnstoff, gelegentlich Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl), solubilisiert und anschließend erneut zentrifugiert. Die optimale Konzentration des Chaotrops ist für jedes überexprimierte Protein unterschiedlich und muss experimentell ermittelt werden. Harnstoff kann bis 8 M eingesetzt werden, das stärkere GuHCl bis 6 M. Dabei ist zu beachten, dass Proben, die das ionische GuHCl enthalten nicht elektrophoretisch aufgetrennt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden *inclusion bodies* mit 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 8 M Harnstoff, pH 8 solubilisiert.

### 3.3. Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen mit His-tag

#### 3.3.1. Ni-NTA-Aufreinigung von CtaG<sub>LF</sub>

Lysepuffer	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	10 mM	β-ME
	1 mM	Pefabloc SC
		pH 8
Puffer A	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	10 mM	β-ME
	0,05 %	DM
		pH 8
Puffer B	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
	10 mM	β-ME
	0,05 %	DM
		pH 8

Die C43(pGR20)-Zellen aus einer 25 L Anzucht (siehe "3.1.2 Expression des löslichen CtaG<sub>LF</sub>-Fragments", S.40) werden in 300 ml Lysepuffer resuspendiert, aufgeschlossen und einer Cytoplasma-Präparation unterzogen (siehe "3.2 Isolierung subzellulärer Kompartimente", S.41). Eine 25 ml NiNTA-Säule wird mit Hilfe des BioPilot FPLC-Systems mit einer Flussrate von 2 ml/min auf 10 mM Imidazol äquilibriert. Dabei werden die Puffer A und B durch das FPLC-Pumpensystem in den entsprechenden Verhältnissen miteinander vermischt. Die Cytosol-Fraktion wird aufgetragen und mit 200 ml 10 mM Imidazol nachgewaschen. Es folgen 200 ml Wasch- bzw. Elutionsschritte bei 20, 40, 60,

80, 150, 250 und 500 mM Imidazol. Die 60, 80 und 150 mM Eluate enthalten CtaG<sub>LF</sub>, wobei das 150 mM Eluat hauptsächliche Aggregate, das 80 mM Eluat wenig Protein und eine Mischung aus Aggregaten und Monomeren, das 60 mM hauptsächlich Monomere enthält. Das 60 mM Eluat wird durch Ultrafiltration mit einem *cutoff* von 10.000 Da (Megafuge, 4800 rpm, 4 °C) ankonzentriert, durch mehrere Verdünnungs- und erneute Zentrifugationsschritte auf eine Imidazolkonzentration von < 1 mM gebracht und, zur Entfernung des His<sub>6</sub>-tags, einem TEV-Verdau (siehe "3.6 TEV-Verdau", S.49) unterzogen. Anschließend wird die Probe erneut auf die mit 10 mM Imidazol äquilibrierte NiNTA-Säule aufgetragen. Der abgespaltete His-tag, unprozessiertes CtaG<sub>LF</sub>, die TEV-Protease und im ersten Chromatographieschritt bei 60 mM Imidazol koeluierte Kontaminanten binden an das Säulenmaterial, während das prozessierte CtaG<sub>LF</sub> mit dem Durchlauf aufgefangen wird. Der Durchlauf dieses zweiten NiNTA-Schritts wird per Ultrafiltration ankonzentriert, per Lowry, SDS-PAGE und Western Blot analysiert und für weitere Experimente eingesetzt.

### 3.3.2. Ni-NTA-Aufreinigung der UE I der Cytochrom c Oxidase

Lysepuffer	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	0,2 % (w/v)	DM ad pH 8 (NaOH)
Puffer A	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	0,05 % (w/v)	DM ad pH 8 (NaOH)
Puffer B	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	300 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
	0,05 % (w/v)	DM ad pH 8 (NaOH)

C43(pGR40)-Zellen aus einer 22,5 L Anzucht (siehe "3.1.3 Expression der UE I der Cytochrom c Oxidase", S.40) werden in 300 ml Lysepuffer resuspendiert, aufgeschlossen und einer Membran-Präparation unterzogen (siehe "3.2 Isolierung subzellulärer Kompartimente", S.41). Die Membranen werden mit einem DM:Protein-Verhältnis von 2:1 solubilisiert und dabei auf eine Proteinkonzentration von ca. 10 mg/ml verdünnt. Vor dem Säulenauftrag wird das Solubilisat durch Ultrazentrifugation (Beckmann Ultrazentrifuge, Ti 45 Rotor, 35.000 rpm, 1-2 h, 4 °C) und Filtration von partikulären Bestandteilen befreit. Eine 25 ml NiNTA-Säule wird mit Hilfe des BioPilot FPLC-Systems mit einer Flussrate von 2 ml/min auf 10 mM Imidazol äquilibriert. Dabei werden die Puffer A und B durch das FPLC-Pumpensystem in den entsprechenden Verhältnissen miteinander vermischt. Das geklärte Solubilisat wird aufgetragen und mit 200 ml 10 mM



Imidazol gewaschen. Es folgen 200 ml Wasch- bzw. Elutionsschritte bei 20, 40, 60, 80, 150, 250 und 500 mM Imidazol. Das 150 mM Eluat wird durch Ultrafiltration mit einem *cutoff* von 50.000 Da (Megafuge, 4800 rpm, 4 °C) ankonzentriert, per Lowry, SDS-PAGE und Western Blot analysiert und für weitere Experimente eingesetzt.

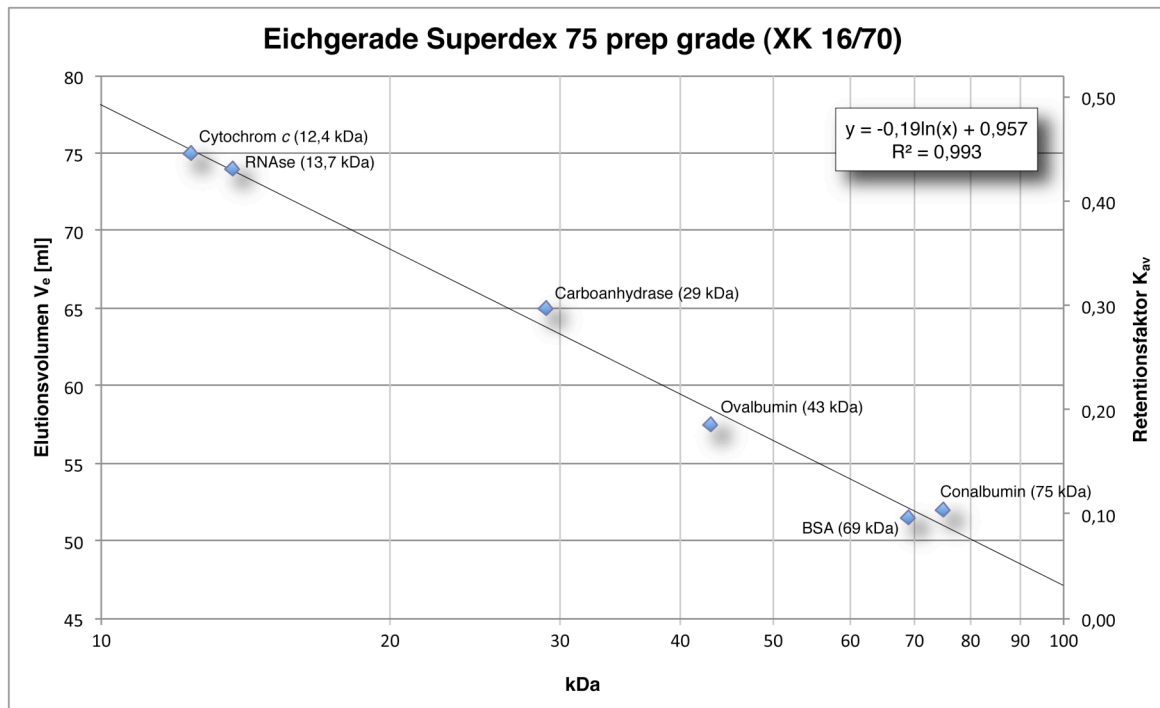
### 3.4. Gelfiltration

Die Gelfiltration dient zur chromatographischen Trennung von Proteinen nach Größe, bzw. zur Analyse von oligomeren Zuständen oder zum Entfernen niedermolekularer Substanzen wie DTT oder Metallionen. Bei dieser auch als *size exclusion chromatography* bezeichneten Methode läuft eine Probe mit der mobilen Phase über eine stationäre Phase, welche beispielsweise im Fall von Superdex-Materialien aus quervernetzten Dextran/Agarose *beads* ( $\varnothing$  24 - 44  $\mu\text{m}$ ) besteht. Das Trägermaterial enthält Poren unterschiedlicher aber definierter Größen, sodass die *beads* von der mobilen Phase durchdrungen werden. Proteine mit einem Durchmesser, der größer ist als die maximale Porengröße, dringen nicht in die stationäre Phase ein und wandern an dieser vorbei. Sie eluieren mit der Lösungsmittelfront im sogenannten Ausschlussvolumen  $V_0$ . Die kleinsten Analyte, wie Ionen oder niedermolekulare Substanzen (DTT, EDTA, etc.) können dagegen in jede Pore eindringen und durchlaufen den maximalen Weg. Sie eluieren mit dem Maximalvolumen  $V_{\text{max}}$ . Je kleiner ein Protein ist, desto häufiger kann es mit dem Trägermaterial interagieren und desto später eluiert es. Größere Proteine werden weniger von der stationären Phase aufgehalten und eluieren früher.

Um eine Aussage über die Molekulargewichte der eluierten Proteine treffen zu können, wird eine Eichgerade mit Proteinen bekannter Größe erstellt. Das Verhalten während der Gelfiltration hängt jedoch stark von der Form der Proteine ab, weshalb beispielsweise Lysozym zum Eichen von Gelfiltrationsmaterialien ungeeignet ist. Längliche, fadenförmige Proteine werden eher von den Poren der stationären Phase zurückgehalten, als globuläre Proteine, was zu unterschiedlichen Elutionsvolumina für zwei Proteine desselben Molekulargewichts führen kann. Die verwendeten Eichproteine sollten daher idealerweise eine globuläre Form aufweisen. Hier wurden Conalbumin (75 kDa), BSA (69 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), RNase (13,7 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) verwendet.

Eine XK 16/70 Säule wurde den Herstellerangaben entsprechend (Amersham) mit Superdex 75 Material gepackt und für die meisten in dieser Arbeit beschriebenen Gelfiltrationen eingesetzt. Gearbeitet wurde primär mit dem FPLC-System *BioPilot* und in Einzelfällen mit dem *Äkta Explorer*-System, beide der Firma *Pharmacia* (heute *GE Healthcare*), bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Maximaldruck von 0,5 MPa für die Superdex 75 XK16/70. Zur zügigeren Entfernung niedermolekularer Substanzen,

insbesondere DTT, wurde eine 35 ml Sephadex G25 Säule (Ø 10 mm) gegossen und ebenfalls mit dem *BioPilot*-System und einer Flussrate von 1 ml/min betrieben.



**Abbildung 9 - Eichgerade Superdex 75 prep grade (XK 16/70)**

Mit Hilfe einiger globulärer Proteine im Molekulargewichtsbereich von 10 - 75 kDa wurde eine Eichgerade für die präparative Superdex 75 Säule erstellt. Aufgetragen ist auf der X-Achse das Molekulargewicht in einer logarithmischen Skala gegen das Elutionsvolumen, das vom verwendeten System (Schlauchlängen, Säulenvolumen, Flussgeschwindigkeiten) abhängig ist (primäre Y-Achse, links), bzw. gegen die von den Systemparametern unabhängigen Retentionsfaktoren ( $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ) auf der sekundären Y-Achse (rechts).

### 3.5. Ultrafiltration

Verdünnte Proteinlösungen, wie sie beispielsweise nach Chromatographieschritten zwangsweise anfallen, werden mit Hilfe der Ultrafiltration ankonzentriert. Die Ultrafiltration nutzt die Zentrifugalkraft zur Beschleunigung des Durchflusses durch eine semipermeable Membran, meist Celluloseacetat, die eine definierte, vom Zielprotein abhängige Porengröße aufweist (beispielsweise *cut-off* 10.000 Da für CtaG<sub>LF</sub> oder 50.000 Da für UEI). In mehreren Zentrifugationschritten lassen sich mit Hilfe der 20 ml Konzentratoren von Millipore oder ??? bis zu 100 ml bequem ankonzentrieren. Von Nachteil ist, dass die Ultrazentrifugation (1) recht Zeitintensiv ist, (2) hydrophobe oder Cysteinhaltige Proteine durch die lokal erhöhte Proteinkonzentration an der Membran zur Aggregation neigen und (3) es zum sogenannten *membrane fouling*, dem Verstopfen der Membran durch die Ablagerung von Partikeln und aggregierten Proteinen kommt und dass (4) Detergenzien aufgrund der Mizellengröße teilweise mit ankonzentriert werden, was zu unbekanntem und sehr hohen Detergenzkonzentrationen im Proteinkonzentrat führt. Trotz dieser Nachteile, bleibt die Ultrafiltration aus Mangel an Alternativen die Methode der Wahl.

Dem *membrane fouling* kann bei Cysteinhaltigen Proteinen durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT entgegengewirkt werden. Zugesezte und damit undurchlässig gewordene Membranen können mit 2 % SDS gereinigt werden. Einige Konzentratoren können bei geeigneter Reinigung und Lagerung wiederverwendet werden. Für die Lagerung empfiehlt sich 0,1 % Azid zur Hemmung mikrobiellen Wachstums in 10-30 %igem Glycerin, was die Membran im Gegensatz zur Lagerung in 30 % Ethanol geschmeidig hält. Bei Volumina über 100 ml empfiehlt sich als Alternative zur Ultrafiltration die Methode der Druckdialyse.

### 3.6. TEV-Verdau

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fusionsproteine sind in der Regel so konstruiert, dass eine Schnittstelle für die *tobacco etch virus* (TEV)-Protease zwischen der Zielsequenz und dem Affinitäts-*tag* liegt. Dadurch kann der His-*tag* während des Aufreinigungsprozesses entfernt werden, um falschen Kupferbindungsstöchiometrien aufgrund einer möglichen Metallbindung durch die Histidinreste vorzubeugen. Die TEV-Protease wird wie unten beschrieben isoliert und in 2 ml Aliquots bei -80 °C in 50 % Glycerin gelagert.

In der Regel werden ca. 15 mg des Zielproteins mit imidazolfreiem Puffer (50 NaPi, 300 NaCl, pH 8) auf 48 ml aufgefüllt, mit einem 2 ml Aliquot (2 mg) der TEV-Protease, sowie 10 mM  $\beta$ -ME versetzt und für 4 h bei 30 °C inkubiert. Nach dem Verdau wird die Lösung mit Hilfe einer zweiten NiNTA-Säule von der Protease und dem abgespaltenen His-*tag* befreit. Die TEV-Protease, der abgespaltene His-*tag* sowie ungespaltene Zielproteine binden an das Säulenmaterial, und das prozessierte Zielprotein findet sich im Durchlauf wieder. Hierfür muss allerdings im Vorfeld sichergestellt sein, dass die Imidazolkonzentration der Lösung 10 mM nicht übersteigt. Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass Kontaminationen, die im ersten Aufreinigungsschritt bei hohen Imidazolkonzentrationen mit dem Zielprotein eluieren, bei 10 mM Imidazol wieder an das NiNTA-Material binden und ebenfalls entfernt werden. Der Durchlauf wird per Ultrafiltration ankonzentriert und bei -80 °C gelagert.

Bei der Arbeit mit Membranproteinen muss beachtet werden, dass Detergenzien die Aktivität der TEV-Protease inhibieren (Mohanty, Simmons et al.) und die Konzentration für das Detergenz DM nicht über 0,1 % liegen darf.

### 3.7. Metallrekonstitution

DTT	1 M	DTT in 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, pH 8
Cu(I)-Acetonitril	500 mM	Tetrakis(acetonitrilo)-Kupfer(I)- Hexafluorophosphat in Acetonitril
Rekonstitutionspuffer - Kupfer	50 mM 300 mM 0,1 %	NaPi NaCl DM pH 8 sterilfiltriert & microaerob (mehrfaches Ent- & mit N <sub>2</sub> Begasen)
Rekonstitutionspuffer - andere Metalle		wie oben, aber pH 5,5

Für den Einbau von Kupfer und anderen Metallen wird CtaG, in den meisten Fällen das lösliche Fragment CtaG<sub>LF</sub>, zunächst für 30 min auf Eis mit 50 mM DTT inkubiert, um die Cysteinständigen Schwefelgruppen, als potentielle Kupfer-Liganden, zu reduzieren. Üblicherweise werden dafür 10-15 mg CtaG<sub>LF</sub> in einem Volumen von 950 µl mit 50 µl 1 M DTT gemischt. Die verwendeten Puffer werden sterilfiltriert und mehrfach mit Stickstoff be- und anschließend entgast, um möglichst anaerobe Bedingungen zu gewährleisten, da sowohl das Protein als auch Cu(I) im reduzierten Zustand gehalten werden sollen. DTT bildet Komplexe mit Metallionen und muss daher vor der Zugabe von Metallionen entfernt werden. Die Probe wird über eine 35 ml Sephadex G25 Säule (Ø 10 mm) mit einer Flussrate von 1 ml/min entsalzt und das Protein wird dabei so aufgefangen, dass möglichst wenig Sauerstoff in die Probe gelangen kann (keine Tropfen, die vom Fraktionssammler auf die CVerfläche schlageb). Die DTT-freie Proteinlösung wird anschließend mit 0,5 mM Cu(I)-Acetonitril versetzt (15 ml + 15 µl 500 mM Tetrakis(acetonitrilo)-Kupfer(I)-Hexafluorophosphat) und für 30 min auf Eis inkubiert. Eventuell ausgefallene Cu(II)-Salze werden durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 15 min, 6.000 rpm, 4 °C) entfernt und der Überstand wird per Ultrafiltration ankonzentriert. Ungebundene Metallionen werden per Gelfiltration (Sephadex G25, vorzugsweise Superdex 75) entfernt, das aufgefangene Metalloprotein wird per Ultrafiltration ankonzentriert, einer Proteinbestimmung (Lowry) unterzogen und bis zum Einsatz in Folgeexperimenten bei -20 °C oder bevorzugt -80 °C gelagert.

### 3.8. Crosslinking

DSP-Lösung	20 mM DSP in DMSO
Reaktionspuffer	100 mM NaPi 150 mM NaCl pH 7,2
Stopp-Lösung	1 M Tris/HCl pH 7,5

In der vorliegenden Arbeit wurden ganze Zellen für die Crosslinking Reaktion eingesetzt. *Paracoccus denitrificans* Pd1222-Kulturen wurden in 1 L LB-Medium angezogen, bei einer  $OD_{600}$  von ca. 1 geerntet (Sorvall RC36, 15 min, 5000 rpm) und zweimal in 100 ml Reaktionspuffer gewaschen, um aminhaltige Verbindungen, die im Nährmedium enthalten sind, zu entfernen. Anschließend werden die Zellen aus 1 L  $OD_{600}=1$  in 100 ml Reaktionspuffer für 30 min mit 1 mM des membrangängigen, aminreaktiven Crosslinkers DSP inkubiert. Die Crosslinking Reaktion wird durch Zugabe von 50 mM Tris abgestoppt und die Zellen werden für eine Membranpräparation eingesetzt. DSP kann gespalten werden, indem die Proben (oder Gelstreifen nach einer ersten Elektrophorese) für ca. 30 min bei 37 °C mit 10-50 mM DTT inkubiert werden.

### 3.9. Lowry

BSA-Stammlösung	2 mg/ml	BSA in H <sub>2</sub> O
Lowry A	188 mM 100 mM	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (wasserfrei) (20 g/l) NaOH (4 g/l)
Lowry B1	2 % (w/v)	Natrium-Kalium-Tartrat
Lowry B2	1 % (w/v)	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
Lowry SDS-Lösung	20 % (w/v)	SDS
Folin-Lösung	500 ml	Folin-Ciocalteus-Reagenz mit H <sub>2</sub> O ad 1l

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird eine weiterentwickelte Form des klassischen Biuret-Tests angewendet (Lowry, Rosebrough et al. 1951; Markwell, Haas et al. 1978). Es wird eine frische Arbeitslösung aus (1) 20 ml Lowry A, (2) 500 µl 20% SDS, (3) 200 µl Lowry B1 und (4) 200 µl Lowry B2 angesetzt. 50 µl einer Probe werden in einem Eppendorfgefäß mit 850 µl der Arbeitslösung versetzt. Die Mischung wird gevortext und 10 min dunkel gestellt. Danach werden jeder Probe 100 µl Folin-Lösung zugegeben. Es wird wieder gevortext und die Proben werden erneut dunkel gestellt,

diesmal für 30 min. Für einen erfolgreichen Lowry hat es sich als angebracht erwiesen, die Lösungen sofort(!) nach Zugabe der einzelnen Lösungen zu vortexen. Neben den Proteinproben, die jeweils doppelt angesetzt werden, werden eine Eichreihe (ebenfalls Doppelbestimmung) mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (10, 20, 30, 40, 50 µg/ml Endkonzentration) und zwei Blindwerte mit 50 µl H<sub>2</sub>O für den Lowry eingesetzt. Die Absorption bei 750 nm wird gegen die Blindwerte gemessen und ist, soweit unter 1,000 OD liegt, proportional zur Proteinkonzentration. Aus den Extinktionswerten der Eichreihe wird eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden kann.

### 3.10. Elektrophorese

Das Pendant zur DNA-Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese ist für Proteine die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Das Gel, das aus Acrylamid und Bisacrylamid polymerisiert, ist mit einer Porengröße zwischen 3 und 5 nm wesentlich engmaschiger als die Agarosegele mit Porengrößen von 150 (1 % Agarose) bis 500 nm (0,16% Agarose). Proteine, die größer als 800 kD sind, können aber in Polyacrylamidgele nicht mehr eindringen. In diesen Fällen werden auch Agarosegele zur Trennung von Proteinen verwendet.

Im Gegensatz zu DNA sind Proteine nicht einheitlich geladen. Um ein einigermaßen konstantes Masse/Ladungs-Verhältnis zu erreichen, werden die Protein-Proben vor dem Gellauf mit Substanzen wie SDS, oder in Einzelfällen Coomassie, behandelt. SDS ist ein ionische Detergenz das an die Aminosäuren bindet und so zu einer relativ gleichmäßig verteilten negativen Ladung des Proteins führt.

In der vorliegenden Arbeit wird meist mit denaturierenden Systemen gearbeitet, bei denen das Protein durch SDS, β-Mercaptoethanol und Hitze zu einem langen Faden entfaltet wird. Eventuelle Wanderungsunterschiede aufgrund unterschiedlicher Form werden so minimiert. Mit der Denaturierung der Proteine geht allerdings gleichzeitig ein Zerfall eventueller Oligomere einher. Um die Komplexbildung von Proteinen zu untersuchen, müssen daher nicht denaturierende, d.h. native Gelsysteme wie beispielsweise Blau-Nativ Gele verwendet werden.

### 3.10.1. Denaturierende Elektrophoresesysteme

#### 3.10.1.1. Laemmli (Tris/Glycin)

In der Regel wurde mit dem klassischen diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli gearbeitet (Cleveland, Fischer et al. 1977).

4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 8 mM EDTA 0,4 % SDS pH 8,8
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,8) 8 mM EDTA 0,4 % SDS pH 6,8
5x Laufpuffer	30 g Tris 142 g Glycin 500 mM EDTA pH 8 50 ml 20 % SDS H <sub>2</sub> O ad 2L
Probenpuffer	12,5 ml Sammelgelpuffer (4x) 10 ml 20 % SDS 2,5 ml β-Mercaptoethanol 10 ml Glycerin 2,5 ml 0,1 % Bromphenolblau H <sub>2</sub> O ad 50 ml
Acrylamid Lösung	30 % Acrylamid 0,8 % Bis-Acrylamid

#### Mini-Gele

12 % Gel 1.4 mm Dicke	Trenngel 3,6 ml Acrylamidsg. 2,25 ml Trenngelpuffer pH 8,8 3,0 ml H <sub>2</sub> O	Sammelgel 700 µl Acrylamidsg. 1 ml Sammelgelpuffer pH 6,8 2,35 ml H <sub>2</sub> O
--------------------------	---	---

15 % Gel 1.4 mm Dicke	Trenngel 4,5 ml Acrylamidsg. 2,25 ml Trenngelpuffer pH 8,8 2,1 ml H <sub>2</sub> O	Sammelgel 700 µl Acrylamidsg. 1 ml Sammelgelpuffer pH 6,8 2,35 ml H <sub>2</sub> O
--------------------------	---	---

	15 µl TEMED 75 µl APS (10%)	10 µl TEMED 50 µl APS (10%)
--	--------------------------------	--------------------------------

Lauf: 180V; ca. 60 min.

**Große Gele**

12 % Gel 1.4 mm Dicke	Trenngel 14,4 ml Acrylamidlg. 9 ml Trenngelpuffer pH 8,8 12,6 ml H <sub>2</sub> O	Sammelgel 2,1 ml Acrylamidlg. 3 ml Sammelgelpuffer pH 6,8 6,9 ml H <sub>2</sub> O
15 % Gel 1.4 mm Dicke	Trenngel 18 ml Acrylamidlg. 9 ml Trenngelpuffer pH 8,8 8,4 ml H <sub>2</sub> O	Sammelgel 2,1 ml Acrylamidlg. 3 ml Sammelgelpuffer pH 6,8 6,9 ml H <sub>2</sub> O
	30 µl TEMED 300 µl APS (10%)	10 µl TEMED 100 µl APS (10%)

**3.10.1.2. Ahn**

2x Trenngelpuffer (Ahn)	152 mM 200 mM 200 mM 200 mM	Tris/HCl (pH 7,4) Serin Glycin Asparaginsäure ad pH 7,4 (NaOH) Autoklavieren
Acrylamidlösung	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)	Acrylamid Bis-Acrylamid
APS	10 % (w/v)	Aminoperoxodisulfat
Proteinprobenpuffer (2x)	0,09 M 20 % (v/v) 2 % (w/v) 0,02 % (w/v) 0,1 M	Tris/HCl (pH 6,8) Glycerin SDS Bromphenolblau β-Mercaptoethanol
Laufpuffer (5x)	250 mM 1,07 M 2 mM 1 % (w/v)	Tris/HCl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (142,25 g/l) EDTA SDS
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) 10 % (v/v) 20 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R250 Essigsäure Methanol
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) 20 % (v/v)	Essigsäure Methanol

Ein Beispiel für ein denaturierendes, kontinuierliches Gelsystem sind die Polyacrylamidgele nach Ahn (Ahn, Yim et al. 2001). Für zwei 15 %ige Ahn-Gele benötigt man (1) 10 ml Acrylamid-Lösung, (2) 10 ml 2x-Trenngelpuffer und als Polymerisationsstarter (3) 36 µl TEMED und (4) 160 µl APS. Es hat sich als hilfreich erwiesen den Boden der Gießkammern (*Mini Protean II System (BioRad)*) vor dem Befüllen mit Hilfe von 1,5 %iger Agarose abzudichten.



Die Protein-Proben werden meist so vorbereitet, dass bei kleinen Gelen 10-50 µg Protein pro Geltasche aufgetragen werden. Vor dem Auftrag werden die Proben 1:1 mit 2x-SDS-Probenpuffer verdünnt und 10 min bei 45°C inkubiert.

### 3.10.2. Nativ-Gele

#### 3.10.2.1. BN-PAGE

Anodenpuffer	25 mM Imidazol/HCl pH 7
Gelpuffer (3x)	1,5 M Aminocaprinsäure 75 mM Imidazol/HCl pH 7
Kathodenpuffer	50 mM Tricin 7,5 mM Imidazol 0,02%(w/v) Serva Blau G
Acrylamidlösung	48 g Acrylamid 1,5 g Bis-Acrylamid ad 100 ml

Bei diesem Gelsystem wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine durch ihre native Größe und die Bindung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie-Blau geprägt; alle Proteine, die diesen Farbstoff binden, wandern bei pH 7,5 anodenwärts [230]. Als Standard dienen die bekannten, aus Rinderherzmitochondrien solubilisierten Atmungskettenkomplexe. Es werden 1,6 mm dicke Gele mit 3,5 % Sammelgel und 3,5 % → 13 % Gradiententrenngel verwendet. Die Gele werden mit einem Gradientenmischer bei 4 °C gegossen und bei RT auspolymerisiert.

	3,5 % Trenngel	13 % Trenngel	3,5 % Sammelgel
A/B-Mischung [ml]	4,2	13,1	1,5
Gelpuffer [ml]	20	16,7	8,3
Glycerin [g]		10	
H <sub>2</sub> O [ml]	ad 60	ad 50	ad 25
10 % APS [µl]	300	170	200
TEMED [µl]	30	17	20

Nach dem Beladen laufen die Gele zunächst bei einer Spannung von 100 V, später bei 500 V 3-4 h. Für eine zweite, denaturierende Dimension wird der interessierende Bereich in einem Streifen ausgeschnitten und auf ein Tricin-SDS-Gel (10 % Sammelgel, 16 % Trenngel) übertragen. Das zweite Gel läuft zu Beginn mit 100 V, nach dem Einlaufen der Proben bei 250 V.

### 3.10.3. Färbemethoden

#### 3.10.3.1. Coomassie-Färbung

Coomassie Färbelösung	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250 10 % Essigsäure 20 % Methanol
Coomassie Entfärber	10 % Essigsäure 20 % Methanol

Zum Färben wird das Gel für ca. 15 min bei 68 °C in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Der überschüssige Farbstoff wird mit Coomassie-Entfärber entfernt.

#### 3.10.3.2. Silberfärbung

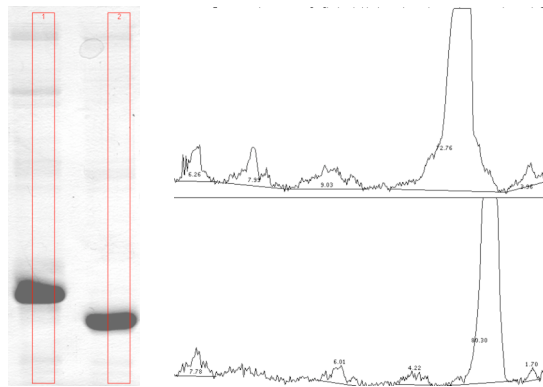
Fixierer	50 % Ethanol 12 % Essigsäure 0,5 ml/l Formaldehyd (37%)
Waschlösung	50 % Ethanol
Sensitisier-Lösung	0,02 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (200 mg/l)
Färber	0,2 % $\text{AgNO}_3$ (1 g/l) 0,75 ml/l Formaldehyd (37%)
Entwickler	6 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (60 g/l) 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 ml Sensitisier-Lösung / 100 ml) 0,5 ml/l Formaldehyd
Stopp-Lösung	50 mM EDTA
Coomassie-Totalentfärber	50 % Methanol 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Die folgenden Zeiten gelten für 0,7 mm starke 12%ige Acrylamid-Gele. Für 1,6 mm starke, bzw. 15%ige Gele sollten die Zeiten verdoppelt werden. Mindestens 2h, besser über Nacht, mit 40 ml Fixierer + 20 µl Formaldehyd fixieren. 3x 20 min in 50% EtOH waschen, 1 min Sensitisierung, 3x 20 sec mit  $\text{H}_2\text{O}$  waschen und 20 min mit 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 400 µl 20%  $\text{AgNO}_3$  und 30 µl Formaldehyd färben. Anschließend 3x 20 sec mit  $\text{H}_2\text{O}$  waschen. Schließlich mit 40 ml Entwickler + 20 µl Formaldehyd entwickeln und nach erfolgter Entwicklung kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  waschen und mit 50 mM EDTA stoppen. Bei zu dunkel gefärbten Gelen, kann man das Gel kurz in 20%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,5% Kaliumdisulfit tauchen danach gut wässern. Direkte Silberfärbung von Coomassie gefärbten Gelen erzeugt dunkle Spots. Besser vorher vollständig entfärben: Gewässertes Gel (kein HAc mehr!) mehrere Stunden in Coomassie-Totalentfärber. Dann mit zweitem Schritt (50% EtOH) fortfahren.

### 3.10.4. Densitometrie

Um die Reinheit einer Probe aus Coomassie- oder Silber-gefärbten Gelen abzuschätzen oder um die Intensität von Western Blot Signalen semi-quantitativ zu vergleichen bietet sich die Methode der Densitometrie an. Das zu analysierende Gel wird eingescannt und die Grafik wird mit dem frei verfügbaren Programm ImageJ des NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) geladen. Die einzelnen Bahnen werden markiert und in Histogrammen aufgetragen: Die x-Achse repräsentiert die Position im Gel, auf der y-Achse wird die Intensität der Bande aufgetragen. Durch Integration lassen sich nun die Peakflächen berechnen, welche dann zueinander in Relation gesetzt werden können.

Da sich verschiedene Proteine in SDS-Gelen jedoch unterschiedlich gut anfärben lassen und da die zu integrierenden Kurven im Histogramm von Hand definiert werden, kann die Densitometrie aber nur zur besseren Abschätzung dienen und darf nicht als exakte Bestimmungsmethode verstanden werden



**Abbildung 10 - Densitometrie zur Bestimmung des Proteinreinheitsgrades aus Gelen**

Mit dem Programm ImageJ lassen sich unter anderem aus eingescannten Gelen einzelne Bahnen in Form von Histogrammen auftragen. Aus den Peakflächen kann dann die relative Signalstärke und somit die Reinheit der Probe grob bestimmt werden.

### 3.11. Western Blot

Für den Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulosemembranen können zwei Methoden verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Nass-Transfers als auch Transfers nach dem *semi dry*-Prinzip durchgeführt.

#### 3.11.1. Nass-Transfer

Stammlösung (5x)	250 mM 1,89 M 0,1 % (w/v)	Tris Glycin (142 g/l) SDS
Transferpuffer (1x)	400 ml 400 ml	Stammlösung Methanol mit H <sub>2</sub> O ad 2l

Die Nitrozellulosemembran und das Proteingel werden zwischen zwei Filterpapieren, zwei Schwämmen und zwei Plastikgittern in eine mit 1x Transferpuffer gefüllte Kammer getaucht und dort einem elektrischen Feld ausgesetzt, das die Protein/SDS-Komplexe aufgrund ihrer negativen Ladung aus dem Gel hinauszieht und sie in Richtung Plus-Pol wandern lässt.

Es muss darauf geachtet werden, dass keinerlei Luftblasen vorhanden sind, die den Proteintransfer unterbinden könnten. Schwämme, Filterpapiere und Nitrozellulosemembran werden daher überreichlich mit 1x Transferpuffer getränkt.

Gelottet wird bei 400 mA für 1 bis 2 h.

#### 3.11.2. *semi dry*-Transfer

Transferpuffer nach Bjerrum und Schafer-Nielsen	48 mM 39 mM 20 % (v/v) 1 % (w/v)	Tris (5,82g/l) Glycin (2,93 g/l) Methanol SDS (0,375 g/l)
---	---	--

Ein etwas weniger aufwendiges Verfahren ist der *semi dry*-Blot, bei dem Gel und Membran nicht in einer Kammer schwimmen, sondern zwischen zwei Plattenelektroden gelegt werden.

Nach dem Gellauf wird das Proteingel 10-15 min in *semi dry*-Puffer äquilibriert, damit störende Salze entfernt werden. Gleichzeitig wird die Nitrozellulosemembran für 15 min in *semi dry*-Puffer eingelegt, damit sie sich ausdehnen kann und jegliche daran gebundene Luft gelöst wird.

Man legt dann ein dickes Filterpapier, das ebenfalls gut mit *semi dry*-Puffer getränkt wurde, auf die Anode, d.h. auf die untere Platte der Blottingapparatur. Darauf legt man die Nitrozellulosemembran, dann das Gel und anschließend wieder ein bis zwei gut getränkte Filterpapiere. Nach jedem dieser Schritte werden Luftblasen entfernt, indem man mit leichtem Druck einen Glasstab oder ähnliches über den Stapel rollt.

Gelottet wird für 45 min bei 15 V.

Nach dem Transfer werden die Umrisse des Gels mit einem schwarzen Kugelschreiber (blau verläuft) auf der Membran angezeichnet.

Anschließend wird die Membran ca. 5 min mit Ponceau S angefärbt. Dadurch werden die Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht, und man kann mit dem Kugelschreiber die Banden des Größenstandards markieren.

Sollte keine Färbung durch Ponceau S auftreten, kann dies an einer zu hohen Ionenstärke liegen. In diesem Fall empfiehlt es sich, die Membran gründlich mit dest. H<sub>2</sub>O zu spülen und erneut zu färben.

### 3.11.3. Blot-Entwicklung

10x TBS	100 mM 75 mM	Tris/HCl (pH 7,5) NaCl
10x TBSTT	200 mM 5 M 0,5% (v/v) 2% (v/v)	Tris/HCl (pH 7,5) NaCl Tween-20 Triton X-100
Blockierungs-Reagenz	3% (v/v)	BSA in 1x TBS
1. Antikörper (Beispiel)	1:2000	Anti-His IgG (aus Maus) in Blockierungs-Reagenz
2. Antikörper (Beispiel)	1:1000	Anti-Maus IgG (aus Ziege) in Blockierungs-Reagenz
TNM	100 mM 100 mM 50 mM	Tris/HCl (pH 9,5) NaCl MgCl <sub>2</sub>
NBT	50 mg/ml	NBT in 70% DMF
BCIP	25 mg/ml	BCIP in 100% DMF
Färbe-Lösung	10 ml 45 µl 45 µl	TNM NBT BCIP
Stopp-Lösung	50 mM	EDTA

Zur Identifizierung einzelner Proteinbanden mit Hilfe spezifischer Antikörper, werden die geblotteten Proteine einer längeren Prozedur unterzogen. Zunächst wird die Nitrozellulosemembran 1 h in 20 ml Blockierungs Reagenz inkubiert, damit sie mit Protein abgesättigt wird und eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran verhindert wird. Das Blockierungs Reagenz wird entfernt und stattdessen wird die Membran 1-2 h mit 5-10 ml der 1. Antikörperlösung inkubiert. Dieser Antikörper soll an

das gesuchte Protein binden. Die Membran wird 2x für je 5 min mit 1x TBSTT und anschließend 5 min mit 1x TBS gewaschen. Danach erfolgt, wenn nötig, die Zugabe von 5-10 ml der 2. Antikörperlösung. Da der 2. Antikörper ein Konjugat aus Immunglobulin und Enzym (wie z.B. Alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase) ist, erfüllt er zwei Aufgaben: er bindet an den 1. Antikörper und katalysiert mit seiner Enzymaktivität eine Färbereaktion. Dieser 2. Antikörper wird nur dann benötigt, wenn der 1. Antikörper selbst keine färbende Enzymaktivität trägt. Nach gründlichem Waschen (5x mit 1x TBSTT, 2x mit 1x TBS) wird die Membran mit TNM-Puffer äquilibriert, mit frisch angesetzter Färbelösung inkubiert und dunkel gestellt. Eine Färbung sollte nach 5-10 min sichtbar werden. Bei sauberer Arbeit kann die Färbung aber gut über mehrere Stunden oder gar über Nacht durchgeführt werden, ohne dass dabei eine nennenswerte Hintergrundfärbung auftritt. Um die Färbereaktion zu stoppen, wird die Färbelösung abgossen und durch 50 mM EDTA ersetzt. Die Membran wird zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und eingescannt.

### 3.12. Methoden zur Kupferbestimmung

In dieser Arbeit kamen für die Bestimmung von Kupfer/Protein-Verhältnissen insgesamt vier Methoden zum Einsatz. Die mit Abstand sensitivste und genaueste Methode ist die ICP-MS. Eine zweite sehr zuverlässige und kostengünstigere Variante ist die TXRF. Beide Methoden haben den Vorteil, dass mehrere Elemente gleichzeitig bestimmt werden können. In Einzelfällen wurden Metallbestimmungen per AAS durchgeführt, und zur schnellen und kostengünstigen Überprüfung des Kupfer/Protein-Verhältnisses wurde ein einfacher photometrischer Assay, der BCA-Assay, durchgeführt.

#### 3.12.1. BCA-Assay

TCA-Lösung	30 g	TCA (163,4 g/mol) in 100 ml dest. H <sub>2</sub> O
Ascorbat-Lösung	35,2 mg	L-Dihydroascorbinsäure in 100 ml dest. H <sub>2</sub> O vor Gebrauch frisch ansetzen
BCA-Lösung	6 mg 3,6 g 15,6 g +	BCA NaOH HEPES 90 ml dest. H <sub>2</sub> O

Ein einfacher Test zum quantitativen Nachweis von Cu-Ionen in Proteinen ist der BCA-Assay nach Brenner und Harris, 1995 {(Brenner und Harris 1995)}. BCA dient als Chelator und bildet einen Komplex mit Cu(I)-Ionen, der bei 358 nm stark und bei 562 nm schwach absorbiert. In der klassischen Variante dieses Assays werden 750 µl der zu untersuchenden Proteinlösung (5-50 µg) in einem Eppendorfgefäß mit 250 µl TCA-Lösung inkubiert, wodurch die Proteine denaturiert werden und eventuell gebundenes

Kupfer in Lösung geht. Nach Vortexen und Zentrifugation (Heraeus Microfuge, 13.000 rpm, 5 min, RT) wird die Probe durch die Überführung von 500 µl in ein neues Eppendorfgefäß gesplittet und dadurch einer Doppelbestimmung unterzogen. Zur Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) werden beide Proben mit je 100 µl Ascorbat versetzt und gründlich gevortext. Anschließend werden die Cu(I)-Ionen durch Zugabe von 400 µl BCA-Lösung komplexiert und es entsteht der oben angesprochene farbige Cu(I)-BCA Komplex. Nach 2 min können die Proben photometrisch vermessen werden. Zur Normierung werden stets ein Blindwert, bei dem 750 µl Puffer der oben beschriebenen Behandlung unterzogen wurden und eine Eichreihe mit vermessen. Die Eichreihe wird mit 5, 10, 15, 20, 30, 40 und 50 µm CuSO<sub>4</sub> in hochreinem Wasser (Seralpur) hergestellt und ebenfalls doppelt bestimmt.

Da sich für die Kupferbestimmung von CtaG bei dieser Variante des Tests einige Probleme ergaben, wurde das Protokoll leicht abgewandelt. In manchen Fällen führte die Zugabe von BCA zu keiner Färbung des Überstandes, aber zu einer deutlichen Verfärbung des im Zuge der TCA-Fällung entstandenen Proteinpellets. Daraus wurde geschlossen, dass das Kupfer nach Zugabe von TCA nicht vollständig aus dem Protein freigesetzt wurde. Auch die Verwendung neuer TCAs oder höherer TCA-Konzentrationen änderte an diesem Phänomen nichts. Daher wurden Reduktionsmittel (Ascorbat) und Chelator (BCA) vor der Fällung des denaturierten Proteins durch Zentrifugation zugegeben. Das heißt, der Zentrifugationsschritt wurde an das Ende des Assays, vor die photometrische Vermessung gesetzt.

Desweiteren wurden die verwendeten Volumina verringert (200 µl Probe, 50 µl TCA, 50 µl Ascorbat, 200 µl BCA), um einerseits weniger Protein für die Bestimmung einsetzen zu müssen und um andererseits in *96-well plates* arbeiten zu können, was eine schnellere Bestimmung und einen höheren Probendurchsatz ermöglichte. Bei der Vermessung von wenigen Proben, kam eine 100 µl Küvette zum Einsatz.

Ein Problem des BCA-Assays ist neben der geringen Sensitivität und der Beschränkung auf Kupfer-Ionen, dass für die Berechnung von Metall/Protein-Verhältnissen eine zusätzliche Bestimmung der Proteinkonzentration, beispielsweise per Lowry (Material & Methoden 3.9, S.51), durchgeführt werden muss. Dies hat neben einem größeren Proteinverbrauch auch einen größeren Fehler zur Folge. Für eine erste grobe Bestimmung des Kupfer/Protein-Verhältnisses stellt der BCA-Assay jedoch eine einfache, schnelle und kostengünstige Variante dar.

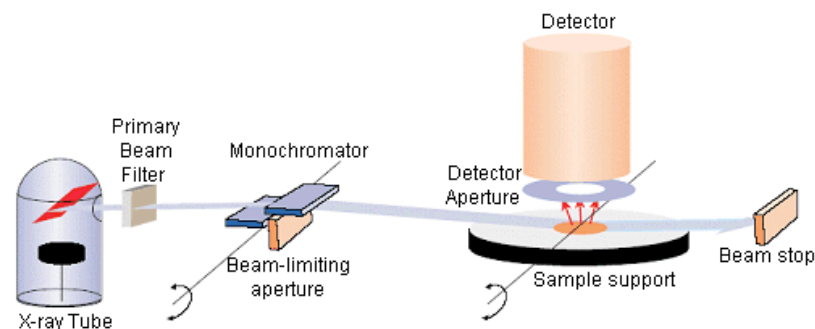
### **3.12.2. Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS)**

Wesentlich sensitiver als der BCA-Assay ist die Metallbestimmung mit Hilfe der Atom-Absorptions-Spektrometrie. Dabei wird eine flüssige Probe durch starkes Erhitzen atomisiert und aus der Absorption definierter Wellenlängen aus einer elementspezifischen

Lampe kann die Elementkonzentration berechnet werden. Eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen der zu untersuchenden Elemente dient als Referenz für die Konzentrationsbestimmung. Hier wurde mit einem Perkin Elmer AAnalyst 300 Flammen-AAS des Max-Planck-Instituts für Biophysik gearbeitet. Die AAS hat den Nachteil, dass zu einem Zeitpunkt immer nur ein Element detektiert werden kann, was bei der Bestimmung mehrerer Metalle große Probenmengen verbraucht. Desweiteren muss auch hier zur Bestimmung von Metall/Protein-Verhältnissen auf eine separate Bestimmung der Proteinkonzentration zurückgegriffen werden, was zwangsläufig zu größeren Fehlern führt.

### 3.12.3. TXRF-Spektrometrie

Mit Hilfe der Totalreflexions Röntgenfluoreszenz Spektrometrie (TXRF) können mehrere Elemente gleichzeitig detektiert werden (Wobruschek 1994). Neben den meisten Metallen und Halbmetallen können auch einige Nichtmetalle quantifiziert werden, was den Vorteil einer internen Standardisierung bezüglich der Metall/Protein-Verhältnisse bietet. Über die Quantifizierung von Schwefel kann, eine gute Probenreinheit und das Wissen über die Anzahl der Cystein- und Methioninreste vorausgesetzt, die Proteinkonzentration berechnet werden, das heißt aus dem gemessenen Metall/Schwefel-Verhältnis kann das Metall/Protein-Verhältnis abgeleitet werden.



**Abbildung 11 - Prinzip der TXRF**

Röntgenstrahlung wird durch einen Monochromator in einem Winkel von unter  $0,1^\circ$  auf einen getrockneten Probenfilm gestrahlt. Der Energiegehalt der emittierten Fluoreszenzbanden hängt von dem bei der jeweiligen Wellenlänge angeregten Atom ab und dient zur Detektion und Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Elemente. (Abbildung vom Hersteller Cameca)

Eine sehr geringe Probenmenge ( $10\text{-}20\ \mu\text{l}$ ,  $\sim 50\ \mu\text{M}$  bzw.  $\sim 1\ \text{mg/ml}$ ) wird mit einem internen Standard gemischt und auf einem Objektträger eingetrocknet. Die Probe wird dann in einem flachen Winkel (meist unter  $0,1^\circ$ ) mit Röntgenstrahlung bestrahlt, sodass es zur Totalreflexion kommt und Streuung minimiert wird. Dadurch wird das Signal/Rausch-Verhältnis im Vergleich zu anderen Röntgenfluoreszenzmessungen erheblich verbessert, was die Sensitivität wiederum wesentlich steigert. Die elementspezifischen Fluoreszenzbanden werden detektiert und zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Elemente herangezogen. Vorteile der TXRF sind die simultane Detektion mehrerer Elemente und der geringe Probenbedarf, Nachteile sind hingegen



eine relativ lange Messzeit zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses (1000 s pro Element), eine Störanfälligkeit durch gängige Ionen wie Natrium-, Kalium-, Chlorid- und Phosphat-Ionen sowie ein erheblicher Wartungsaufwand/Ausfall bei dem älteren *Extra II* Modell der Firma *Atomika Instruments* (Heute *Cameca*), das für die in dieser Arbeit vorliegenden Messungen eingesetzt wurde.

Um die störenden Effekte von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{PO}_4^{2-}$  Ionen zu unterbinden, müssen die Proben in einen unproblematischen Puffer wie beispielsweise 50 mM Tris/Acetat pH 8 umgepuffert werden. Die hier beschriebenen TXRF-Messungen wurden freundlicherweise von Frau Claudia Rittmeyer aus dem Arbeitskreis Kolbesen am Institut für Anorganische und Analytische Chemie dieser Universität durchgeführt.

#### **3.12.4. ICP-MS**

Die zuverlässigste und sensitivste Methode zur Bestimmung der atomaren Zusammensetzung einer Probe ist die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*, ICP-MS). Hier wird die Probe in einem Argon-Plasma bei 5.000 - 10.000 °C atomisiert und die generierten Ionen werden mit Hilfe eines angeschlossenen Massenspektrometers identifiziert. Dabei kann zwischen einzelnen Isotopen unterschieden und nahezu jedes Element bestimmt werden. Die Nachweisgrenze liegt für die meisten Elemente im ng/L bzw. sub-ng/L Bereich. Flüssige Proben werden mit Hilfe in einer Sprühkammer zu Argon-Aerosolen zerstäubt, und da der Zerstäuber leicht blockiert, ist es sinnvoll die Proben vor der Messung mindestens einmal zu filtrieren. Hierfür wurden 0,2 µm Spinfilter der Firma *Pall* verwendet. Desweiteren sollte die Gesamtkonzentration aller gelöster Substanzen nicht über 0,1 % (w/w) liegen. Zur genauen Quantifizierung der einzelnen Isotope wird während der Messung in regelmäßigen Abständen ein Standard bekannter Konzentrationen mit vermessen.

Neben der hohen Sensitivität und dem damit verbundenen niedrigen Probenverbrauch hat diese Methode, wie die TXRF, den Vorteil, dass die Elemente simultan bestimmt werden können und ein Metall/Protein-Verhältnis direkt aus dem Metall/Schwefel-Verhältnis abgeleitet werden kann. Darüberhinaus bietet die ICP-MS im Gegensatz zur TXRF die Vorteile, dass störende Effekte durch  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{PO}_4^{2-}$ -Ionen, hier bei niedrigen Probenkonzentrationen keine Rolle spielen und auch die Messzeit mit ca. 60-300 s (für 10-20 Elemente) vergleichsweise kurz ist. Einziger Nachteil der ICP-MS sind die hohen damit verbundenen Kosten. Die in dieser Arbeit präsentierten Messungen wurden an einem *high resolution multicollector ICP-MS Element 2* der Marke *Thermo Scientific* in Zusammenarbeit mit Dr. Yann Lahaye und Dr. Michael Seitz am Institut für Geowissenschaften unter Prof. Brey durchgeführt.



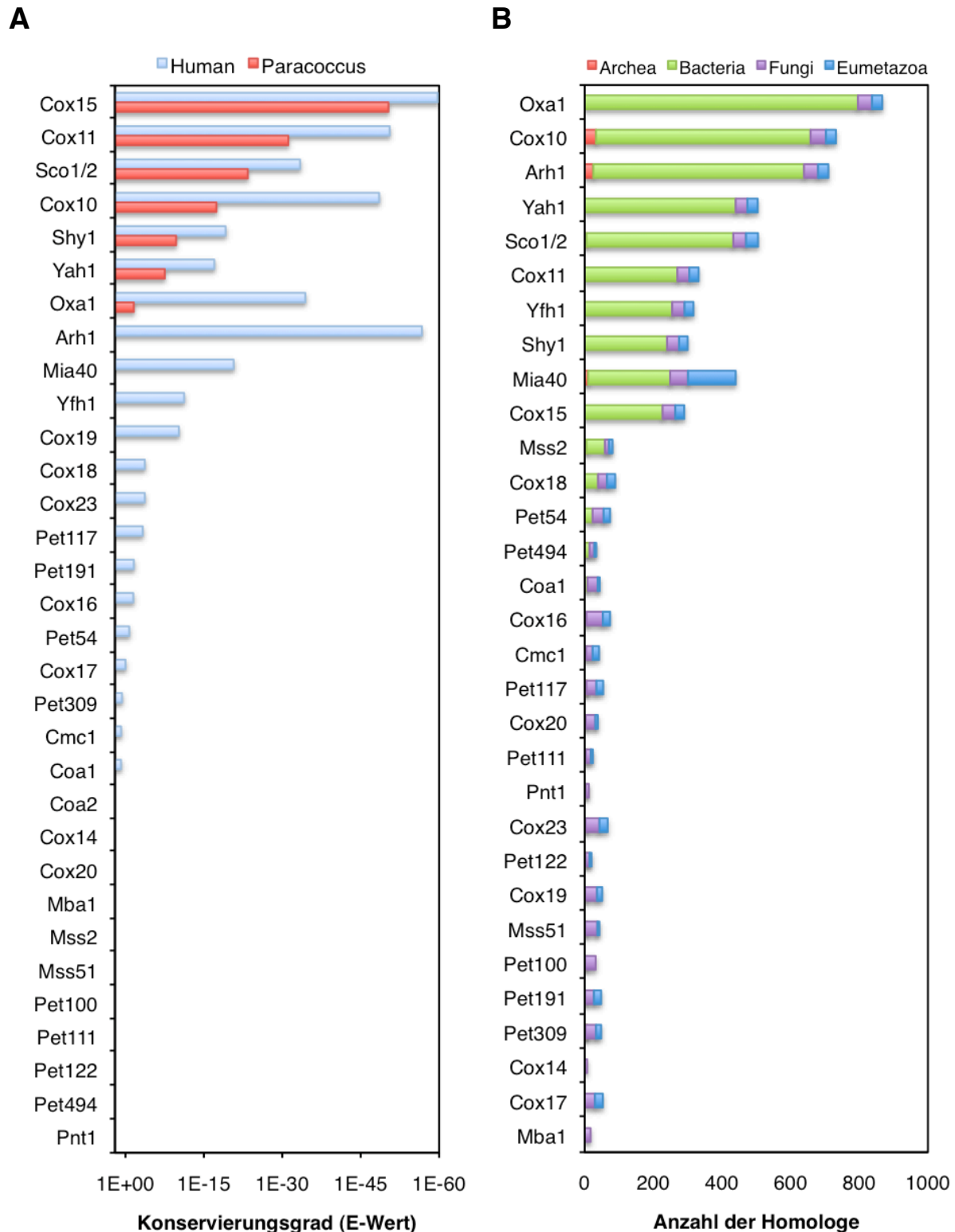
### III. Ergebnisse & Diskussion

#### 1. Bioinformatische Analyse

Wie bereits einleitend erwähnt sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt über 30 Proteine bekannt, die an der Biogenese der Cytochrom c Oxidase in *S. cerevisiae* beteiligt sind ohne einen festen Bestandteil des finalen Komplexes zu bilden (siehe Einleitung, Abschnitt 1.6 Biogenese der Cytochrom c Oxidase, S.11). Um zu überprüfen, welche dieser Assemblierungsfaktoren besonders relevant sind und welche Bedeutung CtaG (Cox11) zukommt, wurde zunächst ein bioinformatischer Ansatz verfolgt. Dabei wurde die Verteilung der bekannten Assemblierungsfaktoren über verschiedene Organismen betrachtet. Zwei Kriterien wurden als Maß für die Bedeutung der einzelnen Assemblierungsfaktoren herangezogen: Zum einen die Häufigkeit ihres Auftretens in anderen Organismen und zum anderen der Grad der Sequenzidentität zwischen den Hefe-Proteinen und ihren jeweiligen Homologen.

Zunächst wurden Protein-BLASTs mit allen aus Hefe bekannten Assemblierungsfaktoren in der NCBI Datenbank nicht-redundanter Proteinsequenzen durchgeführt. Die jeweils identifizierten Homologe wurden taxonomisch sortiert und ihre Verteilung über Archeen, Bakterien, Pilze und höhere Eukaryoten (Eumetazoa bzw. Gewebetiere) wurde bestimmt. Für die humanen Proteine und die Homologe aus dem prokaryotischen Mitochondrien-Modellorganismus *Paracoccus denitrificans* wurde darüberhinaus der jeweilige Grad der Sequenzidentität (bezogen auf die Hefe-Sequenz) bestimmt. Hierfür wurde die sogenannte *Expectation* der BLAST-Ergebnisse herangezogen. Diese, auch als E-Wert bekannte Größe, gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der dieselbe Sequenzübereinstimmung auch mit einer zufälligen Sequenz auftreten würde. Ein sehr kleiner E-Wert steht also für eine sehr hohe Sequenzidentität. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Eine tabellarische Zusammenstellung der Daten findet sich im Anhang der Arbeit.

Wie aus Abbildung 12A hervorgeht, weisen die Assemblierungsfaktoren Cox15, Cox10, Cox11, Sco1, Shy1 und Oxa1 einen besonders hohen Konservierungsgrad zwischen Hefe und Mensch auf. Diese Assemblierungsfaktoren sind auch in dem prokaryotischen Modellorganismus *Paraoccus denitrificans* vertreten und stark konserviert, und sie gehören zu den taxonomisch am weitesten verbreiteten Proteinen dieser Analyse (Abbildung 12B). Interessanterweise sind siebzehn der insgesamt 32 aus Hefe bekannten Assemblierungsfaktoren kaum oder gar nicht in Prokaryoten vertreten. Elf der analysierten Assemblierungsfaktoren weisen kein humanes Homolog auf. Vier dieser elf Proteine liegen sogar ausschließlich in Fungi vor, und auch die übrigen sieben tauchen mit weniger als zehn identifizierten Homologen nur sehr selten in höheren Eukaryoten (Eumetazoa) auf.



**Abbildung 12 - Auftreten und Konservierung von Assemblierungsfaktoren der Cytochrom c Oxidase**

Homologe der bekannten Hefe-Assemblierungsfaktoren wurden mit Hilfe von Protein-BLASTs identifiziert und anschließend taxonomisch sortiert, um besonders relevante Biogenesefaktoren zu identifizieren. **A.** Konservierungsgrad der humanen Homologe, bzw. der Homologe aus dem prokaryotischen Modellorganismus *Paracoccus denitrificans* verglichen mit den Hefe-Sequenzen (Beschreibung E-Wert, siehe Text). **B.** Anzahl der identifizierten Homologe nach taxonomischen Gruppen. CtaG, bzw. Cox11 gehört zu den am stärksten konservierten Assemblierungsfaktoren. (Für Beschreibungen der Funktion einzelner Assemblierungsfaktoren siehe Tabelle 2 - Assemblierungsfaktoren der Cytochrom c Oxidase, S.12)

## Diskussion

Die Assemblierungsfaktoren Cox15, Cox10, Cox11, Sco1, Shy1 und Oxa1 sind besonders stark konserviert und weit verbreitet. CtaG, das prokaryotische Homolog von Cox11, gehört also zu den besonders relevanten Assemblierungsfaktoren für die Cytochrom c Oxidase. Diese sind sowohl in Prokaryoten, als auch in höheren Eukaryoten und im Menschen vertreten und ihre Sequenzen haben sich im Laufe der Evolution kaum verändert. Dies spricht dafür, dass sich auch die essentiellen Schritte des Assemblierungsprozesses im Laufe der Evolution kaum verändert haben. Bis auf Oxa1/YidC, welches für die Insertion von integralen Membranproteinen verantwortlich ist (Kuhn, Stuart et al. 2003), werden diese Proteine alle mit der Biosynthese oder dem Transport von Häm *a* bzw. dem Transport von Kupferionen in Verbindung gebracht. Die hier identifizierten besonders konservierten Schritte der Biogenese scheinen also mit der Insertion der Kofaktoren zusammenzuhängen.

Ein großer Teil der aus Hefe bekannten Assemblierungsfaktoren (über die Hälfte) findet sich nicht in prokaryotischen Homologen wieder. Dies zeugt von der höheren Komplexität eukaryotischer Organismen. Die Existenz zusätzlicher Untereinheiten und die Kommunikation zwischen Mitochondrium und Zellkern erklärt die Notwendigkeit einer höheren Anzahl an Assemblierungsfaktoren in Eukaryoten. Interessanterweise existieren jedoch für elf, d.h. für über ein Drittel der aus Hefe bekannten Assemblierungsfaktoren auch keine humanen Homologe. Vier der Assemblierungsfaktoren treten sogar ausschließlich in Hefen und in keinem anderen eukaryotischen Organismus auf. Obgleich die Hefe also ein gut untersuchter Eukaryot und anerkannter Modellorganismus ist, müssen Vergleiche zwischen den Prozessen in Hefe Mitochondrien und humanen Mitochondrien mit Vorsicht betrachtet werden.

Die besonders stark konservierten Assemblierungsfaktoren Cox15, Cox10, Cox11, Sco1, Shy1 und Oxa1 liegen auch in dem Modellorganismus *Paracoccus denitrificans* vor, was die Eignung von  $\alpha$ -Proteobakterien zur Untersuchung der mitochondrialen Atmungskette weiter unterstreicht. Drei dieser Proteine (Cox10, Cox11 und Shy1 - in *P.d.*: CtaB, CtaG und Surf1c) sind Teil eines Operons. Diese als *cta*-Operon bezeichnete Regulationseinheit kodiert auch für die strukturellen Untereinheiten II und III der Cytochrom c Oxidase. Somit befinden sich in *Paracoccus denitrificans* einige Struktur- und Assemblierungsgene der Cytochrom c Oxidase unter gemeinsamer Kontrolle.

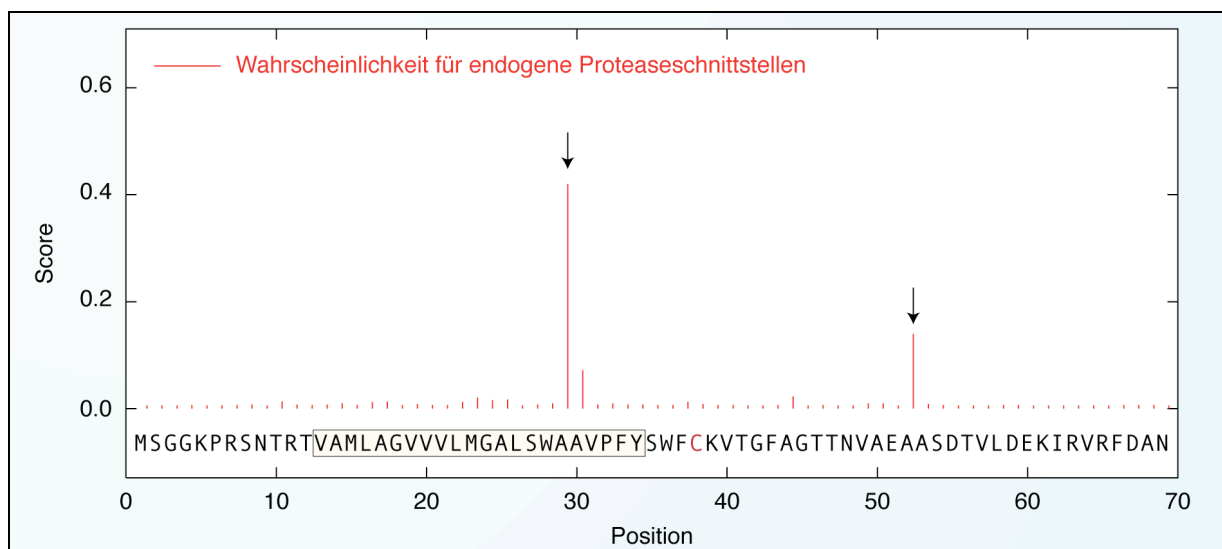
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die grundlegenden Schritte der Assemblierung der Cytochrom c Oxidase mit dem Einbau der Kofaktoren zusammenhängen und sich im Laufe der Evolution kaum geändert haben. Die bei der Untersuchung prokaryotischer Modellsysteme gewonnenen Erkenntnisse, sollten daher auch für die komplexeren Mechanismen der eukaryotischen Oxidase-Assemblierung zutreffen.



## 2. Expression und Aufreinigung von CtaG

### 2.1. Einleitung

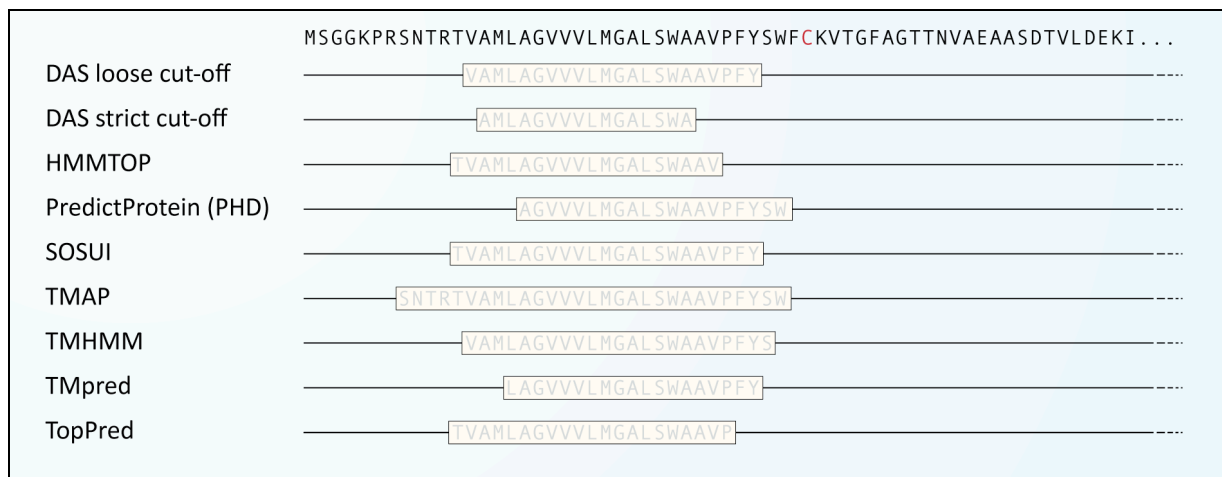
Um das für die Biogenese der Cytochrom c Oxidase essentielle Protein CtaG eingehend charakterisieren zu können, war es zunächst Ziel der Arbeit, das potentielle Kupferchaperon in ausreichenden Mengen zu isolieren. Im Vorfeld konnten bereits Protokolle für die heterologe Expression und Aufreinigung von zwei CtaG-Varianten etabliert werden (Greiner 2003): Sowohl das Gesamtprotein als auch ein lösliches CtaG-Fragment wurden dabei in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert, wobei die Ausbeute für das lösliche Fragment mit 11 mg/L Zellkultur bedeutend höher war als für das membranständige Gesamtprotein (0,2 mg/L Zellkultur). Da die Kupferionen sehr wahrscheinlich ohne Beteiligung der Transmembranhelix in der hydrophilen periplasmatischen Domäne von CtaG gebunden werden (Carr, Maxfield et al. 2005), sollte hier zunächst mit dem in größeren Mengen verfügbaren löslichen Fragment gearbeitet werden. Ein solches lösliches CtaG-Fragment wurde in der vorangegangenen Arbeit unter Berücksichtigung einer potentiellen endogenen Proteaseschnittstelle geplant und beginnt mit Aminosäure 53 (rechter Pfeil in Abbildung 13). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CtaG in seinem natürlichen Wirt *Paracoccus denitrificans* als Membranprotein vorliegt und die potentielle Proteaseschnittstelle somit offenbar nicht genutzt wird (Greiner 2003), was vermutlich mit der Lokalisation der potentiellen Schnittstelle zusammenhängt. Diese befindet sich auf der periplasmatischen Seite, während die meisten Proteasen im Zytosol der Zelle vorliegen.



**Abbildung 13 - SignalP Schnittstellenvorhersage für CtaG**

Potentielle Proteaseschnittstellen (Pfeile) innerhalb der ersten 70 Aminosäuren der CtaG-Sequenz. Vorhergesagt mit dem Programm SignalP (Bendtsen, Nielsen et al. 2004). In einer vorangegangenen Arbeit war die auf eine mögliche endogene Proteaseschnittstelle folgende Aminosäure Alanin 53 als N-Terminus gewählt worden (Greiner 2003). Da diese Schnittstelle *in vivo* nicht genutzt wird und ein für die Metallbindung interessantes Cystein (C38, rot) in dem Fragment fehlt, wurden neue Expressionsplasmide für das lösliche Fragment entworfen.

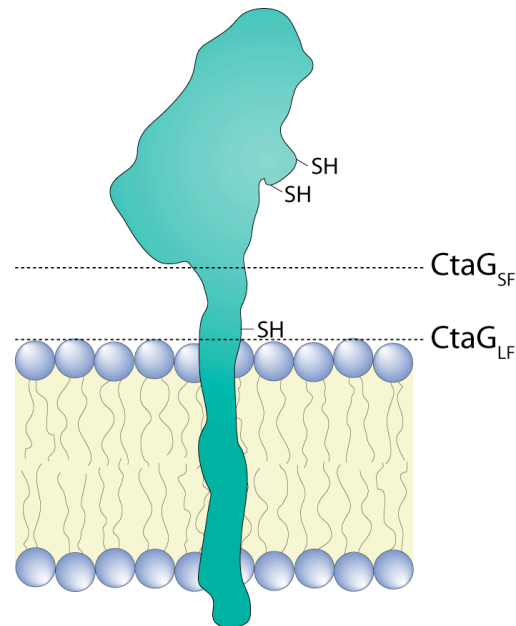
Kupferionen werden in Proteinen meist von Stickstoff (Histidin) oder Schwefel (Cystein/Methionin) ligandiert (Davis und O'Halloran 2008). In dem vorliegenden Protein könnte ein hochkonserviertes CFCF-Motiv (C129-F132) für die Metallbindung verantwortlich sein. Nun befindet sich unmittelbar hinter der Transmembranhelix ein weiteres hochkonserviertes Cystein (Abbildung 14), welches in dem oben beschriebenen löslichen CtaG-Fragment nicht vorhanden ist. Da für dieses Fragment in der vorangegangenen Arbeit keine bzw. nur marginale Kupferbindung nachgewiesen werden konnte und da bei der Analyse der Metallbindung mit dem löslichen Fragment möglichst nah an der physiologischen Situation gearbeitet werden sollte, wurden neue Expressionsplasmide kloniert, welche auch für dieses dritte Cystein kodieren. Nach einer eingehenden Analyse der CtaG-Sequenz bezüglich des Transmembranbereichs (Abbildung 14) wurde das unmittelbar am Ende der Transmembrandomäne befindliche Tryptophan 36 als Startpunkt für das neue CtaG-Fragment ausgewählt. Das neue, längere CtaG-Fragment soll im folgenden CtaG<sub>LF</sub> für *long fragment* genannt werden, während das alte, kürzere CtaG-Fragment als CtaG<sub>SF</sub> für *short fragment* bezeichnet wird (Abbildung 15).



**Abbildung 14 - Transmembran-Vorhersagen für CtaG**

Vorhersagen für die Transmembrandomäne von CtaG. Verschiedene über ExPASy aufrufbare Programme (links) kommen zu unterschiedlichen aber ähnlichen Ergebnissen. Allen Vorhersagen ist ein Kernbereich zwischen den Aminosäuren Alanin 17 und Alanin 29 gemeinsam. Das konservierte Cystein 38 (rot) liegt in jedem Fall in unmittelbarer Nähe der Transmembranhelix.





### Abbildung 15 - Schematische Darstellung der CtaG-Fragmente

Das potentielle Kupferchaperon CtaG besteht aus einer N-terminalen Transmembrandomäne und einer löslichen C-terminalen Domäne, die vermutlich auf der periplasmatischen Seite der Membran liegt. Ein kurzes CtaG-Fragment (CtaG<sub>SF</sub> für *short fragment*), das bereits im Vorfeld exprimiert wurde, zeigte nahezu keine Kupferbindung (Greiner 2003). Dieses kurze Fragment enthält zwei Cysteine (als SH-Gruppen dargestellt), die in einem hochkonservierten CFCF-Motiv vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues längeres Fragment (CtaG<sub>LF</sub> für *long fragment*) exprimiert, welches ein drittes hochkonserviertes Cystein nahe der Transmembranhelix einschließt. Die Darstellung der löslichen Domäne orientiert sich an der NMR-Struktur eines löslichen CtaG-Fragments aus *S. meliloti* (1SPO).

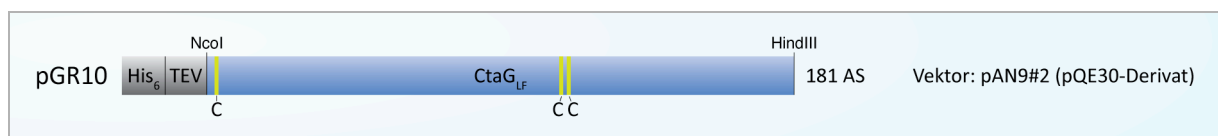
## 2.2. pQE-basiertes CtaG-Expressionsplasmid

Da sich das pQE-System (Qiagen 2003) für die Expression des kürzeren CtaG-Fragments bewährt hatte, sollte das längere Fragment CtaG<sub>LF</sub>, welches das konservierte Cystein 38 beinhaltet, ebenfalls mit diesem System exprimiert werden.

### 2.2.1. Planung und Klonierung des pQE-basierten Expressionsplasmids

Als Ausgangsvektor zur Klonierung des längeren CtaG-Fragments wurde das von pQE30 abgeleitete pAN9#2 Plasmid gewählt. Dieses kodiert zusätzlich zu dem auf pQE30 vorhandenen N-terminalen His<sub>6</sub>-tag für eine TEV-Proteaseschnittstelle, mit deren Hilfe der tag abgespalten werden kann (Anderka 2005). Hinter der Sequenz für die Proteaseschnittstelle wurde eine NcoI-Schnittstelle eingeführt, deren Vorteil darin besteht, dass sie ein ATG-Codon enthält. Über NcoI lassen sich Gene somit derart einklonieren, dass keine zusätzlichen, durch die Restriktionsschnittstelle bedingten, Triplets vor dem Start-ATG entstehen. Eine auf dem pQE30-Vektor bereits an anderer Stelle vorhandene NcoI-Schnittstelle musste bei der Konstruktion dieses Vektors durch gerichtete Mutagenese codonneutral entfernt werden (Anderka 2005). Um die Zielsequenz aus dem *ctaG*-Gen in den pAN9#2-Vektor klonieren zu können, wurde das Gen zunächst per PCR amplifiziert. Als *template* diente hierbei das Plasmid pSelN, ein pAlter-Derivat, in welchem ein BamHI-Fragment mit dem *cta*-Operon aus *Paracoccus*

*denitrificans* vorliegt. Die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen NcoI und HindIII wurden mit Hilfe der PCR-Primer 10F und 4R nach dem oben beschriebenen Prinzip (Abbildung 7, S.35) eingefügt. Vektor und PCR-Produkt wurden mit NcoI und HindIII restringiert, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Nach Ligation und Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurde die Plasmid-DNA von zehn Klonen isoliert und per Restriktionsanalyse überprüft. Das neue Plasmid pGR10 wurde aus einem der positiven Klone in größerem Maßstab isoliert und mit Hilfe eines T5-Promotor-Primers sequenziert. Als sichergestellt war, dass keine Mutation in dem rekombinanten *cta*G<sub>LF</sub>-Gen vorlag, wurde das Plasmid in die Expressionsstämme *E. coli* M15(pRep4) und SG13009(pRep4) transformiert, welche für die Expression mit dem pQE-System optimiert sind (Qiagen 2003).



**Abbildung 16 - Schematische Darstellung des pQE-basierten CtaG<sub>LF</sub>-Konstrukts pGR10**

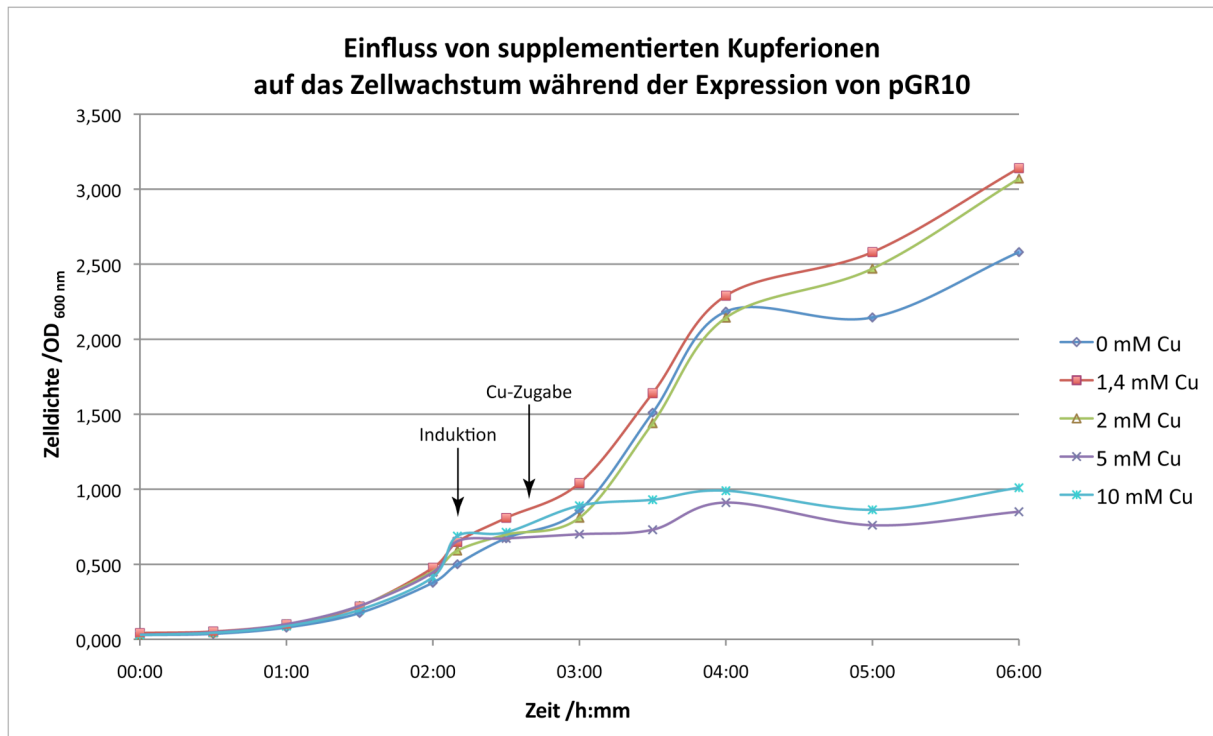
### 2.2.2. Testexpression des pQE-basierten CtaG-Fragments

Für erste Testexpressionen wurden je 200 ml LB-Medium auf 32 °C vorgewärmt, 1 %ig mit Übernachtskulturen der Expressionsstämme M15(pGR10/pRep4) bzw. SG13009(pGR10/pRep) angeimpft und bei verschiedenen Temperaturen (37 °C, RT und 16 °C) geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> ~ 0,6 - 0,8 wurden die Kulturen mit 0,5 mM IPTG induziert. Sowohl vor Induktion als auch vier Stunden nach Induktion wurden 2 ml-Proben abgenommen und mit Hilfe der optischen Dichte auf gleiche Zellmengen normiert. Die Proben wurden als Ganzzelllysate auf SDS-Gele aufgetragen und einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen den Polyhisitidin-tag und gegen das zuvor isolierte kurze CtaG-Fragment (Greiner 2003) unterzogen (Daten nicht gezeigt). In keinem der Blots konnte ein Signal im Bereich des erwarteten Molekulargewichts von ca. 20 kDa detektiert werden. Lediglich das als Positivkontrolle verwendete kurze CtaG-Fragment CtaG<sub>SF</sub> aus der vorangegangenen Arbeit (Greiner 2003) konnte detektiert werden.

Der *E. coli* Stamm C43(DE3), ein von *E. coli* BL21(DE3) abgeleiteter Mutationsstamm, in dem sich manche Proteine exprimieren lassen, die für gewöhnliche *E. coli*-Expressionsstämme toxisch sind (Miroux und Walker 1996), wurde mit den Plasmiden pGR10 und pRep4 transformiert und ebenfalls für eine Testexpression eingesetzt. Auch hier konnte per Western Blot keine Expression nachgewiesen werden.

Es wurde eine weitere Testreihe durchgeführt, bei der die Zellen 30 min nach Induktion mit Kupferionen in verschiedenen Konzentrationen supplementiert wurden (Endkonzentrationen: 0; 1,4; 2 und 5 mM Cu(II)SO<sub>4</sub>). Für die Wahl der Kupferkonzentrationen wurden zuvor Wachstumskurven bei verschiedenen Kupferkonzentrationen

aufgenommen (Abbildung 17). Auch die Gegenwart freier Metallionen während der Expression führte zu keinem detektierbaren Signal in Western Blots gegen CtaG oder den Polyhistidin-*tag*.



**Abbildung 17 - Einfluss von supplementierten Kupferionen auf das Zellwachstum während der Expression von pGR10**

Wachstumskurven des *E. coli* Stamms SG13009(pGR10/pRep4) nach der Zugabe von Cu(II)SO<sub>4</sub>. Die Kulturen wurden nach 2:10 h mit 0,5 mM IPTG induziert und 30 min später mit 0; 1,4; 2; 5; bzw. 10 mM CuSO<sub>4</sub> supplementiert. Bis zu 2 mM CuSO<sub>4</sub> kann den Zellen zugegeben werden, ohne das Wachstum im Vergleich zu Kulturen ohne Kupferzugabe nennenswert zu beeinflussen.

### 2.2.3. Diskussion

Im Gegensatz zu dem kürzeren löslichen CtaG-Fragment CtaG<sub>SF</sub> (pGR4 (Greiner 2003)) konnte das neue pQE30-basierte Konstrukt pGR10 in den *E. coli* Stämmen M15 und SG13009, welche für das pQE-System optimiert sind, nicht exprimiert werden. Das längere CtaG-Fragment CtaG<sub>LF</sub> umfasst C-terminal 17 zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zu dem zuvor erfolgreich exprimierten CtaG<sub>SF</sub>. Besondere Bedeutung kommt innerhalb dieser 17 Aminosäuren dem konservierten Cystein 38 zu, welches an der Kupferbindung beteiligt sein könnte.

Das neue Konstrukt könnte aufgrund der Präsenz aller potentiell für die Kupferbindung verantwortlichen Cysteine eine höhere Metallaffinität aufweisen, dadurch in die Metallhomöostase von *E. coli* eingreifen und so toxisch auf den Wirt wirken. Um toxischen Effekten von CtaG<sub>LF</sub> entgegenzuwirken, wurden Versuche mit dem gegenüber toxischen Proteinen resistenteren *E. coli* Stamm C43(DE3) durchgeführt. Einem potentiellen Kupfermangel aufgrund einer erhöhten Metallbindung durch CtaG sollte durch die Supplementation mit CuSO<sub>4</sub> entgegengewirkt werden. Diese Maßnahmen

hatten jedoch keinen Effekt auf die Expression von CtaG<sub>LF</sub>. Auch eine Betrachtung der Wachstumskurven der Expressionsstämme macht einen toxischen Effekt von CtaG<sub>LF</sub> unwahrscheinlich (Abbildung 17). Im Falle eines toxischen Effekts wäre zu erwarten, dass die Zelldichte zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Induktion abnimmt. Diese Abnahme müsste zwar zeitlich verzögert eintreten, da das Protein zunächst synthetisiert werden muss, aber die Zelldichte dürfte bei einem toxischen Expressionsprodukt keinesfalls stetig zunehmen. Das Ausbleiben der CtaG<sub>LF</sub>-Expression muss daher eine andere Ursache haben.

Die Integrität des Expressionsvektors war per Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert worden. Die Sequenz hatte zu 100 % mit den Erwartungen übereingestimmt, war aber mit Hilfe eines T5-Promotor-Primers erhalten worden. Die Tatsache, dass dieser Primer ein gutes Sequenzierergebnis liefert, deutet zwar darauf hin, dass der Promotor intakt ist, eine Mutation im Promotorbereich kann dadurch aber nicht ausgeschlossen werden. Nachdem CtaG<sub>LF</sub> mit Hilfe der unten beschriebenen pET-basierten Konstrukte erfolgreich exprimiert werden konnte, wurde durch weitere Sequenzierungen auch der Promotorbereich des pQE-basierten Konstrukts (pGR10) überprüft. Diese mit dem T5-Terminator-Primer durchgeführten Sequenzierungen zeigten, dass im Promotorbereich ca. 20 bp dupliziert vorlagen. Interessanterweise trat diese Insertionsmutation nur dann auf, wenn das Plasmid in den für Klonierungsarbeiten standardmäßig verwendeten *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert wurde. Eine Wiederholung der Klonierung bei der aus dem selben Ligationsansatz sowohl DH5 $\alpha$  als auch JM109 transformiert wurden, lieferte für JM109 Klone ohne Mutation und für DH5 $\alpha$  dieselbe Insertionsmutation im Promotorbereich.

### 2.3. pET-basierte CtaG-Expressionsplasmide

Da mit dem pQE-basierten Konstrukt pGR10 wider Erwarten keine Expression erreicht werden konnte, wurden weitere Expressionsplasmide für das verlängerte Fragment CtaG<sub>LF</sub> kloniert. Eine Alternative zum pQE-System ist das pET-System. Dieses arbeitet zwar verglichen mit dem pQE-System mit dem etwas schwächeren T7-Promotor, bietet aber ein weitaus größeres Spektrum an Expressionsvektoren mit den unterschiedlichsten Eigenschaften. Durch die Wahl des pET-Vektors können beispielsweise C- oder N-terminale optional spaltbare *tags* an das Zielprotein fusioniert werden (Novagen 2006). Manche pET-Vektoren bieten die Möglichkeit, Signalsequenzen zur Sekretion des Zielproteins in den periplasmatischen Raum (*pe/B*) anzuhängen oder spaltbare Fusionen mit sehr gut löslichen Proteinen (GST-, Nus- und Trx-*tag*) herzustellen, die eine bessere Löslichkeit von tendenziell aggregierenden Proteinen bewirken können. Desweiteren sind die meisten pET-Plasmide mit verschiedenen Resistenzgenen verfügbar, was die

simultane heterologe Expression mit mehreren Plasmiden ermöglicht (siehe 8.7 Koexpression von CtaG und UE I in *E. coli*, S.171).

### 2.3.1. Planung und Klonierung der pET-basierten Expressionsplasmide

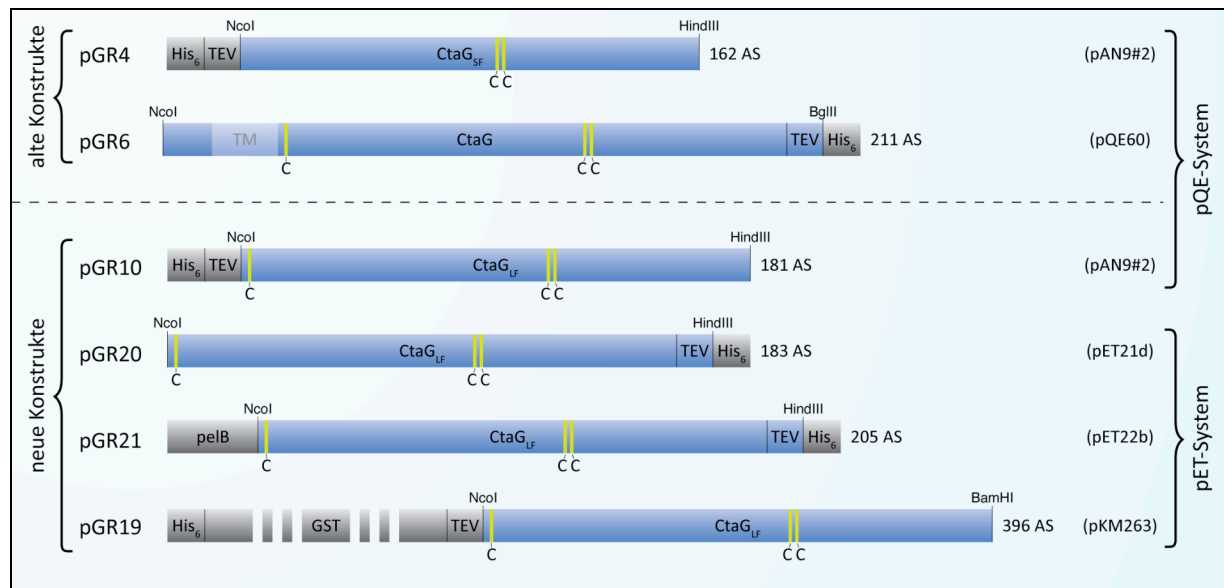
Basierend auf dem pET-System wurden drei weitere CtaG<sub>LF</sub>-Expressionsplasmide kloniert:

(1) pGR20: Ein pET21d basiertes Konstrukt, welches für ein cytosolisches CtaG-Fragment mit C-terminalem, TEV-spaltbarem Hexahistidin-*tag* kodiert.

(2) pGR21: Ein pET22b basiertes Konstrukt, das ebenfalls für ein CtaG-Fragment mit C-terminalem, TEV-spaltbarem Hexahistidin-*tag* kodiert, jedoch zusätzlich über eine *pelB*-Signalsequenz zur Sekretion in den periplasmatischen Raum verfügt. Die Sekretion soll einem potentiell toxischen Effekt von CtaG<sub>LF</sub> entgegenwirken.

(3) pGR19: Das dritte Konstrukt kodiert für die Fusion eines TEV-spaltbaren, Hexahistidin markierten GST-Proteins an den N-Terminus von CtaG<sub>LF</sub>. Dieses Konstrukt wurde mit dem Vektor pKM263 hergestellt (Melcher 2000), welcher wiederum auf dem Plasmid pET3b basiert, und soll einem potentiellen Translationsabbruch bei der CtaG-Expression entgegenwirken: Selten genutzte Triplets, die im Anfangsbereich einer mRNA liegen, können zum Abbruch der Translation führen. Die Wahrscheinlichkeit einer vorzeitigen Termination nimmt ab, wenn die Translation bereits mit häufig genutzten Codons in Gang gekommen ist. Da die GST Sequenz für *E. coli codon usage* optimiert ist, wird diese Sequenz vor die CtaG-Sequenz kloniert, um Problemen beim Translationsstart vorzubeugen. Die Eigenschaft von GST-Fusionen, die Löslichkeit des Zielproteins zu erhöhen, spielt hier nur eine untergeordnete Rolle.

Die *ctaG<sub>LF</sub>*-Sequenz wurde per PCR aus dem Plasmid pSelN amplifiziert. Dabei erfolgte die Klonierung von pGR20 und pGR21 mit dem gleichen Insert über NcoI und HindIII, wobei die Restriktionsschnittstellen sowie die C-terminale TEV-Proteaseschnittstelle über die PCR-Primer (10F/20R) eingeführt wurden (siehe Abbildung 7, Material und Methoden 2.7.1, S.34). Die Klonierung von pGR19, der GST-Fusion, erfolgte über NcoI und BamHI (Primer 10F/3R). Der Erfolg der Ligation wurde per Restriktionsanalyse und Sequenzierung (mit T7-Terminator-Primern) verifiziert. Die drei Plasmide wurden nach positiv ausgefallener Kontrolle in den Expressionsstamm C41(DE3) transformiert und für Testexpressionen eingesetzt.



**Abbildung 18 – Schematische Darstellung einiger relevanter CtaG-Konstrukte**

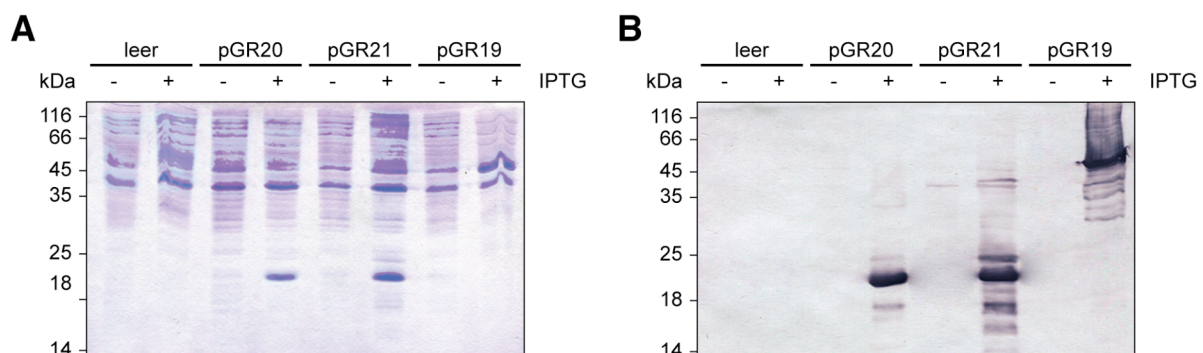
Um bezüglich potentieller Kupfer-Liganden (Cysteine in **gelb**) möglichst nah an der physiologischen Situation zu bleiben und ausreichende Proteinmengen erhalten zu können, mussten neue Konstrukte kloniert werden. **Grau** unterlegte Sequenzabschnitte werden durch den jeweiligen Ausgangsvektor (Plasmidnamen rechts, in Klammern) kodiert, **blaue** Abschnitte wurden per PCR amplifiziert und über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in die Ausgangsvektoren kloniert. (**His<sub>6</sub>**: Hexahistidin-tag, **TEV**: tobacco etch virus Protease-Erkennungssequenz, **TM**: Transmembrandomäne, **pelB**: Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport ins Periplasma, **GST**: Glutathion-S-Transferase)

### 2.3.2. Testexpression der pET-basierten CtaG-Fragmente

Je 200 ml vorgewärmtes LB-Medium wurden 1 %ig mit Übernachtskulturen der Expressionsstämme C41(pGR20), C41(pGR21) bzw. C41(pGR19) angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein untransformierter C41-Stamm mit angezogen. Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 0,6 - 0,8$  wurden jeweils 10 ml der Schüttelkulturen als nicht induzierte Kontrollen abgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden mit 0,5 mM IPTG induziert, bei 37 °C geschüttelt und nach 4 h geerntet. Die Zellen wurden mit Hilfe der optischen Dichte auf gleiche Mengen normiert und als Ganzzelllysate für eine Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western Blot-Analyse eingesetzt. Für die Expressionsplasmide pGR20 und pGR21 ist bereits in der Coomassie-Färbung ein deutlicher Unterschied zwischen der induzierten Probe und der nicht induzierten Kontrolle zu erkennen (Abbildung 19, links). Eine prominente Bande bei ca. 18 kDa wird durch die Induktion mit IPTG hervorgerufen. Das rechnerische Molekulargewicht der CtaG-Fragmente aus pGR20 und pGR21 beträgt 20,4 kDa, wobei das zweite Konstrukt vor der Entfernung der *pelB*-Signalsequenz ein Molekulargewicht von 22,7 kDa aufweist. Im Fall des Expressionsplasmids pGR19, welches für die Fusion aus GST und CtaG<sub>LF</sub> kodiert, ist der Unterschied zwischen Kontrolle und induzierter Probe in der Coomassie Färbung nicht ganz so augenscheinlich. Bei genauerer Betrachtung ist jedoch zu erkennen, dass eine prominente Bande bei ca. 45 kDa in der induzierten Probe wesentlich intensiver gefärbt

ist als in der Kontrolle. Das erwartete Fusionsprotein aus GST und CtaG<sub>LF</sub> hat ein rechnerisches Molekulargewicht von 45,4 kDa.

Die Western Blot-Analyse (Abbildung 19, rechts) mit CtaG<sub>SF</sub>-Antiserum bestätigt die Ergebnisse aus der Coomassie-Färbung und beweist desweiteren, dass es sich bei den exprimierten Proteinen in allen drei Fällen um CtaG bzw. CtaG-Fusionsproteine handelt. Neben den prominenten Banden bei dem jeweils erwarteten Molekulargewicht treten im Western Blot weitere Signale auf: für alle drei Konstrukte sind Banden bei niedrigerem Molekulargewicht sichtbar. C41(pGR21) weist darüberhinaus eine zweite prominente Bande bei ca. 22 kDa und einige schwache Banden bei höherem Molekulargewicht auf. Im Fall von pGR19 zieht sich die prominente 45 kDa Bande über einen größeren Bereich bei höherem Molekulargewicht.



**Abbildung 19 - Testexpression der pET-basierten CtaG-Fragmente**

**A.** Coomassie-Färbung und **B.** Western Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus leeren und transformierten C41(DE3)-Stämmen vor (-) und nach (+) Induktion mit 0,5 mM IPTG (15 % Laemmli). Die Western Blot-Analyse erfolgte mit einem Antiserum gegen CtaG<sub>SF</sub>. pGR20: CtaG<sub>LF</sub> (cytosolisch), pGR21: pelB + CtaG<sub>LF</sub> (periplasmatisch), pGR19: GST + CtaG<sub>LF</sub> (cytosolische GST-Fusion).

### 2.3.3. Diskussion

Die Induktion mit IPTG führt bei den transformierten C41-Stämmen jeweils zu einer prominenten Bande im Bereich des erwarteten Molekulargewichts. Diese Banden lassen sich im Western Blot mit Hilfe von CtaG-spezifischen Antikörpern nachweisen und treten weder in untransformierten C41-Zellen noch in transformierten aber nicht induzierten C41-Zellen auf. Daraus lässt sich schließen, dass alle drei pET-Konstrukte erfolgreich exprimiert werden und die Systeme keine basale Expression in Abwesenheit des Induktors aufweisen. Die Expressionssysteme sind "dicht". Aus diesen Ergebnissen kann desweiteren abgeleitet werden, dass die Problematik der pQE-basierten CtaG<sub>LF</sub>-Expression (pGR10, Ergebnisse & Diskussion 2.2.2, S.72) nicht in veränderten Eigenschaften des längeren CtaG-Fragments oder dessen Gens begründet liegen kann. Vielmehr liegt ein grundlegendes Problem mit dem pQE-Vektor nahe, was durch die Sequenzierung des Promotorbereichs und die dadurch entdeckte Mutation im Promotor auch bestätigen werden konnte (Ergebnisse & Diskussion 2.2.3, S.73).

Der Western Blot zeigt für die pET-basierten Konstrukte in allen drei Fällen mehrere Banden bei niedrigerem Molekulargewicht, also unterhalb der prominenten Bande bei

18 kDa (pGR20 und pGR21), bzw. 45 kDa (pGR19). Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um proteolytische Abbauprodukte des jeweils überexprimierten Proteins. In dieser ersten Testexpression wurde auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren verzichtet, da lediglich überprüft werden sollte, ob der Wechsel des Expressionssystems prinzipiell zu nachweisbaren Mengen des längeren CtaG-Fragments führt. Dies konnte hier bestätigt werden.

Bei dem zusätzlichen prominenten Western Signal für C41(pGR21) auf einer Höhe von ca. 20 kDa (Abbildung 19, rechts) handelt es sich sehr wahrscheinlich um die unprozessierte Form von CtaG<sub>LF</sub>, welche noch über die Signalsequenz *pe/B* verfügt. Da für die Hauptbande bei ca. 18 kDa kein Größenunterschied im Vergleich zu C41(pGR20) festzustellen ist, wird die *pe/B*-leader Sequenz offensichtlich zu großen Teilen erfolgreich durch die Signalpeptidase I (LepB) abgespalten. Da diese auch als *leader peptidase* bekannte Signalpeptidase I lediglich Proteine auf der periplasmatischen Seite der Membran prozessiert, kann gefolgert werden, dass das Produkt von pGR21 erfolgreich in den periplasmatischen Raum sezerniert wird.

Die Fusion des CtaG-Fragments an GST (pGR19) hat keine höhere Expressionsrate zur Folge und war lediglich für den Fall gedacht, dass die ersten Triplets des CtaG<sub>LF</sub>-Gens einen vorzeitigen Translationsstop verursachen. Der Fokus wurde daher auf die Plasmide pGR20 und pGR21 gelegt. Im Folgenden sollten die subzelluläre Lokalisation und die optimalen Expressionsbedingungen ermittelt sowie ein Protokoll zur Isolierung von CtaG<sub>LF</sub> etabliert werden.

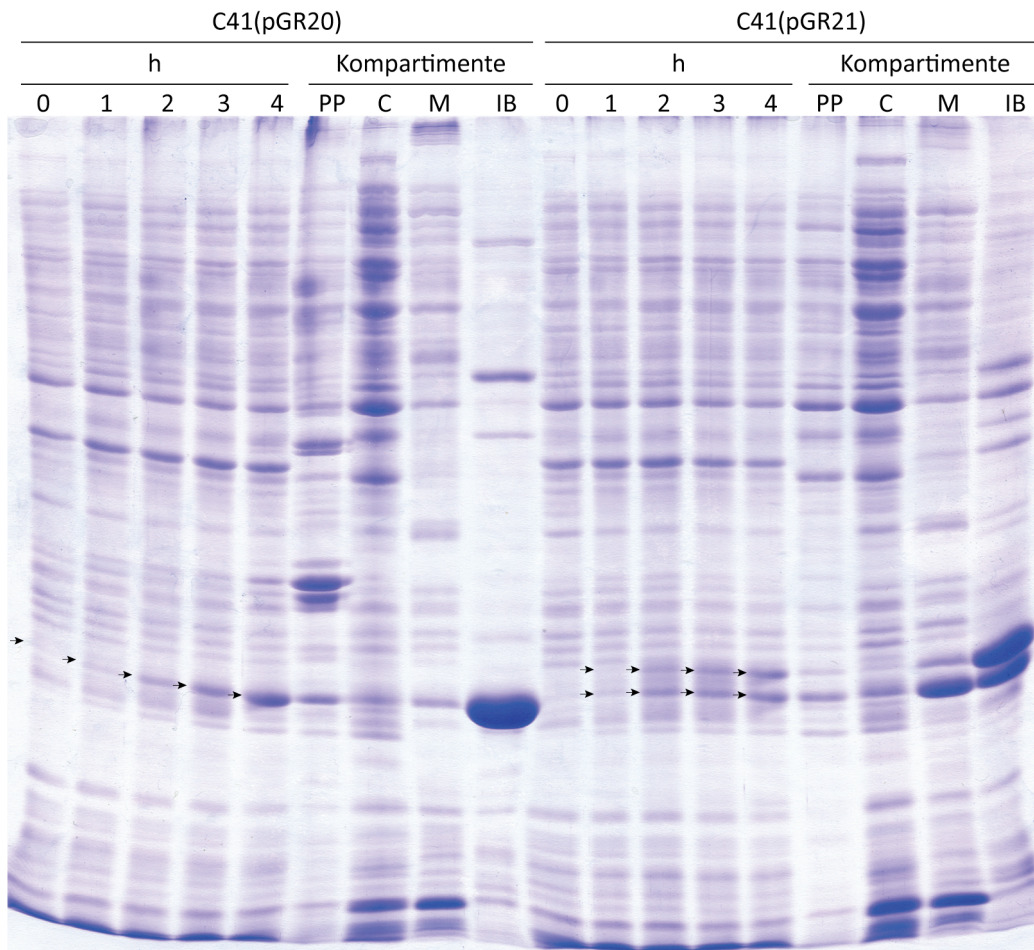
## 2.4. Expressionsbedingungen für CtaG<sub>LF</sub>

### 2.4.1. Löslichkeitsanalyse nach Expression bei 37 °C

Um zu überprüfen, welches der Plasmide pGR20 und pGR21 am besten für die Expression und Aufreinigung des längeren CtaG-Fragments geeignet ist, sollte zunächst eine Löslichkeitsanalyse durchgeführt werden. Dazu wurden jeweils 2,5 L auf 32 °C vorgewärmtes LB-Medium 1 %ig mit Übernachtskulturen von C41(pGR20) bzw. C41(pGR21) angeimpft, bei 37 °C und 140 rpm inkubiert und bei OD<sub>600</sub> ~ 0,6 - 0,8 mit 0,5 mM IPTG induziert. Um den Verlauf der Expression zu verfolgen, wurde zum Zeitpunkt der Induktion und jede darauf folgende Stunde ein Aliquot der Expressionskultur abgenommen. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet und zur Überprüfung der subzellulären Lokalisation von CtaG<sub>LF</sub> in die Kompartimente Cytosol, Periplasma, Membranen und *inclusion bodies* aufgetrennt (Material & Methoden 3.2, Isolierung subzellulärer Kompartimente, S.41). Die während der Expression abgenommenen Aliquots wurden mit Hilfe der optischen Dichte auf gleiche Konzentrationen normiert und als Ganzzelllysate für die Elektrophorese eingesetzt.



Zusätzlich wurden jeweils 50 µg der einzelnen Kompartimente aufgetragen (Abbildung 20).



**Abbildung 20 - Zeitabhängigkeit und Löslichkeitsanalyse der Expression von Cta<sub>GLF</sub>**

Coomassie-Färbung (15 % Laemmli, groß) von während der pGR20 bzw. pGR21 Expression abgenommenen Ganzzelllysaten (0-4 h nach Induktion) sowie jeweils 50 µg der subzellulären Kompartimente nach 4 h Expression (PP: Periplasma, C: Cytosol, M: Membranfraktion, IB: *inclusion bodies*). Durch die Induktion mit IPTG hervorgerufene Banden sind durch Pfeile hervorgehoben.

Die Induktion des C41(pGR20)-Stamms führt zu einer auffälligen Bande in den Ganzzelllysaten, deren Intensität mit steigender Expressionsdauer zunimmt (Pfeile, Abbildung 20, linke Seite). Diese Bande ist in den Kompartimenten Cytosol, Membran und Periplasma nur schwach, in der *inclusion body* Fraktion hingegen extrem stark vertreten. Ähnliches gilt für die Expression mit dem C41(pGR21)-Stamm, wobei hier aufgrund der zusätzlichen *pe/B*-Signalsequenz, die durch die *leader peptidase* teilweise entfernt wird, eine Doppelbande entsteht (Doppelpfeile, rechte Seite). In beiden Fällen findet sich nur ein verschwindend geringer Anteil des exprimierten Proteins in den löslichen Cytosol- bzw. Periplasma-Fractionen. Der weitaus größte Teil findet sich in *inclusion bodies* wieder.

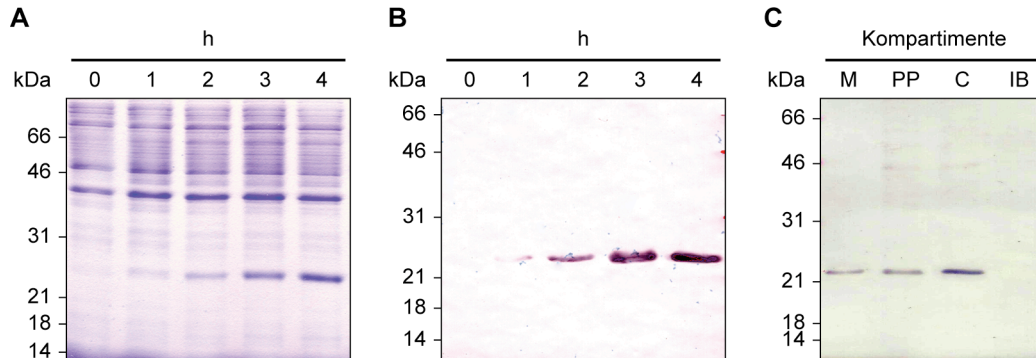
#### **Diskussion**

Die Löslichkeitsanalyse nach einer Expression von pGR20 und pGR21 bei 37 °C zeigt, dass CtaG<sub>LF</sub> größtenteils in *inclusion bodies* vorliegt. Die Verwendung von *inclusion bodies* als Ausgangsmaterial zur Proteinaufreinigung hat zwar einige Vorteile, ist aber in diesem Fall keine Option. Das Protein liegt in den Einschlusskörpern zwar, wie in Abbildung 20 zu sehen, bereits relativ sauber und stark angereichert vor, befindet sich aber nicht in seiner nativen Konformation. Es muss zunächst unter harschen Bedingungen (8 M Harnstoff/6 M GuHCl) solubilisiert, d.h. entfaltet werden und anschließend durch Entzug des Chaotrops, beispielsweise durch Verdünnung, Dialyse oder Umpuffern auf der Säule, wieder rückgefaltet werden. Ob das Protein bei der Rückfaltung seine physiologische Konformation annimmt, muss beispielsweise durch Aktivitätstests überprüft werden. Für CtaG ist jedoch keine enzymatische Aktivität bekannt und als einziges Kriterium für den Rückfaltungserfolg könnte die Stöchiometrie der Kupferbindung herangezogen werden. Dies ist jedoch ohne Kenntniss der physiologischen Stöchiometrie und ohne Positivkontrolle, sprich nativ gefaltetes CtaG, ebenfalls problematisch. Die Rückfaltung großer CtaG<sub>LF</sub>-Mengen aus *inclusion bodies* wird erst dann sinnvoll, wenn eine korrekt gefaltete Form von CtaG isoliert wurde und genauere Kenntnisse über die physiologischen Eigenschaften des Proteins vorliegen. Zu diesem Zweck sollten die Expressionsbedingungen so optimiert werden, dass möglichst viel CtaG<sub>LF</sub> in löslicher Form vorliegt. Der Export ins Periplasma liefert augenscheinlich keinen Vorteil bezüglich Reinheit oder Ausbeute, sondern ist aufgrund der unvollständig abgespaltenen *pe/B*-Signalsequenz eher von Nachteil, weil zwei Varianten des Proteins an die Affinitätsmatrix binden können. Daher wurde die cytosolisch lokalisierte CtaG<sub>LF</sub>-Form (pGR20) für weitere Testexpressionen ausgewählt.

#### **2.4.2. Löslichkeitsanalyse nach Expression bei Raumtemperatur**

Die Senkung der Expressionstemperatur drosselt die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese, wodurch der naszierenden Polypeptidkette mehr Zeit bleibt, ihre thermodynamisch günstigste Konformation einzunehmen. Es wurde daher überprüft, ob die Expression bei geringerer Temperatur zu einer verbesserten Löslichkeit des CtaG<sub>LF</sub>-Fragments führt. Hierfür wurden 2,5 L einer C41(pGR20)-Kultur bei RT (24 °C) angezogen und ansonsten identisch behandelt, wie für die 37 °C-Expression beschrieben (Ergebnisse 2.4.1, S.78). In der Coomassiefärbung der Ganzzelllysate erscheint eine prominente Bande bei ca. 23 kDa, die durch Induktion mit IPTG hervorgerufen wird und zeitabhängig zunimmt (Abbildung 21 A). Diese Bande wird auch in einem Western Blot gegen den Hexahistidin-*tag* angefärbt (Abbildung 21 B), CtaG<sub>LF</sub> wird also auch bei Raumtemperatur in ausreichenden Mengen exprimiert. Die nach 4-stündiger Expression präparierten Kompartimente wurden für eine Western Blot Analyse gegen den

Hexahistidin-*tag* eingesetzt, aus der hervorgeht, dass CtaG<sub>LF</sub> am stärksten in der cytosolischen Fraktion vertreten ist (Abbildung 21 C). Bei der Präparation der subzellulären Kompartimente fielen kaum *inclusion bodies* an, und der Western Blot zeigt, dass die entsprechende Fraktion kein CtaG<sub>LF</sub> enthält.



**Abbildung 21 - Testexpression von CtaG<sub>LF</sub> bei Raumtemperatur (24 °C)**

**A.** Coomassie-Färbung von C41(pGR20) Ganzzelllysaten zum Zeitpunkt der Induktion (0) und jede folgende Stunde (1-4). **B.** Korrespondierender  $\alpha$ -His Western Blot. **C.** Western Blot ( $\alpha$ -His) mit je 50  $\mu$ g der präparierten Zellkompartimente zur Klärung der Lokalisation von CtaG<sub>LF</sub> nach 4-stündiger Expression bei RT. **M:** Membranen; **PP:** Periplasma; **C:** Cytosol; **IB:** *inclusion bodies* (15 % Lämmli).

## Diskussion

Wie aus dem Western Blot (Abbildung 21 C) hervorgeht, wird die Löslichkeit von CtaG<sub>LF</sub> durch die Verringerung der Expressionstemperatur eindeutig verbessert. Es liegen keine *inclusion bodies* mehr vor und CtaG<sub>LF</sub> ist am stärksten in der Cytosol-Fraktion vertreten.

Durch die reduzierte Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese wird jedoch nicht nur die Bildung von *inclusion bodies* reduziert, sondern konsequenterweise auch die innerhalb von 4 h exprimierte Gesamtmenge des Zielproteins. Um zu überprüfen, ob eine höhere Ausbeute erzielt werden kann, wurden daher weitere Faktoren systematisch variiert. Dazu gehörten Medium, Induktionszeitpunkt und Induktorkonzentration, O<sub>2</sub>-Zufuhr durch Verwendung von Schikanekolben, sowie Additive (1 M Sorbitol/100 mM Glycerin). Die variierten Bedingungen führten jedoch zu keiner nennenswerten Steigerung der CtaG<sub>LF</sub>-Ausbeute, weshalb die CtaG<sub>LF</sub>-Expressionen im Folgenden bei Raumtemperatur (24 °C) unter den oben beschriebenen Bedingungen (Ergebnisse 2.4.1, S.78) durchgeführt wurden.

## 2.5. Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls für CtaG<sub>LF</sub>

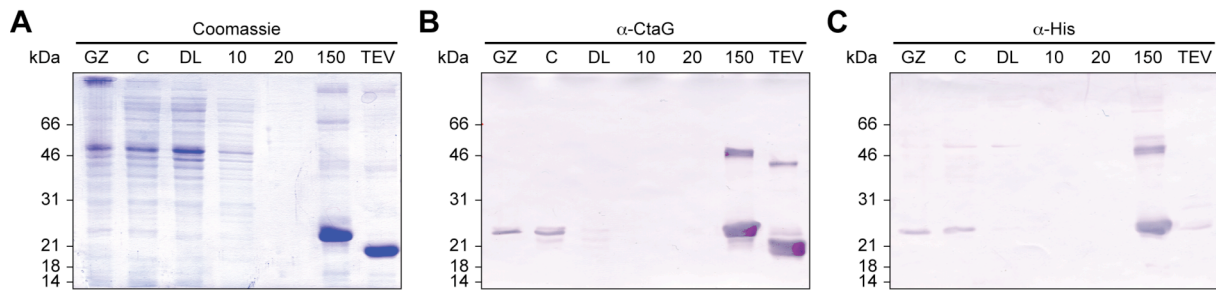
### 2.5.1. Aufreinigungsstrategie

Das Expressionsplasmid pGR20 kodiert für das neue CtaG-Fragment (CtaG<sub>LF</sub>) mit einem spaltbaren C-terminalen His<sub>6</sub>-*tag*, durch den das Protein über eine erste NiNTA-Säule vorgereinigt wird. Anschließend wird der *tag* durch die TEV-Protease abgespalten und die Lösung auf eine zweite NiNTA-Säule aufgetragen. Die Protease, die abgespaltenen Polyhistidinpeptide, unprozessiertes CtaG<sub>LF</sub> sowie Kontaminationen, die von der ersten

NiNTA koeluiert wurden, binden an die zweite Säule, und das reine CtaG<sub>LF</sub> wird mit dem Durchlauf aufgefangen.

#### **2.5.2. Erste Aufreinigungsversuche**

Für eine erste Aufreinigung des CtaG<sub>LF</sub>-Fragments wurde eine C43(pGR20)-Anzucht im 10 L-Maßstab durchgeführt wie unter Material & Methoden 3.1.2 (S.40) beschrieben. Als Puffer für die Cytoplasmapräparation wurde zunächst ein 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol Puffer bei pH 8 verwendet. Eine 20 ml NiNTA-Säule wurde per *gravity flow* mit demselben Puffer äquilibriert und anschließend mit der Cytosolfraktion beladen. Nach vollständigem Auftrag wurde mit ca. 5 Säulenvolumina 10 mM Imidazol (in 50 NaPi, 300 NaCl, pH 8) gewaschen, bis sich eine konstante Basislinie für die Absorption bei 280 nm eingestellt hatte. Es folgten Wasch- bzw. Elutionsschritte mit jeweils 5 Säulenvolumina 20 und 150 mM Imidazol (in 50 NaPi, 300 NaCl, pH 8), wobei die Eluate in 5 ml Fraktionen gesammelt wurden. Von den Peak-Fraktionen der 10 und 20 mM Waschschrte wurden Aliquots für die Elektrophorese abgenommen, und die Peak-Fraktionen des 150 mM Eluats wurden vereinigt und per Ultrafiltration ankonzentriert. Dabei wurde das Imidazol durch mehrere Verdünnungs- und Konzentrationschritte weitgehend entfernt (Endkonzentration < 1 mM), um eine stringente Bindung der Kontaminanten an die zweite NiNTA-Säule zu gewährleisten. Zur Entfernung des His<sub>6</sub>-tags wurde die Lösung für 4 h bei 30 °C mit der TEV-Protease inkubiert (Material & Methoden 3.6, S.49). Die Probe wurde dann auf eine zweite NiNTA-Säule aufgetragen und der Durchlauf, der das reine, prozessierte CtaG<sub>LF</sub> enthalten sollte, wurde aufgefangen und per Ultrafiltration ankonzentriert. Die Proteinkonzentrationen sämtlicher während der Aufreinigung angefallenen Fraktionen wurden per Lowry bestimmt (Material & Methoden 3.9, S.51) und es wurden, soweit möglich, jeweils 20 µg auf SDS-Gele aufgetragen, um den Verlauf der Aufreinigungsprozedur per Coomassie-Färbung und Western Blot zu analysieren (Abbildung 22). Die Ausbeute für das noch leicht verunreinigte und unprozessierte CtaG<sub>LF</sub> im 150 mM Eluat betrug 25,4 mg, für das reine, prozessierte CtaG<sub>LF</sub> im Durchlauf der zweiten Säule 11,1 mg. Es wurde also ca. 1 mg Zielprotein aus 1 L Kulturmedium gewonnen.



**Abbildung 22 - Coomassie-Färbung und Western Blots einer ersten Aufreinigung von CtaG<sub>LF</sub> aus pGR20**  
**A.** Coomassie-Färbung; **B.** Western Blot gegen den His<sub>6</sub>-tag; **C.** Western Blot gegen CtaG. **GZ:** Ganzzelllysate; **C:** Cytosol; **DL:** Durchlauf; **10:** 10 mM Imidazol Waschschrift; **20:** 20 mM Imidazol Waschschrift; **150:** 150 mM Eluat; **TEV:** Durchlauf einer 2. NiNTA Säule nach Entfernung des His<sub>6</sub>-tags durch die TEV-Protease.

## Diskussion

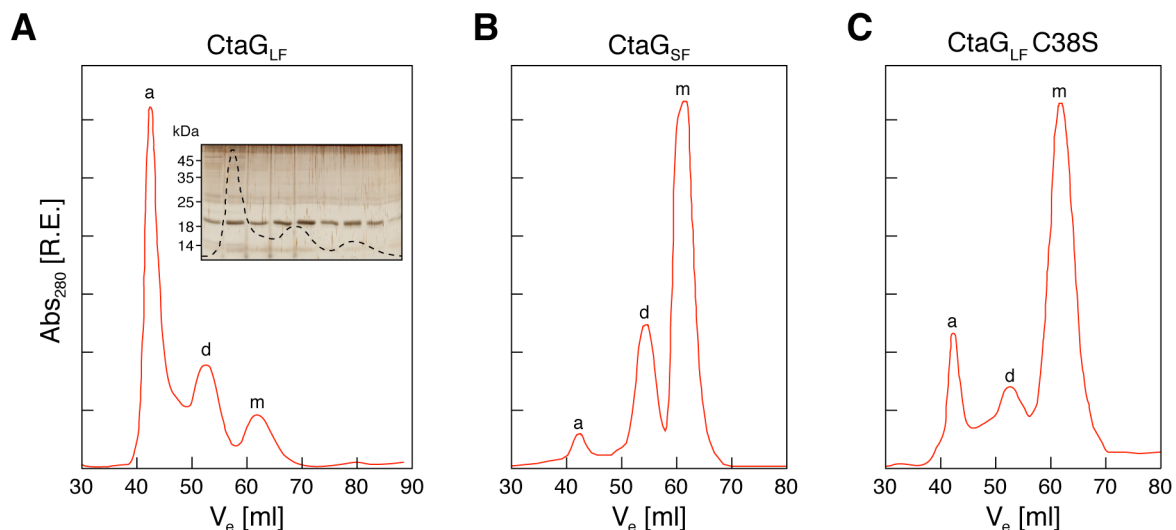
Bereits in der Coomassie-Färbung in Abbildung 22A ist zu erkennen, dass das 150 mM Eluat der ersten Säule ein stark angereichertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 22 kDa enthält. Durch den anschließenden TEV-Verdau verschiebt sich das Molekulargewicht auf ca. 20 kDa. Die rechnerischen Größen für CtaG<sub>LF</sub> vor und nach Prozessierung betragen 20,5 bzw. 18,8 kDa. Die apparenten Molekulargewichte und die Größendifferenz liegen also im erwarteten Bereich, und aus der Coomassie-Färbung kann bereits auf eine erfolgreiche Aufreinigung geschlossen werden. Die Reinheit des CtaG<sub>LF</sub>-Fragments wird durch die zweite NiNTA deutlich verbessert, und densitometrisch kann geschätzt werden (Material & Methoden 3.10.4, S.57), dass die Reinheit durch diese Strategie von ca. 70-75 % auf 90-95 % erhöht wird. Die Western Blots (Abbildung 22B und C) bestätigen den Erfolg der Aufreinigung: Aus der  $\alpha$ -CtaG-Färbung wird ersichtlich, dass CtaG<sub>LF</sub> in Ganzzelllysate und Cytosol sowie in dem 150 mM Eluat und dem Durchlauf der zweiten Säule vorliegt. Wie in der Coomassie-Färbung ist der erwartete Größenunterschied nach Entfernung des tags zu sehen. Der  $\alpha$ -His-Western Blot bestätigt, dass der His<sub>6</sub>-tag im letzten Schritt erfolgreich entfernt wurde, da der Durchlauf der zweiten Säule kein His-Signal mehr aufweist.

Beide Western Blots zeigen für das aufgereinigte Protein eine zweite, schwächere Bande bei etwa doppeltem Molekulargewicht. Dabei handelt es sich offensichtlich um ein CtaG<sub>LF</sub>-Dimer, welches aufgrund des denaturierenden Gelsystems auf einer kovalenten Verknüpfung durch Disulfidbrücken beruhen muss.

Die Ausbeute für das prozessierte Protein ist mit 1 mg/L Kulturvolumen zwar deutlich geringer als für das zuvor mit dem pQE-System exprimierte kürzere Fragment CtaG<sub>SF</sub> (~ 11 mg/L Kulturvolumen), liegt aber noch immer in einem vertretbaren Bereich. Eine geringere Ausbeute war durch die verringerte Expressionstemperatur zu erwarten. Auf den ersten Blick scheint das Aufreinigungsprotokoll vielversprechend.

### 2.5.3. Gelfiltration

Ein präparativer Superdex 75 (XK 16/70) Gelfiltrationslauf brachte zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt dieser Arbeit jedoch eine entscheidende Erkenntnis: Der weitaus größte Teil, des nach dem oben beschriebenen Protokoll aufgereinigten CtaG<sub>LF</sub> liegt in aggregierter Form vor, was zuvor aus der Kontrolle des Proteins per Elektrophorese (Abbildung 22A) und den Gelfiltrationen mit Sephadex G25-Material nicht ersichtlich werden konnte. Dieses größtenteils aggregierte CtaG<sub>LF</sub> war bereits für etliche Experimente zur Metallbindung, mit kaum reproduzierbaren Ergebnissen, zum Einsatz gekommen. Erst die Einführung eines zusätzlichen Gelfiltrationsschritts, mit der Intention einer gründlicheren Entfernung ungebundener Metallionen nach der Rekonstitution, ermöglichte die Detektion verschiedener oligomerer Zustände von CtaG<sub>LF</sub> (Abbildung 23) und deckte die Ursache für die mangelnde Reproduzierbarkeit der zuvor erzielten Ergebnisse auf.



**Abbildung 23 - Elutionsprofile nach Superdex 75 Gelfiltrationsläufen**

**A.** Elutionsprofil des neuen CtaG-Fragments CtaG<sub>LF</sub> verglichen mit **B.** dem kurzen Fragment (CtaG<sub>SF</sub>) aus der vorhergehenden Arbeit und **C.** einer Mutante des neuen CtaG-Fragments, bei der das zusätzliche Cystein 38 durch ein Serin ausgetauscht wurde. Das Inset in Abbildung A zeigt die Silberfärbung eines 15 % Laemmli Gels, auf das Aliquots der aufgefangenen Fraktionen aufgetragen wurden. **a:** Aggregate (Elution mit dem Ausschlussvolumen, > 75 kDa); **d:** Dimer (apparentes Molekulargewicht ~58 kDa); **m:** Monomer (app. MW ~29 kDa). Alle Läufe in 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, pH 8.

Das Elutionsprofil für CtaG<sub>LF</sub> (Abbildung 23A) zeigt drei Peaks bei 41, 54 und 63 ml. Eine Silberfärbung der einzelnen Fraktionen (Inset Abbildung 23A) beweist, dass es sich bei allen drei Peaks um CtaG<sub>LF</sub> handelt. Der letzte Peak bei 63 ml entspricht einem apparenten Molekulargewicht von ca. 29 kDa. Da CtaG<sub>LF</sub> kein perfekt globuläres Protein ist, kann davon ausgegangen werden, dass es in seinem Laufverhalten vom Idealverhalten abweicht und es sich bei dem zuletzt eluierenden Peak um das Monomer handelt. Der mittlere Peak bei 54 ml entspricht einem apparenten Molekulargewicht von ca. 58 kDa, also exakt dem doppelten des 63 ml Peaks. Es handelt sich daher sehr wahrscheinlich um ein CtaG<sub>LF</sub>-Dimer. Der weitaus größte Teil von CtaG<sub>LF</sub> eluiert mit dem

Ausschlussvolumen von 41 ml, weist also ein apparentes Molekulargewicht von über 75 kDa auf. Es kann sich dabei weder um monomeres noch um dimeres CtaG<sub>LF</sub> handeln und muss somit höhermolekulare Aggregate darstellen. Das neue CtaG-Fragment verhält sich somit vollkommen anders als das zuvor exprimierte und isolierte kürzere CtaG<sub>SF</sub>-Fragment, dessen Elutionsprofil in Abbildung 23B dargestellt ist. Dieses weist ebenfalls drei Peaks bei ähnlichen Elutionsvolumina auf, zeigt aber die entgegengesetzte Verteilung. Der weitaus größte Teil des kürzeren CtaG<sub>SF</sub>-Fragments liegt als Monomer vor, ein kleiner Teil (<20 %) als Dimer und es sind kaum (<5 %) höhermolekulare Aggregate vorhanden. Die zusätzlichen 17 N-terminalen Aminosäuren, die CtaG<sub>LF</sub> von CtaG<sub>SF</sub> unterscheiden, führen also zu einer drastischen Veränderung der oligomeren Zustände von CtaG. Als eine entscheidende Aminosäure für diese Veränderung kommt das zusätzliche Cystein 38 in Frage. Das Elutionsprofil einer CtaG<sub>LF</sub>-Mutante bei der besagtes Cystein durch ein Serin ausgetauscht wurde (C38S) erhärtet diesen Verdacht: Durch die gerichtete Mutagenese wird die ursprüngliche CtaG<sub>SF</sub>-Verteilung wieder nahezu hergestellt. Der weitaus überwiegende Teil von CtaG<sub>LF</sub>(C38S) liegt als Monomer vor und die Menge an höhermolekularen Aggregaten nimmt drastisch ab (Abbildung 23C).

In der C38S-Mutante liegen jedoch immer noch mehr Aggregate vor als im Fall des kurzen CtaG<sub>SF</sub>-Fragments. Neben dem zur Ausbildung von Disulfidbrücken fähigen Cystein 38 scheinen noch weitere Eigenschaften der zusätzlichen 17 Aminosäuren für die Aggregation von Bedeutung zu sein.

### **Diskussion**

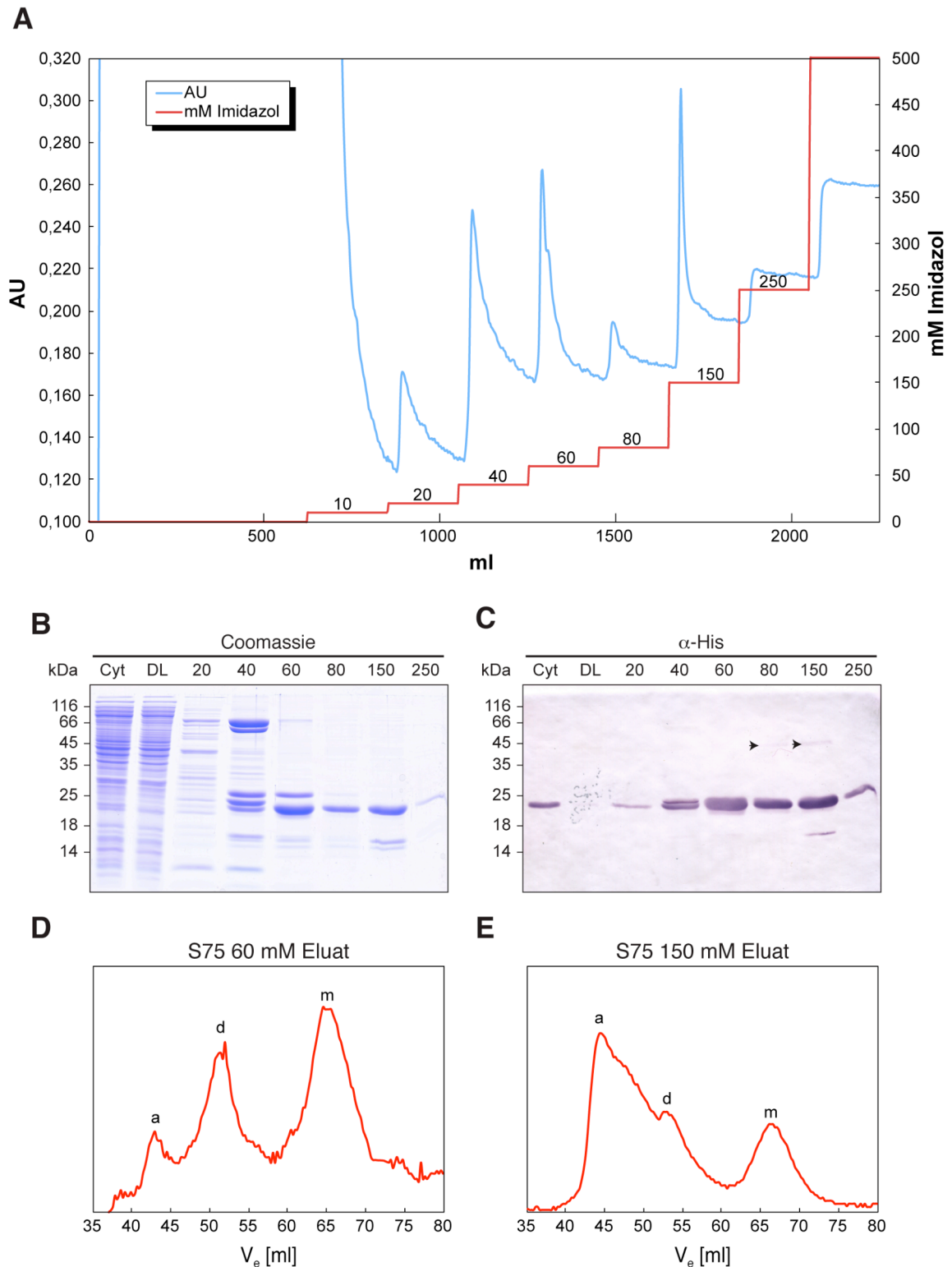
Das Verhalten von CtaG<sub>LF</sub> während der Gelfiltration erklärt die Probleme der bereits durchgeführten Metallbindungsexperimente (Daten nicht gezeigt). Das Protein lag offensichtlich bei sämtlichen Arbeiten in aggregierter Form vor, was eine freie Diffusion von Metallionen und CtaG<sub>LF</sub> unmöglich und die potentielle Kupferbindungsstelle von CtaG<sub>LF</sub> vermutlich größtenteils unzugänglich machte. Der Vergleich mit einer Cystein-Mutante zeigt, dass die Aggregation hauptsächlich auf der Ausbildung von Disulfidbrücken beruht. Die überwiegend hydrophobe Natur der zusätzlichen 17 Aminosäuren (WFCKVTGFAGTTNVAEA; 3 hydrophil, 5 neutral, 9 hydrophob) scheint die Tendenz zur Aggregation jedoch zusätzlich zu fördern, da auch in der Cytstein-Mutante noch mehr Aggregate vorliegen als im Fall des kurzen CtaG<sub>SF</sub>-Fragments (Vergleich Abbildung 23B und C). Das dritte Cystein und damit die gesamten zusätzlichen 17 Aminosäuren sind für die Metallbindungsexperimente unabdingbar, somit kann weder auf das kurze CtaG<sub>SF</sub>-Fragment noch auf die C38S-Mutante umgestiegen werden. Auch der Versuch, die CtaG<sub>LF</sub>-Aggregate nachträglich durch Zusatz von bis zu 100 mM DTT und bis zu 5 % DM aufzulösen, erwies sich als nicht zielführend. Stattdessen musste die Aufreinigung von CtaG<sub>LF</sub> so verändert werden, dass der Anteil an Aggregaten minimiert wird.

#### 2.5.4. Finales Aufreinigungsprotokoll für CtaG<sub>LF</sub>

Um den Anteil an monomerem CtaG<sub>LF</sub> zu erhöhen, wurden mehrere Maßnahmen ergriffen. (1) Zum einen wurden sämtliche bei der Aufreinigung verwendete Puffer mit 10 mM des Reduktionsmittels  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) versetzt, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu verringern. Höhere Konzentrationen oder der Einsatz des stärkeren Reduktionsmittels DTT ( $> 1$  mM) sind nicht möglich, da Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu metallischem Nickel reduziert und das Ni-NTA-Material somit ruiniert würde. (2) Desweiteren wurde konsequent in Gegenwart von 0,05 % des Detergenz Dodecylmaltosid (DM) gearbeitet, um die zusätzliche Aggregationstendenz aufgrund der hydrophoben Aminosäuren im verlängerten N-Terminus zu verringern. (3) Darüberhinaus wurde ein erweitertes Protokoll für die affinitätschromatographische Aufreinigung angewendet: Da höhermolekulare Aggregate mehrere His-tags enthalten, ist zu erwarten, dass die Aggregate eine höhere Avidität und somit eine stärkere Bindung an das NiNTA-Material aufweisen. Daher wurden zusätzliche Waschschrte zwischen 20 und 150 mM Imidazol eingeführt, wodurch eine getrennte Elution der verschiedenen oligomeren Zustände erreicht werden sollte. (4) Eine weitere Veränderung war der Umstieg auf ein computergesteuertes FPLC-System (BioPilot), welches aufgrund der höheren Flussrate und der Programmierbarkeit des Systems die Möglichkeit bietet, komplexe Aufreinigungsprotokolle in relativ kurzer Zeit durchzuführen, was die Zeit von der Zellernte bis zum Erhalt des prozessierten CtaG<sub>LF</sub> drastisch verkürzt.

Abbildung 24 zeigt die Elutionsprofile und die entsprechenden Gele einer Aufreinigung unter den veränderten Bedingungen. Die Peak-Fractionen der 60 und 150 mM Eluate wurden per Ultrafiltration ankonzentriert, durch die TEV-Protease prozessiert und über eine zweite NiNTA-Säule von Kontaminationen, dem His<sub>6</sub>-tag und der TEV-Protease befreit. Zur Überprüfung der oligomeren Zustände wurden Aliquots von 0,5 mg per Gelfiltration analysiert. Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, wird CtaG<sub>LF</sub> bei 20, 40, 60, 80, 150 und 250 mM Imidazol eluiert, wobei die 20 und 40 mM Eluate noch stark verunreinigt sind (Abbildung 24B). Das Elutionsprofil zeigt vergleichsweise große Proteinpeaks für die 60 und 150 mM Imidazol Fraktionen, während bei 80 mM Imidazol relativ wenig und bei 250 und 500 mM Imidazol kaum noch Protein eluiert wird. Der Western Blot weist für das 150 mM Eluat ein Signal auf Höhe des CtaG<sub>LF</sub>-Dimers auf (Abbildung 24C, Pfeil), was bereits darauf hindeutet, dass CtaG<sub>LF</sub> in den Fraktionen höherer Imidazolkonzentration in höheren oligomeren Zuständen vorliegt. Dies wird durch die Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration untermauert: Das aus dem 60 mM Eluat gewonnene CtaG<sub>LF</sub>-TEV (CtaG<sub>LF</sub> nach Entfernung des His<sub>6</sub>-tags durch die TEV-Protease) weist kaum Aggregate auf, während das aus dem 150 mM Eluat gewonnene CtaG<sub>LF</sub> zum weitaus größten Teil mit dem Ausschlussvolumen der Superdex 75, also in aggregierter Form, eluiert (Abbildung 24D und E).





**Abbildung 24 - Aufreinigung von Cta<sub>GLF</sub> nach dem finalen Reinigungsprotokoll.**

Neben dem Zusatz des Reduktionsmittels  $\beta$ -ME und des Detergenz DM während der gesamten Aufreinigung wurden zusätzliche Wasch/Elutionsschritte zwischen 20 und 150 mM Imidazol eingeführt, um eine weitgehende Trennung der Aggregate von monomerem und dimerem Cta<sub>GLF</sub> zu erreichen. **A.** Elutionsprofil der ersten NiNTA-Säule (vor Entfernung des His-tags), **B.** Coomassie-Färbung der jeweiligen Peak-Fractionen und **C.** entsprechender  $\alpha$ -His-Western Blot. **Cyt:** Cytosolfraktion; **DL:** Durchlauf; **20-250:** 20-250 mM Imidazol Eluate. Cta<sub>GLF</sub> wurde durch TEV-Verdau und Sammeln des Durchlaufs einer zweiten NiNTA aus den 60 und 150 mM Eluaten gewonnen. Die Oligomeren Zustände wurden anschließend mit Hilfe einer Superdex 75 Gelfiltration überprüft. **D.** Superdex 75 Elutionsprofil von Cta<sub>GLF</sub> aus dem 60 mM Eluat und **E.** Cta<sub>GLF</sub> aus dem 150 mM Eluat.

Der Anteil an mono- und dimerem CtaG<sub>LF</sub> wird durch die Zusätze  $\beta$ -ME und DM von ~25 % (Integration der Peaks aus Abbildung 23A) auf über 55 % (Vergleich 60 und 150 mM Eluate) erhöht. Die Koelution von Aggregaten mit den Mono- und Dimeren kann durch eine schrittweise Elution mit verschiedenen Imidazolkonzentration erfolgreich vermieden werden. Die Ausbeute an CtaG<sub>LF</sub> ist mit 0,6 mg/L Kulturvolumen zwar gering, aber noch immer um den Faktor 3 größer als für die heterologe Überexpression des membrangebundenen Gesamtproteins (pGR6; 0,2 mg/L).

## 2.6. Zusammenfassung

Die Etablierung eines Protokolls zur Expression und Aufreinigung eines neuen löslichen CtaG-Fragments (CtaG<sub>LF</sub>), das alle konservierten Cysteine beinhaltet, gestaltete sich aufwendiger als erwartet: Mehrere Expressionsplasmide wurden kloniert, und eine erfolgreiche Expression konnte erst durch die Verwendung des pET-Systems anstelle des zuvor eingesetzten pQE-Systems erzielt werden. Für das am besten geeignete Plasmid pGR20 (ein pET21d-Derivat) wurden Expressionsbedingungen eruiert, unter denen die Bildung von *inclusion bodies* minimal bzw. die Löslichkeit von CtaG<sub>LF</sub> maximal ist. Mit Hilfe eines spaltbaren C-terminalen His<sub>6</sub>-tags konnte das Protein über eine 2 Schritt NiNTA-Strategie in hochreiner, aber, wie die analytische Gelfiltration zeigte, zunächst aggregierter Form gewonnen werden. Die Aggregation konnte auf hydrophobe Effekte und die Ausbildung von Disulfidbrücken zurückgeführt werden. Diese Effekte werden durch die zusätzlichen 17 Aminosäuren am N-Terminus des neuen CtaG-Fragments hervorgerufen. Das Problem der Aggregation konnte durch Zugabe eines Reduktionsmittels und eines Detergenz während der Aufreinigung sowie durch die Einführung zusätzlicher Wasch- und Elutionsschritte gelöst werden. Auf diese Weise konnte ein Protokoll für die Aufreinigung des verlängerten löslichen CtaG-Fragments etabliert werden, mit dem CtaG<sub>LF</sub> mit einer Ausbeute von 0,6 mg/L Kulturvolumen in hochreiner und aggregatfreier Form isoliert werden kann.

### 3. Kupferrekonstitution und Stöchiometrie der Metallbindung von CtaGLF

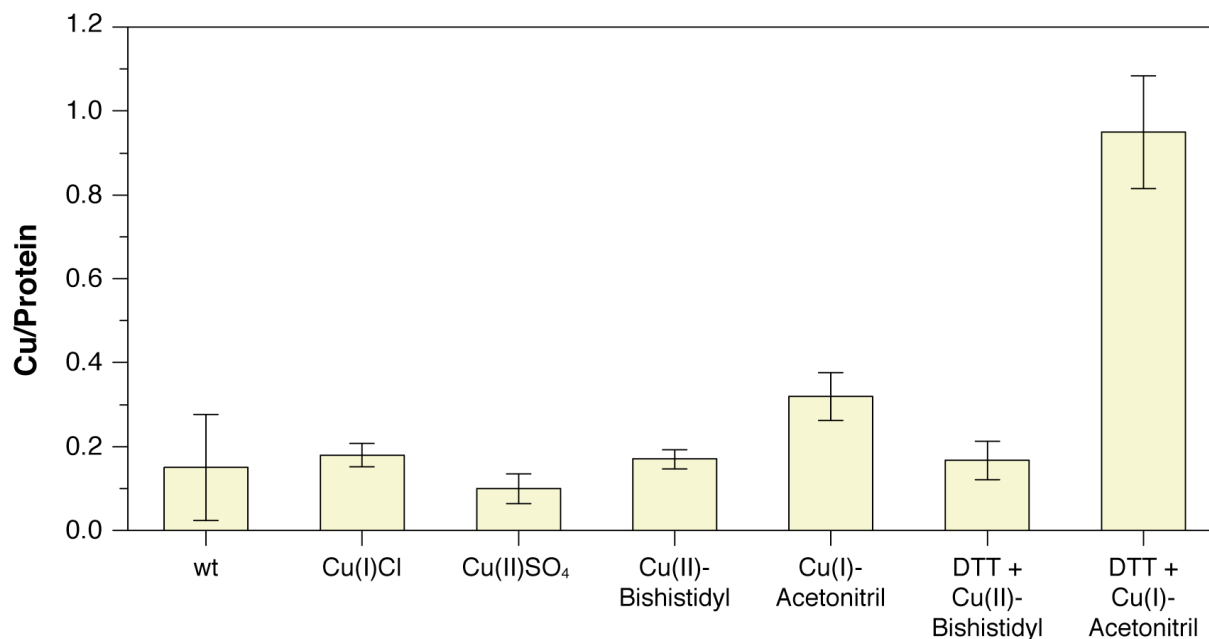
#### 3.1. Einleitung

CtaG ist essentiell für den Einbau von Kupfer in das aktive Cu<sub>B</sub>:Häm a<sub>3</sub>-Zentrum der Cytochrom c Oxidase (Hiser, Di Valentin et al. 2000). Ob das Protein jedoch für die direkte Insertion von Kupfer verantwortlich ist oder nur indirekt am Kupfereinbau beteiligt ist, bleibt unklar. Eine wichtige Voraussetzung für den direkten Einbau ist, dass CtaG selbst Kupfer bindet. In diesem Zusammenhang stellen sich einige Fragen, die durch eine eingehende Charakterisierung des Proteins geklärt werden sollen: Bindet CtaG Kupfer und, wenn ja, in welchem stöchiometrischen Verhältnis? Bindet es auch andere Metallionen und, wenn ja, gibt es bevorzugte Metalle? Welche Aminosäuren sind für die Metallbindung verantwortlich? Und gibt es eine Eigenschaft anhand derer sich der Metalltransfer beobachten lässt? Das isolierte CtaGLF wurde daher mit verschiedenen Methoden insbesondere auf seine metallbindenden Eigenschaften hin untersucht. Im vorliegenden Kapitel wird zunächst die Fähigkeit des Proteins Kupferionen zu binden sowie die Stöchiometrie dieser Bindung untersucht. Weitere Aspekte wie die Selektivität und Affinität der Metallbindung oder für die Bindung verantwortliche Aminosäuren werden in den folgenden Kapiteln behandelt.

#### 3.2. Kupferrekonstitution

Das heterolog exprimierte und aus dem Cytosol von *E. coli* isolierte CtaGLF weist nach der Aufreinigung keine nennenswerte Kupferbindung auf. Die Stöchiometrie liegt je nach Qualität der Aufreinigung und der verwendeten Detektionsmethode (Material und Methoden 3.12, S.60 ff) zwischen 0 und ca. 0,2 Cu/Protein. Auch die Zugabe von bis zu 1,4 mM CuSO<sub>4</sub> während der Expression erhöht den Kupfergehalt des aufgereinigten CtaGLF nicht.

Um die Kupferbindung von CtaGLF zu untersuchen, musste daher ein Verfahren zum nachträglichen Einbau von Kupfer *in vitro* etabliert werden. Die Inkubation von unbehandeltem CtaGLF mit Cu(I)Cl, Cu(II)SO<sub>4</sub>, Cu(II)-Bis-Histidyl oder Tetrakis(acetonitrilo)-Cu(I)-Hexafluorophosphat ([Cu(I)(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub>, im Folgenden vereinfacht als "Cu(I)-Acetonitril" bezeichnet) im 100-fachen molaren Überschuss führte nach der Entfernung ungebundener Metallionen durch Gelfiltration (Sephadex G25) zu einem Cu/Protein-Verhältnis von maximal 0,34. Durch Vorbehandlung mit 50 mM DTT und Entfernung des DTTs vor der Inkubation mit Cu(I)-Acetonitril wird das Cu/Protein-Verhältnis auf 0,95 ± 0,23 erhöht. Die Metall/Protein-Verhältnisse wurden hier aus der per AAS bestimmten absoluten Cu-Konzentration und der per Lowry bestimmten Proteinkonzentration berechnet.



**Abbildung 25 - Kupfergehalt von CtaG<sub>LF</sub> nach verschiedenen Rekonstitutionsversuchen**

Das isolierte CtaG<sub>LF</sub> wurde mit verschiedenen Cu-Verbindungen inkubiert, ungebundenes Kupfer wurde per Gelfiltration (Sephadex G25) abgetrennt und der Kupfer/Protein-Gehalt wurde per AAS und Lowry bestimmt. Eine Probe wurde vor der Zugabe von Cu(I)-Acetonitril mit 50 µM DTT reduziert, wobei das DTT vor der Metallzugabe per Gelfiltration entfernt wurde.

### Diskussion

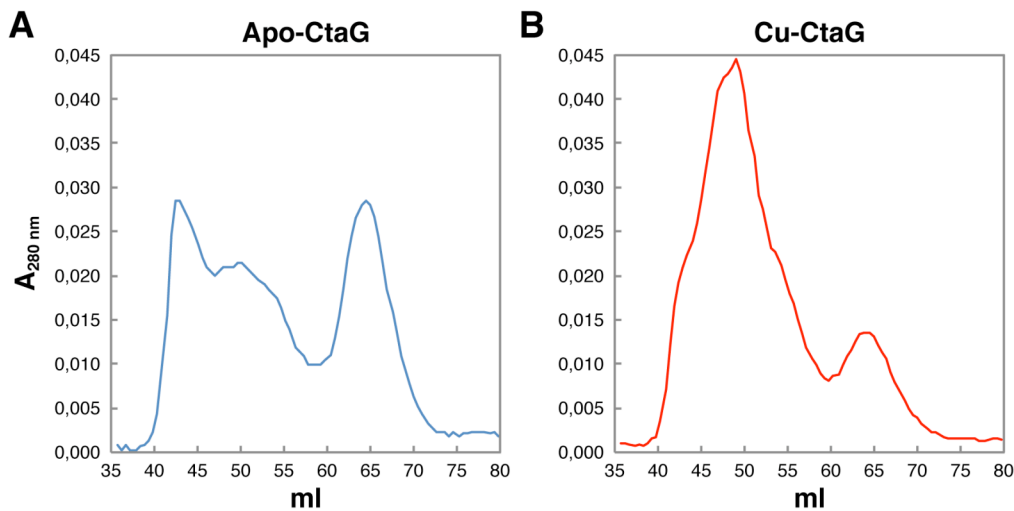
Die Inkubation mit verschiedenen Kupfersalzen und organischen Kupferkomplexen erhöht den Kupfergehalt von CtaG<sub>LF</sub> nur marginal. Der organische Cu(I)-Komplex Tetrakis(acetonitrilo)-Kupfer(I)-Hexafluorophosphat führt zwar immerhin zu einer Verdopplung des Cu/Protein-Verhältnisses. Die Eigenschaft des Acetonitril-Komplexes, Cu(I) vor der Oxidation zu Cu(II) zu schützen, scheint also förderlich für die Bindung von Kupfer an CtaG zu sein. Das erzielte Cu/Protein-Verhältnis liegt jedoch mit  $0,32 \pm 0,02$  immer noch weit unter einem stöchiometrisch sinnvoll interpretierbaren Verhältnis. Ein überzeugendes Verhältnis kann jedoch durch Vorbehandlung mit 50 mM DTT und anschließende Inkubation mit Cu(I)-Acetonitril, in Abwesenheit von DTT, erzielt werden. Diese Prozedur erhöht das Cu/Protein-Verhältnis von CtaG<sub>LF</sub> auf  $0,95 \pm 0,13$ , es wird also nach Rekonstitution ein Kupfer pro Protein gebunden. Der positive Effekt der Vorbehandlung mit DTT deutet darauf hin, dass Cysteine an der Ligandierung von Kupfer beteiligt sind. Ähnliche Rekonstitutionsversuche, bei denen nach der Reduktion mit DTT Cu(II)Cl<sub>2</sub> oder Cu(II)-Bishistidyl angeboten wurden, konnten das Cu/Protein-Verhältnis nicht erhöhen ( $0,21 \pm 0,0064$  bzw.  $0,12 \pm 0,0082$ , Daten nicht gezeigt). Offensichtlich muss Kupfer für die Bindung an CtaG in der reduzierten Cu(I)-Form vorliegen, CtaG scheint also ein Cu(I)-bindendes Protein zu sein.

### 3.3. Stöchiometrie der Kupferbindung

Das Cu/Protein-Verhältnis um 1 suggeriert die Bindung von einem Kupferion an ein CtaG<sub>LF</sub>-Molekül. Theoretisch besteht jedoch die Möglichkeit, dass CtaG mehrere Kupferbindungsstellen aufweist und nur ein Teil der Proteine nach der Rekonstitution Kupferionen gebunden hat. Desweiteren könnte die Kupferbindung eine Veränderung im Oligomerisierungsgrad des Proteins hervorrufen. Um diesen Fragen nachzugehen, wurden einige Gelfiltrations- und ICP-MS-Experimente durchgeführt.

#### 3.3.1. Gelfiltration

Zur Untersuchung der oligomeren Zustände eines Proteins eignet sich neben der nativen Elektrophorese oder der analytischen Ultrazentrifugation besonders die Methode der Gelfiltration (Material & Methoden 3.4, S.47). CtaG<sub>LF</sub> wurde nach der Entfernung des His<sub>6</sub>-tags mit 50 mM DTT reduziert, das DTT wurde unter mikroaeroben Bedingungen durch einen Sephadex G25-Lauf entfernt und ein Teil des reduzierten CtaG<sub>LF</sub> wurde mit 1 mM Cu(I)-Acetonitril inkubiert, während die andere Hälfte lediglich mit Acetonitril versetzt wurde. Anschließend wurden die beiden Proben, Apo-CtaG<sub>LF</sub> und Cu-CtaG<sub>LF</sub>, mit einer Superdex 75 XK 16/70 analysiert. Das nicht rekonstituierte Apo-CtaG weist zwei ausgeprägte Peaks bei 64 und 43 ml sowie einen diffuseren Peak bei einem Elutionsvolumen um 50 ml auf (Abbildung 26A). Es handelt sich hierbei um das Monomer (64 ml), Dimer (50 ml) und höhermolekulare Aggregate (43 ml) von CtaG<sub>LF</sub>. Das rekonstituierte Cu-CtaG eluiert dagegen fast ausschließlich bei 50 ml, also als Dimer (Abbildung 26 B). Ein Teil des Proteins liegt auch nach der Rekonstitution noch als Monomer vor (64 ml) und eine Schulter im Dimer-Peak bei etwa 42 ml deutet auf die Anwesenheit kleiner Mengen des Aggregats hin.



**Abbildung 26 - Elutionsprofile von Apo- und Cu-CtaG nach Superdex 75 Gelfiltrationsläufen**

Die oligomeren Zustände von unrekonstituiertem und mit Cu(I) inkubiertem CtaG<sub>LF</sub> wurden mit Hilfe von Superdex 75 Gelfiltrationsläufen aufgelöst. **A.** Das unrekonstituierte Apo-CtaG eluiert in drei Peaks bei 64, 51 und 42 ml, entsprechend monomerem, dimerem und höhermolekular aggregiertem CtaG<sub>LF</sub>. **B.** Das rekonstituierte Cu-CtaG eluiert überwiegend bei etwa 51 ml, also als Dimer. Eine leichte Schulter bei 42 ml deutet auf die Anwesenheit von höhermolekularen Aggregaten hin und ein kleiner Teil des Proteins eluiert zusätzlich als Monomer bei etwa 64 ml.

### Diskussion

Offensichtlich wird durch die Kupferrekonstitution eine Dimerisierung von CtaG<sub>LF</sub> hervorgerufen. Allerdings finden sich auch in nicht rekonstituiertem CtaG<sub>LF</sub> Aggregate und Dimere wieder. Der Vergleich zwischen Abbildung 26 A und B suggeriert auf den ersten Blick, dass nicht nur monomeres, sondern auch aggregiertes CtaG<sub>LF</sub> durch die Kupferrekonstitution zum Dimer umgewandelt werden kann. Dies ist jedoch aus mehreren Gründen unwahrscheinlich: Zum einen ließen sich die Aggregate in vorherigen Versuchen weder durch die Zugabe von bis zu 100 mM DTT noch durch Detergenzien in Dimere oder Monomere spalten, und zum anderen führte die Bindung von Kupfer an aggregiertes CtaG<sub>LF</sub> nie zu einem erhöhten Dimerpeak. Eine andere Erklärung für den größeren Anteil an Aggregaten in der Apo-CtaG<sub>LF</sub> Probe erscheint plausibler: Die Aufreinigung wird in Gegenwart von Reduktionsmittel und Detergenz durchgeführt. Im Zuge der Kupferrekonstitution wird CtaG mit einer hohen DTT-Konzentration vorreduziert und das Reduktionsmittel wird vor der Zugabe von Kupfer vollständig entfernt. Es besteht also die Möglichkeit, dass CtaG<sub>LF</sub> durch die Entfernung des Reduktionsmittels langsam oxidiert und sich Disulfidbrücken zwischen einzelnen Monomeren ausbilden. Da jedes CtaG<sub>LF</sub> über drei verschiedene Cysteinreste verfügt, bilden sich unterschiedlich geartete Dimere aus, die sich für Apo-CtaG<sub>LF</sub> zunächst in dem diffusen Dimerpeak (Abbildung 26 A, ca. 50 ml) äußern und letztendlich durch Ausbildung weiterer Disulfidbrücken in der vermehrten Bildung hochmolekularer Aggregate enden. Wird nach der Entfernung des Reduktionsmittels jedoch Cu(I) angeboten, so bildet sich aufgrund der Kupferbindung ein Dimer in einer definierten Konformation, das sich in dem wesentlich homogenen Dimerpeak der Cu-CtaG<sub>LF</sub> Probe niederschlägt. Dieses

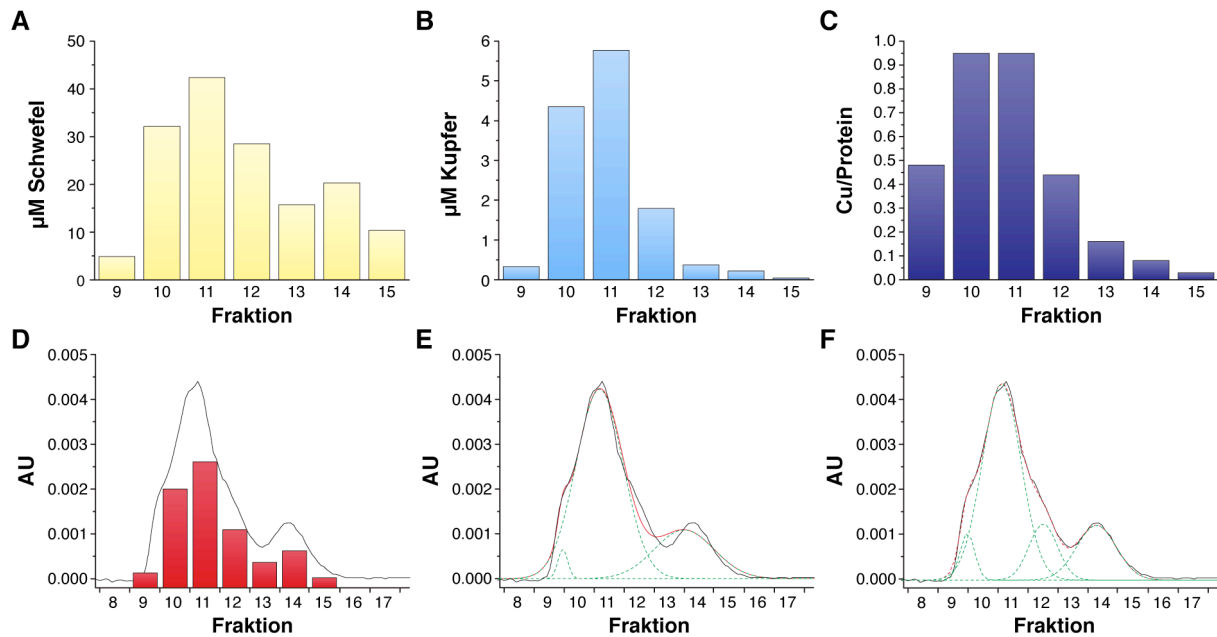
kupferhaltige Dimer ist dann so stabil, dass trotz oxidativer Bedingungen keine Disulfidbedingte Aggregation stattfindet.

Um die Verteilung von Kupfer über die verschiedenen oligomeren Zustände weiter zu untersuchen, wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Cu/Protein-Gehalt hin untersucht.

#### **3.3.2. ICP-MS**

Eine besonders sensitive und exakte Methode zur Bestimmung von Metall/Protein-Verhältnissen ist die Massenspektrometrie mit gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry* ICP-MS, Material & Methoden 3.12.4, S.63). Diese hat gegenüber der AAS den Vorteil, dass wesentlich weniger Protein für die Messungen benötigt wird und dass sie die simultane Bestimmung mehrerer Elemente einschließlich Schwefel ermöglicht. Ist die Anzahl der im Protein enthaltenen Cysteine und Methionine bekannt, kann aus dem Metall/Schwefel-Verhältnis direkt auf das Metall/Protein-Verhältnis geschlossen werden, ohne eine zweite Methode zur Proteinbestimmung heranziehen zu müssen. Desweiteren ist die ICP-MS so sensitiv, dass Proben direkt aus den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration analysiert werden können und nicht, wie für die ebenfalls geeignete Methode der Totalreflexions Röntgenfluoreszenz Spektrometrie (TXRF), ankonzentriert und umgepuffert werden müssen.

Jeweils 100 µl der Einzelfraktionen der Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Probe (Abbildung 26 B) wurden mit 900 µl Seralpur verdünnt, sterilfiltriert und per ICP-MS analysiert (Abbildung 27).



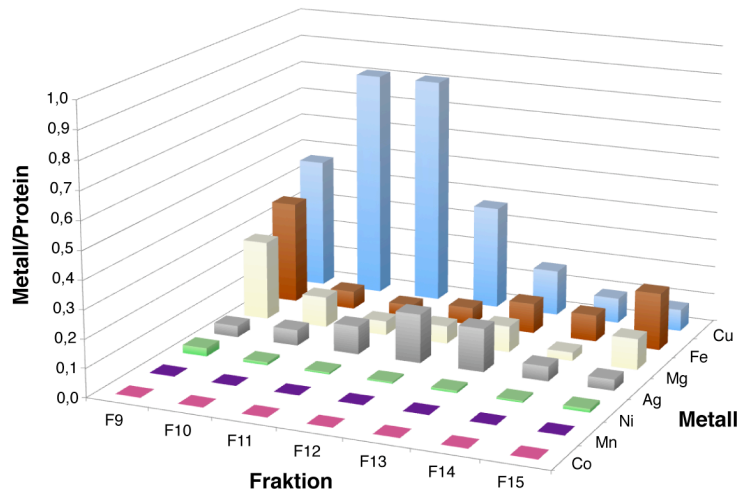
**Abbildung 27 - Kupferverteilung über die verschiedenen oligomeren Zustände von Cta<sub>GLF</sub>**

Die einzelnen, während der Gelfiltration aufgefangenen, Fraktionen (9-15) wurden per ICP-MS auf ihren (A) Schwefel- und (B) Kupfergehalt hin untersucht und das entsprechende (C) Cu/Protein-Verhältnis wurde daraus berechnet. (D) Die integrierten Flächen unter dem Elutionsprofil für die jeweiligen Fraktionen dienen als Maß für die erwarteten Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen. Ein Vergleich zwischen A und D zeigt, dass die tatsächliche Schwefel-, d.h. Proteinkonzentration gut mit den Erwartungen übereinstimmt. Um die Verteilung zwischen Monomer, Dimer und Aggregaten besser aufzulösen, wurde das Elutionsprofil mit Gaussskurven gefittet. Das Elutionsprofil lässt sich durch vier Peaks (F), d.h. durch die Annahme von zwei unterschiedlich gearteten Monomer oder Dimer-Spezies, wesentlich besser beschreiben, als durch drei Peaks (E) (schwarz: Elutionsprofil, rot: Summe der einzelnen, grünen, Gaussskurven).

Der Schwefelgehalt der einzelnen Fraktionen korreliert mit den integrierten Flächen aus dem Cu-Cta<sub>GLF</sub>-Elutionsprofil (vergleiche Abbildung 27 A und D). Der Kupfergehalt hingegen korreliert nicht mit dem Elutionsprofil (Abbildung 27 B). Wie besonders deutlich aus den Kupfer/Protein-Verhältnissen hervorgeht (Abbildung 27 C), ist der Kupfergehalt für das Dimer wesentlich höher als für Monomer und Aggregate. Das Kupfer/Protein-Verhältnis liegt in den Fraktionen 10 und 11, die fast ausschließlich das Cta<sub>GLF</sub>-Dimer enthalten, bei 0,95, während die Fraktion 14, in welcher nur das Monomer vorliegen sollte, ein Kupfer/Protein-Verhältnis von 0,08 aufweist.

Neben Kupfer wurden einige weitere Metalle bei der ICP-MS Analyse bestimmt. Die für diese Metalle erhaltenen Metall/Protein-Verhältnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Weder Co noch Mn oder Ni finden sich in der mit Kupfer rekonstituierten Cta<sub>GLF</sub>-Probe wieder. Fe und Mg sind in geringen Mengen in den Randfraktionen, entsprechend Monomer und Aggregaten, detektierbar. Ebenfalls in geringen Mengen, aber in einem definierten Elutionsprofil, wird Ag detektiert.





**Abbildung 28 - Verteilung weiterer Metalle über die verschiedenen oligomeren Zustände von CtaGLF**

Neben Cu wurde bei der ICP-MS Analyse auch der Co-, Mn-, Mg-, Ni-, Fe- und Ag-Gehalt des einer Kupferrekonstitution unterzogenen CtaGLF untersucht. Co, Mn und Ni sind nicht oder nur in Spuren vorhanden. Fe und Mg sind in substöchiometrischen Mengen detekierbar und finden sich nicht in der Dimerfraktion, zu einem Teil in der Monomerfraktion, überwiegend jedoch in der Aggregatfraktion wieder. Geringe Mengen von Ag finden sich in einem Profil wieder, das weder dem üblichen Monomer noch dem Dimer entspricht. Dieses Ag-Profil korreliert gut mit dem durch Fitten des Elutionsprofils vorhergesagten vierten Peak (Abbildung 27 F).

### 3.3.3. Diskussion

Die ICP-MS Analyse der Gelfiltrationsfraktionen von Cu-CtaGLF zeigt klar, dass Kupfer durch das CtaGLF-Dimer gebunden wird. Das Cu/Protein-Verhältnis spiegelt den Dimerpeak des Elutionsprofils gut wider und beträgt in den Fraktionen 10 und 11, die fast ausschließlich das Dimer enthalten, nahezu 1 (Abbildung 27 C), während die Fraktion 14, die nur aus Monomer besteht, nur 0,08 Kupfer/Protein enthält. Offensichtlich führt die Kupferbindung zur Dimerisierung von CtaGLF und die tatsächliche Stöchiometrie beträgt genau genommen zwei Kupferionen pro CtaGLF-Dimer.

Das Elutionsprofil für Cu-CtaGLF lässt sich in einem multiplen Gaußkurvenfit unter der Annahme von drei Peaks relativ gut beschreiben (Abbildung 27 E). Die Annahme von vier Peaks liefert jedoch eine wesentlich bessere Übereinstimmung mit dem tatsächlichen Elutionsprofil (Abbildung 27 F). Es besteht also die Möglichkeit, dass mehrere konformationell unterschiedliche Formen des Monomers oder des Dimers vorliegen. Allerdings darf beim Fitten von Elutionsprofilen nicht vergessen werden, dass reale Chromatographie-Peaks selten einer idealen Gaußkurve ähneln, sondern meist schneller das Maximum erreichen und aufgrund der Wechselwirkung mit der Säulenmatrix nach hinten breiter auslaufen. Die ICP-MS Analyse über mehrere Metalle untermauert die Hypothese von vier CtaGLF-Varianten, da neben dem Cu-Peak, der mit dem Dimer einhergeht, ein zweiter Peak für Ag vorliegt, der gut mit der zusätzlichen Gaußkurve im 4-Peak fit übereinstimmt. Die Bindung von Ag an die  $\beta$ -Thiolatgruppe von Cystein könnte zu einer veränderten Faltung führen und so ein anderes Laufverhalten verglichen mit dem Monomer hervorrufen.

Die Tatsache, dass CtaG<sub>LF</sub> in Folge der Kupferbindung dimerisiert war aus den Gelfiltrationsexperimenten bereits abzusehen und könnte eine Schutzfunktion darstellen. Zum einen wird die Zelle vor ungewollten Reaktionen an den transportierten Kupferionen geschützt, und zum anderen werden die Kupferionen vor einer möglichen Oxidation zu Cu(II) geschützt. Die Stöchiometrie von zwei Kupferionen pro Dimer ist aber dennoch verwunderlich, da die postulierte Aufgabe von CtaG, der Einbau von Kupfer in das binukleäre Cu<sub>B</sub>:Häm a<sub>3</sub>-Zentrum der Cytochrom c Oxidase, lediglich ein Kupferion involviert. Warum sollte CtaG zwei Kupferionen anbieten, wenn nur eines benötigt wird?

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass CtaG die Kupferionen für zwei Oxidasen bereitstellt. Es ist bekannt, dass die Cytochrom c Oxidase in Mitochondrien als Dimer vorliegt (Tsukihara, Aoyama et al. 1996). Während der Biogenese der Oxidase könnte also beispielsweise zu einem relativ frühen Zeitpunkt ein dimerer Assemblierungskomplex gebildet werden, der von CtaG bedient wird. Für dieses Szenario müsste der Kupfereinbau wahrscheinlich posttranslational, also nach vollständiger Expression und Membraninsertion von zwei Untereinheit I Molekülen, stattfinden. Im Fall der bakteriellen Cytochrom c Oxidase gibt es jedoch keine Hinweise für das Vorliegen eines Dimers. Auch scheint die Dimerisierung des mitochondrialen Enzyms maßgeblich durch Untereinheit VIa hervorgerufen zu sein (Tsukihara, Aoyama et al. 1996), für die sich im bakteriellen System kein Homolog findet. Ein dimerer Assemblierungskomplex könnte zwar auch transientser Natur sein und durch Assemblierungsfaktoren wie CtaG oder Surf1 vermittelt werden. Diese Hypothese erscheint jedoch relativ unwahrscheinlich, da es außer der 2:2-Stöchiometrie von Kupfer und CtaG, weder in pro- noch in eukaryontischen Systemen Hinweise auf einen dimeren Assemblierungskomplex gibt.

Eine alternative Erklärung für das Mißverhältnis zwischen benötigtem und angebotenen Kupfer involviert das zweite, für die Biogenese der Cytochrom c Oxidase essentielle Kupferchaperon Sco1. Interessanterweise bindet Sco1 lediglich ein Kupfer, obwohl es für die Biogenese des aus zwei Kupferionen bestehenden Cu<sub>A</sub>-Zentrums verantwortlich zu sein scheint (Lode, Kuschel et al. 2000; Nittis, George et al. 2001). CtaG und Sco1 transportieren somit zusammen drei Kupferionen zur Cytochrom c Oxidase, was insgesamt genau der benötigten Menge entspricht. Eine denkbare, aber hoch spekulatives Szenario wäre daher auch, dass CtaG ein Kupferion für das Cu<sub>B</sub>-Zentrum liefert und das zweite Kupferion gemeinsam mit dem von Sco1 stammenden Kupferion zur Assemblierung des Cu<sub>A</sub>-Zentrums verwendet wird. Diese Hypothese ist experimentell vermutlich schwer anzugehen. Ein denkbare Experiment wäre die selektive Markierung der Kupferionen eines der Assemblierungsfaktoren. Beispielsweise könnte CtaG *in vitro* mit einem Kupferisotop rekonstituiert werden, Sco1 mit einem anderen. Da die ICP-MS verschiedene Isotope unterscheiden kann, könnte aus dem Isotopenverhältnis geklärt

werden, ob ein oder zwei Kupferionen in der Cytochrom *c* Oxidase von CtaG stammen. Bei bestehendem Kristallisationsprotokoll könnte mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse die genaue Position der Isotope identifiziert werden. Voraussetzung für das selektive Labelling ist natürlich die Zugänglichkeit des Expressionssystems. *In vitro* rekonstituiertes CtaG kann nicht zurück in das *in vivo* System gebracht werden. Stattdessen müsste die komplette Assemblierung *in vitro* durchgeführt werden, was dem Experiment klare Grenzen aufzeigt. Ein *in vitro* System für die Expression funktionaler Cytochrom *c* Oxidase existiert noch nicht. Erste Schritte in Richtung eines solchen Systems wurden aber im Rahmen dieser Arbeit durch zwei meiner Diplomanden unternommen (Margraf 2006; Hannappel 2007).

Selbstverständlich sollte bezüglich des 2 Kupfer-Dimers auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass ein *in vitro* erzielt Kupfer/Protein-Verhältnis lediglich ein Artefakt darstellt und die Situation *in vivo* eine andere sein könnte. 50 mM DTT und 1 mM Cu(I) entsprechen wohl kaum physiologischen Bedingungen. Die Isolierung von nativem CtaG aus dem natürlichen Wirt *Paracoccus denitrificans* könnte diese Frage klären. Um die Möglichkeit eines Kupferabflusses in Richtung Oxidase zu verhindern, könnte in einem *ctaDII*-Deletionsstamm, also vor einer Untereinheit I freier Hintergrund, gearbeitet werden. Die Aufreinigung müsste dann ohne *tag*, d.h. nativ erfolgen, da jegliche Veränderung der CtaG-Sequenz für ein solches Experiment vermieden werden sollte. Da ein Kupfer/Protein-Verhältnis von 1 jedoch auch für CtaG Homologe aus anderen Organismen beschrieben ist (Carr, George et al. 2002; Banci, Bertini et al. 2004), wurde in dieser Arbeit auf die native Aufreinigung von CtaG verzichtet. Stattdessen sollten die Selektivität & Affinität der Kupferbindung näher untersucht und die als Liganden dienenden Aminosäuren identifiziert werden.

### **3.4. Zusammenfassung**

Es wurde eine Rekonstitutionsmethode etabliert, mit deren Hilfe CtaG<sub>LF</sub> ein Kupferion pro Monomer bindet. Das Metallion wird dabei nur in der reduzierten Cu(I)-Form gebunden. Gelfiltrationsanalysen zeigen, dass die Kupferbindung zu einer Dimerisierung von CtaG<sub>LF</sub> führt und eine weitergehende Analyse des Metallgehalts per ICP-MS zeigt, dass die Kupferionen ausschließlich durch das CtaG<sub>LF</sub>-Dimer gebunden werden. Die tatsächliche Stöchiometrie für Kupfer und CtaG<sub>LF</sub> entspricht daher zwei Cu(I)-Ionen pro Dimer. Eine mögliche Erklärung für die Bildung eines CtaG<sub>LF</sub>-Dimers ist eine verringerte Zugänglichkeit der Kupferionen und somit ein höherer Schutz der Zelle vor potentiellen Nebenreaktionen mit toxischen Effekten.

## 4. Selektivität der Kupferbindung von CtaG<sub>LF</sub> – Konkurrenz verschiedener Metallionen

### 4.1. Einleitung

Um die metallbindenden Eigenschaften von CtaG näher zu untersuchen, wurde überprüft, ob das Protein neben Kupfer noch weitere Metallionen binden kann und ob es aus einer Mischung verschiedener Metallionen präferiert Cu(I) bindet. Als physiologisch interessante Ionen wurden neben Cu(I) die M<sup>2+</sup>-Ionen von Kupfer, Kobalt, Magnesium, Mangan, Eisen und Nickel untersucht. Diese wurden entweder einzeln oder in einem Konkurrenzexperiment gemeinsam angeboten. Darüberhinaus wurde in einem separaten Ansatz der Effekt von Silberionen untersucht, welche neben Quecksilberionen als stabile Cu(I)-Analoge gelten.

### 4.2. Durchführung

In einem ersten Versuch wurden die Rekonstitutionen analog zur oben beschriebenen Methode für die Kupferrekonstitution durchgeführt (siehe Material & Methoden 3.7 "Metallrekonstitutionen", S.50), allerdings präzipitierten hier einige der zu untersuchenden Metallionen, da sie in dem für die Kupferrekonstitution verwendeten Phosphatpuffer schwer lösliche Metallphosphate bilden. Es musste daher ein anderes Puffersystem gewählt werden. Zunächst wurden einige Rekonstitutionsreihen in dem für TXRF-Messungen empfohlenen Tris/Acetat-System durchgeführt.

Um das Ausgangsmaterial von potentiell gebundenen Metallionen zu befreien, wurde es für 30 min mit 10 mM EDTA und 1 mM BCA inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Zugabe von 50 mM DTT reduziert und mit Hilfe einer zügigen Gelfiltration (Sephadex-G25) unter mikroaeroben Bedingungen von EDTA, BCA und DTT befreit. Das gestrippte und reduzierte CtaG<sub>LF</sub> wurde dann in mehrere Aliquots gesplittet und mit verschiedenen Metallsalzlösungen für ca. 30 min auf Eis inkubiert.

Zur Gewährleistung einer einheitlichen Inkubationszeit

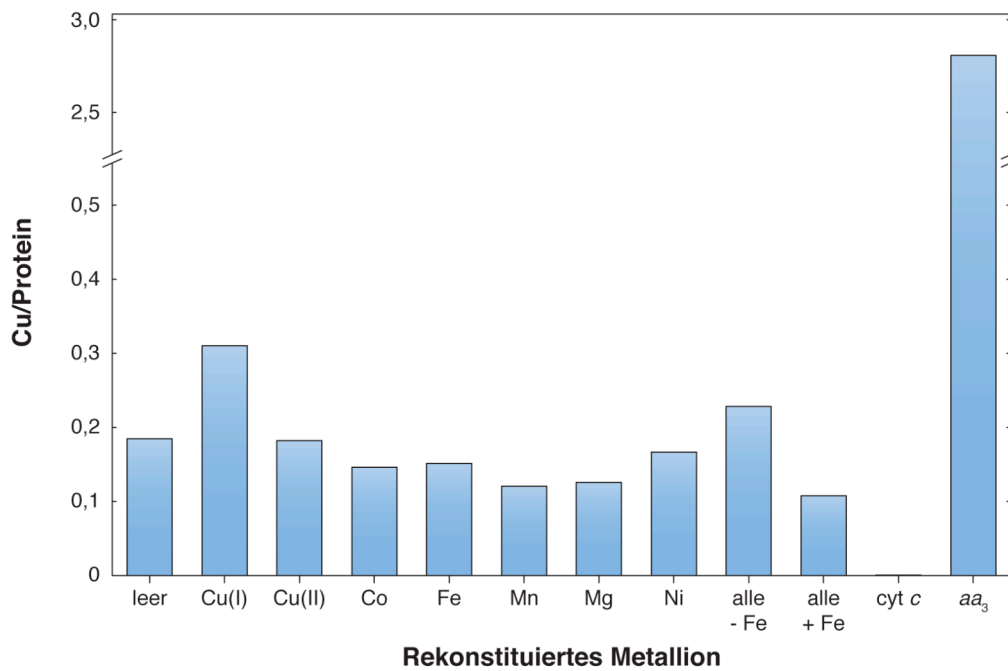
wurden die Proben nach der Rekonstitution in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Behandlung bei -80 °C gelagert. Um eine besonders gründliche Trennung zu erreichen und gleichzeitig die Veränderung des Oligomerisierungsgrades von CtaG<sub>LF</sub> zu verfolgen, wurden die überschüssigen Metallionen mit Hilfe einer präparativen Superdex 75 Säule entfernt. Anschließend wurden die eluierten CtaG<sub>LF</sub>-Proben per ICP-MS (oder TXRF) auf ihren Metallgehalt hin untersucht.

### 4.3. Rekonstitutionen in Tris/Acetat pH 8

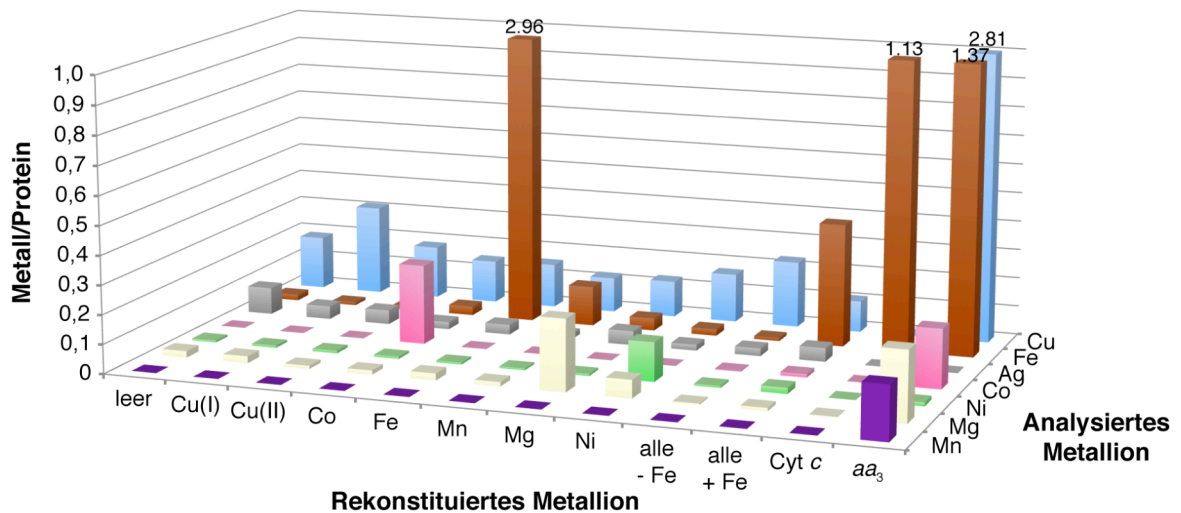
Bei der Verwendung von Tris-Acetat pH 8 anstelle von Na-Phosphat pH 8 wird der Kupfergehalt von CtaG<sub>LF</sub> durch die Rekonstitution mit Cu(I) etwa verdoppelt. Die Rekonstitution führt also zu einer verstärkten Kupferbindung, der Absolutwert von 0,31 Cu/Protein liegt jedoch weit unter der in Na-Phosphat erzielten Stöchiometrie von etwa 1 Cu/Protein. Bietet man Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> alleine an, kommt es zu einer Erhöhung des jeweiligen Metallgehalts auf 0,27 Co/Protein, 0,25 Mg/Protein bzw. 0,13 Ni/Protein. Interessanterweise bindet CtaG<sub>LF</sub> aus einer Mischung von Cu(I), Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> (Probe "alle -Fe") kein Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> mehr, sondern lediglich Cu(I). Das Protein zeigt keinerlei Mn<sup>2+</sup>-Bindung, die Rekonstitution mit Fe<sup>2+</sup> hingegen führt in Tris/Acetat pH 8 zu einer signifikanten Erhöhung des Fe/Protein-Verhältnisses auf ca. 3 Fe/Protein (siehe Abbildung 29).

4. Selektivität der Kupferbindung von CtaGLF  
– Konkurrenz verschiedener Metallionen

**A**



**B**



**Abbildung 29 - Metallbindung nach Rekonstitution in Tris/Acetat pH 8**

**A.** Der Kupfergehalt von CtaGLF liegt nach der Rekonstitution in Tris/Acetat zwischen 0,11 und 0,31. Die höchsten Werte werden durch die Rekonstitution mit Cu(I) bzw. einer Mischung aus Cu(I), Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> (Probe "alle -Fe") erzielt. Die als Kontrollen für die ICP-MS Messungen eingesetzten Proteine Cytochrom c und die aus *P.d.* isolierte Cytochrom c Oxidase (Probe "aa<sub>3</sub>"), liegen mit 0,01 und 2,81 im erwarteten Bereich von 0 bzw. 3 Cu/Protein.

**B.** Vergleichende Darstellung der verschiedenen per ICP-MS detektierten Metall/Protein-Verhältnisse. Auf der X-Achse sind die untersuchten Proben aufgetragen, die Z-Achse zeigt die analysierten Metalle: **blau:** Cu; **braun:** Fe; **grau:** Ag; **rosa:** Co; **grün:** Ni; **weiß:** Mg; **violett:** Mn.

#### Diskussion

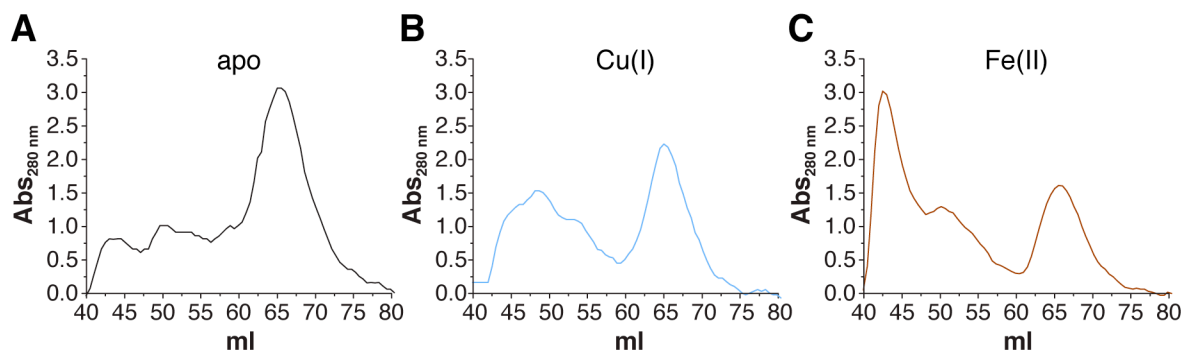
Die Kupferrekonstitution erweist sich in Tris/Acetat pH 8, verglichen mit den Rekonstitutionsversuchen in Na-Phosphat pH 8, als wenig effektiv. Das maximal erreichte Cu/Protein-Verhältnis von 0,31 für die Rekonstitution mit Cu(I) liegt weit unter dem erwarteten stöchiometrischen Verhältnis von etwa 1 Cu/Protein. Ein systematischer Fehler während der ICP-MS Analyse aufgrund falsch angesetzter Eichlösungen oder ein fehlerhaftes Ergebnis aufgrund unreiner Proteinproben wäre denkbar. Durch die simultan analysierten Kontrollen Cytochrom c (1 Fe/Protein) und Cytochrom c Oxidase (3 Cu und 2 Fe/Protein) kann ein Fehler in der ICP-MS Analytik jedoch ausgeschlossen werden. Unreine CtaG<sub>LF</sub>-Proben würden aufgrund der zusätzlich enthaltenen Proteine einen erhöhten Schwefelgehalt aufweisen, was zu einem niedrigeren Cu/S-Verhältnis führen und somit in einem falschen Cu/CtaG<sub>LF</sub>-Verhältnis resultieren würde. Dieses Problem gilt für die Analyse von Metall/Protein-Verhältnissen generell und kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Allerdings deuten weder die Gelelektrophorese noch Gelfiltrationen auf nennenswerte Kontaminationen der CtaG<sub>LF</sub>-Proben hin. Densitometrisch aus Coomassiegefärbten Laemmli-Gelen bestimmt, liegt die Reinheit von CtaG<sub>LF</sub> bei 90-95 %. Da für die Rekonstitution in Na-Phosphat, welche ein Cu/Protein-Verhältnis von etwa 1 ergab, vergleichbares Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, kann die Reinheit der Proben als Fehlerquelle ebenfalls ausgeschlossen werden.

Wahrscheinlicher ist vielmehr, dass Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) selbst als Chelator wirkt und während der Rekonstitution einen Großteil der zugegebenen Metallionen abfängt. Die Affinität von Tris für ein- und zweiwertige Metallionen sollte zwar wesentlich geringer sein als die Affinität von CtaG für Cu(I). Da die Puffersubstanz jedoch mit 50 mM in großem Überschuss vorliegt (die Proteinkonzentration beträgt etwa 50 µM), wird das Gleichgewicht offensichtlich auf die Seite des Tris-Metall-Komplexes verschoben.

Besonders auffällig ist in dieser Rekonstitutionsserie die Bindung von Fe<sup>2+</sup>. Ein signifikant erhöhter Fe-Gehalt von ca. 3 Fe/Protein tritt in diesem Experiment nach der Rekonstitution von CtaG<sub>LF</sub> mit Fe<sup>2+</sup> auf. Ob es sich hierbei um eine physiologisch relevante Beobachtung oder ein Artefakt handelt, kann zwar nicht abschließend geklärt werden, vieles spricht jedoch für eine unspezifische Fe-Bindung. Zum einen variiert der Fe-Gehalt in verschiedenen Versuchsreihen sehr stark und zum anderen sind die Fe/Protein-Verhältnisse mit bis zu 7,81 Fe/CtaG<sub>LF</sub> weit von sinnvoll interpretierbaren Stöchiometrien entfernt. Weiter unterscheidet sich Fe<sup>2+</sup> von den übrigen hier untersuchten Metallionen insofern, als es relativ leicht zu Fe<sup>3+</sup> oxidieren kann. Dieses wird von Tris nicht gebunden und aufgrund der überwiegend negativen Oberflächenladung von CtaG<sub>LF</sub> (siehe Abbildung 56 - Darstellung der Oberflächenelektrostatik von UE I und CtaG., S.157) ist eine unspezifische Bindung von



Kationen an die Proteinoberfläche gut möglich. Diese wäre bei einem dreiwertigen Kation stärker ausgeprägt, als bei den übrigen ein- und zweiwertigen Kationen. Es wurden zwar Vorkehrungen getroffen, um möglichst anaerob zu arbeiten und um unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren. Die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  und eine unspezifische Bindungen an die Proteinoberfläche kann aber auch unter mikroaeroben Bedingungen und bei einer vergleichsweise hohen Ionenstärke von 0,3 M nicht ausgeschlossen werden. Ein weiteres Argument gegen eine physiologische Bedeutung der beobachteten Fe-Bindung findet sich in der Verteilung zwischen den oligomeren Zuständen. Während die unrekonsituierte apo-Form von CtaG<sub>LF</sub> überwiegend als Monomer vorliegt (Elutionsvolumen von ca. 65 ml) und die mit Cu(I) rekonsituierte Form eine leichte Verschiebung in Richtung des Dimers (Elutionsvolumen von ca. 50 ml) aufweist, liegt CtaG<sub>LF</sub> nach der Inkubation mit  $\text{Fe(II)Cl}_2$  überwiegend in aggregierter Form vor (ca. 42 ml).



**Abbildung 30 - Elutionsprofile von CtaG<sub>LF</sub> nach Rekonstitutionen in Tris/Acetat pH 8**

**A.** Das unbehandelte apo-Protein liegt in Tris/Acetat überwiegend als Monomer (ca. 65 ml) vor. **B.** Die Rekonstitution mit Cu(I) führt zu einer partiellen Verschiebung in Richtung des CtaG<sub>LF</sub>-Dimers (ca. 50 ml), wobei das geringe Ausmaß der Dimerisierung mit der ebenfalls niedrigen Erhöhung des Cu-Gehalts (siehe Abbildung 29A) in Tris/Acetat einhergeht. **C.** Die Inkubation mit  $\text{Fe(II)Cl}_2$  führt zur Bildung von Aggregaten (ca. 42 ml).

Es ist also wahrscheinlich, dass in diesem *in vitro* Experiment Eisenionen an die negativ geladene Proteinoberfläche von CtaG<sub>LF</sub> binden, dadurch die elektrostatische Abstoßung einzelner CtaG<sub>LF</sub>-Moleküle aufheben und die Aggregation des Proteins fördern. Mit Hilfe einer separaten Bestimmung der Metall/Protein-Verhältnisse für jeden einzelnen oligomeren Zustand könnte eruiert werden, ob Eisen primär in CtaG<sub>LF</sub>-Aggregaten vorliegt oder auch in physiologisch sinnvollen Stöchiometrien an das Monomer oder Dimer gebunden wird.

Trotz der niedrigen Absolutwerte und der unspezifischen Bindung von Fe-Ionen lassen sich aus den vorliegenden Daten einige Schlüsse über die metallbindenden Eigenschaften von CtaG ziehen. Zum einen wird deutlich, dass Kupfer in der reduzierten Cu(I)-Form vorliegen muss, um von CtaG<sub>LF</sub> gebunden zu werden. Während die Rekonstitution mit Cu(I) zu einer Erhöhung des Kupfergehalts um 70 % (von 0,18 auf 0,31) führt, bleibt der Kupfergehalt nach Rekonstitution mit Cu(II) unverändert bei 0,18. Weiterhin lässt sich

feststellen, dass CtaG<sub>LF</sub> aus einer Mischung verschiedener Metallionen selektiv Cu(I) bindet. Die Rekonstitution mit Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup> alleine führt zwar zu einer leichten Erhöhung der jeweiligen Metall/CtaG<sub>LF</sub>-Verhältnisse. Werden Cu(I), Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> jedoch gleichzeitig angeboten, erhöht sich lediglich der Kupfergehalt von CtaG<sub>LF</sub>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> werden nicht mehr gebunden. *CtaG<sub>LF</sub> ist also ein spezifisch Cu(I) bindendes Protein.*

#### 4.4. Weitere Konkurrenzexperimente

Da der zunächst verwendete Tris/Acetat Puffer aufgrund der komplexbildenden Eigenschaften des Tris keine stöchiometrische Rekonstitution von CtaG<sub>LF</sub> mit Cu(I) zulässt, wurden weitere Puffersysteme für das Konkurrenzexperiment eingesetzt. Die ausschließlich mit Kupferionen durchgeführte Rekonstitution war in Natriumphosphatpuffer pH 8 erfolgreich. Dieses Puffersystem konnte hier jedoch nicht eingesetzt werden, da Cu(II), Co, Fe, Mn und Ni als schwer lösliche Metallphosphate präzipitieren. Eine Vielzahl der gängigen Puffersysteme, insbesondere die meisten der sogenannten *Good* Puffer, wie beispielsweise HEPES, MOPS, EPPS oder TAPS schieden für das Experiment ebenfalls aus, da sie Schwefel enthalten und somit eine TXRF- oder ICP-MS-basierte Bestimmung des Metall/Protein-Verhältnisses aus dem Metall/Schwefel-Verhältnis unmöglich machen. Andere schwefelfreie Systeme, die im Bereich um pH 8 puffern, wie z.B. Tricin, Glycin, Glycylglycin, Citrat, ADA oder Ethanolaminbasierte Substanzen erwiesen sich ebenso als ungeeignet, da sie, wie Tris, als Chelatoren für Metallionen wirken. Nachdem tatsächlich keine gängige Puffersubstanz für den Bereich um pH 8 identifiziert werden konnte, die weder Schwefel enthält noch komplexbildende Eigenschaften besitzt, wurde eine Reihe von Konkurrenzexperimenten mit Phosphatpuffer im sauren pH-Bereich durchgeführt. Die Bildung von Metall-Phosphat-Komplexen findet hauptsächlich im basischen Bereich statt und eine Testreihe bei verschiedenen pH-Werten zeigte, dass bei pH 6 nur noch eines, bei pH 5,5 keines der verwendeten Metalle mehr nennenswerte Präzipitation aufweist.

Die Rekonstitutionen wurden analog zu den oben beschriebenen Tris/Acetat-Experimenten durchgeführt, wobei der Puffer im Zuge der Entfernung von EDTA, BCA und DTT während der Sephadex-G25 Filtration von pH 8 auf pH 5,5 umgestellt wurde.

Die Rekonstitutionen in saurem Phosphatpuffer lieferten regelmäßig superstöchiometrische Kupfer/Protein-Verhältnisse mit wenig reproduzierbaren Absolutwerten. Ein Phänomen, das auf eine säurebedingte Denaturierung des Proteinanteils der Proben zurückgeführt werden kann. Die denaturierten Proteine präzipitieren und werden bei der Probenvorbereitung entfernt. Sie entgehen daher der Detektion per ICP-MS. Die gebundenen Metallionen hingegen werden im Zuge der Denaturierung freigesetzt und liegen in Lösung vor. Sie werden daher auch dann

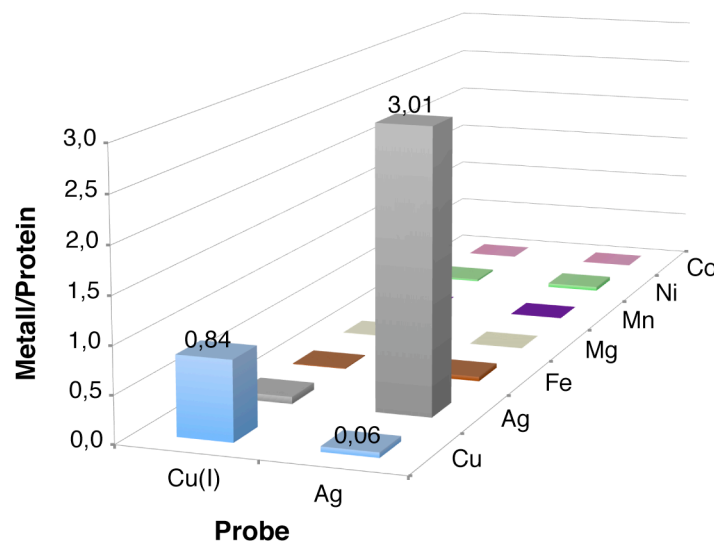
detektiert, wenn ihr entsprechender Proteinbindungspartner bereits denaturiert ist. Dies führt zur Bestimmung erhöhter Metall/Protein-Verhältnisse.

Trotz der quantitativ unbefriedigenden Ergebnisse konnten die Beobachtungen der vorherigen Konkurrenzexperimente qualitativ bestätigt werden: Ausschließlich die Rekonstitution mit Cu(I) oder einer Mischung aus Cu(I),  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  führt zu einer Erhöhung der Kupfer/Protein-Verhältnisse. Die Rekonstitution mit Cu(II) hingegen zeigt keine Erhöhung der Kupferbindung. Im Gegensatz zu den Versuchen in Tris/Acetat pH 8 zeigt die Rekonstitution mit anderen Metallionen, wie Co, Fe, Mn und Ni in saurem Phosphatpuffer jedoch keinerlei Erhöhung der jeweiligen Metall/Protein-Verhältnisse. *CtaG scheint also ausschließlich und selektiv Cu(I) zu binden.*

Zwei Substanzen, deren Eignung für das Konkurrenzexperiment noch getestet werden könnten, wären beispielsweise Cholaminchlorid (kostenintensiv, pKa 7,1) oder Cacodylat (toxische Arsen-Verbindung, pKa 6,2).

#### 4.5. Effekt von Ag(I) auf die Kupferbindung von CtaGLF

In einer weiteren Rekonstitutionsreihe wurde der Effekt von Ag(I)-Ionen auf die Kupferbindung untersucht. Wird CtaGLF in Tris/Acetat mit Ag(I) rekonstituiert zeigt sich ein nahezu vollständiger Verlust des zuvor gebundenen Kupfers. Stattdessen wird Ag(I) in einer reproduzierbaren Stöchiometrie von 3 Ag/Protein gebunden.



**Abbildung 31 - Rekonstitution von CtaGLF mit Ag(I)-Ionen**

Die Rekonstitution mit Ag(I) führt zu einer Verdrängung der zuvor gebundenen Cu-Ionen und zu einem Ag/Protein-Verhältnis von 3.

#### Diskussion

Ag(I) gilt ebenso wie Hg(II) als stabiles Cu(I)-Analogon (Palumaa, Kangur et al. 2004). Mit einem Ionenradius von  $1,13 \text{ \AA}$  ist es zwar etwas größer als Cu(I) mit  $0,98 \text{ \AA}$ , kann aber aufgrund seiner ähnlichen Koordinationsanforderungen Cu(I) in einigen Metall-Thiolat-Clustern ersetzen. Erfolgreich wurden solche Substitutionen beispielsweise für das Metallothionein Cup1 (Peterson, Narula et al. 1996) und den Transkriptionsfaktor

Ace1 aus Hefe (Dameron, Winge et al. 1991) durchgeführt. Das Kupferchaperon Cox17 welches vier Cu(I)-Ionen in einem Polythiolat-Cluster bindet, kann hingegen nicht mit Ag(I)-Ionen rekonstituiert werden (Palumaa, Kangur et al. 2004).

Die Rekonstitution von CtaG<sub>LF</sub> mit Ag(I)-Ionen führt zur Bindung von drei Silberionen pro CtaG<sub>LF</sub>-Monomer, wobei das zuvor gebundene Kupfer nahezu vollständig verdrängt wird (siehe Abbildung 31). Es handelt sich also tatsächlich um eine Substitution von Cu(I) durch Ag(I). Allerdings stimmt die Stöchiometrie des Ag(I)-CtaG<sub>LF</sub> Komplexes nicht mit der von Cu(I)-CtaG<sub>LF</sub> überein. Das entstehende Ag-CtaG<sub>LF</sub> kann daher nicht als Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Analogon betrachtet werden. Im Gegensatz zu zwei Cu(I)-Ionen pro Dimer, werden im Fall von Ag-CtaG<sub>LF</sub> insgesamt sechs Metallionen pro Dimer koordiniert. Anstelle von Komplexen, in denen Ag(I)-Ionen zwei, drei oder vierfach koordiniert vorliegen, könnte auch eine kovalente Bindung zwischen Ag(I) und dem Cysteinthiolat gebildet werden. Es entstünde ein C-S-Ag Thioether ähnlich dem Silbersulfid (Ag-S-Ag). Im Gegensatz zu der Ag(I)-Substitution bei Ace1 (Dameron, Winge et al. 1991) wird CtaG<sub>LF</sub> vor der Zugabe von Ag(I) mit DTT reduziert, was die Reaktivität der Cysteinschwefel erhöht. Sollte Ag(I) lediglich komplexiert sein, müsste das Metallion bei einer Denaturierung zumindest teilweise in Lösung gehen, was zum einen durch eine Protonierung des Thiolats zum Sulfhydryl bei niedrigen pH-Werten und durch eine erhöhte Ionenstärke erleichtert werden könnte. Beispielsweise könnte Ag-CtaG<sub>LF</sub> mit Trichloressigsäure unter Hochsalzbedingungen denaturiert werden. Eine anschließende Bestimmung der Ag-Konzentration in Überstand und Pellet könnte Aufschluss darüber geben, ob das Metall kovalent oder ionisch an CtaG gebunden wurde. Außerdem könnte die Silberrekonstitution mit CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten durchgeführt werden, bei denen einzelne Cysteinreste fehlen. Korreliert das Ag/Protein-Verhältnis mit der Anzahl der vorhandenen Cysteine, so ist dies ein weiterer Hinweis für eine spezifische Reaktion der Ag-Ionen mit den Thiolatresten.

#### 4.6. Zusammenfassung

Um zu untersuchen, ob CtaG<sub>LF</sub> neben Kupfer noch weitere Metallionen binden kann, wurde die Rekonstitution des potentiellen Kupferchaperons mit einer Reihe von Metallsalzen durchgeführt. Desweiteren wurde dem Protein eine Mischung verschiedener Metallsalze angeboten, um zu verifizieren, dass CtaG selektiv Cu(I) bindet. Da die meisten der untersuchten Metallionen in Phosphatpuffer (pH 8) präzipitieren, mussten für diese Experimente andere Pufferbedingungen gewählt werden als für die zuvor etablierte reine Kupferrekonstitution. Sowohl in Tris/Acetat pH 8 als auch in Natriumphosphat pH 5,5 zeigt sich, dass CtaG<sub>LF</sub> bevorzugt Cu(I) bindet. Dies trifft nicht nur zu, wenn CtaG<sub>LF</sub> mit Cu(I), Cu(II), Co(II), Fe(II), Mn(II), Mg(II) oder Ni(II) einzelnen rekonstituiert wird, sondern auch, wenn diese Metallionen in einer Mischung simultan angeboten werden. Allerdings weichen die Stöchiometrien der resultierenden Metall/CtaG<sub>LF</sub>-Komplexe von den Erwartungen ab. Während Tris Komplexe mit zweiwertigen Metallionen bildet und mit CtaG<sub>LF</sub> um die Metallionen konkurriert, führt die Verwendung von saurem Phosphatpuffer zu einer partiellen Denaturierung des Proteins. Ein optimales Puffersystem für Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Metallionen konnte nicht identifiziert werden, aber zusammengenommen deuten die Ergebnisse aus verschiedenen Rekonstitutionsreihen darauf hin, dass CtaG ein selektiv Cu(I) bindendes Protein ist.



## 5. Untersuchung der Kupferbindungsstelle mittels gerichteter Mutagenese

### 5.1. Einleitung

Um Liganden zu identifizieren, die für die Metallbindung von CtaG verantwortlich sind, wurden einige hochkonservierte Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht und die resultierenden CtaG-Mutanten wurden auf ihre kupferbindenden Eigenschaften hin untersucht. Zunächst wurden konservierte Aminosäuren innerhalb der CtaG-Sequenz mit Hilfe einer *MultiSeq* Analyse identifiziert.

### 5.2. Multiseq Analyse

*MultiSeq* (Roberts, Eargle et al. 2006) ist eine Erweiterung für das Strukturvisualisierungsprogramm *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (Humphrey, Dalke et al. 1996). Mit Hilfe dieser Anwendung können Sequenzvergleiche mit großen Datenmengen und unter Berücksichtigung taxonomischer Zugehörigkeiten durchgeführt werden. Ein besonderer Vorteil von *MultiSeq* gegenüber anderen *Alignment* Programmen ist die Möglichkeit, die Ergebnisse des Sequenzvergleichs anhand der Struktur des Proteins zu visualisieren. So lässt sich schnell sagen, ob eine bestimmte hochkonservierte Aminosäure beispielsweise an der Proteinoberfläche oder in der Nähe des aktiven Zentrums liegt.

Insgesamt 341 CtaG/Cox11-Sequenzen wurden bei einem *blastp* über die gesamte NCBI-Datenbank identifiziert (*word size 3; expect 10; Blosun62; gap costs: existence 11, extension 1; results 1000*). Sequenzen die doppelt vorkamen oder keine taxonomische Metainformation enthielten wurden entfernt und die verbleibenden 247 CtaG Sequenzen wurden in pro- und eukaryontische Sequenzen unterteilt. *MultiSeq alignments* wurden zunächst innerhalb dieser beiden Gruppen durchgeführt und anschließend wurden die beiden Gruppen miteinander verglichen (Abbildung 32). Das Programm greift hierfür auf den bekannten ClustalW-Algorithmus zurück (Thompson, Higgins et al. 1994).

Basierend auf der NMR-Struktur des löslichen Fragments eines CtaG-Homologs aus *Sinorhizobium meliloti* (Banci, Bertini et al. 2004), wurde der Konservierungsgrad der einzelnen Aminosäuren anschließend auf das dreidimensionale Strukturmodell übertragen (Abbildung 33 A). Aus dieser Darstellung konnten dann besonders hoch konservierte Oberflächenreste identifiziert werden (Abbildung 33 B). Als "hoch konserviert" wurden Aminosäuren definiert, die in über 70 % der 247 CtaG Sequenzen identisch sind. Eine Ausnahme ist Threonin 133, welches in Prokaryoten zwar hoch konserviert ist, an dessen Stelle in Eukaryoten jedoch ein Glutamat sitzt. Neben dem CFCF-Motiv liegen an der Proteinoberfläche fünf ionische (acidic: E91, E134, E141, D152; basic: K126), sieben

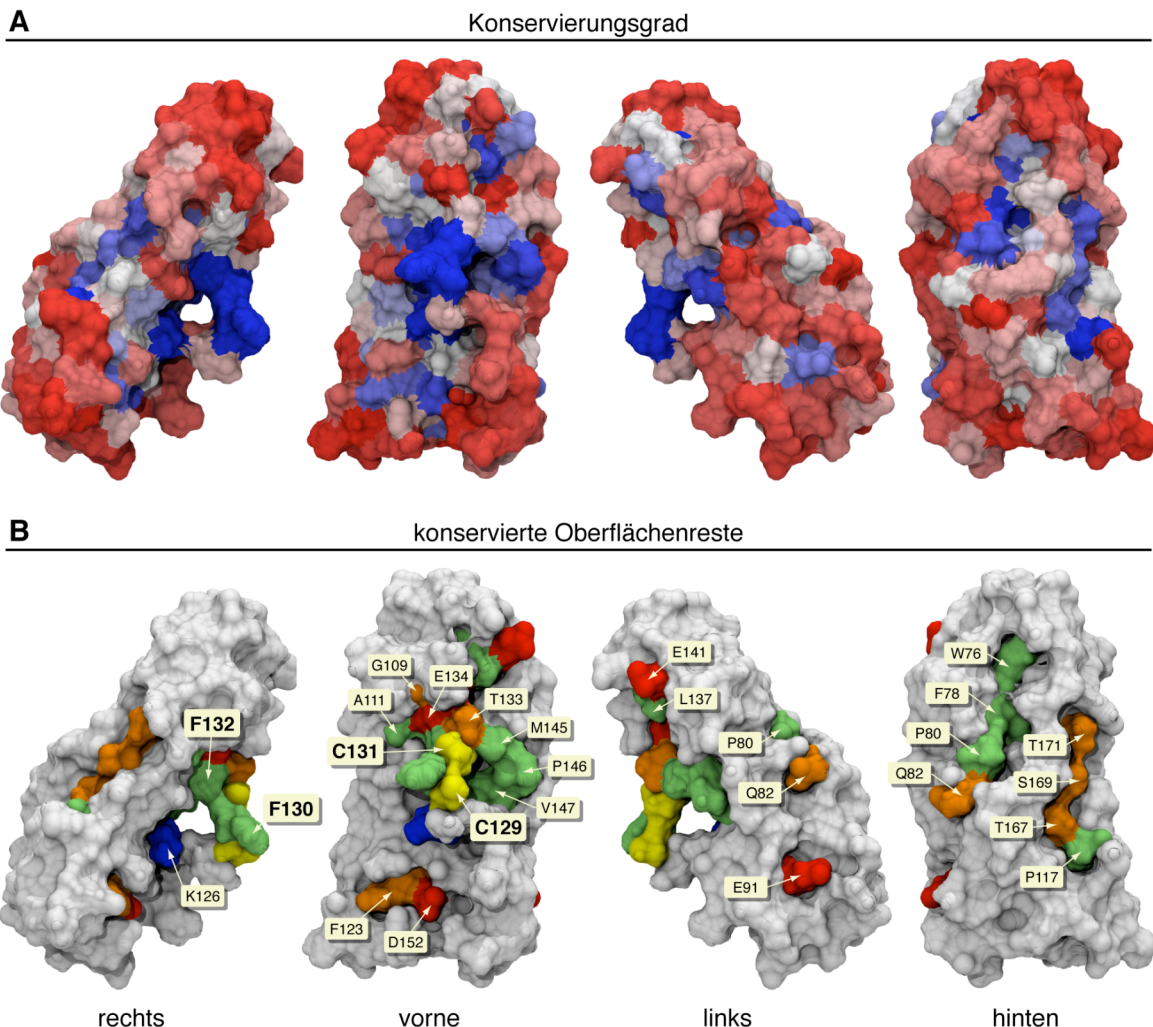
### III. Ergebnisse & Diskussion

polare (G75, Q82, G109, T133, T167, S169, T171) und neun unpolare Aminosäuren (W76, F78, P80, A111, P117, F124, M145, P146, V147), die hoch konserviert sind.

Sequence Name	720	730	740	750	760	770	780
<b>Auswahl</b>							
<input type="checkbox"/> COO2_PARDE	F Y E A	N N T D E P Y T	G T A S Y N V A	D A A G Y F F N K I E	C F C F T E Q T L Q P G E R Y E M P Y S F F Y D	A D L Y N D R D A G V I R D I	
<input type="checkbox"/> 1S09	M Y R A K N	L A S T P T T G	A T F N V T F	M A A G A Y F N K Y Q	C F C F T E T T L E P G E R E M E M P Y V F F Y D	P E I Y K P V E T G G I K T L	
<input type="checkbox"/> mesapCox11	M Y R A K N	L A S T P T T G	A T F N V T F	M A A G A Y F N K Y Q	C F C F T E T T L E P G E R E M E M P Y V F F Y D	P E I Y K P V E T G G I K T L	
<b>Bacteria</b>							
<input type="checkbox"/> 69938326	F Y E A	N N T D E P Y T	G T A S Y N V A	D A A G Y F F N K I E	C F C F T E Q T L Q P G E R Y E M P Y S F F Y D	A D L Y N D R D A G R I R D I	
<input type="checkbox"/> 56697906	F Y E A	N P T D R P Y A	G Q A S Y N V A F Y S A G	G V F D K I A	C F C F E E Q Y L Q P G E R Y Q M P Y T F E Y D	P E I Y N D R D A K V Y H T I	
<input type="checkbox"/> 99071029	F Y E A	H N P T D R P Y A	G Q A S Y N V A F Y S A G	G V F D K I D	C F C F T E Q Y L Q P G E R Y E M P Y S F F Y D	P A I Y D D E G G V Y H T I	
<input type="checkbox"/> 96931529	F Y E A	N P T D R P Y A	G Q A S Y N V A F Y S A G	G V F D K I Q	C F C F T E Q Y L Q P G E R Y Q M P Y T F E Y D	P E I Y D P E A K V Y H T I	
<input type="checkbox"/> 94521552	F Y E A	H N P T D R P Y A	G Q A S Y N V A F Y S A G	G V F D K I Q	C F C F T E Q Y L Q P G E R Y Q M P Y T F E Y D	P E I Y D P E A K V Y H T I	
<input type="checkbox"/> 98137979	F Y E A	N P T D R P Y A	G Q A S Y N V A F Y S A G	G V F D K I Q	C F C F T E Q Y L Q P G E R Y E M P Y S F F Y D	P A I Y K D R D G R Y R Q I	
<input type="checkbox"/> Rhodobacter sp	F Y E A	N P T D R T V A	G T A S Y N V T F	D A A G Y F F A I A	C F C F T E Q Y L A P G E R Y E M P Y S F F Y D	P A I Y K D R D G R Y R Q I	
<b>Eukaryota</b>							
<input type="checkbox"/> Homo sapiens	F Y R A K N	P T D K P Y I G	I S T Y N I Y F F E A G Q V F N K I Q	C F C F E E Q R L N P D E E Y D M P Y F F Y I D	P E F A E D P R M I K Y D L I		
<input type="checkbox"/> Orangutan	F Y R A K N	P T D K P Y I G	I S T Y N I Y F F E A G Q V F N K I Q	C F C F E E Q R L N P D E E Y D M P Y F F Y I D	P E F A E D P R M I K Y D L I		
<input type="checkbox"/> Mouse	F Y K A K N	P T D K P Y I G	I S T Y N I Y F F E A G Q V F N K I Q	C F C F E E Q R L N P D E E Y D M P Y F F Y I D	P E F A E D P R M Y N Y D L I		
<input type="checkbox"/> Arabidopsis	F Y T A E N	K S S A P T	G Y S T Y N V T M K A G Y V F N K I Q	C F C F E E Q R L L P G E Q T D M P Y F F Y I D	P E F E T D P R M D G I T N L I		
<input type="checkbox"/> Drosophila	F Y T A R N	P T D K P Y I G	I S S Y N T F G A A Y V F N K I Q	C F C F E E Q L N P E E Y D M P Y F F Y I D	P P V L D P A L E Y L D S L I		
<input type="checkbox"/> C. elegans	F Y T A R N	P T D K P Y I G	I S S Y N T F G A A Y V F N K I Q	C F C F E E Q L N P E E Y D M P Y F F Y I D	P P V L D P A L E Y L D S L I		
<input type="checkbox"/> Neurospora	F Y T A T N	M S D K D I I G	M A T Y S V F P G E A A P V F S I Q	C F C F E E Q R L N A G E T Y D M P Y F F Y I D	P P V L N D N M K G I E T D I		
<input type="checkbox"/> Yeast	F Y K A K N	K D I I G	M A T Y S V F P G E A A P V F N I Q	C F C F E E Q K L A A G E E I D M P Y F F Y I D	P P F A A D P A M R N I D D I		

**Abbildung 32 - Ausschnitt eines MultiSeq-Alignments von homologen CtaG Sequenzen**

247 CtaG Sequenzen wurden in Pro- und Eukaryoten gruppiert, und zunächst innerhalb der Gruppen einem Alignment mit dem ClustalW-Algorithmus unterzogen. Anschließend wurden die beiden Gruppen miteinander aligned. Gezeigt ist ein Ausschnitt einiger pro- und eukaryotischen Sequenzen, der das potentiell kupferbindende CFCF-Motiv enthält. **Blau** hinterlegte Aminosäuren sind stark konserviert, **rot** hinterlegte sind wenig bis gar nicht konserviert.



**Abbildung 33 - Ergebnisse der MultiSeq-Analyse von CtaG**

Oberflächendarstellungen der löslichen Domäne des CtaG-Homologs aus *S. meliloti* (1SP0). **A**. Die einzelnen Aminosäuren sind nach ihrem Konservierungsgrad gefärbt (**blau**: stark konserviert, **rot**: wenig konserviert). **B**. Die am stärksten konservierten Oberflächenreste sind mit der *Paracoccus denitrificans* Nummerierung versehen und nach ihren Eigenschaften gefärbt (**rot**: sauer, **blau**: basisch, **orange**: polar, **grün**: unipolar, **gelb**: Cysteine). In dieser Darstellung nicht gezeigt sind konservierte Aminosäuren in der Transmembrandomäne bzw. in der linker-Region zwischen löslicher Domäne und Transmembranbereich.



## 5. Untersuchung der Kupferbindungsstelle mittels gerichteter Mutagenese

<i>P.d.</i>	<i>S.m.</i>	<i>R.s.</i>	<i>S.c.</i>	<i>H.s.</i>	% konserviert	bekannte Mutationen in Hefe	Phänotyp	Referenz
E91	E62	E88	E170	E179	80%			
G109	G80	G106	G188	G197	78%	G188D/A235D	kein Wachstum	(Banting und Glerum 2006)
A111	A82	A108	A190	S199	82%			
F123	Y94	Y120	Y202	Y211	83%			
K126	K97	K123	K205	K214	100%	K205E	kein Wachstum	(Banting und Glerum 2006)
C129	C100	C126	C208	C217	100%	C208A	kein Wachstum	(Carr, George et al. 2002), (Banting und Glerum 2006)
						C208A/C210A	kein Wachstum	(Carr, George et al. 2002)
						C111A/C208A/C210A	Cu/Protein 0,2	(Carr, George et al. 2002)
F130	F101	F127	F209	F218	100%	F209A	kein Wachstum	(Banting und Glerum 2006)
C131	C102	C128	C210	C219	100%	C210A	kein Wachstum	(Carr, George et al. 2002), (Banting und Glerum 2006)
						C208A/C210A	kein Wachstum	(Carr, George et al. 2002)
						C111A/C208A/C210A	Cu/protein 0,2	(Carr, George et al. 2002)
F132	F103	F129	F211	F220	100%	F211A	Wildtyp	(Banting und Glerum 2006)
T133	T104	T130	E212	E221				
E134	E105	E131	E213	E222	52%	G169D/E213G/D245G/D265G	kein Wachstum	(Banting und Glerum 2006)
E141	E112	E138	E220	E229	76%			
M145	M116	M142	M224	M233	76%	M224L	Wildtyp	(Carr, George et al. 2002)
P146	P117	P143	P225	P234	93%	P225R	kein Wachstum	(Banting und Glerum 2006)
V147	V118	V144	V226	V235	77%	V226W	kein Wachstum	(Banting und Glerum 2006)
D152	D123	D149	D231	D240	91%			
G75	P46	P72	P154	Q163	72%			
W76	W47	W73	W155	W164	88%			
F78	F49	F75	F157	F166	97%			
P80	P51	P77	P159	P168	89%			
Q82	Q53	Q79	Q161	Q170	53%			
P117	P88	P114	P196	P205	99%	P196A	Wildtyp	(Banting und Glerum 2006)
T167	T139	T165	I247	T256	85%			
S169	S141	S167	H249	S258	82%			
T171	T143	T169	T251	T260	87%			

**Tabelle 14 - Konservierte CtaG-Oberflächenreste und bekannte Mutationen dieser Reste**

Einige der durch die *MultiSeq*-Analyse identifizierten Oberflächenreste von CtaG wurden in anderen Organismen bereits ohne Kenntnis der CtaG-Struktur per Mutagenese untersucht. Nahezu alle Reste, für die Mutagenesedaten vorliegen, sind essentiell für die Funktion der Cytochrom *c* Oxidase. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Nummerierungen mehrerer relevanter Organismen aufgeführt. **P.d.:** *Paracoccus denitrificans*; **S.m.:** *Sinorhizobium meliloti* (Nummerierung der PDB-Struktur 1SP0); **R.s.:** *Rhodobacter sphaeroides*; **S.c.:** *Saccharomyces cerevisiae*; **H.s.:** *Homo sapiens*

### Diskussion

Mit Hilfe der *MultiSeq*-Analyse konnten Aminosäuren identifiziert werden, welche hoch konserviert sind und auf der Oberfläche von CtaG liegen (Abbildung 33). Die meisten dieser Oberflächenreste liegen in der Nähe des CFCF-Motivs und könnten gemeinsam mit diesem eine Rolle bei der Kupferbindung spielen. Funktionelle Gruppen, die allgemein an einer Kupferbindung direkt beteiligt sein können, sind neben Cysteinthiolaten beispielsweise die Imidazolgruppe des Histidins, der Thioether des Methionins und die Carboxylatgruppen von Aspartat und Glutamat. In seltenen Fällen können auch die Hydroxylgruppen von Tyrosin oder Serin, sowie deprotonierte Peptid-Amide an der Ligandierung von Kupferionen beteiligt sein (Davis und O'Halloran 2008).

Von den hochkonservierten Oberflächenresten im Bereich des CFCF-Motivs könnten also neben den beiden Cysteinen lediglich ein Glutamat (E134) und ein Methionin (M145) eine Rolle als Liganden bei der Kupferkoordination spielen. Die anderen Aminosäuren könnten

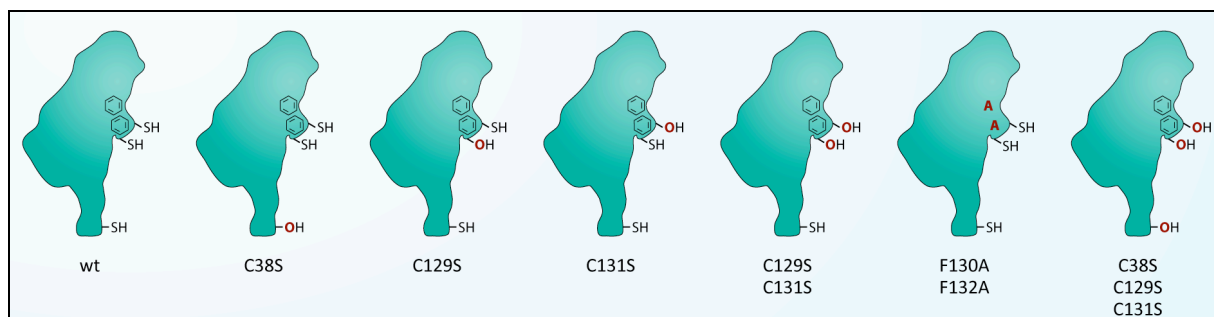
jedoch auch indirekt, durch elektronenziehende bzw. -schiebende Effekte, Einfluss auf das Ligandenfeld und somit auf die Stärke der Kupferbindung nehmen. Sie könnten also an einer Feinjustierung der Kupferaffinität beteiligt sein.

Desweiteren könnten diejenigen konservierten Oberflächenreste, welche selbst keine Liganden für Kupfer sind, auch eine Rolle bei der Dimerisierung von CtaG spielen oder für die Wechselwirkung mit anderen Bindungspartnern, wie beispielsweise der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase, von Bedeutung sein.

Ein Teil der hier identifizierten hochkonservierten Oberflächenreste wurde bereits in vorherigen Untersuchungen, ohne Kenntnis der CtaG-Struktur, mutiert. Interessanterweise haben nahezu alle Mutationen, welche die hier identifizierten Aminosäuren betreffen, einen drastischen Effekt auf die Kupferbindung, bzw. auf die Biogenese der Cytochrom c Oxidase. Diese Beobachtung unterstreicht die Aussagekraft der Multiseq-Analyse und lässt vermuten, dass die übrigen hier identifizierten Oberflächenreste ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Funktion von CtaG spielen.

### 5.3. Kupferbindung spezifischer Mutanten

Einige für die Kupferbindung besonders interessante Aminosäuren wurden per Mutagenese ausgetauscht und die Kupfer/Protein-Verhältnisse der Mutanten wurden per ICP-MS untersucht. Folgende Mutationen wurden in das CtaG<sub>LF</sub>-Gen auf dem Plasmid pGR20 eingeführt:



**Abbildung 34 - Schematische Darstellung der in CtaG<sub>LF</sub> eingeführten Mutationen**

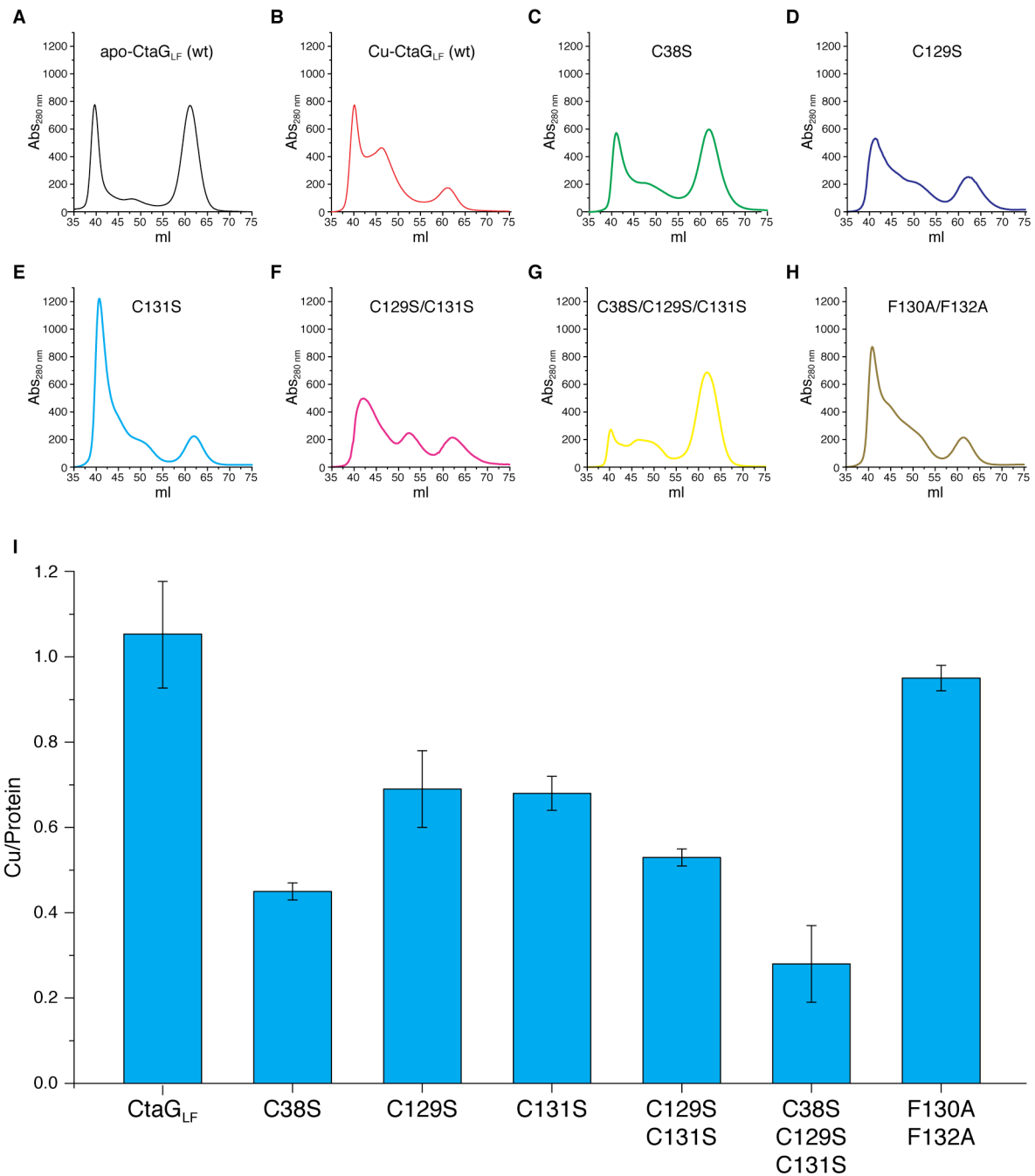
Die beiden Cysteine C129 und C131, welche in dem für CtaG charakteristischen CFCF-Motiv liegen, wurden jeweils einzeln und als Doppelmutante gegen Serin ausgetauscht, um festzustellen ob beide Cysteine aktiv an der Kupferbindung beteiligt sind, und wenn ja, ob eines der beiden einen größeren Anteil an der Metallbindung hat.

In einer weiteren Mutante wurde das dritte Cystein C38 durch ein Serin ersetzt. Dieses Cystein ist ebenfalls in sämtlichen CtaG-Sequenzen konserviert und befindet sich in direkter Nähe der Transmembranhelix. In Anbetracht der Tatsache, dass der Zielort des Cu<sub>B</sub>-Ions, das binukleäre Zentrum der Cytochrom c Oxidase, ca. 13 Å unterhalb der Membranoberfläche liegt, kommt diesem Cystein eine besondere Bedeutung zu: Es könnte beispielsweise eine Rolle als transienter Ligand beim Transfer des Kupfers vom

CFCF-Motiv in die Membran spielen oder eine zweite vom CFCF-Motiv unabhängige Kupferbindungsstelle des Proteins darstellen. Neben einer einfachen C38S Mutation wurde auch eine Trippelmutante untersucht, in der alle drei Cysteine fehlen (C38S, C129S, C131S).

Ebenfalls auffällig ist der große Anteil an aromatischen Aminosäuren in der CtaG-Sequenz. Mit 13 Phenylalaninen, die größtenteils zu über 90 % konserviert sind, verfügt CtaG über einen Phenylalaninanteil von knapp 7 %. Verglichen mit dem *Paracoccus denitrificans* Proteom, das insgesamt 3,5 % Phenylalanine enthält und mit eukaryotischen Organismen, die eine beobachtete Frequenz von 4 % aufweisen, ist der Phenylalaninanteil von CtaG signifikant erhöht. Besonders hervorzuheben sind die Phenylalanine innerhalb des CFCF-Motivs, welches anstelle des bei Kupferchaperonen häufig auftretenden CXXC-Motivs für die Kupferbindung von CtaG verantwortlich sein könnte. Die Phenylalanine scheinen für die Funktion von CtaG essentiell zu sein, und ihre Rolle bei der Kupferbindung soll durch die simultane Mutation von F130 und F132 zu Alaninen überprüft werden.

Sämtliche Mutationen wurden mit Hilfe der gerichteten Mutagenese (Material & Methoden 2.8, S.36) eingeführt und die erhaltenen Plasmide wurden nach Sequenzierung für die heterologe Expression in *E. coli* C43 eingesetzt. Die Mutanten wurden analog zu nicht modifiziertem CtaG<sub>LF</sub> exprimiert, aufgereinigt und einer Kupferrekonstitution (Material & Methoden 3.7, S.50) unterzogen. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe einer Superdex 75 Gelfiltration von ungebundenen Kupferionen befreit und per ICP-MS auf ihren Metall/Protein-Gehalt hin untersucht.



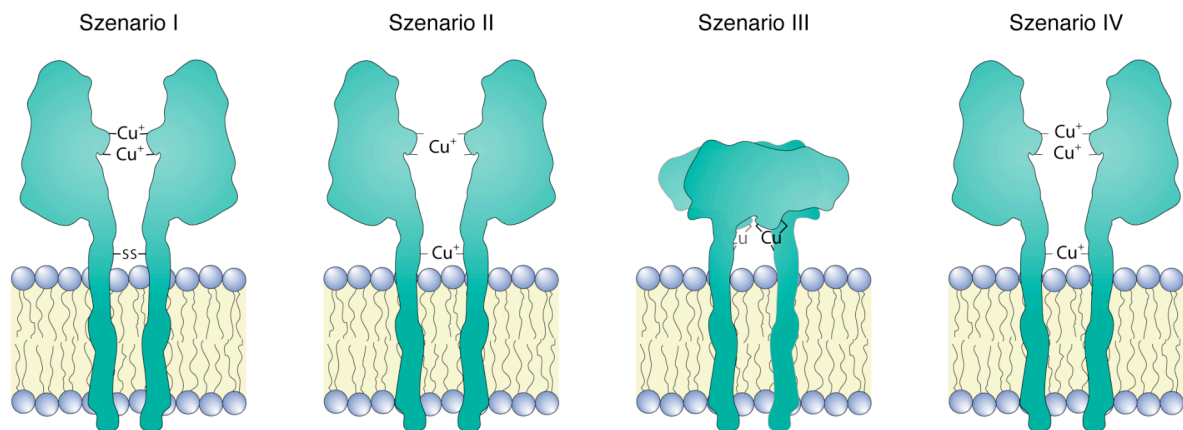
**Abbildung 35 - Elutionsprofile und Kupfer/Protein-Verhältnisse der Cta<sub>GLF</sub>-Mutanten**

Cta<sub>GLF</sub>-Mutanten wurden heterolog exprimiert, aufgereinigt und mit Cu(I) rekonstituiert. Überschüssiges Kupfer wurde nach der Rekonstitution per Gelfiltration entfernt. Die Elutionsprofile **C-H** zeigen die Verteilung zwischen den oligomeren Zuständen der verschiedenen Cta<sub>GLF</sub>-Varianten während dieses Gelfiltrationsschrittes. Zum Vergleich sind in **A** und **B** die oligomeren Zustände des kupferfreien, sowie des rekonstituierten wildtyp Cta<sub>GLF</sub> dargestellt. Bei etwa 62 ml eluiert das Monomer, zwischen 48 und 53 ml eluiert das Dimer, welches in zwei verschiedenen Spezies vorliegen kann, und mit dem Ausschlussvolumen von etwa 40 ml eluieren höhermolekulare Aggregate. Das Balkendiagramm **I** zeigt die per ICP-MS bestimmten Cu/Protein-Verhältnisse des Gesamtproteins.

## Diskussion

Die Mutageneseversuche zeigen, dass alle drei Cysteine einen Einfluss auf die Kupferbindung haben. Während die Mutation von C38 zu einer Verringerung der Kupferbindung um etwas über 50 % führt, zeigt der Austausch von C129 oder C131 lediglich eine Verringerung von etwa 30 %. Die gleichzeitige Mutation beider im CFCF-Motiv gelegenen Cysteine führt jedoch ebenfalls zu einer Reduktion der Kupferbindung um etwa 50 %. Diese Ergebnisse lassen sich auf den ersten Blick durch zwei unabhängige Bindungsstellen, wie sie in Abbildung 36 Szenario II dargestellt sind, erklären. Auch der nahezu vollständige Verlust der Kupferbindung bei gleichzeitiger Mutagenese aller Cysteine passt gut in dieses Bild.

Berücksichtigt man jedoch die verschiedenen oligomeren Zustände der CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten, zeigt sich ein anderes Bild. Beispielsweise ist dem Elutionsprofil der C38S-Mutante zu entnehmen, dass nach der Rekonstitution noch etwa 50 % des Proteins im monomeren Zustand vorliegen (Abbildung 35 C). Aus der Analyse des Wildtyp-Fragments (Abbildung 27, S.94) wissen wir jedoch, dass das CtaG<sub>LF</sub> Monomer kein Kupfer bindet. Somit liegt das Protein zu 50 % in kupferfreier Form vor und die ~0,5 Cu/Gesamtprotein verteilen sich lediglich auf die höhermolekularen Zustände von CtaG. Für die metallhaltige CtaG<sub>LF</sub>-Fraktion ergibt sich somit ein Cu/Protein-Verhältnis von 1. Die C38S Mutante liegt also nicht mit einem Kupferion pro Dimer vor, sondern zu 50 % kupferfrei und zu 50 % mit zwei Kupferionen pro Dimer.



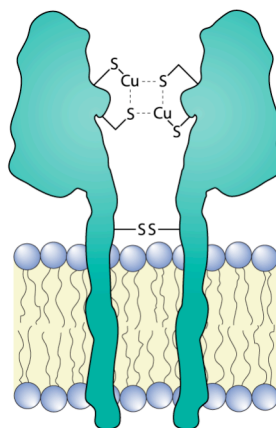
**Abbildung 36 - Mögliche Szenarien für die Kupferbindung von CtaG**

Mehrere Szenarien können für die Bindung von Kupfer an CtaG postuliert werden. Diese werden im Text anhand der Datenlage diskutiert. Die Szenarien I-III basieren auf der Bindung von zwei Kupferionen durch das CtaG-Dimer, während Szenario IV von drei Kupferionen pro Dimer ausgeht. **Szenario I** wurde bereits von Banci et al postuliert und sieht ein binukleäres Kupferzentrum im Bereich des CFCF-Motivs vor. Cystein 38 dient in diesem Modell zur Stabilisierung des Komplexes durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke. **Szenario II** sieht zwei Kupferbindungsstellen vor: Eine lineare Cu(I)Cys<sub>2</sub>-Koordination nahe der Membranoberfläche sowie eine quadratisch planare, bzw. tetraedrische Cu(I)Cys<sub>4</sub>-Koordination am CFCF-Motiv. Eine weitere Variante ist in **Szenario III** dargestellt: Die Thiolatgruppen des CFCF-Motivs einer Peptidkette ligandieren Cu(I) gemeinsam mit dem nahe der Membran gelegenen Cystein der zweiten Peptidkette. Auf diese Weise entstehen zwei symmetrische Kupferbindungsstellen. Tatsächlich ist die dreifache Koordination von Cu(I) die am häufigsten beobachtete. **Szenario IV** basiert auf der Annahme, dass drei Kupferionen von CtaG gebunden werden. Neben dem binukleären Cluster am CFCF-Motiv, würde in diesem Modell ein drittes Kupferion in einer linearen Koordination von den nahe der Membran gelegenen Cysteinen gebunden werden.

Das zunächst naheliegende Modell der zwei unabhängigen Bindungsstellen aus Szenario II passt zwar gut zu den Ergebnissen der Metallanalyse, hält aber einer näheren Überprüfung anhand der oligomeren Zustände nicht Stand. Um der realen Situation näher zu kommen, sollen daher einige denkbare Szenarien anhand der Datenlage diskutiert werden. Szenario I wurde bereits von der Gruppe um Lucia Banci postuliert (Banci, Bertini et al. 2004), die Szenarien II-IV werden hier neu vorgeschlagen.

#### **Szenario I:**

In diesem Modell dient das CFCF-Motiv als einziges kupferbindendes Element und ligandiert an der Kontaktfläche des CtaG-Dimers, gemeinsam mit dem CFCF-Motiv der zweiten Peptidkette, ein zweikerniges Cu(I)-Zentrum. Da EXAFS-Messungen an dem von Banci et al. beschriebenen CtaG-Homolog aus *Sinorhizobium meliloti* auf die Bindung von Cu(I) durch drei Schwefelatome hindeuten, dient in diesem Modell jeweils ein Thiolat als klassischer Kupferligand, das zweite als Brückenligand. Das dritte Cystein (C38) soll keine metallbindende Funktion haben, sondern durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zur Stabilisierung des Dimers dienen. Diese Hypothese für die Funktion des Cystein 38, beruht auf der Tatsache dass die CtaG-Struktur Ähnlichkeiten zu den  $\beta$ -Immunglobulinen aufweist und diese wiederum durch eine nahe der Transmembranhelix gelegene Disulfidbrücke dimerisieren.



#### **Abbildung 37 - Mögliche Koordination der Kupferionen in Szenario I**

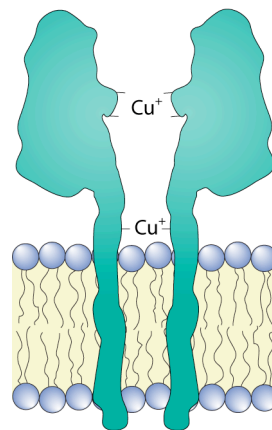
EXAFS Messungen an einem homologen Protein deuten darauf hin, dass zwei Kupferionen in räumlicher Nähe liegen und jeweils durch drei Schwefelatome ligandiert werden. Diese dreifach Koordination kann auch für ein Cu:S-Verhältnis von 2:4 erreicht werden, wenn zwei Schwefelatome als Brückenliganden dienen. Das dritte Cystein dient in diesem von Banci *et al.* 2004 vorgeschlagenen Modell zur Stabilisierung des Dimers, indem es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke dient.

Ein Argument für dieses Szenario ist, dass CtaG<sub>LF</sub> in Abwesenheit von Cystein 38 verstärkt als Monomer vorliegt (Abbildung 35 C und G). Gegen das Modell spricht jedoch, dass (1) CtaG<sub>LF</sub> nach der Mutation beider Cysteine des CFCF-Motivs noch ein Kupfer/Protein-Verhältnis von 0,5 aufweist. Erwarten würde man stattdessen einen nahezu vollständigen Verlust der Kupferbindung. Da in Einzelfällen auch die

Hydroxylgruppe von Serin als Kupferligand dienen kann, ist zwar eine Restbindung durch die Serine denkbar, diese wäre jedoch mit 50 % der Wildtyp-Bindung sehr hoch. (2) Desweiteren ergäbe die Verringerung der Kupferbindung durch die zusätzliche Mutagenese von Cystein 38 (C38S C129S C131S) nur Sinn, wenn das Dimer eine Voraussetzung für die Bindung von Kupfer wäre. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da (3) das CtaG<sub>LF</sub>-Dimer auch ohne Kupfer vorliegen müsste, was für das apo-Protein jedoch nicht bestätigt werden kann (Abbildung 35 A). Szenario I erscheint zwar möglich, weist aber einige Widersprüche auf.

### Szenario II:

Szenario II sieht zwei voneinander getrennte Kupferbindungsstellen vor: Eine am CFCF-Motiv, sowie eine zweite nahe der Membranoberfläche. Die Bindungsstelle nahe der Membran könnte sowohl in einer linearen Cu(I)Cys<sub>2</sub>-Koordination vorliegen, als auch weitere Liganden, wie beispielsweise die Carboxylatgruppe des Aspartat 152 (siehe Abbildung 33B, S.110) involvieren. Für die Bindungsstelle am CFCF-Motiv käme beispielsweise eine quadratisch planare, bzw. tetraedrische Cu(I)Cys<sub>4</sub>-Koordination in Frage. Dieses Modell würde zu dem oben postulierten, sehr spekulativen Mechanismus passen (siehe Diskussion zur Stöchiometrie der Kupferbindung 3.3.3, S.95), der eine Funktion von CtaG bei der Assemblierung beider Kupferzentren der Cytochrom c Oxidase vorschlägt: Das nahe der Membranoberfläche gelegene Kupferion könnte zur Assemblierung des Cu<sub>B</sub>-Zentrums dienen, während das weiter oben gebundene Kupferion gemeinsam mit dem von Sco1 oder PCuAC gelieferten Kupferion das zweikernige Cu<sub>A</sub>-Zentrum bilden könnte (Abbildung 38).



### Abbildung 38 - Mögliche Koordination der Kupferionen nach Szenario II

Dieses Szenario II, bei dem Cu(I) an zwei verschiedenen Bindungsstellen von CtaG vorliegt, könnte mit einer Beteiligung von CtaG an der Biogenese beider Cu-Zentren der Cytochrom c Oxidase zusammenpassen. Während das nahe der Membranoberfläche gebundene Cu-Ion für die Assemblierung des innerhalb der Membran gelegenen Cu<sub>B</sub> : Häm a<sub>3</sub> Zentrums genutzt würde, könnte das am CFCF-Motiv ligandierte Cu-Ion zur Komplettierung der, durch Sco1/PCuAC vorbereiteten Untereinheit II dienen.

Das Vorhandensein von zwei unabhängigen Kupferbindungsstellen, bestehend aus dem CFCF-Motiv einerseits und Cystein 38 andererseits, würde die Kupfer/Protein-Verhältnisse der Mutanten zwar hervorragend erklären. Die Mutagenese von Cystein 38 führt zum Verlust eines Kupferions und die Mutagenese der Cysteine 129 und 131 führt zum Verlust des anderen Kupferions. Wird nur eines der beiden Cysteine im CFCF-Motiv entfernt, kommt es zu einer Destabilisierung aber nicht zum vollständigen Verlust der Kupferbindung. Das Modell passt jedoch nicht mit den beobachteten oligomeren Zuständen von CtaG zusammen. Während das Modell beispielsweise für die C38S Mutante ein Dimer vorhersagt, welches 1 Cu/Dimer bindet, wird experimentell nachgewiesen, dass 50 % des Proteins als kupferfreies Monomer vorliegen und die restlichen 50 % 2 Cu/Dimer binden. Desweiteren existieren zwar sowohl lineare Cu(I)-Cys<sub>2</sub>- als auch tetraedrische, bzw. quadratisch planare Cu(I)-Cys<sub>4</sub>-Koordinationen, am häufigsten tritt für Cu(I) jedoch eine 3-fach Koordination auf. EXAFS-Messungen an CtaG-Homologen aus Hefe und *S. meliloti* deuten auf eine 3-fache Koordination der Cu(I)-Ionen hin (Carr, George et al. 2002; Banci, Bertini et al. 2004). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Cu(I)-Ionen auch in dem hier untersuchten *Paracoccus* CtaG 3-fach koordiniert werden. Szenario II entspricht daher sehr wahrscheinlich nicht der realen Situation.

#### **Szenario III:**

Das dritte Modell sieht eine Beteiligung aller drei Cysteine an der Koordination der Kupferionen vor, wobei das CFCF-Motiv der einen Peptidkette und das Cystein 38 der anderen Peptidkette eine Einheit bilden durch die das Kupferion trigonal koordiniert wird. Dies würde mit den EXAFS Daten der CtaG-Homologe (Carr, George et al. 2002; Banci, Bertini et al. 2004) und der Tatsache, dass Cu(I) in den meisten Fällen 3-fach koordiniert wird, zusammenpassen. Die Überkreuz-Koordination in diesem Szenario ermöglicht also die Bindung von zwei Kupferionen an spiegelbildlichen Bindungsstellen, die verglichen mit den Szenarien II und III räumlich nah beieinander liegen.

Eine ähnliche, zueinander entgegengesetzte Orientierung der CtaG-Moleküle wurde im Rahmen von Simulationen für das CtaG-Dimer vorhergesagt. Diese *docking* Simulationen wurden mit dem Programm HADDOCK durchgeführt und basieren auf (1) der Struktur des bakteriellen *Sinorhizobium meliloti* CtaG-Fragments, (2) der Sequenz des humanen Cox11 und (3) dem in Szenario I beschriebenen 2 Cu-4 S-Cluster (van Dijk, Ciofi-Baffoni et al. 2007). Die Simulation sagte eine entgegengesetzte Orientierung der beiden Monomere und eine Kontaktfläche seitlich des CFCF-Motivs voraus (siehe Abbildung 39B).

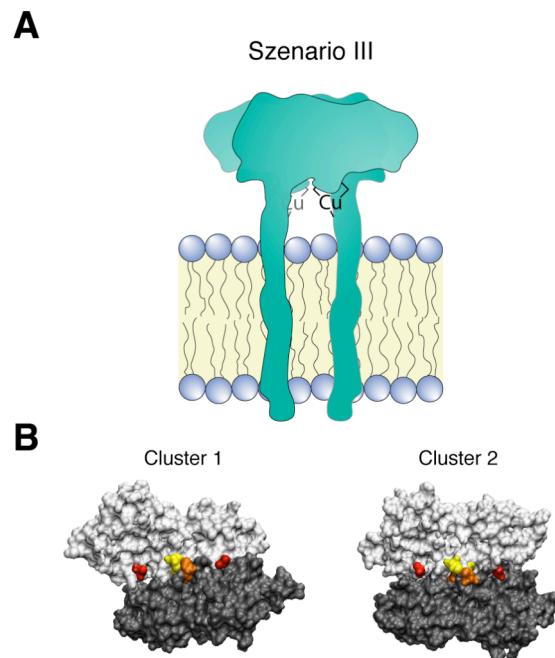
Dieses Modell kann sowohl die Daten zur Metallbindung als auch die oligomeren Zustände der CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten erklären: Wird eines der beiden Cysteine des CFCF-Motifs entfernt,



so verbleiben zwei der ursprünglich drei Thiolatliganden und die Kupferionen können noch immer gebunden werden, wenn auch zu einem geringeren Teil. Da die beiden verbleibenden Thiolatliganden auf unterschiedlichen Peptidketten liegen, können die Kupferionen über eine lineare Cu(I)-Cys<sub>2</sub>-Koordination gebunden werden und im Zuge dieser Kupferbindung kommt es weiterhin zu einer Dimerisierung. Wird hingegen das Cystein 38 entfernt, liegen die beiden verbleibenden Thiolatliganden (die Cysteine des CFCF-Motifs) auf derselben Polypeptidkette. Diese liegen so nah beieinander, dass eine lineare Cu(I)-Cys<sub>2</sub>-Koordination nicht möglich ist. Die Kupferionen können in diesem Fall also nicht durch die verbleibenden Reste der eigentlichen Kupferbindungsstelle koordiniert werden. Die Anzahl gebundener Kupferionen sinkt und der Anteil an Monomeren nimmt zu.

Die beobachtete Restbindung beruht vermutlich auf der Bildung alternativer Dimerspezies, worauf auch die unterschiedlichen Elutionsvolumina für das Dimer im Rahmen der Gelfiltrationen hindeuten. Im Fall der C38S-Mutation können die CFCF-Motive eine gemeinsame Kupferbindungsstelle bilden, im Fall der C129S/C131S-Mutation findet die Kupferbindung über die beiden Cystein 38-Thiolate statt.

Dieses Modell ist sowohl mit verschiedenen Literaturdaten als auch mit den hier durchgeführten Messungen vereinbar und sollte daher als wahrscheinlichstes Szenario betrachtet werden.

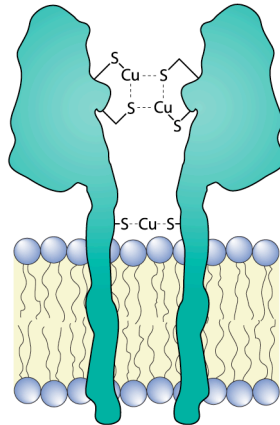


**Abbildung 39 - Modell für eine antiparallele Dimerisierung von CtaG**

Denkbar ist auch (A) ein Szenario in dem das CFCF-Motiv einer Peptidkette gemeinsam mit dem nahe der Membran gelegenen Cystein der anderen Peptidkette eine trigonale Cu(I)-Cys<sub>3</sub>-Koordination bildet. In diesem Modell würden die CFCF-Motive zur Membran weisen und die beiden Monomere in entgegengesetzter Orientierung dimerisieren. (B) Eine computerbasierte *docking* Analyse mit einem humanen Cox11-Modell deutete ebenfalls auf eine entgegengesetzte Orientierung der Monomere hin (van Dijk et al 2007, **gelb/orange**: Cysteine des CFCF-Motivs; **rot**: N-termini der bekannten Struktur).

#### Szenario IV

Da die Gruppe um Jonathan Hosler für das CtaG-Homolog aus *Rhodobacter sphaeroides* nach der Kupferrekonstitution Stöchiometrien im Bereich von 1,5 Cu/Protein erhält, hat diese Gruppe ein weiteres Modell postuliert, welches weitestgehend dem von Banci *et al.* 2004 postulierten Dimer entspricht, anstelle der Disulfidbrücke nahe der Transmembranhelix jedoch eine weitere Kupferbindungsstelle vorsieht.



**Abbildung 40 - Schematische Darstellung der Kupferbindungsstellen nach Szenario IV**

Szenario IV entspricht weitestgehend dem von Banci *et al.* 2004 postulierten Dimer (Szenario I), mit dem Unterschied, dass die nahe der Transmembranhelix gelegenen Cysteine keine Disulfidbrücke ausbilden, sondern zur Koordination eines weiteren Kupferions dienen. Dieses Szenario sieht also die Bindung von 1,5 Cu/Protein bzw. 3 Cu/Dimer vor.

Dieses Modell kann die beobachteten Effekte der Mutagenesen auf die Kupferbindung jedoch nur teilweise erklären. Während die Mutagenese eines der beiden Cysteine aus dem CFCF-Motiv zu einem Verlust der Kupferbindung von etwa 30 % führt, was dieses Modell erklären könnte, lassen sich die übrigen Beobachtungen nicht mit diesem Modell in Einklang bringen. Die gleichzeitige Mutagenese der beiden Cysteine des CFCF-Motivs müsste in diesem Modell zu einer Reduktion der Kupferbindung um über 60 % führen, was jedoch nicht der Fall ist. Und auch die Reduktion der Kupferbindung um über 50 %, die für die Mutagenese des nahe der Transmembranhelix gelegenen Cysteins beobachtet wird, kann mit diesem Modell nicht erklärt werden. Auch die Absolutwerte der Cu/Protein-Verhältnisse sprechen nicht für die Bindung von drei Kupferionen pro CtaG<sub>LF</sub>-Dimer.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage, scheint dieses Szenario zumindest für das *Paracoccus* CtaG-Fragment nicht zuzutreffen.

#### **5.4. Zusammenfassung**

Die eingehende Analyse sämtlicher verfügbarer CtaG-Homologe anhand von Sequenz- und Struktur-Alignments deckte eine Reihe von Oberflächenresten auf, die hoch konserviert sind und an der Bindung von Kupferionen oder an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein könnten. Eine Auswahl dieser Aminosäuren wurde per gerichteter Mutagenese ersetzt und der Effekt dieser Mutationen auf die Stöchiometrie der Metallbindung sowie auf die oligomeren Zustände von Cu-CtaG<sub>LF</sub> wurde mittels ICP-MS und Gelfiltrationen untersucht. Es wurden mehrere Szenarien für die Bindung von Kupferionen an CtaG postuliert und anhand der Daten- und Literaturlage diskutiert. Das Modell aus Szenario III, welches die aktuelle Datenlage am besten erklärt, sieht eine trigonale Koordination der Kupferionen vor, an der die Cysteine des CFCF-Motivs einer Polypeptidkette mit dem nahe der Transmembranhelix gelegenen Cystein 38 der jeweils anderen Polypeptidkette ein gemeinsames Koordinationsfeld bilden. Diese Überkreuz-Bindung ermöglicht die Koordination von zwei Kupferionen pro Dimer an identischen Bindungsstellen, welche punktsymmetrisch zueinander sind, sich in räumlicher Nähe zueinander befinden und nahe der Membranoberfläche liegen.

## 6. Bestimmung der Affinität von CtaG<sub>LF</sub> für Cu(I)

### 6.1. Einleitung

Eine Eigenschaft, die bei der Untersuchung von Bindungsstellen von besonderem Interesse ist, ist die Affinität der Bindungsstelle für den Liganden, also in diesem Fall die Affinität des Proteins (P) für das Metallion (M). Für das Gleichgewicht



wird die Affinität beispielsweise durch die Gleichgewichtskonstante für die Bildung des Metalloproteins (MP) gegeben. Diese wird auch als Assoziationskonstante  $K_a$  oder Bindungskonstante bezeichnet.

$$K_a = \frac{[MP]}{[P] \cdot [M]} \quad [6.2]$$

Alternativ wird in der Biochemie zur Beschreibung des Bindungsverhaltens auch gerne die Gleichgewichtskonstante der Rückreaktion, die sogenannte Dissoziationskonstante  $K_d$  verwendet.

$$K_d = \frac{[P] \cdot [M]}{[MP]} \quad [6.3]$$

Zur Bestimmung von Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten stehen prinzipiell mehrere Methoden zur Verfügung, die in der Regel auf Titrationsexperimenten unter verschiedenen Bedingungen und mit unterschiedlichen Detektionsmethoden beruhen. Einige der möglichen Methoden sind im Anhang (Kapitel 3 - Theorie zur Bestimmung von Bindungskonstanten, S.187) beschrieben. Im Fall von CtaG wurde aus den im Folgenden erläuterten Gründen mit der Kompetitionstitration gearbeitet.

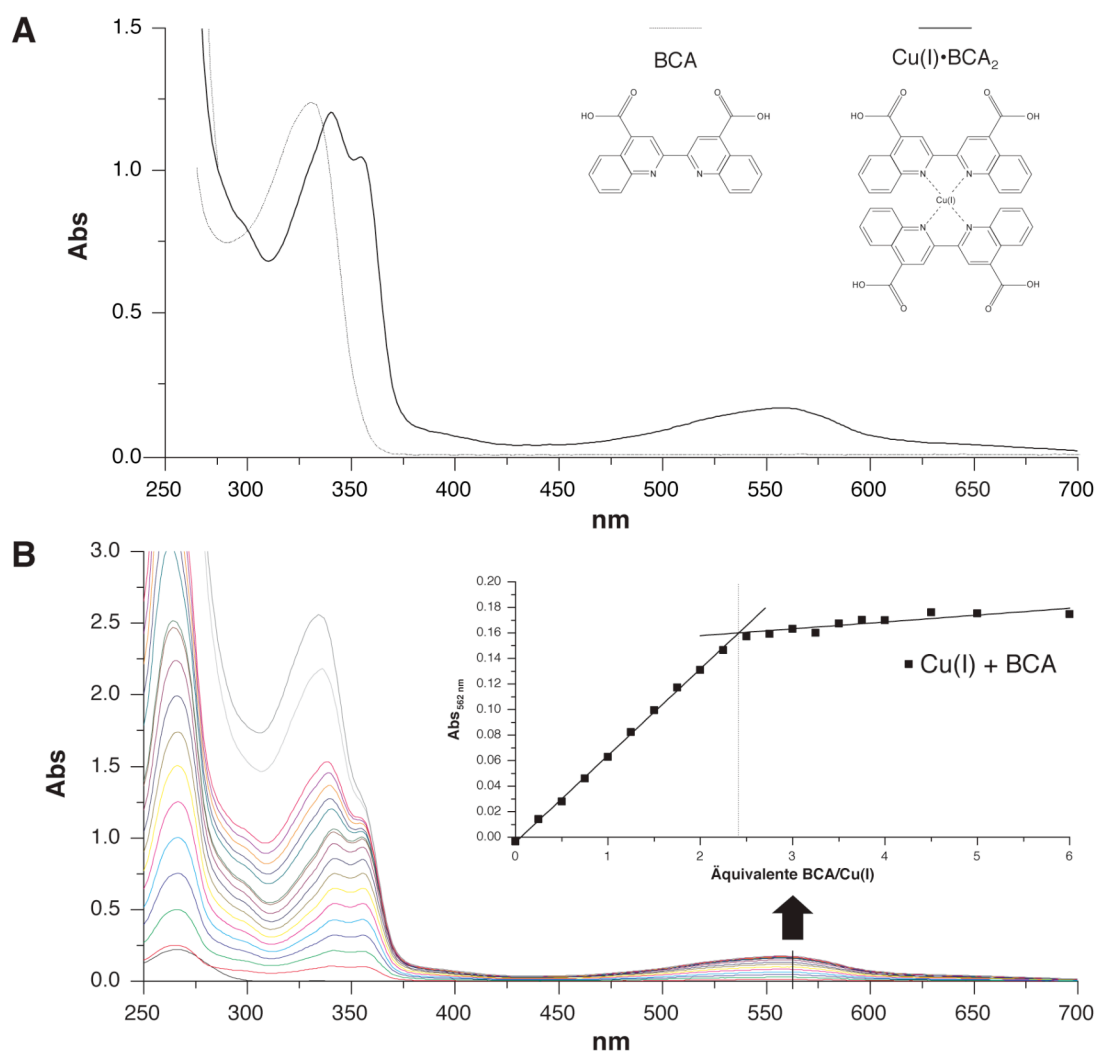
### 6.1.1. Wahl der geeigneten Methode für Bindungsstudien mit CtaG<sub>LF</sub>

Für die Anwendung der *einfachen Gleichgewichtstitration* (siehe S.187) müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen wird ein UV/Vis-spektroskopisches Signal zur Verfolgung einer der Komponenten benötigt, und zum anderen muss die Proteinkonzentration im Bereich der  $K_d$  oder darunter liegen. Wie in Abschnitt 7 - "Spektroskopische Charakterisierung von CtaG<sub>LF</sub>" (S.140) beschrieben, existiert zwar ein spektroskopisches Signal für die Bindung von Cu(I) an CtaG<sub>LF</sub>, die Affinitäten von Kupferchaperonen sind aber im Allgemeinen zu hoch, als dass sie sich mit Hilfe der einfachen Gleichgewichtstitration zuverlässig untersuchen ließen. Zur photometrischen Verfolgung des Cu-Signals von CtaG, sollte die CtaG<sub>LF</sub>-Konzentration in etwa 100 µM, also  $10^{-4}$  M, betragen. Die geringste in der Literatur beschriebene Affinität für ein Kupferchaperon ist eine  $K_d$  von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  M für Atx1 (Wernimont, Yatsunyk et al. 2004). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich mit Hilfe der Gleichgewichtstitration eine  $K_d$  für CtaG bestimmen lässt ist also sehr gering. Desweiteren birgt die Titration von Cu(I)-Ionen die Problematik, dass Cu(I) in wässriger Lösung sehr instabil ist und rasch zu Cu(II) oxidiert. Somit sind die Cu(I)-Konzentrationen, die für die Auswertung der Titrationskurven unerlässlich sind, nicht zuverlässig.

Für Proteine mit hohen Affinitäten ist die *Kalorimetrie* zur Bestimmung von Bindungskonstanten besonders gut geeignet, da für diese Methode bewusst außerhalb der Gleichgewichtsbedingungen gearbeitet wird, damit das Protein den zutitrierten Liganden quantitativ bindet. Die rasche Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) ist allerdings auch hier problematisch. Es muss strikt anaerob gearbeitet werden, damit zum einen die Cu(I)-Konzentrationen verlässlich sind und zum anderen die Messung der Bindungswärme nicht durch Nebenreaktionen gestört wird, wie beispielsweise die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) oder zusätzliche Redoxreaktionen durch beigefügte Reduktionsmittel, die zur Stabilisierung der Cu(I)-Konzentration dienen. Leider konnte kein anaerob aufgebautes Kalorimetrie-System ausfindig gemacht werden, weshalb auf Messungen mit dieser Methode verzichtet werden musste.

Die Cu(I)-Bindung von CtaG wurde daher in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von *Kompetitionstitrationen* untersucht. Ein zur Untersuchung von Kupferproteinen häufig eingesetzter Chelator ist EDTA. Dieses bindet Cu-Ionen jedoch nur in der oxidierten Cu(II)-Form. Der durch die Zugabe von EDTA hervorgerufene Cu-Verlust von CtaG<sub>LF</sub> (siehe Ergebnisse & Diskussion, Abschnitt 7.3, S.142) muss daher mit einer Oxidation der Cu(I)-Ionen durch Luftsauerstoff einhergehen. Diese zusätzliche Redoxreaktion erhöht die Komplexität des beobachteten Systems derart, dass eine quantitative Aussage zu Bindungskonstanten wenn nicht unmöglich, dann zumindest sehr unzuverlässig wird. Statt des Cu(II)-spezifischen Chelators EDTA wurde daher der starke Cu(I)-spezifische

Chelator BCA verwendet. Die im Englischen *bicinchoninic acid* (BCA) genannte, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure bindet Cu(I) indem vier Stickstoffliganden von zwei BCA-Molekülen das Metallion gemeinsam komplexieren (siehe Inset). Die 1:2-Stöchiometrie des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes macht die Auswertung von Titrationskurven zwar nicht einfacher, dafür ist BCA sehr spezifisch für Cu(I) und hat zudem den Vorteil, dass es seine UV/Vis-spektroskopischen Eigenschaften im Zuge der Metallbindung ändert. Zum einen kommt es zu einer leichten Rotverschiebung der 331 nm Bande auf 341 nm, und zum anderen entstehen mit der Cu(I)-Bindung zwei zusätzliche Absorptionsbanden bei 354,5 nm und 562 nm (siehe Abbildung 41).



**Abbildung 41 - UV/Vis-Spektren von freiem BCA und dem Cu(I)-BCA<sub>2</sub> Komplex**

Der Chelator BCA weist eine Absorptionsbande bei 331 nm auf. In Gegenwart von Cu(I)-Ionen bildet sich ein Komplex aus zwei BCA-Molekülen und einem Cu(I)-Ion, der zum einen durch eine Rotverschiebung der 331 nm Bande auf 341 nm charakterisiert ist und zum anderen zwei zusätzliche Absorptionsbanden bei 354,5 nm und 562 nm aufweist. Diese Eigenschaft kann im Rahmen des BCA-Assays zur quantitativen Cu-Bestimmung genutzt werden, oder wie hier, zur Aufnahme von Konkurrenztitrationskurven. **A:** Vergleich freies BCA und Cu(I)-BCA-Komplex (gepunktete Linie: 75 µM BCA; durchgezogene Linie: 75 µM BCA + Cu(I)). **B:** Titration von BCA in 6,25 µM Schritten zu einer 25 µM Cu(I)-Lösung (25 µM Cu(II)SO<sub>4</sub> + 100 mM Ascorbat). **Inset B:** Absorption bei 562 nm in Abhängigkeit des BCA/Cu(I) Verhältnisses.

Die 354,5 nm Absorption des Cu(I)-BCA<sub>2</sub>-Komplexes überlagert die kupferabhängige Absorptionsbande von CtaG und verhindert somit deren Messung, dafür haben die Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Absorptionen einen wesentlich größeren Extinktionskoeffizienten als das CtaG-spezifische Signal, was die Bestimmung von Konzentrationen während der Titration wesentlich exakter macht. Die Affinität von BCA für Cu(I) wurde von der Gruppe um Amy Rosenzweig mit einem anaeroben ITC-Setup gemessen, und liegt für ein einzelnes BCA-Molekül bei  $K_A = 2,145 \pm 0,003 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  (Yatsunyk und Rosenzweig 2007). Für den Komplex aus zwei BCA-Molekülen und einem Cu(I)-Ion ist die Stabilität entsprechend höher: Die apparente Assoziationskonstante für Cu(I)BCA<sub>2</sub> liegt bei  $\beta_2 = K_A \cdot K_A \approx 4,60 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-2}$ . Diese Werte wurden in 50 mM HEPES bei einem pH von 7.5 und einer NaCl-Konzentration von 0.2 M bestimmt.

Da die Dissoziationskonstanten dem Kehrwert der Assoziationskonstanten entsprechen, gilt für die Bindung eines BCA-Moleküls an Cu(I)  $K_{d \text{ BCA}} = 4,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  und für den Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplex  $K_{d \text{ Cu(I)BCA}_2} = 2,17 \cdot 10^{-15} \text{ M}^2$ .

Mit Hilfe dieses Chelators und dessen Dissoziationskonstanten können zum einen qualitative Aussagen zur relativen Affinität von CtaG<sub>LF</sub> und den in dieser Arbeit erstellten Mutanten getroffen werden. Zum anderen können erste Werte für die Dissoziationskonstanten von Cu(I) und CtaG<sub>LF</sub> berechnet werden.

## 6.2. Durchführung

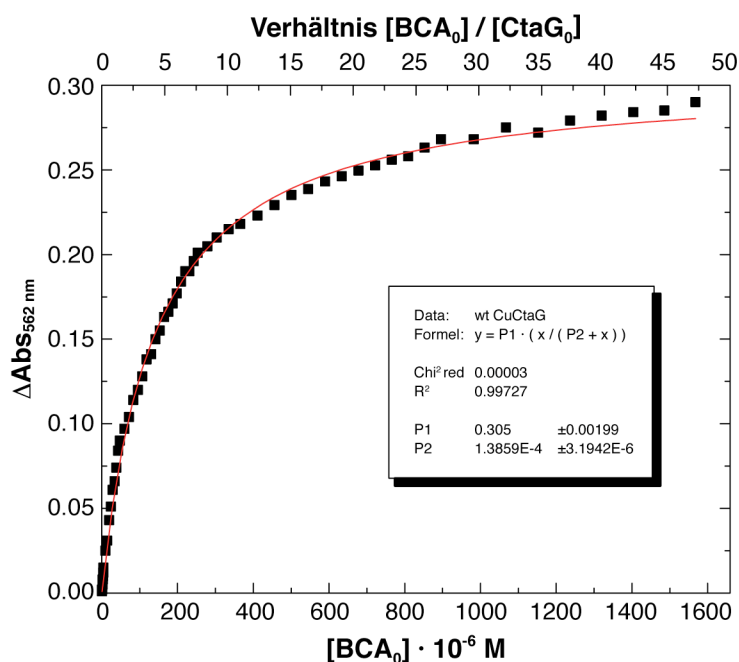
Für die Titration von BCA zu Cu-CtaG wurden BCA-Stammlösungen mit Konzentrationen von 250, 2500, 5000 und 25000  $\mu\text{M}$  in Wasser angesetzt. Die exakten Konzentrationen dieser BCA-Stammlösungen wurden wie folgt per Titration bestimmt: Zu 1 ml einer im Überschuss vorliegenden Cu(I)-Lösung, welche durch Reduktion von Cu(II)SO<sub>4</sub> mittels Ascorbat hergestellt wurde, wurden definierte Volumina (2-5  $\mu\text{l}$ ) der BCA-Stammlösungen titriert. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{562 \text{ nm}} = 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurden die Konzentration des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes bestimmt, aus denen wiederum die Konzentrationen der BCA-Stammlösungen berechnet werden konnten.

Sowohl das Wildtyp Protein als auch die CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und mit Cu(I) rekonstituiert. Cu-CtaG-Verdünnungen mit einer Proteinkonzentration von ca. 50  $\mu\text{M}$  wurden in einem Volumen von 1,5 ml angesetzt. 500  $\mu\text{l}$  dieser Cu-CtaG-Stammlösung wurden zur Bestimmung der genauen Protein- und Kupferkonzentration sowie zur Kontrolle der Probe eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde dabei mit Hilfe des Lowry-Assays bestimmt, die Cu-Konzentration per BCA-Assay (Methoden 3.12.1, S. 60), zusätzlich wurde das Cu/Protein-Verhältnis per ICP-MS gemessen. Die Integrität und Reinheit der Probe wurde per Elektrophorese und anschließender Silberfärbung überprüft.

1000  $\mu\text{l}$  dieser Cu-CtaG-Stammlösung wurden in einer mit Säure gereinigten, verschließbaren Küvette (Hellma 117.104, 1400  $\mu\text{l}$ ,  $d = 10\text{ mm}$ ) vorgelegt, welche anschließend mit Hilfe eines Septums verschlossen wurde, um Probenverluste und somit ungewollte Konzentrationsänderungen während der Titration auszuschließen. Mit Hilfe einer 5  $\mu\text{l}$  Hamilton-Spritze wurden die BCA-Stammlösungen in 2-5  $\mu\text{l}$  Schritten durch das Septum zu der Cu-CtaG-Stammlösung titriert. Durch mehrmaliges Invertieren der Küvette wurde die Probe durchmischt und nach einer 1-minütigen Inkubation wurde für jeden Titrationsschritt ein Spektrum von 250-800 nm aufgenommen. Bestimmt wurde für jeden Titrationsschritt die Konzentration des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes, anhand der Extinktion bei 562 nm und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{562\text{ nm}} = 7700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Aus den bekannten Konzentrationen für Cu-CtaG und BCA wurden dann die Konzentrationen von freiem und metallgebundenem BCA sowie freiem und metallgebundenem CtaG<sub>LF</sub> berechnet. Da bis zu 60 Titrationsschritte durchgeführt wurden und sich das Probenvolumen dabei um bis zu 150  $\mu\text{l}$ , also um 15 % vergrößerte, wurde die Verdünnung in die Auswertung mit einbezogen.

### 6.3. BCA-Titration mit dem Wildtyp-Fragment CtaG<sub>LF</sub>

Wird Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit BCA titriert, so erhält man einen hyperbolischen Verlauf für die Bildung des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes, spricht für den Entzug von Cu(I) aus CtaG<sub>LF</sub>.



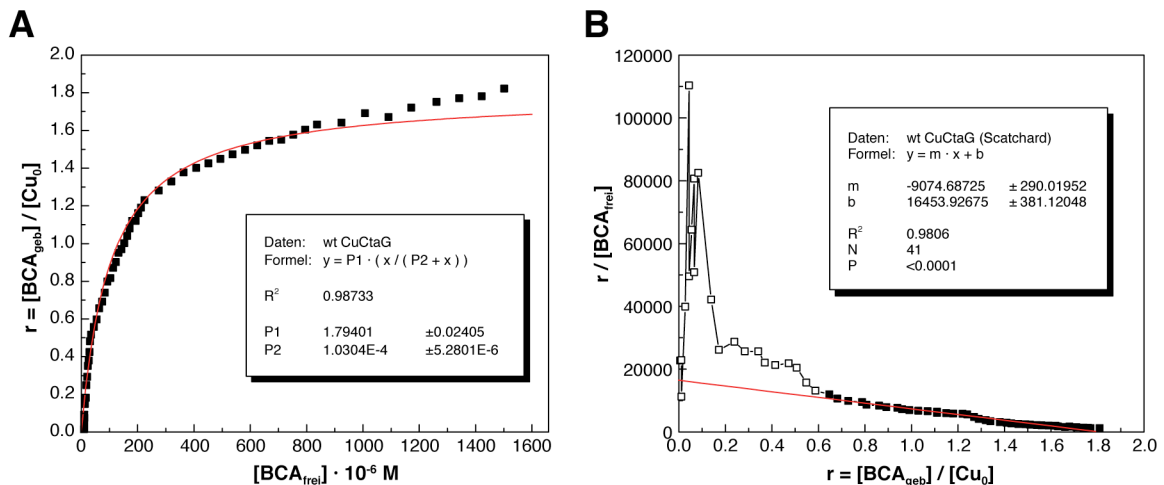
**Abbildung 42 - Titrationskurve von Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit BCA**

1 ml einer Cu-CtaG<sub>LF</sub> Stammlösung (37,7  $\mu\text{M}$ , Cu/Protein 1,27) wurde in 60 Schritten mit 2-5  $\mu\text{l}$  BCA (250, 2500, 5000 oder 25000  $\mu\text{M}$ ) versetzt. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein Spektrum von 250-800 nm aufgenommen. Dargestellt ist die Absorption bei 562 nm, die ausschließlich auf die Bildung des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes zurückzuführen ist. Der hyperbolische Verlauf der Titrationskurve (—) wurde anhand der einzelnen Messpunkte (■) gefittet.



Der Chelator BCA ist also dazu in der Lage Cu(I)-Ionen aus Cu-CtaG<sub>LF</sub> zu entfernen. Liegt BCA in einem 3-5fachen Überschuss gegenüber CtaG vor, so wird etwa die Hälfte des zuvor an CtaG gebundenen Kupfers auf BCA übertragen. Unter der Voraussetzung, dass das System zum Zeitpunkt der Messung bereits im Gleichgewicht ist, kinetische Effekte also keine Rolle spielen, lässt sich daraus bereits ableiten, dass CtaG um den Faktor 3-5 affiner für Cu(I) ist als BCA.

Eine genaue Quantifizierung ist aus dieser Form der Auftragung jedoch noch nicht möglich, da die für die Auftragung eingesetzte BCA-Konzentration der gesamten zutitrierten BCA-Konzentration entspricht. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten muss nach Gleichung [6.17] (siehe S.191ff) jedoch die Konzentration des freien Chelators verwendet werden. Um verschiedene Titrations besser miteinander vergleichen zu können, wurde außerdem statt der Absorption bei 562 nm, bzw. der Konzentration des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes die Sättigung  $r$  ( $r = [\text{BCA}_{\text{geb}}] / [\text{Cu}_0]$ ) als Ordinatenwert eingeführt.



**Abbildung 43 - Titrationskurve und Scatchard-Diagramm einer BCA-Titration mit Cu-CtaG<sub>LF</sub>**

**A.** Normierte und zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten geeignete Umwandlung der Titrationskurve aus Abbildung 42. Aufgetragen wird die Sättigung  $r$ , also in diesem Fall das Verhältnis aus gebundenem Chelator  $[\text{BCA}_{\text{geb}}]$  und insgesamt vorhandenem Cu(I)  $[\text{Cu}_0]$ , gegen die Konzentration des noch freien, ungebundenen Chelators  $[\text{BCA}_{\text{frei}}]$  (■ Datenpunkte; — hyperbolischer *fit*).

**B.** Scatchard-Diagramm zu A. Um die Hyperbel (aus A) zu linearisieren wird das Verhältnis aus deren Ordinate und Abszisse ( $r/[\text{BCA}_{\text{frei}}]$ ) gegen die Ordinate ( $r$ ) aufgetragen (■ Datenpunkte; — Regressionsgerade; □ bei der Regression unberücksichtigte Datenpunkte).

Aus diesen Diagrammen kann unter Kenntniss der  $K_d$  von BCA auch die  $K_d$  von CtaG<sub>LF</sub> bestimmt werden. Anschaulich dargestellt entspricht die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion der BCA-Konzentration  $[\text{BCA}_{\text{frei}}]$ , bei welcher Cu-CtaG<sub>LF</sub> und Cu(I)BCA<sub>2</sub> zu gleichen Teilen vorliegen. Dies ist laut dem hyperbolischen *fit* bei  $103 \pm 5,28 \mu\text{M}$   $[\text{BCA}_{\text{frei}}]$ , also bei einem 2,8 fachen Überschuss an freiem BCA der Fall.

Mathematisch ergibt sich aus Gleichung [6.18] (siehe S.191ff) für die  $K_d$  von CtaG:

$$P_2 = K_{d_{\text{Chelator}}} \left( 1 + \frac{[\text{P}]}{K_{d_{\text{Protein}}}} \right) \quad [6.18]$$

$$K_{d_{\text{CtaG}}} = \frac{[\text{CtaG}]}{\frac{P_2}{K_{d_{\text{BCA}}} - 1}} \quad [6.19]$$

Die in der Literatur beschriebene  $K_d$  für die Bindung von Cu(I) an BCA liegt bei  $\sim 4,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  (Yatsunyk und Rosenzweig 2007). Daraus ergibt sich für die  $K_d$  von CtaG<sub>LF</sub>:

$$K_{d_{\text{CtaG}}} = \frac{37,7 \mu\text{M}}{\frac{103 \mu\text{M}}{\sim 4,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}} - 1} \approx \mathbf{1,71 \cdot 10^{-8} \text{ M}} \quad [6.20]$$

Diese  $K_d$  ist 2,7 mal kleiner als die  $K_d$  von BCA, was also wieder bedeutet, dass die Affinität von CtaG<sub>LF</sub> für Cu(I) etwa dreimal höher ist als die des Chelators BCA.

Die Sättigung  $r$  strebt laut des hyperbolen *fits* gegen 1,79. Dieser Parameter der Hyperbel entspricht der Zahl  $n$  der Bindungsstellen (siehe Gleichung [6.9], S. 187ff). Im beobachteten Gleichgewicht entspricht dies also der Zahl der BCA-Moleküle, die an ein Cu(I)-Ion binden können.  $r$  sollte somit im Idealfall gegen 2 streben, da jeweils 2 BCA-Moleküle ein Cu(I)-Ion komplexieren.

Erwartungsgemäß liefert die Auswertung der Titration mit Hilfe des Scatchard-Diagramms (Abbildung 43B) ähnliche Werte. Wie bei Scatchard-Diagrammen üblich, sind die Werte nahe der Y-Achse einer starken Streuung unterworfen, was auf das ungünstige Signal/Rausch-Verhältnis in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen zurückzuführen ist (siehe Abbildung 70 ff). Da zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten die Datenpunkte entscheidend sind, in denen ein Gleichgewicht zwischen Produkten und Edukten herrscht, sind in diesem Fall die Werte im Bereich um  $r = 1$ , also wenn Cu-CtaG und Cu(I)BCA<sub>2</sub> in etwa zu gleichen Teilen vorliegen, für die lineare Regression zu verwenden. Aus der Steigung  $m = -9074 \pm 290$  der Regressionsgeraden ergibt sich über  $m = -1/K$  eine Gleichgewichtskonstante von  $K = 110 \pm 3,5 \mu\text{M}$  für die Kompetitionsreaktion, was durchaus in Übereinstimmung mit dem hyperbolen *fit* ist. Aus dem Abszissenschnittpunkt ergibt sich desweiteren für die Zahl der Bindungsstellen ein Wert von  $n = 1,81$ , was ebenfalls mit dem hyperbolen *fit* und den Erwartungen übereinstimmt.

$$K_{d_{\text{CtaG}}} = \frac{37,7 \mu\text{M}}{\frac{110 \mu\text{M}}{\sim 4,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}} - 1} \approx \mathbf{1,60 \cdot 10^{-8} \text{ M}}$$

Die Auswertung nach Scatchard liefert somit für CtaG eine  $K_d$  von  $\sim 1,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ . Zusammenfassend ergibt die Titration von Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit BCA, dass CtaG etwa dreimal affiner für Cu(I) ist als BCA, und dass sich die  $K_d$  für CtaG<sub>LF</sub> und Cu(I), unter der Annahme einer  $K_{d_{\text{BCA}}}$  von  $\sim 4,66 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ , mit  $\sim 1,6 - 1,7 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  im nanomolaren Bereich bewegt.

**Diskussion**

Die Titration des kupferbeladenen, löslichen CtaG<sub>LF</sub>-Fragments (Cu-CtaG<sub>LF</sub>) mit BCA zeigt einen hyperbolischen Verlauf für die Bildung des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes, bzw. für den Entzug von Cu(I) aus CtaG<sub>LF</sub>. Die Affinität des Chelators BCA liegt also in einer ähnlichen Größenordnung wie die Affinität von CtaG für Cu(I), d.h. mit Hilfe dieses Wettbewerbsansatzes lassen sich auswertbare Titrationskurven aufnehmen. Aus diesen Kurven geht hervor, dass BCA in einem 3-5fachen Überschuss gegenüber CtaG<sub>LF</sub> vorliegen muss, um die Hälfte der Cu(I)-Ionen aus CtaG<sub>LF</sub> zu entziehen. Cu(I) bindet also etwa dreimal stärker an CtaG als an den Chelator BCA.

Die Auswertung mit Hilfe der bekannten Affinität des Chelators BCA ergibt für die Dissoziationskonstante von CtaG<sub>LF</sub> und Cu(I) Absolutwerte in der Größenordnung von 10<sup>-8</sup> M, also im nanomolaren Bereich. Diese Werte bewegen sich, verglichen mit Literaturwerten für andere Kupferproteine, in einem vertretbaren Bereich, sollten jedoch kritisch betrachtet werden. Drei Faktoren, welche die Absolutwerte der K<sub>d</sub> für CtaG maßgeblich beeinflussen und verfälschen können, werden im folgenden diskutiert: (a) die Pufferbedingungen, (b) die kinetische Komponente der Wettbewerbsreaktion und (c) die Stöchiometrie der Cu(I)BCA-Bindung.

(a) Einfluss der Pufferbedingungen: Die aus der Berechnung nach Gleichung [6.19] hervorgehende K<sub>d</sub> für CtaG hängt stark von dem Wert der für BCA veranschlagten K<sub>d</sub> ab. Die hier verwendeten Werte wurden aus der Literatur übernommen und stammen aus ITC-Experimenten, die in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,5 durchgeführt wurden. Sowohl die Ionenstärke, als auch der pH beeinflussen jedoch das Bindungsgleichgewicht, sodass die K<sub>d</sub> für BCA in dem hier verwendeten Puffer (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, pH 8) vom Literaturwert abweichen dürfte. Dementsprechend werden die berechneten Werte für die K<sub>d</sub> von CtaG<sub>LF</sub> ebenfalls geringfügig von den realen Werten abweichen.

Eine mathematische Korrektur der Bindungskonstanten von BCA wäre zwar möglich. So kann der Einfluss der Ionenstärke nach Martell und Smith (Martell und Smith 1974) und der Einfluss des pH-Wertes mit Hilfe der Schwarzenbach-Gleichung (Schwarzenbach und Flaschka 1965) korrigiert werden, sofern sämtliche pK<sub>a</sub>-Werte des Chelators bekannt sind. Da für BCA keine pK<sub>a</sub>-Werte vorliegen, war eine mathematische Korrektur der K<sub>d</sub> jedoch nicht möglich. Sinnvoller wäre es ohnehin entweder die Titrationskurven unter den Literaturbedingungen zu wiederholen, oder die K<sub>d</sub> für BCA unter den hier verwendeten Bedingungen erneut zu bestimmen, wofür sich ein anaerober ITC-*setup* am Besten eignen würde. Da für die Einschätzung von Affinitäten jedoch nicht der exakte Zahlenwert der K<sub>d</sub> entscheidend ist, sondern ihre Größenordnung, sind die vorliegenden Werte für eine erste Einschätzung der Affinität von CtaG für Cu(I) vollkommen ausreichend.

(b) Einfluss der kinetischen Komponente der Kompetitionsreaktion: Die Ergebnisse einer Titration können nur dann quantitativ ausgewertet werden, wenn sich nach jedem Titrationsschritt ein Gleichgewicht eingestellt hat, bevor die Messung und somit die Konzentrationsbestimmung, in diesem Fall des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes, durchgeführt wird. Wird zu schnell gemessen, so wird die Konzentration des Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes als zu niedrig bestimmt, was bei der Auswertung fälschlicherweise zu einer zu hohen Affinität, also einer kleineren K<sub>d</sub> führt. Das Gleichgewicht zwischen Cu-CtaG<sub>LF</sub> und Cu(I)BCA<sub>2</sub> stellt sich bereits innerhalb von 20-40 Sekunden ein, wie eine kinetische Verfolgung der Extinktion bei 562 nm zeigte. Diese Zeitskala bewegt sich in der selben Größenordnung wie der Cu(I)-Transfer zwischen Atox1 und BCA (Hussain, Olson et al. 2008). Da die Proben vor jeder Messung eine Minute inkubiert wurden, spielt der kinetische Effekt hier also keine bedeutende Rolle. Er darf aber bei der Durchführung von Titrationsexperimenten mit BCA nicht außer Acht gelassen werden. Beispielsweise dauert der Cu(I)-Transfer zwischen den Metall-Bindedomänen (MBDs) des *Wilson Disease* Proteins und BCA bei Raumtemperatur über 45 min (Yatsunyk und Rosenzweig 2007).

(c) Die Stöchiometrie der Cu(I)BCA-Bindung: Wie bereits unter (a) erwähnt, hängt der berechnete Wert für die K<sub>d</sub> von CtaG stark von der für BCA veranschlagten K<sub>d</sub> ab. Nun bindet Cu(I) mit einer K<sub>d</sub> von  $\sim 4,66 \cdot 10^{-8}$  M an ein BCA Molekül. Für den Komplex aus zwei BCA Molekülen und einem Cu(I)-Ion ergibt sich aber eine Stabilitätskonstante von  $\beta_2 \approx 4,6 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}$ , was einer apparenten K<sub>d</sub> von  $2,17 \cdot 10^{-15}$  M entspricht. Setzt man für die Auswertung der Kompetition diese K<sub>d</sub> für das Gleichgewicht zwischen BCA und Cu(I) an, erhält man wesentlich höhere Affinitäten für CtaG und Cu(I). Zum einen müssen die zutitrierten BCA-Konzentrationen halbiert werden, da jeweils zwei BCA-Moleküle als "ein Chelator" gerechnet werden, und zum anderen fließt mit  $K_{d \text{ Cu(I)BCA}_2} = 2,17 \cdot 10^{-15}$  M eine wesentlich niedrigere K<sub>d</sub> in die Berechnung ein. Unter diesen Voraussetzungen ergäbe sich für CtaG eine Dissoziationskonstante von

$$K_{d \text{ CtaG}} = \frac{37,7 \mu\text{M}}{\frac{51,5 \mu\text{M}}{\sim 2,17 \cdot 10^{-15} \text{ M}}^{-1}} \approx 1,58 \cdot 10^{-15} \text{ M}$$

Nach dieser Berechnung müsste die K<sub>d</sub> für CtaG<sub>LF</sub> also im femtomolaren Bereich und damit noch unterhalb der bekannten Dissoziationskonstanten für andere Kupferchaperone liegen. Für das Kupferchaperon Atox1 findet man beispielsweise eine mit Hilfe der BCA-Titration ermittelte K<sub>d</sub> von  $3,5 \cdot 10^{-10}$  M (Yatsunyk und Rosenzweig 2007). Für das an der Biogenese des Cu<sub>A</sub>-Zentrums beteiligte Protein Sco1 wurde per Kalorimetrie eine K<sub>d</sub> von  $3,5 \cdot 10^{-12}$  M für Cu(II) ermittelt (Davidson und Hill 2009). Und für das auf Eukaryoten beschränkte und als "Lieferant" für Sco1 und CtaG geltende Kupferchaperon Cox17 wurde mit Hilfe von Kompetitionstitrationen eine K<sub>d</sub> von  $1,3 \cdot 10^{-14}$  M bestimmt (Palumaa, Kangur et al. 2004). In Anbetracht der Tatsache, dass Cox17

in Eukaryoten als Cu(I)-Donor für CtaG dient, erscheint eine niedrigere  $K_d$  für CtaG zwar nicht vollkommen abwegig. Auch existieren andere Zellkomponenten, die noch wesentlich höhere Affinitäten aufweisen, wie beispielsweise Glutathion mit einer Stabilitätskonstanten von  $\beta_2 = 10^{38.8} \text{ M}^{-2}$  (Osterberg, Ligaarden et al. 1979). Eine Affinität im femtomolaren Bereich ist aber dennoch relativ unwahrscheinlich. Zumal die Cu-Ionen aus Cu-CtaG selbst durch den vergleichsweise schwächeren Chelator EDTA entzogen werden können (siehe Abschnitt 7.3 "Kupferabhängigkeit der 358 nm Bande – EDTA-Titrations", S.142). Um die Affinität von CtaG<sub>LF</sub> nicht irrtümlich zu überschätzen, wurde deshalb, wie von Rosenzweig et al empfohlen, für die quantitative Auswertung der Titrationskurven die  $K_d$  für Cu(I) und ein BCA-Molekül angesetzt. Um die Größenordnung der Dissoziationskonstanten für CtaG zu überprüfen, wäre die Titration mit einem weiteren Chelator, wie zum Beispiel dem ebenfalls Cu(I)-spezifischen Bathocuproindisulfonat (BCS) denkbar. Dieses bildet allerdings ebenfalls einen 2:1 Komplex mit Cu(I) und birgt somit dieselbe Problematik wie BCA. Ein Cu(I)-spezifischer Chelator, der einen 1:1 Komplex bildet, konnte zwar nicht ausfindig gemacht werden, stattdessen wurden in dieser Arbeit aber Titrations mit EDTA durchgeführt, welches einen 1:1 Komplex mit Cu(II) eingeht (siehe siehe Abschnitt 7.3 "Kupferabhängigkeit der 358 nm Bande – EDTA-Titrations", S.142).

Eine zusätzliche Bestimmung der  $K_d$  von CtaG mit Hilfe der Kalorimetrie wäre sinnvoll, um die vorliegenden Werte weiter zu überprüfen und zu untermauern. Da die Bestimmung per Kalorimetrie direkt abläuft und nicht indirekt über einen Chelator bekannter Affinität durchgeführt wird, sollte sie prinzipiell auch genauer sein. Leider konnte jedoch keine anaerob aufgebaute Kalorimetrie-Apparatur für die Titration von Cu(I) zu CtaG<sub>LF</sub> ausfindig gemacht werden.

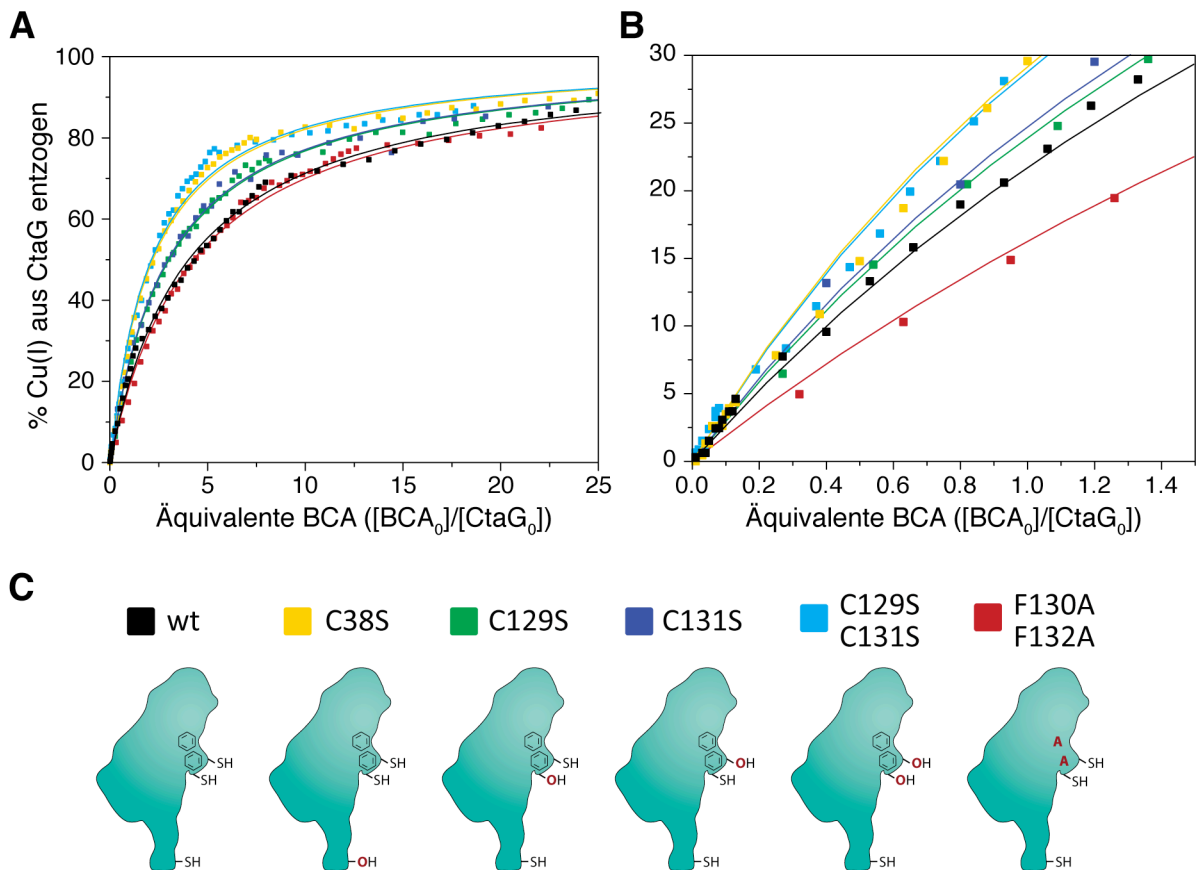
Im Bezug auf Affinitätskonstanten von kupferbindenden Proteinen sollte an dieser Stelle weiter angemerkt werden, dass deren Werte generell ein Problem darstellen. Die unterschiedlichen Methoden und Bedingungen unter denen Affinitätskonstanten in verschiedenen Laboren bestimmt werden, führen für dasselbe Protein zu unterschiedlichsten Werten. Im Falle des Kupferchaperons Cox17 wurden beispielsweise per ITC (*isothermal titration calorimetry*) Dissoziationskonstanten im Bereich von  $10^{-6} \text{ M}$  gemessen (Abajian, Yatsunyk et al. 2004), während Titrationsexperimente mit DTT, deren Detektion auf ESI-MS (*electrospray ionisation mass spectrometry*) beruhte,  $K_d$ -Werte im Bereich von  $10^{-14} \text{ M}$  ergaben (Palumaa, Kangur et al. 2004). Bei Atox1 ist die Diskrepanz ähnlich dramatisch: Während ITC-Messungen eine  $K_d$  von  $10^{-5}$ - $10^{-6} \text{ M}$  ergaben (Wernimont, Yatsunyk et al. 2004), deuteten BCA-Titrations auf eine  $K_d$  von  $10^{-10} \text{ M}$  (Yatsunyk und Rosenzweig 2007) und sogar über  $10^{-14} \text{ M}$  (Hussain, Olson et al.

2008) hin. Die Absolutwerte von Dissoziationskonstanten sind daher mit größter Vorsicht zu betrachten.

Es wäre hilfreich und sinnvoll, eine standardisierte Bestimmung der Dissoziationskonstanten ausgewählter Kupferchaperone in einem Labor und mit einem experimentellen System durchzuführen. So wäre eine bessere Vergleichbarkeit der Affinitäten gegeben und es könnte überprüft werden, ob der Transport von Kupferionen über mehrere beteiligte Proteine thermodynamisch oder kinetisch angetrieben wird. Sollten Kupferchaperone, die einen mehrstufigen Transportweg von der Aufnahme bis zum finalen Bestimmungsort bilden, der Reihe nach steigende Affinitäten aufweisen, wäre klar, dass der gesamte Transport thermodynamisch angetrieben wird. Dies wäre vergleichbar mit den kontinuierlich steigenden Redoxpotentialen der einzelnen Stationen in der Elektronentransportkette. Sollte die Reihenfolge der Affinitäten jedoch nicht mit der Abfolge im Kupfertransportweg übereinstimmen, müsste man davon ausgehen dass auch kinetische Effekte oder Redoxreaktionen für den Kupfertransport von Bedeutung sind.

#### **6.4. Vergleich der Affinitäten verschiedener CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten**

Neben der Bestimmung eines ersten Zahlenwertes für die  $K_d$  von CtaG<sub>LF</sub> und Cu(I) bietet sich die BCA-Titration insbesondere dafür an, die Affinitäten der verschiedenen CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten (siehe Ergebnisse & Diskussion 5 "Untersuchung der Kupferbindungsstelle mittels gerichteter Mutagenese", S. 109) miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde für jede Mutante eine Titration wie in Abschnitt 6.2 (S. 125) beschrieben durchgeführt. Um einen direkten visuellen Vergleich der Titrationskurven zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Werte normiert. Unterschiede wie die eingesetzte Proteinkonzentration und das Cu(I)/Protein-Verhältnis der jeweils titrierten Probe verändern den Kurvenverlauf und können berücksichtigt werden, indem die maximale Sättigung  $r$  einer Titration als 100 % definiert und gegen das BCA/Protein-Verhältnis aufgetragen wird (siehe Abbildung 44).



**Abbildung 44 - normierte Titrationskurven der CtaGLF-Mutanten**

Die Rohdaten der Titrationsen wurden zunächst ausgewertet wie für das Wildtyp Fragment beschrieben. Für einen direkten visuellen Vergleich der Titrationskurven wurden die einzelnen Datensätze zusätzlich auf ihre maximale Sättigung normiert und gegen das BCA/Proteinverhältnis, also die Äquivalente an zugegebenem BCA aufgetragen. **A.** Vergleich der gesamten Titrationskurven der CtaGLF-Mutanten. **B.** Vergrößerung des Anfangsbereichs von A. **C.** Schematische Darstellung der untersuchten Mutanten.

Aus den normierten Titrationskurven (Abbildung 44) wird ersichtlich, dass die Cysteinmutanten bereits bei niedrigeren BCA-Konzentrationen Cu(I) abgeben, als das Wildtyp Fragment. Offensichtlich und erwartungsgemäß sind die Affinitäten der Cysteinmutanten niedriger als die des Wildtyp-Fragments. Die simultane Mutation beider Cysteine des CFCF-Motivs wirkt sich dabei stärker aus als Einzelmutationen der Cysteine innerhalb des CFCF-Motivs. Interessanterweise hat die Mutation des nahe der Membran gelegenen Cystein 38 denselben Effekt wie die Mutation beider Cysteine des CFCF-Motivs. Die Affinität ist in diesen Fällen am niedrigsten. Die Mutation der beiden Phenylalanine innerhalb des CFCF-Motivs hingegen hat auf den ersten Blick keinen Effekt auf die Affinität von CtaGLF. Die F130A/F132A-Mutante verhält sich ähnlich wie das Wildtyp-Fragment, weist aber eine geringfügig höhere Affinität auf. Insbesondere im Anfangsbereich der Titration (Abbildung 44B) gibt die Phenylalaninmutante weniger Cu(I) an den Chelator BCA ab als der Wildtyp. Zur Quantifizierung der Affinitäten wurden die Titrationskurven sowohl einem hyperbolen *fit* unterzogen als auch mit Hilfe von Scatchard Diagrammen ausgewertet. Die aus dem Scatchard Diagramm resultierenden Geraden sind in Abbildung 46 dargestellt, deren mathematische Auswertung ist in Tabelle

15 zusammengefasst. Da die Scatchard Diagramme keinen kurvenförmigen Verlauf aufweisen, sondern in dem für die Auswertung relevanten Bereich linear verlaufen, besteht kein Hinweis auf die Anwesenheit von mehreren Kupferbindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten.

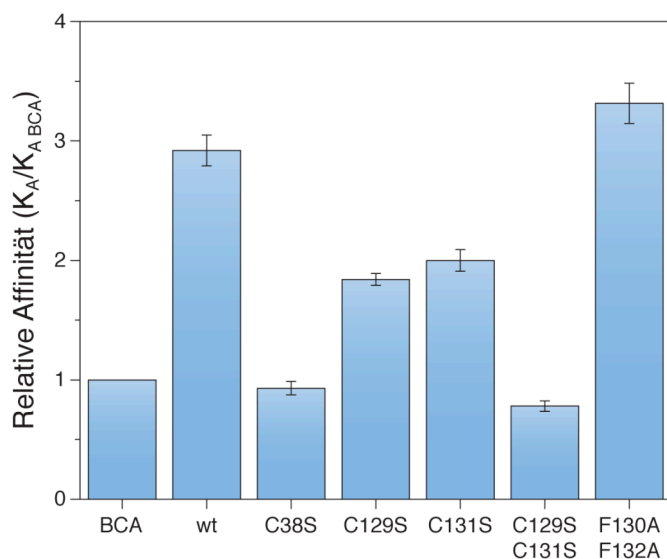
Wird für BCA von einer  $K_d$  von 46,6 nM ausgegangen, so erhält man für die Mutanten C38S und C129S/C131S mit 49,9 bzw. 59,5 nM die niedrigsten Affinitäten. Die beiden Cystein-Einzelmutationen innerhalb des CFCF-Motivs, C129S bzw. C131S, weisen im Vergleich dazu bereits eine höhere Affinität von 25,3 bzw. 23,3 nM auf. Die Phenylalaninmutante, F130A/F132A, hat mit einer  $K_d$  von 13,6 nM eine geringfügig höhere Affinität als das Wildtyp-Fragment mit 15,9 nM, und zeigt damit die stärkste Bindung für Cu(I). Ein Vergleich der Affinitäten kann Abbildung 45 entnommen werden. Da für die genaue  $K_d$  von BCA unter den vorliegenden Bedingungen, wie bereits unter 6.3 diskutiert, keine definitive Aussage getroffen werden kann, wurden die Affinitäten der CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten für eine verlässliche Darstellung zu dem Chelator BCA in Relation gesetzt (siehe Abbildung 45).

	Steigung	$K_{\text{gesamt}}$	$K_d \text{ CtaG}^*$
Wildtyp	-9074,68 ± 290,02	110,2 ± 4,99 μM	15,9 ± 0,72 nM
C38S	-26737,87 ± 493,02	37,4 ± 0,97 μM	49,9 ± 1,30 nM
C129S	-14775,21 ± 283,59	67,7 ± 1,83 μM	25,3 ± 0,69 nM
C131S	-15993,03 ± 524,36	62,5 ± 2,90 μM	23,3 ± 1,08 nM
C129S C131S	-23743,88 ± 500,62	42,1 ± 1,25 μM	59,5 ± 1,77 nM
F130A F132A	-9224,50 ± 111,93	108,4 ± 1,85 μM	13,6 ± 0,23 nM

**Tabelle 15 - Quantitative Auswertung der BCA-Titrationsen mit CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten**

Die Titrationskurven der CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten wurden mit Hilfe von Scatchard-Diagrammen quantitativ ausgewertet. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt sich die Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion  $K_{\text{Gesamt}}$ . Diese dient zur Berechnung der Dissoziationskonstanten der jeweils titrierten CtaG<sub>LF</sub>-Mutante.

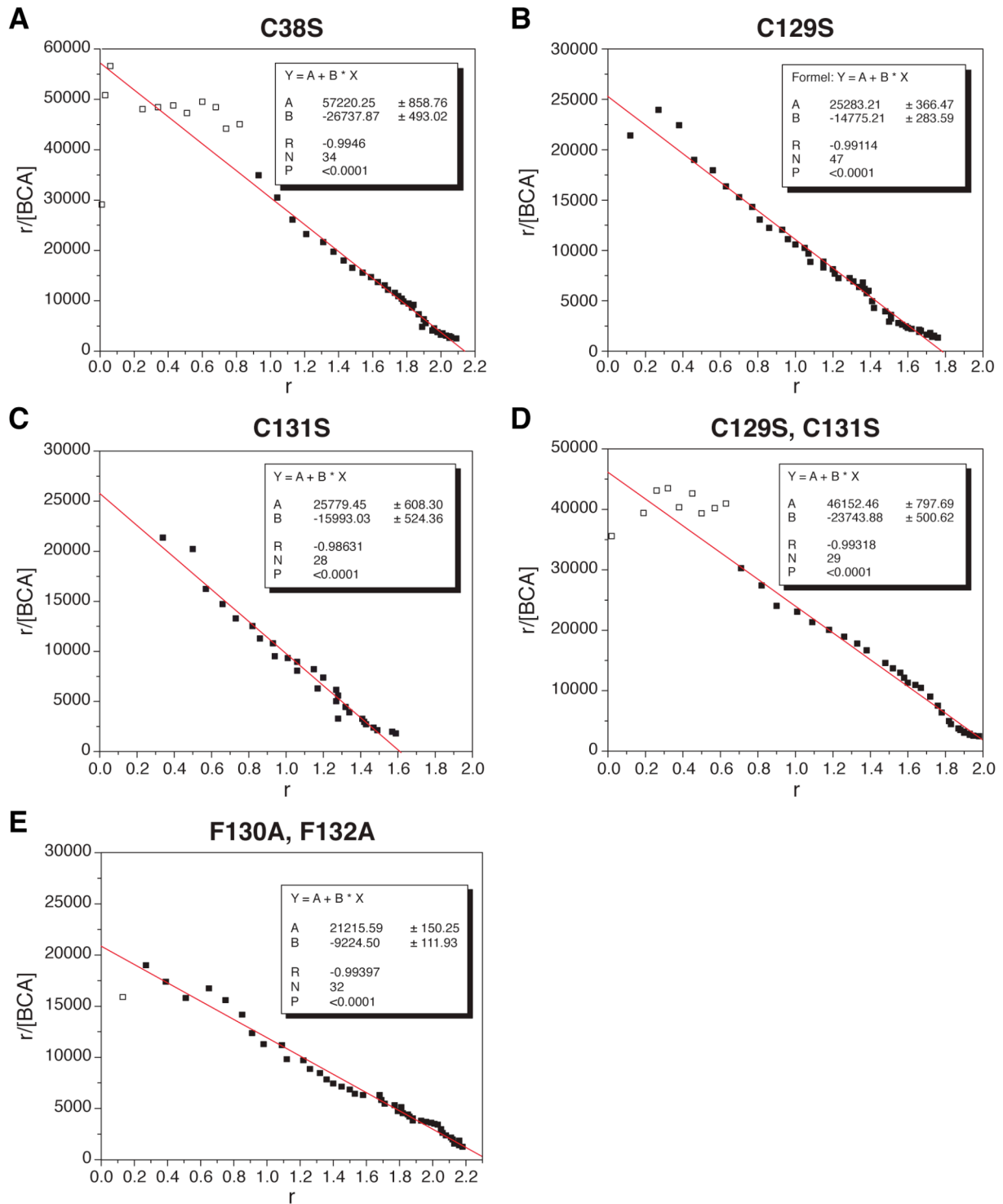
\* Die  $K_d$  für CtaG wird anhand von Gleichung [6.19] berechnet, wobei für die  $K_d$  von BCA ein Wert von  $4,66 \cdot 10^{-8}$  M angesetzt wurde.



**Abbildung 45 - Affinitäten einzelner CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten verglichen mit dem Chelator BCA**

Die aus den Titrationsmessungen erhaltenen Affinitäten für die einzelnen CtaG<sub>LF</sub>-Varianten wurden zu dem verwendeten Chelator BCA in Relation gesetzt. Die relativen Affinitäten der einzelnen Mutanten sind als Säulen dargestellt.



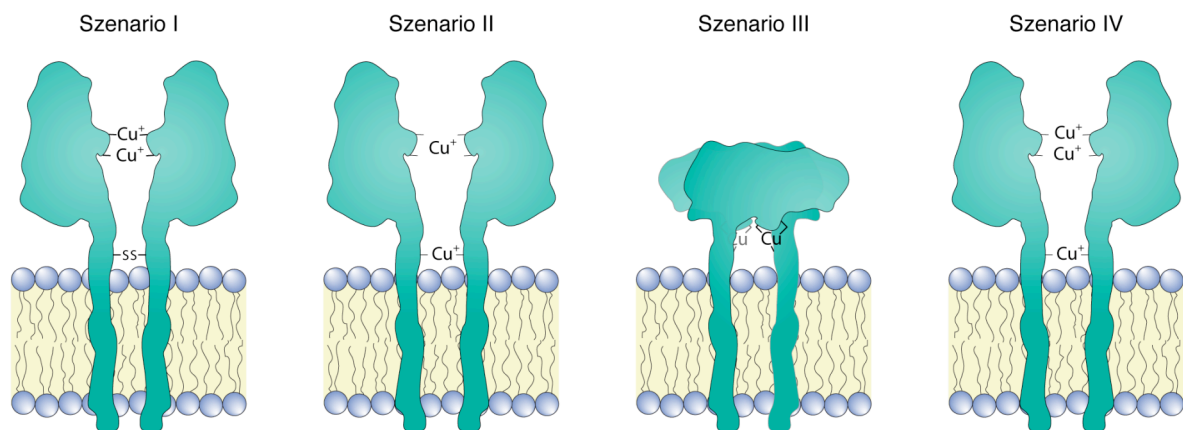


**Abbildung 46 - Scatchard Diagramme der Konkurrenztitrationen mit BCA und CtaGLF-Mutanten**

Verschiedene CtaGLF Mutanten wurden heterolog exprimiert, aufgereinigt und mit Cu(I) rekonstituiert. Nach der Entfernung überschüssiger Metallionen durch Gelfiltrationsläufe wurden die kupferhaltigen Mutanten in Konkurrenzexperimenten untersucht, indem der Cu(I)-spezifische Chelator BCA zu den Proben titriert wurde. Die Auftragung nach Scatchard führt zu einem linearen Kurvenverlauf, was gegen die Existenz mehrerer unterschiedlich gearteter Kupferbindungsstellen spricht. Das Verhältnis  $r$  bewegt sich um 2, was die Stöchiometrie des Cu(I)-BCA<sub>2</sub>-Komplexes widerspiegelt.

### Diskussion

Wie aus den Titrationskurven hervorgeht, weisen die verschiedenen CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten wie erwartet unterschiedliche Affinitäten für Cu(I) auf. Insbesondere die gleichzeitige Mutation der beiden Cysteine im CFCF-Motiv (Cystein 129 und 131) hat einen negativen Effekt auf die Affinität von CtaG<sub>LF</sub>. Interessanterweise hat die Mutation des einzelnen, im nativen CtaG nahe der Transmembrandomäne gelegenen Cystein 38 einen ähnlich dramatischen Effekt auf die Affinität für Cu(I). Betrachtet man die in Abschnitt 5.3 (Abbildung 36, S. 115) diskutierten Szenarien für die Cu(I)-Bindung durch CtaG, so untermauern die Ergebnisse der BCA-Titration maßgeblich das Szenario III, welches eine gemeinsame Koordination von Cu(I) durch das CFCF-Motiv eines Monomers und das nahe der Transmembranhelix gelegene Cystein 38 des anderen Monomers vorsieht.



**Abbildung 47 - Mögliche Szenarien für die Kupferbindung von CtaG**

Szenario I scheidet aufgrund des starken Einflusses der C38S-Mutation auf die Cu(I)-Affinität, wie bereits bei der Betrachtung der Kupfer/Protein-Verhältnisse weiterhin aus. Die Szenarien II und IV werden durch die BCA-Titrations ebenfalls unwahrscheinlich, da in diesen Szenarien zwei unterschiedliche Cu(I)-Bindungsstellen vorliegen, für die man unterschiedliche Affinitäten und somit einen nicht-linearen Verlauf der Scatchard-Diagramme erwarten würde. Die Scatchard Diagramme zeigen aber einen linearen Verlauf, was die Anwesenheit mehrerer Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität ausschließt. Denkbar wäre zwar, dass verschiedene Bindungsstellen vorliegen, welche eine ähnliche Affinität aufweisen. Dies erscheint jedoch schon aufgrund der Zahl der jeweils vorliegenden Cystein-Liganden unwahrscheinlich. Szenario III passt hingegen gut zu den beobachteten Ergebnissen: Während die Mutation eines der beiden Cysteine im CFCF-Motiv die Cu(I)-Bindung zwar schwächt, da keine trigonale Koordination durch die Beteiligung aller drei Cysteinschwefel mehr möglich ist, besteht in diesem Fall aber noch die Möglichkeit einer linearen Cu(I)Cys<sub>2</sub>-Koordination zwischen C38 und einem der beiden Cysteine des CFCF-Motivs. Diese immernoch vergleichsweise stabile Cu(I)-Koordination ist im Fall einer Doppelmutation im CFCF-Motiv oder einer Mutation des

Cystein 38 jedoch nicht mehr möglich, da im ersten Fall kein zweites Cystein für die Koordination von Cu(I) vorhanden ist, und im zweiten Fall die räumliche Nähe der beiden Cysteine des CFCF-Motivs eine lineare Cu(I)Cys<sub>2</sub>-Koordination nicht erlauben würde. Dadurch könnte erklärt werden, warum die Affinität für Cu(I) in diesen Fällen am stärksten sinkt.

Der Frage, warum in diesen Fällen überhaupt noch eine Kupferbindung stattfindet, kann dadurch begegnet werden, dass in jedem Fall ein Cystein pro Monomer vorliegt und das Dimer somit immer über zwei Cysteine zur Koordination des Cu(I)-Ions verfügt. Diese Koordination entspräche dann zwar nicht mehr der nativen Situation, dürfte aber dennoch eine relativ hohe Affinität aufweisen, da Komplexe aus Cu(I) und Thiolaten generell stabil sind.

Die Mutation der beiden Phenylalanine des CFCF-Motivs hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Affinität von CtaG. Allenfalls könnte eine geringfügige Erhöhung der Affinität vorliegen, was den Phenylalaninen eine Rolle bei der Feinregulierung der Affinität zuschreiben könnte.

Die hohe Stabilität von Cu(I)-Thiolat-Komplexen, wie sie beispielsweise für die Mercaptane Glutathion, DTT, Mercaptoethanol und die Metallothioneine bekannt ist, könnte auch erklären, warum die absoluten Affinitäten der untersuchten Mutanten sich nicht um mehrere Größenordnungen voneinander unterscheiden. Obgleich die Mutanten durchaus unterschiedlich affin für Cu(I) sind und die Ergebnisse der BCA-Titration, bei einem Vergleich der Affinitäten untereinander, Sinn ergeben, bewegen sich die berechneten Dissoziationskonstanten allesamt im nanomolaren Bereich. Bei einer dramatischen Mutation, wie der Entfernung beider Cysteine des CFCF-Motivs, die zu einer Reduktion des Cu(I)-Gehalts um ~ 50 % führt, könnte man eine Erhöhung der  $K_d$  um mehrere Größenordnungen erwarten. Dies ist jedoch nicht zu beobachten. In den vorliegenden Titrationen wurde Cu(I) aus den CtaG<sub>LF</sub>-Mutanten entzogen und daraus auf die Affinität der Mutante für Cu(I) rückgeschlossen. *De facto* wurde also die *Stabilität* der zuvor *in vitro* hergestellten Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Komplexe bestimmt. Da Cu-Thiolat-Komplexe generell eine hohe Stabilität aufweisen, könnten aber auch unphysiologische Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Komplexe Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich aufweisen. Die Ergebnisse der BCA-Titrationen sollten daher immer unter Berücksichtigung anderer Ergebnisse, wie beispielsweise der maximalen Cu/Protein-Verhältnisse der einzelnen Mutanten, interpretiert werden.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Betrachtung von Affinitäten nicht vergessen werden sollte ist, dass kinetische und sterische Effekte *in vivo* vermutlich eine mindestens ebenso bedeutende Rolle für den Kupfertransfer spielen, wie die Affinitäten selbst. Ein unphysiologischer Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Komplex aus zwei Cysteinen und einem Cu(I)-Ion könnte zwar ähnlich stabil sein wie ein nativer Komplex, obgleich seine Entstehung *in vivo* allein

aufgrund der Struktur des Proteins oder des Cu(I)-Lieferanten sehr unwahrscheinlich wäre.

#### **6.5. Zusammenfassung**

Sowohl der Wildtyp als auch verschiedene Mutanten des CtaG<sub>LF</sub>-Fragments wurden mit Hilfe der Konkurrenztitration auf ihre Affinität für Cu(I) hin untersucht. Hierfür wurde der selektive Cu(I)-Chelator BCA zu Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Proben titriert, und die Entstehung des farbigen Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes wurde bei 562 nm photometrisch verfolgt. Aus den Titrationskurven, die sowohl durch hyperbole *fits*, als auch mit Hilfe von Scatchard-Diagrammen ausgewertet wurden, geht hervor, dass die Affinitäten von CtaG<sub>LF</sub> und BCA vergleichbar sind, und dass Cu(I) mit etwa dreimal höherer Affinität an CtaG<sub>LF</sub> bindet als an BCA. Legt man der Auswertung eine  $K_d$  für BCA von  $4,6 \cdot 10^{-8}$  M (46,6 nM) zugrunde, so erhält man für CtaG<sub>LF</sub> eine Dissoziationskonstante von  $\sim 1,6 \cdot 10^{-8}$  M ( $\sim 15,9$  nM). Einzelmutationen der Cysteine des CFCF Motivs verringern die Affinität von CtaG<sub>LF</sub> gleichwertig auf Dissoziationskonstanten von  $\sim 25,3$  bzw.  $\sim 23,3$  nM. Die gleichzeitige Mutation beider Cysteine des CFCF-Motivs senkt die Affinität am stärksten ( $K_d \approx 59,5$  nM). Einen ähnlich drastischen Effekt hat jedoch auch die Mutation des nahe der Transmembranhelix gelegenen Cystein 38 ( $K_d \approx 49,9$  nM). Diese Ergebnisse untermauern das in Abschnitt 5 "Untersuchung der Kupferbindungsstelle mittels gerichteter Mutagenese" vorgeschlagene Szenario III für die Cu-Bindung, welches die Koordination von zwei Cu(I)-Ionen pro CtaG-Dimer vorsieht, indem jedes Cu(I)-Ion durch das CFCF-Motiv des einen und das Cystein 38 des anderen Monomers koordiniert wird.



## 7. Spektroskopische Charakterisierung von Cu-CtaG<sub>LF</sub> – Identifikation eines kupferabhängigen UV/Vis-Signals

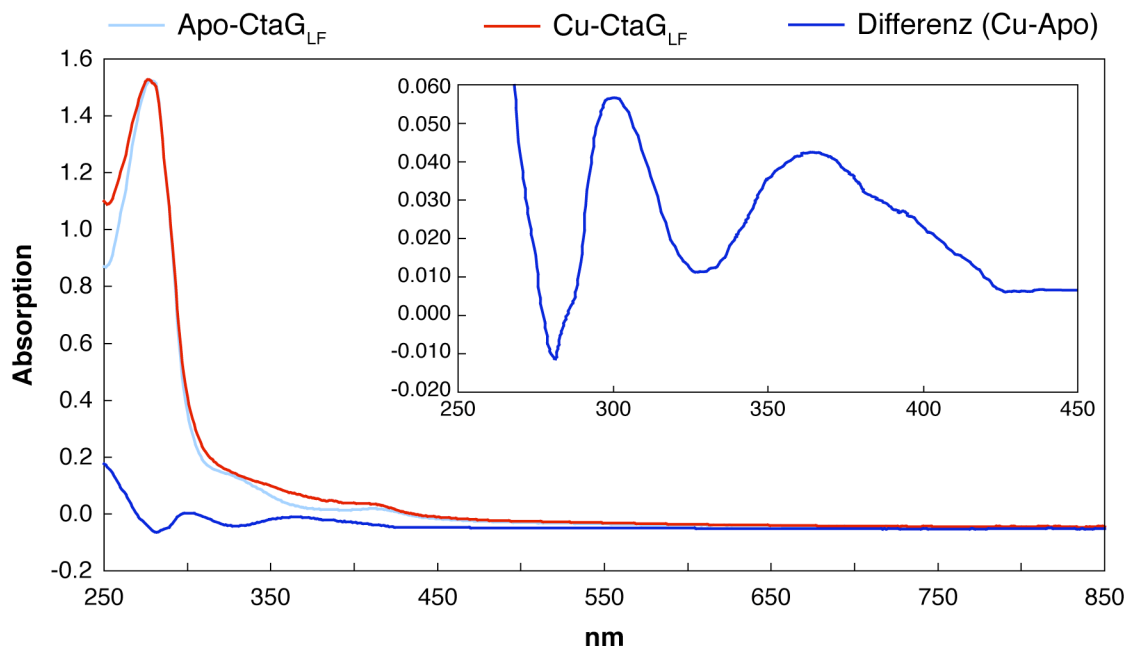
### 7.1. Einleitung

Aus Deletionsexperimenten mit *Paracoccus denitrificans* (Pfitzner 2000) und *Rhodobacter sphaeroides* (Hiser, Di Valentin et al. 2000) ist bekannt, dass CtaG für die Assemblierung der Metallzentren der Cytochrom c Oxidase essentiell ist. Da CtaG ein kupferbindendes Protein ist (Carr, George et al. 2002) und im Fall von *Rhodobacter* ein selektiver Verlust des Cu<sub>B</sub>-Ions nach der CtaG-Deletion beobachtet wurde (Hiser, Di Valentin et al. 2000), geht man davon aus, dass CtaG speziell für die Insertion des Cu<sub>B</sub>-Ions verantwortlich ist. Unklar ist jedoch, ob CtaG direkt mit der Untereinheit I der Oxidase interagiert und unmittelbar für die Insertion des Kupferions verantwortlich ist oder ob es nur indirekt an der Insertion beteiligt ist. Die Frage ob CtaG Kupferionen direkt auf die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (UE I) übertragen kann, ließe sich beispielsweise mit Hilfe eines *in vitro* Kupfertransferassays untersuchen. Dass CtaG dazu in der Lage ist, Kupferionen auf einen geeigneten Akzeptor zu übertragen, wurde im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel des Chelators BCA gezeigt (Kapitel 6 "Bestimmung der Affinität von CtaG<sub>LF</sub> für Cu(I)"). Sollte Cu-CtaG in einem ähnlichen *in vitro* Experiment nun auch Kupferionen auf eine kofaktorfreie UE I übertragen, so wäre dies ein Beweis für die Rolle von CtaG als unmittelbarer Kupferdonor. Ein solcher *in vitro* Transfer würde weiterhin auf eine posttranslationale Insertion des Kofaktors hindeuten und gegen einen kotranslationalen Mechanismus sprechen. Angestrebt wird daher ein *in vitro* Transferassay, in welchem die kofaktorfreie UE I der Cytochrom c Oxidase als Akzeptor für Kupferionen von CtaG<sub>LF</sub> dient. Hierfür werden zum einen die isolierten Proteinkomponenten, das heißt kupfergebundenes CtaG<sub>LF</sub> und eine kofaktorfreie Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase benötigt. Zum anderen bedarf es einer Eigenschaft, anhand derer der Transfer von Kupferionen zwischen CtaG und UE I verfolgt werden kann. Die erste Komponente, Cu-CtaG<sub>LF</sub>, ist bereits vorhanden und wurde in den vorangegangenen Kapiteln behandelt. Desweiteren wird in einem späteren Kapitel gezeigt, dass auch die zweite Komponente, die kofaktorfreie Form der Untereinheit I (Apo-UE I) zugänglich gemacht und für den *in vitro* Kupfertransferassay bereitgestellt werden kann (siehe Abschnitt 8.6 "Heterologe Expression und Aufreinigung der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase", S.168). Um den Transfer von Kupferionen von CtaG auf den Akzeptor UE I direkt verfolgen zu können, bedarf es also noch einer messbaren kupferabhängigen Eigenschaft einer der beiden Komponenten. Der Kupfertransfer von CtaG<sub>LF</sub> auf den Akzeptor BCA wurde anhand der Absorption des entstehenden Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes verfolgt. Bei Verwendung eines von BCA abweichenden Akzeptors wird daher eine andere

spektroskopische Eigenschaft zur Verfolgung des Kupfertransfers benötigt. Auf der Suche nach einer solchen Eigenschaft wurde die UV/Vis-spektroskopische Signatur des löslichen CtaG-Fragments in der kupferfreien und kupfergebundenen Form näher untersucht.

## 7.2. UV/Vis-Signal von Cu-CtaGLF

Zur Identifikation eines potentiellen kupferabhängigen UV/Vis-Signals wurden Spektren von jeweils 50  $\mu\text{M}$  kupferfreiem (Apo-CtaGLF) und kupfergebundenem CtaGLF (Cu-CtaGLF) aufgenommen. Da die Proteinkonzentrationen geringfügig voneinander abwichen, wurden die Spektren auf ihre Extinktion bei 280 nm normiert. Die Spektren von (—) Apo- und (—) Cu-CtaGLF sowie das daraus resultierende (—) Differenzspektrum (Cu minus Apo-CtaGLF) sind in Abbildung 48 dargestellt. Die Kupferbindung führt tatsächlich zu einem veränderten Absorptionsspektrum von CtaGLF: Zum einen kommt es zu einer Verbreiterung und leichten Blauverschiebung des 280 nm Peaks, und zum anderen tritt eine schwache zusätzliche Absorption mit einem Maximum um etwa 358 nm auf. Diese zusätzliche Absorption zeigt sich zwar nicht als definierter Peak im Absorptionsspektrum von Cu-CtaGLF, ist aber in dem Differenzspektrum (Inset Abbildung 48) gut zu erkennen.



**Abbildung 48 - UV/Vis-spektroskopische Signatur von kupferfreiem und kupfergebundenem CtaGLF**

Die Spektren von 50  $\mu\text{M}$  (—) Apo-CtaGLF und (—) Cu-CtaGLF wurden gegen Puffer gemessen und auf die Absorption bei 280 nm normiert. Die Unterschiede zwischen Apo- und Cu-CtaGLF werden aus dem Differenzspektrum (—) Cu-CtaGLF minus Apo-CtaGLF, welches in dem Inset vergrößert dargestellt ist, besonders deutlich.

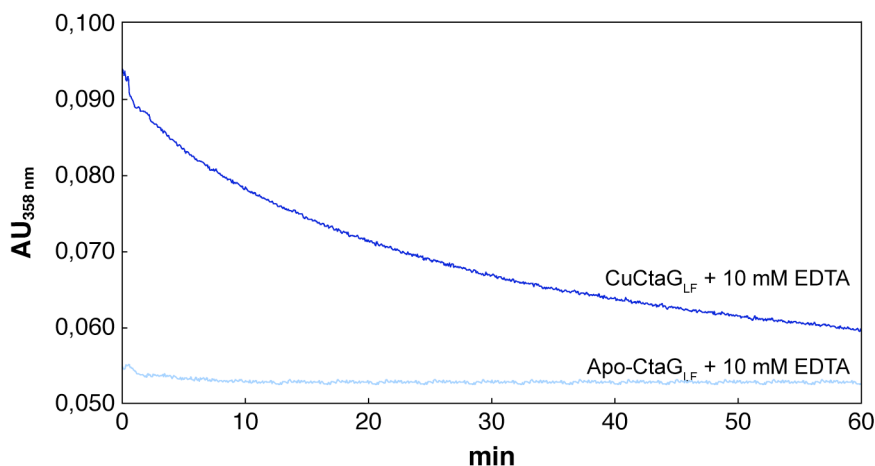
### Diskussion

Die UV/Vis-spektroskopische Analyse zeigt leichte Unterschiede im Absorptionsverhalten von kupferfreiem und kupfergebundenem CtaGLF. Zum einen kommt es zu einer

Verbreiterung und leichten Blauverschiebung des 280 nm Peaks, was bereits für Cox11, das CtaG-Homolog aus Hefe beschrieben wurde und vermutlich auf einer *ligand to metal charge transfer* Bande (LMCT-Bande), in diesem Fall auf einer  $S \rightarrow Cu$ -charge transfer Bande beruht (Carr, George et al. 2002). Die Absorption bei 358 nm hingegen scheint eine Besonderheit des *Paracoccus*-Proteins zu sein und über den ihr zugrundeliegenden Elektronenübergang kann hier nur spekuliert werden. Eine Diskussion dieser möglichen Elektronenübergänge folgt am Ende des Kapitels. Zunächst soll gezeigt werden, dass die Absorption bei 358 nm tatsächlich auf der Bindung von Kupferionen beruht.

### 7.3. Kupferabhängigkeit der 358 nm Bande – EDTA-Titrations

Sollte die Absorption bei 358 nm tatsächlich durch die Bindung von Kupferionen an CtaG<sub>LF</sub> hervorgerufen werden, so müsste ein Entzug der Metallionen zu einer Abnahme der Extinktion bei 358 nm führen. Ein Entzug von Kupferionen lässt sich zum Beispiel durch Inkubation mit einem geeigneten Chelator realisieren. Da die Cu(I)-bindenden Chelatoren BCA, BCS und DTT jedoch selbst Absorptionen im Bereich um 358 nm aufweisen, überlagern sie das Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Signal. Diese Chelatoren kommen für eine photometrische Verfolgung des Kupferentzugs daher nicht in Frage. Als Alternative wurde der starke Metallionen-Chelator EDTA verwendet. Jeweils 50  $\mu$ M Cu-CtaG<sub>LF</sub> und Apo-CtaG<sub>LF</sub> wurden mit 10 mM EDTA inkubiert und die Änderung der Extinktion bei 358 nm wurde zeitlich verfolgt.



**Abbildung 49 - Änderung der 358 nm Absorption von CtaG<sub>LF</sub> nach Zugabe von EDTA**

Jeweils 50  $\mu$ M Cu-CtaG<sub>LF</sub> und Apo-CtaG<sub>LF</sub> wurden mit 10 mM EDTA inkubiert. Während im Fall von Cu-CtaG<sub>LF</sub> ein Abfall der Extinktion bei 358 nm zu beobachten ist, hat die Inkubation des kupferfreien Apo-CtaG<sub>LF</sub> mit EDTA keinen Effekt auf die Extinktion.

Der Entzug von Metallionen mit Hilfe des Chelators EDTA führt tatsächlich zu einer Abnahme des 358 nm Signals und um die Konzentrationsabhängigkeit dieser Veränderung zu überprüfen, wurde im Anschluß eine ganze Reihe von Kinetiken aufgenommen, bei der Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen inkubiert wurde. Die Anfangskonzentrationen von EDTA bewegten sich dabei im Bereich von 25  $\mu$ M bis 12,8 mM. Die entsprechenden Kinetiken sind in Abbildung 50 dargestellt.



7. Spektroskopische Charakterisierung von Cu-CtaGLF  
 – Identifikation eines kupferabhängigen UV/Vis-Signals

$\mu\text{M}$ EDTA-Stammlösung	$\mu\text{M}$ EDTA-Endkonzentration	EDTA/Protein
25	20,8	0,5
50	41,7	1
100	83,3	2
200	166,7	4
400	333,3	8
800	666,7	16
1600	1333,3	32
3200	2666,7	64
6400	5333,3	128
12800	10666,7	256

Tabelle 16 - Für die Kinetiken eingesetzte EDTA-Konzentrationen

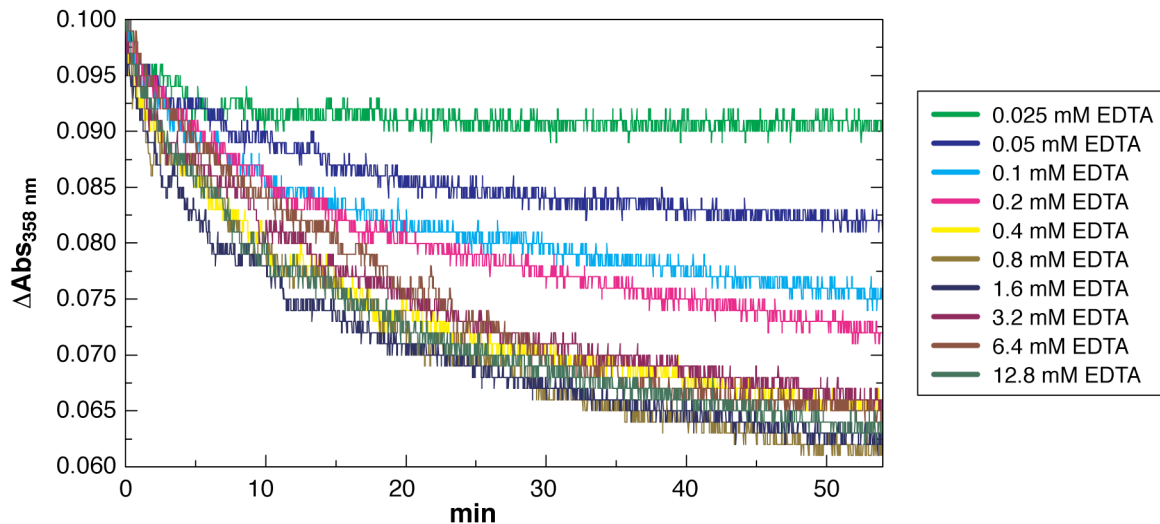
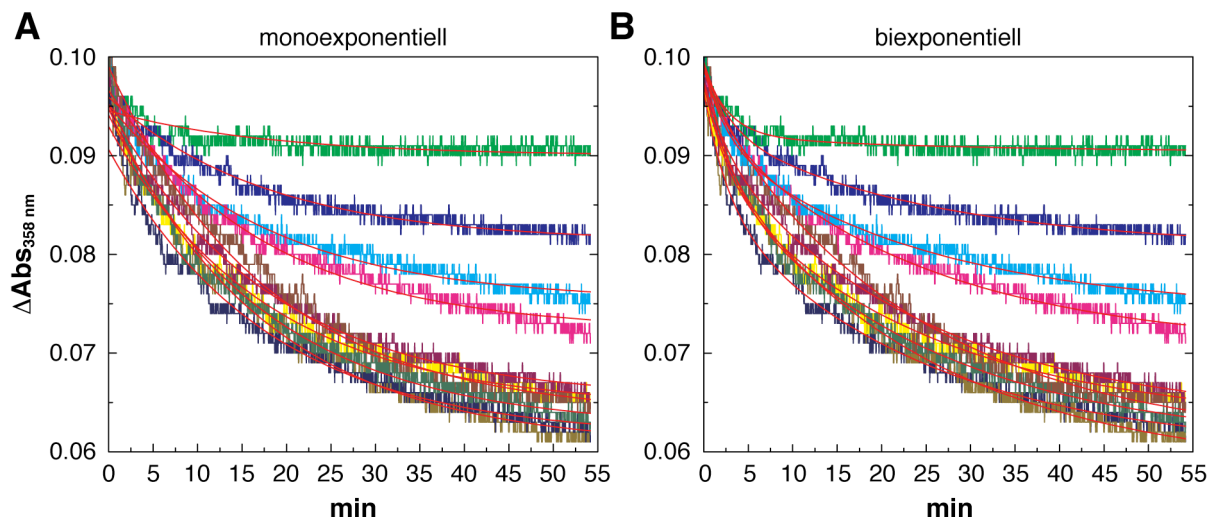


Abbildung 50 - Kinetiken des Kupferentzugs aus Cu-CtaGLF mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen

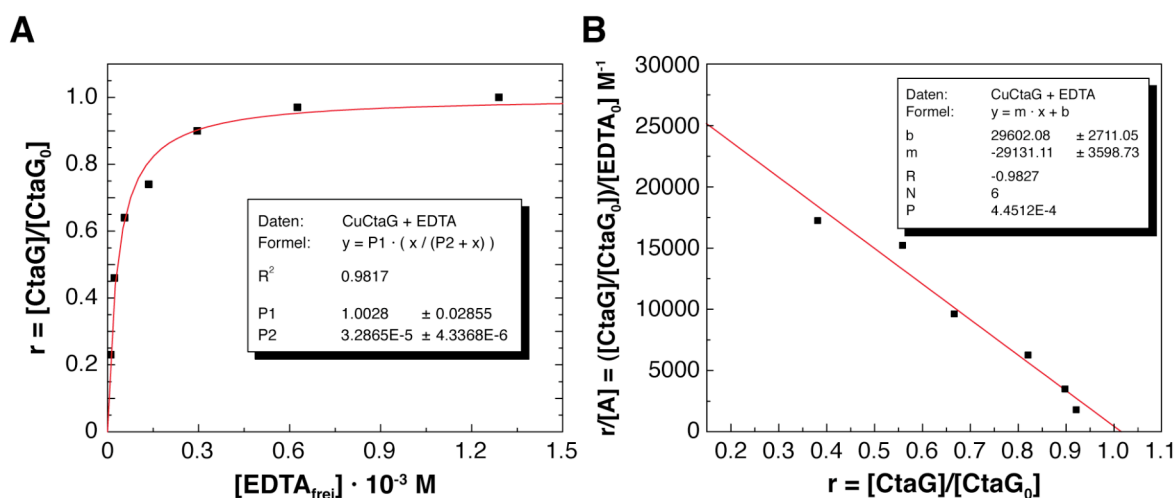
Cu-CtaGLF wurde in einer Endkonzentration von 41,66  $\mu\text{M}$  mit verschiedenen EDTA-Stammlösungen inkubiert und die Veränderung der Extinktion bei 358 nm wurde zeitlich verfolgt.

Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Signaländerung von der eingesetzten EDTA-Konzentration, die bei einer EDTA-Anfangskonzentration von etwa 800  $\mu\text{M}$  maximal wird. Da jeweils 30  $\mu\text{l}$  einer 250  $\mu\text{M}$  Cu-CtaGLF-Lösung mit 150  $\mu\text{l}$  der EDTA-Stammlösungen inkubiert wurden, entspricht die "800  $\mu\text{M}$ "-Probe aus Abbildung 50 einer EDTA-Endkonzentration von 666  $\mu\text{M}$  und einem EDTA/Protein-Verhältnis von 16 (siehe Tabelle 16). Der Kurvenverlauf erinnert in allen Fällen an einen exponentiellen Abfall, weshalb die Kinetiken mit Hilfe von Origin 6.1 sowohl monoexponentiell als auch biexponentiell *gefittet* wurden. Dabei wurden alle Datensätze simultan *gefittet*, so dass die Geschwindigkeitskonstanten  $t_1$  und gegebenenfalls  $t_2$  für alle Kurven identisch waren. Während sich die Kurven mit einem monoexponentiellen *fit* nur unzureichend simulieren lassen, ist die Übereinstimmung mit den biexponentiellen *fits* sehr gut (siehe insbesondere Kurven 1 und 10 in Abbildung 51A).


**Abbildung 51 - Vergleich mono- und biexponentielle fits der EDTA-Kinetiken**

Die aus der Inkubation von Cu-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen erhaltenen Kurvenverläufe für die kupferabhängige Absorption bei 358 nm wurden sowohl monoexponentiell (A) als auch biexponentiell (B) gefittet.

Um die vorliegenden Ergebnisse in Form einer Titrationskurve darstellen zu können, wurde ein erster Extinktionskoeffizient für das kupferspezifische Signal bei 358 nm berechnet: Die Amplitude der hier erhaltenen Kurven kann als Maß für die jeweils aus Cu-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> entzogene Menge an Kupferionen betrachtet werden. Die maximale Änderung der Extinktion bei 358 nm beträgt für die hier verwendete Cu-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> Probe  $\Delta E_{358 \text{ nm}} = 0,39$ . Dies entspricht dem vollständigen Entzug von Kupferionen aus Cu-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub>. Es ergibt sich somit ein Extinktionskoeffizient für die Änderung bei 358 nm von  $\epsilon_{\Delta 358 \text{ nm}} = \Delta E_{358 \text{ nm}} / (c \cdot d) = 936 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Mit Hilfe dieses Extinktionskoeffizienten wurden die Konzentrationen von Cu-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> und Apo-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> für jeden EDTA-Titrationsschritt berechnet. So konnten die vorliegenden Daten analog zu den Titrationskurven für BCA graphisch aufgetragen werden.


**Abbildung 52 - Titrationskurve und Scatchard-Diagramm für den Kupferentzug aus Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> durch EDTA**

Anhand der Extinktion bei 358 nm lässt sich der Kupfergehalt von Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> bestimmen. So kann für jeden Titrationsschritt das Verhältnis zwischen Cu-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> und Apo-Cta<sub>G<sub>LF</sub></sub> berechnet werden. Unter Kenntnis dieser Größen, lassen sich die Ergebnisse in Form einer klassischen Titrationskurve und als Scatchard-Diagramm auftragen.

Um die Titrationsdaten analog zu dem für BCA beschriebenen Verfahren auszuwerten, muss ein Gleichgewicht vorausgesetzt werden, bei dem zunächst CtaG<sub>LF</sub> und das Lösungsmittel um die Kupferionen konkurrieren. Gleichzeitig konkurriert der Chelator EDTA ebenfalls mit dem Lösungsmittel um die Kupferionen. Da es sich auch hier um eine Konkurrenztitration handelt, wird für die Berechnung der  $K_d$  von Cu-CtaG<sub>LF</sub> wieder die Affinität des Chelators benötigt. Unter Standardbedingungen gilt für die Bindungskonstante von Kupfer und EDTA:  $\log K = 18,8$  (Martell und Smith 1974). Daraus folgt  $K_a = 10^{18,8} = 6,3 \cdot 10^{18} \text{ M}^{-1}$  bzw. für die Dissoziationskonstante  $K_d = 1/K_a = 1,58 \cdot 10^{-19} \text{ M}$ . Dieser Wert muss jedoch noch an pH und Ionenstärke des verwendeten Puffersystems angepasst werden. Die nach Schwarzenbach für pH 8 (Korrekturwert  $\alpha$ ) und nach Martell und Smith auf eine Ionenstärke von 300 mM (Korrekturwert  $I$ ) korrigierte Affinitätskonstante für EDTA beträgt:

$$\log K_{\text{app}} = \log K - \log \alpha + I = 18,8 - 2,51 + 0,13 = 16,43$$

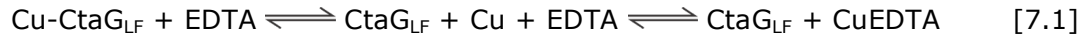
Dies entspricht einer apparenten  $K_a$  von  $2,69 \cdot 10^{16} \text{ M}^{-1}$  bzw. einer  $K_d$  von  $3,7 \cdot 10^{-17} \text{ M}$ . Berechnet man nun mit Hilfe dieser  $K_d$  für EDTA die Dissoziationskonstante von Cu-CtaG<sub>LF</sub> nach Gleichung [6.19], erhält man einen Wert von  $K_d = 3,86 \pm 0,05 \cdot 10^{-17} \text{ M}$ . Die Affinität von CtaG wäre also in etwa so hoch wie die Affinität von EDTA.

### Diskussion

Zunächst zeigt Abbildung 49, dass der Entzug von Metallionen mit Hilfe des Chelators EDTA zu einer Abnahme der Extinktion bei 358 nm führt. Diese Abnahme ist nur für Cu-CtaG<sub>LF</sub> zu beobachten und tritt bei kupferfreiem Apo-CtaG<sub>LF</sub> nicht auf. Das 358 nm Signal beruht also tatsächlich auf der Bindung von Kupfer an CtaG und mit Hilfe dieser spektroskopischen Eigenschaft lässt sich der Transfer von Kupferionen auf einen Akzeptor direkt verfolgen.

Eine Reihe von Kinetiken mit unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen zeigt weiterhin, dass mit Hilfe des kupferspezifischen Signals prinzipiell auch Konkurrenztitrationen verfolgt werden können (Abbildung 50). Aus den beobachteten Kurven lässt sich zunächst ein Extinktionskoeffizient für den Kupferbeladungsstatus von CtaG<sub>LF</sub> berechnen. Der Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{\lambda 358 \text{ nm}} = 936 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ist verglichen mit echten Chromophoren, wie einem Cytochrom *c* ( $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 19400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) oder dem Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplex ( $\epsilon_{562 \text{ nm}} = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) sehr niedrig. Dies verwundert jedoch nicht, da bereits aus den ersten Spektren hervorgeht, dass die kupferspezifische Absorption um 358 nm sehr schwach ist (Abbildung 48). Unter Annahme einer  $K_d$  von  $3,7 \cdot 10^{-17} \text{ M}$  für EDTA (pH 8, Ionenstärke 0,3 M) ergibt sich aus diesen Titrationskurven für CtaG<sub>LF</sub> eine  $K_d$  von  $3,86 \pm 0,05 \cdot 10^{-17} \text{ M}$ .

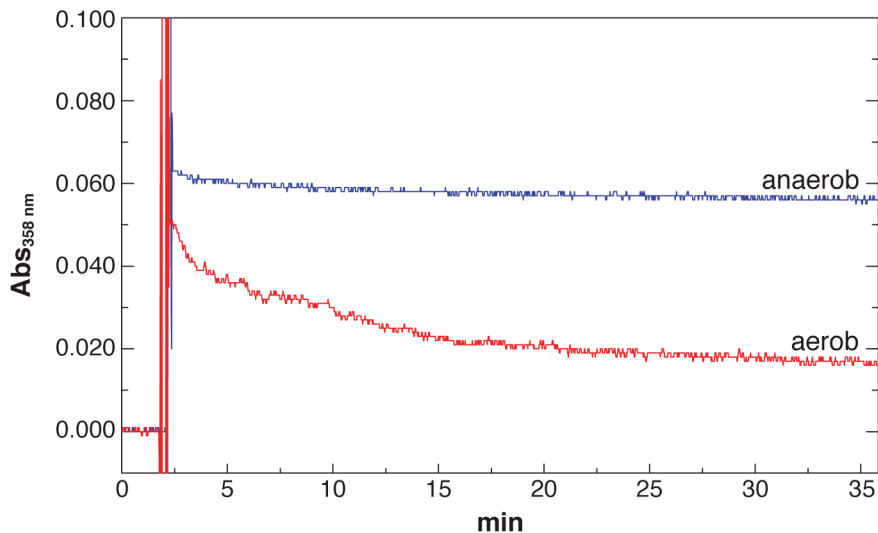
Diese  $K_d$  weicht jedoch von den zuvor bestimmten Bindungskonstanten ab und kann aus folgendem Grund nicht korrekt sein: Um die EDTA-Titrations quantitativ auswerten zu können, müsste ein vereinfachtes Gleichgewicht angenommen werden, das die Oxidationsstufe der Kupferionen vernachlässigt:



Die reale Situation ist aber wesentlich komplexer, da EDTA zweiwertige Metallionen bindet, CtaG und BCA hingegen einwertige. Bereits in der ersten EDTA-Kinetik (Abbildung 49) fällt auf, dass der Kupfertransfer von CtaG auf EDTA sehr langsam verläuft. Während der Entzug von Kupferionen durch den Cu(I)-spezifischen Chelator BCA innerhalb von 20-40 Sekunden das Gleichgewicht erreicht (siehe S. 130, "(b) Einfluss der kinetischen Komponente der Kompetitionsreaktion"), ist der Transfer zwischen EDTA und Cu-CtaG<sub>LF</sub> auch nach 1 h noch nicht abgeschlossen. Ursache für diesen vergleichsweise langsamen Entzug der Kupferionen durch EDTA ist vermutlich die Tatsache, dass die Cu(I)-Ionen erst zu Cu(II) oxidieren müssen, was die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion drosselt und einen irreversiblen Schritt in die Gesamtreaktion einführt. Die Bestimmung von Affinitäten aus den EDTA-Titrations ist daher nicht möglich.

#### **7.4. Sauerstoffabhängigkeit des Kupferentzugs durch EDTA**

Um zu testen, ob der Entzug von Kupferionen aus CtaG<sub>LF</sub> tatsächlich mit einer Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) einhergeht, wurde die Sauerstoffabhängigkeit der Reaktion überprüft. Dafür wurden eine ~ 250 µM Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Probe und 800 µl einer 12,8 mM EDTA-Lösung über Nacht anaerobisiert, indem die Proben offen in ein Anaerobenzelt gestellt wurden. Hierfür durfte freundlicherweise eine Vorrichtung der Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Bioenergetik (Institut für Molekulare Biowissenschaften) mitbenutzt werden. Gasdichte Hamiltonspritzen wurden von Ellen Oelgeschläger (AK Rother) zur Verfügung gestellt, die auch bei der Arbeit im Anaerobenzelt behilflich war und freundlicherweise eine Einführung in korrektes anaerobes Arbeiten gab. Die anaerobisierten Proben wurden in gasdichten Küvetten mit einem Septum verschlossen, aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und anschließend wie alle in dieser Arbeit präsentierten Spektren an einem aerob aufgestellten Photometer (Hitachi U-3000) vermessen. Zunächst wurden 200 µl des anaerobisierten Cu-CtaG<sub>LF</sub> unter anaeroben Bedingungen in 800 µl anaerobisiertes EDTA (12,8 mM) transferiert und die Extinktion bei 358 nm wurde verfolgt. Anschließend wurden weitere 200 µl derselben anaerobisierten Cu-CtaG<sub>LF</sub>-Probe in eine zuvor mit Luft durchspülte also aerobe EDTA-Lösung (12,8 mM) pipettiert, welche sich in einer offenen Küvette befand. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 53 dargestellt.

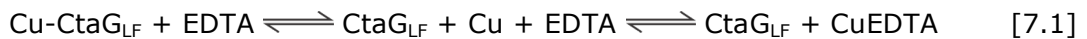


**Abbildung 53 - Inkubation von Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit EDTA unter aeroben und anaeroben Bedingungen.**

ca. 50  $\mu\text{M}$  anaerobisiertes Cu-CtaG<sub>LF</sub> wurden sowohl unter aeroben Bedingungen (—), als auch anaerob (—) mit 10 mM EDTA inkubiert. Unter anaeroben Bedingungen findet kaum noch ein Transfer von Kupferionen zwischen CtaG<sub>LF</sub> und EDTA statt.

### Diskussion

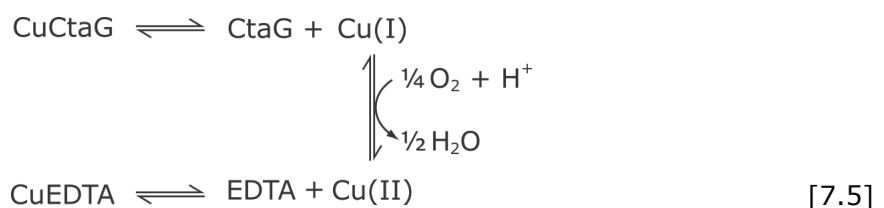
Wie in Abbildung 53 zu erkennen, nimmt das kupferspezifische Signal kaum noch ab, wenn die Inkubation von Cu-CtaG<sub>LF</sub> und EDTA unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wird. Offensichtlich wird für den Kupfertransfer von CtaG<sub>LF</sub> auf EDTA Sauerstoff benötigt, was mit der Theorie übereinstimmt, dass eine Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) mit dem Kupfertransfer von CtaG<sub>LF</sub> auf EDTA einhergeht. Das beobachtete Gleichgewicht entspricht also nicht einfach:



Stattdessen wird eine Kombination aus drei Gleichgewichtsreaktionen beobachtet:



Zusammengenommen ergeben diese drei Gleichgewichte das folgende Bild für die beobachtete Gesamtreaktion:



Das Gleichgewicht zwischen Cu-CtaG und freiem Cu(I) liegt zwar aufgrund der hohen Affinität von CtaG für Cu(I) auf der Seite von Cu-CtaG. Da aber EDTA in großem Überschuss vorliegt, werden Cu(II) Ionen, die aus der Oxidation von Cu(I)

hervorgegangen sind, sofort mit hoher Affinität von EDTA gebunden. Die so entstehende Verringerung der freien Cu(I)-Konzentration verschiebt das Gleichgewicht zwischen Cu-CtaG und freiem Cu(I) zu Ungunsten des Cu-CtaG-Komplexes. Es kommt also zu einem indirekten Entzug von Cu(I) durch den Chelator EDTA. Und die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) könnte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion sein, zumal die Sauerstoffkonzentration in wässriger Lösung mit maximal  $\sim 260 \mu\text{M}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) nicht wesentlich größer ist als die Konzentration von Cu(I) ( $\sim 50 \mu\text{M}$ ). Dies würde den vergleichsweise langsamen Ablauf des Kupferentzugs durch EDTA erklären.

Der zusätzliche Oxidationsschritt erklärt auch, warum sich die EDTA-Kinetiken nur unzureichend mit einem monoexponentiellen Modell *fitten* lassen und ein biexponentieller *fit*, welcher zwei überlagerte Reaktionen auf verschiedenen Zeitachsen simuliert, eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten liefert (siehe Abbildung 51).

Desweiteren wird durch die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) ein irreversibler Schritt in das Gleichgewicht zwischen Cu-CtaG<sub>LF</sub> und CuEDTA eingeführt. Einmal zu Cu(II) oxidierte Kupferionen können ohne Reduktionsmittel nicht mehr zu Cu(I) reduziert werden und sind somit für CtaG nicht mehr zugänglich. Es besteht also *de facto* kein "Gleichgewicht" zwischen Cu-CtaG<sub>LF</sub> und CuEDTA, weshalb eine quantitative Auswertung der vorliegenden Ergebnisse mit dem Ziel einer Affinitätsbestimmung nicht möglich ist. Im Fall eines Cu(I)-spezifischen Akzeptors könnte die Absorption bei 358 nm jedoch auch zur quantitativen Auswertung von Konkurrenztitrationen herangezogen werden. Generell eignet sich das neu identifizierte kupferspezifische Signal sehr gut, um den Beladungsstatus von CtaG<sub>LF</sub> mit Kupfer zu überwachen und um den Transfer von Kupferionen zwischen CtaG<sub>LF</sub> und einem Akzeptor zu beobachten. Somit sind alle Voraussetzungen für einen *in vitro* Kupfertransferassay zwischen Cu-CtaG<sub>LF</sub> und der UE I der Cytochrom c Oxidase erfüllt.

## 7.5. Diskussion möglicher Elektronenübergänge

Die Frage nach der physikalischen Ursache für das kupferabhängige Signal um 358 nm lässt sich ohne weitere Experimente nicht abschließend beantworten. Da Cu(I)-Proteine im sichtbaren Bereich üblicherweise keine Absorption zeigen, ist die Datenlage zur Absorptionsspektroskopie von Cu(I)-Proteinen gering, und über den ursächlichen Elektronenübergang kann hier nur spekuliert werden. Allgemein kommen für eine Absorptionsbande, welche durch die Bindung eines Metallions an ein Protein hervorgerufen wird, drei verschiedene Arten von Elektronenübergängen in Frage (Lippard und Berg 1995; Kaim und Schwederski 2004):

1. Übergänge zwischen dem Metallion und einem Liganden, der das Metallion komplexiert, sogenannte *ligand to metal charge transfer* Banden (LMCT).
2. Interne Übergänge des Metallions ( $d \rightarrow d$  Übergänge).
3. Übergänge innerhalb des Proteins, auch interne Ligandenübergänge (z.B.  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergänge) genannt.

Im Fall eines mehrkernigen Metallzentrums kommt darüber hinaus noch eine vierte Art von Elektronenübergängen in Frage:

4. Ein Ladungstransfer zwischen den Metallionen (Chen, Cabrito et al. 2002).

Elektronische Übergänge innerhalb des Metallions (Fall 2) setzen voraus, dass Elektronen aus einem Orbital in ein anderes Orbital übergehen können. Die charakteristischen Farben der d-Metalle Kupfer, Kobalt, Mangan, Nickel etc. rühren allesamt von  $d \rightarrow d$  Übergängen, also von Übergängen in der äußersten Schale des Metallions her. Nun sind die d-Orbitale von  $d_{10}$ -Metallen wie Cu(I), Ag(I) oder Hg(II) voll besetzt. Es kann also im Normalfall zu keinem  $d \rightarrow d$  Übergang innerhalb eines Cu(I)-Ions kommen. Aus diesem Grund sind Cu(I)-Proteine in der Regel farblos und ein interner Elektronenübergang des Cu(I)-Ions ist als Ursache für das 358 nm Signal von Cu-CtaG sehr unwahrscheinlich.

Im Fall eines mehrkernigen Cu(I) Zentrums (Fall 4) wäre ein simultaner Austausch zweier Elektronen zwischen den beiden Cu(I)-Ionen jedoch durchaus denkbar. Dieser könnte bei einem Thiolatverbrückten Cu-S-Cu Cluster, wie es beispielsweise in Szenario I der hier vorgeschlagenen Szenarien für die Kupferbindung (siehe Abbildung 37, S.116) vorliegen würde, über einen sogenannten *sigma/sigma superexchange pathway* stattfinden (Chen, Cabrito et al. 2002). Ein solcher Übergang müsste jedoch theoretisch auch bei den CtaG-Homologen aus Hefe, *S. meliloti* oder *R. sphaeroides* beobachtet werden. Interessanterweise ist die 358 nm Absorptionsbande für Cu-CtaG bisher jedoch für keines der Homologe beschrieben, d.h. es handelt sich um eine für das *Paracoccus*-Homolog charakteristische Eigenschaft. Da CtaG stark konserviert ist, muss die kupferspezifische Absorption durch einen geringfügigen Sequenzunterschied

hervorgerufen werden, der das *Paracoccus* Protein von anderen Homologen unterscheidet. Dieser Sequenzunterschied könnte einen Einfluss auf die Struktur des Proteins haben und beispielsweise Unterschiede in der Lösungsmittelzugänglichkeit des Kupferzentrums mit sich ziehen.

Es ist aber auch denkbar, dass aufgrund einer etwas anderen Aminosäurezusammensetzung speziell im Fall des *Paracoccus* Proteins ein interner Ligandenübergang (Fall 3) möglich ist, beispielsweise ein  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang in den delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystemen der Phenylalanine des CFCF-Motivs. Dem könnte relativ einfach durch eine UV/Vis-spektroskopische Analyse der Phenylalaninmutante (F130A F132A) nachgegangen werden. Allerdings bewegen sich die Absorptionen der aromatischen Aminosäuren üblicherweise im UV-Bereich. Wahrscheinlicher ist daher ein Effekt, der auf der Wechselwirkung zwischen dem Metallion und einem Liganden beruht.

Sind an der Metallkoordination Cysteinthiolate beteiligt, kann es aufgrund der Cu(I)-Bindung zu  $S \rightarrow \text{Cu(I)-charge transfer}$  Banden kommen (Fall 1). Diese treten üblicherweise im UV-Bereich auf und sind, wie oben erwähnt, vermutlich Ursache der Verbreiterung und Blauverschiebung des 280 nm Peaks von Cu-CtaG<sub>LF</sub>. Liegt das Kupferion jedoch in der oxidierten Cu(II)-Form vor, so befindet sich die  $S \rightarrow \text{Cu-charge transfer}$  Bande üblicherweise im Bereich um 600 nm, was den blauen Kupferproteinen ihre charakteristische Farbe verleiht. Diese  $S \rightarrow \text{Cu(II)-charge transfer}$  Bande kann sich abhängig von der Form des Ligandenfeldes verschieben. Für grüne Kupferproteine wie die Nitrit-Reduktase liegt sie beispielsweise bei etwa 450 nm, und das rote Kupferprotein Nitrosocyanin zeigt sogar eine Verschiebung auf 390 nm (Basumallick, Sarangi et al. 2005). Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums der  $S \rightarrow \text{Cu(II)-charge transfer}$  Bande hängt mit einer Veränderung des Winkels zwischen S und Cu(II) zusammen: während das Kupferion in blauen Kupferproteinen trigonal planar koordiniert vorliegt und einen schwachen axialen Liganden aufweist, wird die Koordination für die grünen und roten Kupferproteine zunehmend tetraedrisch verzerrt. Mit zunehmender Verzerrung nimmt die Intensität der  $S-\pi \rightarrow \text{Cu(II)}$  Absorption ab und die Intensität der  $S-\sigma \rightarrow \text{Cu(II)}$  Absorption zu. Das heißt die S-Cu-Bindung geht mit zunehmender Verzerrung der Koordinationssphäre von einer pi-Bindung in eine sigma-Bindung über und dadurch verändert sich die Absorption der  $S \rightarrow \text{Cu(II)-charge transfer}$  Bande von blau über grün nach rot.

Eine ähnliche  $S \rightarrow \text{Cu(II) charge transfer}$  Bande wurde auch für das potentielle Kupferchaperon Sco1 beschrieben, welches über ein konserviertes CX<sub>3</sub>C-Motiv und ein distales Histidin sowohl Cu(I) als auch Cu(II) binden kann (Horng, Leary et al. 2005; Rigby, Cobine et al. 2008). Diese Cu(II)-abhängige Sco1-Bande liegt mit einem Maximum von etwa 360 nm in einem sehr ähnlichen Bereich, wie die hier beschriebene



Absorption von Cu-CtaGLF. Es ist also nicht vollkommen auszuschließen, dass die Absorption bei 358 nm auf Cu(II) Ionen und somit auf eine  $S \rightarrow \text{Cu(II)}$  *charge transfer* Bande zurückzuführen ist. Eine Kontrolle der Cu-CtaGLF-Probe mittels EPR würde sich anbieten, um potentiell gebundenes Cu(II) zu identifizieren. Desweiteren könnte eine Titration von Cu-CtaGLF mit beiden Chelatoren (EDTA und BCA) durchgeführt werden: Ist nach vollständig beendeter EDTA-Titration immernoch die Bildung eines Cu(I)BCA<sub>2</sub>-Komplexes zu beobachten, so würde dies auf die Bindung von zwei Kupferspezies (Cu(I) und Cu(II)) hindeuten. Allerdings weist Sco1 zwei  $S \rightarrow \text{Cu(II)}$ -*charge transfer* Banden auf: Eine für die  $\sigma$ -Bindung bei 360 nm und eine zweite für die  $\pi$ -Bindung bei etwa 480 nm. Eine solche zweite Bande tritt bei Cu-CtaGLF nicht auf. Die oben beschriebenen farbigen Typ 1 Kupferproteine weisen weiterhin alle eine Koordination des Cu(II)-Ions durch zwei N(His)-Liganden auf. Eine solche N(His)-Cu-N(His) Koordination kann aber im Fall von CtaG keinesfalls vorliegen, da das Protein lediglich ein Histidin enthält, welches weder konserviert ist, noch in räumlicher Nähe zu den kupferbindenden Cysteinen liegt. Darüberhinaus wurde bei Cyclovoltammetrie-Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Frank Wiertz am Leiden Institute of Chemistry (Prof. G.W. Canters) durchgeführt wurden, beobachtet, dass die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) zu einer sofortigen Freisetzung des Metallions aus CtaGLF führt (Daten nicht gezeigt). Diese Argumente und die Tatsache, dass für den Kupfertransfer von CtaG auf EDTA Sauerstoff benötigt wird, sprechen dafür, dass CtaG ausschließlich Cu(I) bindet und dass das Cu-CtaGLF-Signal bei 358 nm nicht auf einer  $S \rightarrow \text{Cu(II)}$ -*charge transfer* Bande, sondern auf einer Cu(I)-abhängigen Eigenschaft beruht. Dabei könnte es sich aber durchaus um einen Ladungstransfer zwischen Cu(I) und einem der Liganden also um eine LMCT-Bande handeln. Allerdings ist meines Wissens gegenwärtig keine ähnliche  $S \rightarrow \text{Cu(I)}$ -*charge transfer* Bande in der Literatur beschrieben.

Der tatsächliche Elektronenübergang, welcher dem kupferabhängigen UV/Vis-Signal bei 358 nm zugrundeliegt, ließe sich nur mit Hilfe einer umfassenden spektroskopischen Analyse identifizieren. Absorptions-, MCD-, CD- und EPR-Spektren, die allesamt bei sehr niedrigen Temperaturen aufgenommen werden, wären ein erster Schritt zur Charakterisierung dieses neuen kupferabhängigen Signals. Eine Kooperation mit einer auf die spektroskopische Charakterisierung bioanorganischer Metallzentren spezialisierten Arbeitsgruppe würde sich hierfür anbieten.

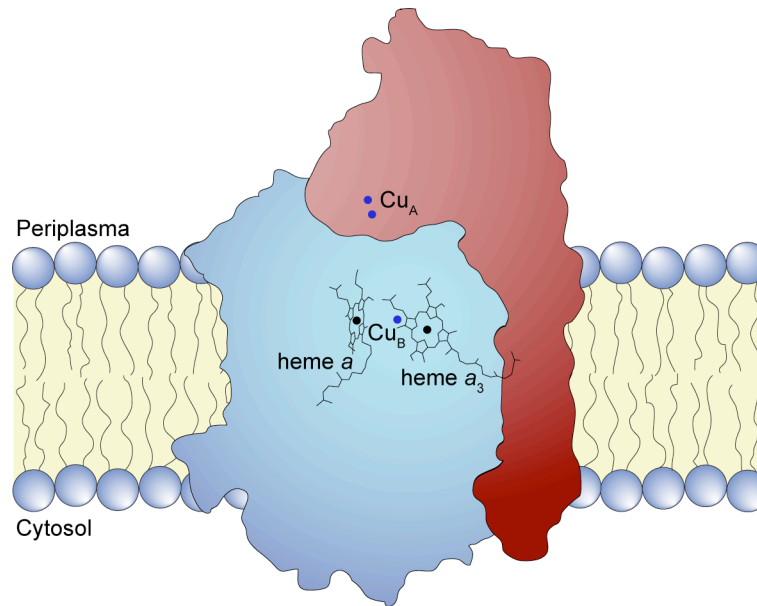
## 7.6. Zusammenfassung

Um eine Eigenschaft zu identifizieren, anhand derer der Kupfertransfer von CtaG<sub>LF</sub> auf einen Akzeptor verfolgt werden kann, wurde das lösliche CtaG-Fragment UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Die Absorptionsspektren zeigen definierte Unterschiede zwischen kupferfreiem und kupfergebundenem CtaG<sub>LF</sub>. Zum einen kommt es im Zuge der Kupferbindung zu einer Verbreiterung und leichten Blauverschiebung des 280 nm Peaks, die auf einer Überlappung der Absorption aromatischer Aminosäuren mit einer  $S \rightarrow Cu(I)$ -charge transfer Bande beruht. Zum anderen zeigt sich eine Absorption mit einem Maximum bei etwa 358 nm, die bisher für keines der CtaG-Homologe beschrieben wurde und hier erstmals gezeigt wird. Dieses 358 nm Signal kann mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\lambda 358 \text{ nm}} = 936 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  als Reporter für den Kupferbeladungsstatus von CtaG verwendet werden. Am Beispiel des Chelators EDTA konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Kupferionen zwischen CtaG und einem Akzeptor mit Hilfe des 358 nm Signals direkt verfolgt werden kann.

## 8. Wechselwirkung und Kupfertransfer zwischen CtaG und der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase

### 8.1. Einleitung

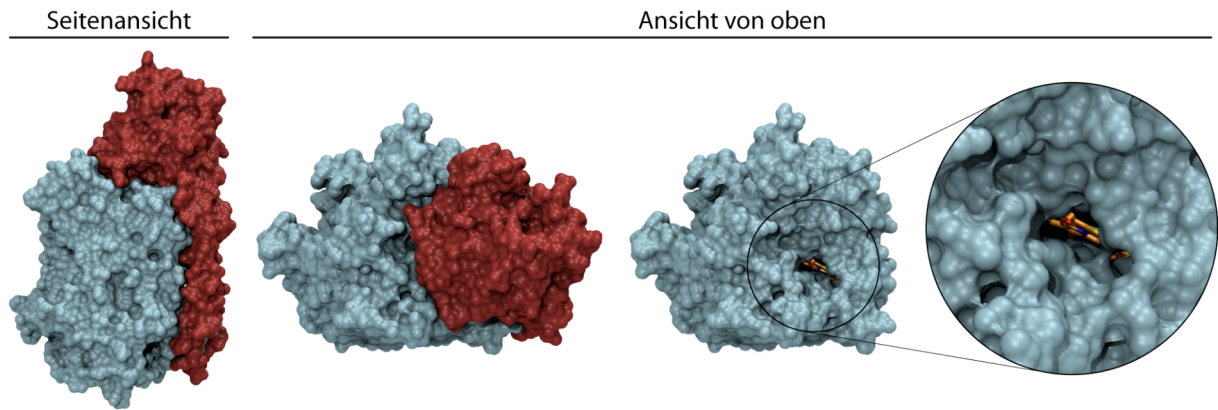
Eine letzte wichtige Eigenschaft, die betrachtet werden muss, um die Rolle von CtaG als Kupferchaperon bei der Assemblierung des  $\text{Cu}_B$ -Zentrums zu untersuchen, ist die Wechselwirkung mit dem potentiellen Interaktionspartner des Kupferchaperons, die Wechselwirkung mit der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (UE I). Da CtaG nicht Teil des finalen Komplexes, der vollständigen Cytochrom c Oxidase ist, muss es sich bei der potentiellen Interaktion zwischen CtaG und UE I um eine transiente Wechselwirkung handeln. Das heißt CtaG trifft auf UE I, inseriert das Kupferion und verlässt den transienten Komplex sofort wieder. Zum einen stellt sich jedoch noch immer die grundlegende Frage, ob CtaG überhaupt mit UE I interagiert. Es wird zwar allgemein davon ausgegangen, dass CtaG für die Insertion des  $\text{Cu}_B$ -Ions verantwortlich ist, da die Deletion von CtaG zu einem Verlust des  $\text{Cu}_B$ -Ions führt und da CtaG ein Cu(I)-bindendes Protein ist (Hiser, Di Valentin et al. 2000; Carr, George et al. 2002). Bisher konnte jedoch für keines der CtaG-Homologe eine Interaktion mit der UE I der Cytochrom c Oxidase nachgewiesen werden. Weitere Fragen, die sich aus einer möglichen Wechselwirkung ergeben, beziehen sich auf den Zustand in dem die UE I zum Zeitpunkt der Interaktion vorliegt. Befindet sie sich noch im Synthesestadium, also als naszierende Kette am Ribosom, oder liegt sie bereits als fertig synthetisiertes integrales Membranprotein vor – das heißt findet der Kupfertransfer kotranslational oder posttranslational statt? Und liegt die UE I als kofaktorfreies Apo-Protein vor oder enthält sie bereits einen oder mehrere der Häm *a* Kofaktoren? Auch die Frage, ob weitere Chaperone für die Kupferinsertion notwendig sind, indem sie beispielsweise die Rekrutierung verschiedener Assemblierungsfaktoren koordinieren oder Assemblierungsintermediate stabilisieren, gilt es zu beantworten.



**Abbildung 54 - Schematische Darstellung des katalytisch aktiven Zwei-Untereinheiten Komplexes der Cytochrom c Oxidase und der redoxaktiven Kofaktoren.**

Betrachtet man die Lage der Kofaktoren innerhalb der Cytochrom c Oxidase (Abbildung 54), so zeigt sich, dass das  $\text{Cu}_B$ -Ion etwa  $13 \text{ \AA}$  unterhalb der Membranoberfläche liegt und von den zwölf Transmembranhelices der UE I sicher umschlossen ist (Iwata, Ostermeier et al. 1995). Auf den ersten Blick liegt daher ein Mechanismus nahe, in dem die Kofaktoren bereits eingebaut werden bevor das Protein vollständig exprimiert und in die Membran integriert wurde. Daher basiert eine Strategie zur Untersuchung der Biogenese der Cytochrom c Oxidase, auf der Arbeitshypothese, dass die Insertion der Kofaktoren in UE I kotranslational stattfindet.

Im Rahmen dieser kotranslationalen Strategie wurde ein System etabliert, mit welchem die UE I der Cytochrom c Oxidase zellfrei exprimiert werden kann, so dass die naszierende Kette der UE I experimentell zugänglich gemacht werden konnte. Dieser Ansatz hat zum Ziel, der wachsenden Peptidkette sowohl freie als auch Chaperon gebundene Kofaktoren in verschiedenen Kombinationen und zeitlichen Abfolgen anzubieten und Assemblierungsintermediate zu isolieren. Die Zugabe von Crosslinkern soll weiterhin die Charakterisierung von transienten Assemblierungskomplexen ermöglichen. Die entsprechenden Projekte wurden von mir konzipiert, betreut und überwacht und zeigten bereits erste Erfolge. Da die praktische Arbeit hierfür jedoch zu großen Teilen von meinen Diplomanden durchgeführt wurde, sei für deren Ergebnisse auf die entsprechenden Diplomarbeiten verwiesen (Werner 2005; Margraf 2006; Hannappel 2007).



**Abbildung 55 - Ein Kanal innerhalb der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase eröffnet Zugang zum binukleären Zentrum und könnte die posttranslationale Insertion des Kupferions ermöglichen.**

Neben einem möglichen kotranslationalen Mechanismus zur Kupferinsertion eröffnet ein zweiter Blick auf die Struktur der Oxidase auch die Möglichkeit, dass das Kupferion erst nach vollständiger Expression und Membranintegration der UE I inseriert wird. Betrachtet man die Struktur der *Paracoccus*-Oxidase genauer (Abbildung 55), so zeigt sich ein Kanal innerhalb der UE I, welcher einen direkten Zugang zum aktiven Cu<sub>B</sub>:Häm a<sub>3</sub>-Zentrum ermöglicht. Dieser Kanal liegt auf der periplasmatischen Seite des Proteins und wird in der fertigen Oxidase fest von der zweiten Untereinheit des Komplexes verschlossen. Es besteht also die Möglichkeit, dass CtaG das Kupferion erst durch diesen Kanal, also in einem posttranslationalen Mechanismus inseriert und die Untereinheit II den Kanal anschließend verschließt, um die katalytisch aktive Oxidase zu bilden. Im Rahmen dieser posttranslationalen Strategie wurden die potentiellen Wechselwirkungspartner CtaG und UE I heterolog exprimiert und aufgereinigt und eine mögliche Interaktion wurde *in vitro* untersucht. Hierfür wurde ein *in vitro* Assay entwickelt, mit dessen Hilfe der Transfer von Kupferionen von CtaG<sub>LF</sub> auf einen Akzeptor, wie beispielsweise die UE I der Cytochrom c Oxidase, direkt verfolgt werden kann. Die kupferspezifische Absorption bei 358 nm diente hierbei als Reportersystem (siehe Abschnitt 7.2 "UV/Vis-Signal von Cu-CtaGLF", S.141). Desweiteren wurde mit Hilfe von Koaffinitätsaufreinigungen untersucht, ob eine Protein-Protein-Interaktion zwischen CtaG und UE I vorliegt.

Darüber hinaus wurde mit Crosslinking-Experimenten nach einer Wechselwirkung zwischen CtaG und der UE I im nativen Wirt *Paracoccus denitrificans* also *in vivo* gesucht, und mit Hilfe von Blau-Nativ Gelen wurden Superkomplexe aus *Paracoccus*-Membranen analysiert und auf die gleichzeitige Anwesenheit von CtaG und UE I in einem möglichen Assemblierungskomplex hin untersucht.

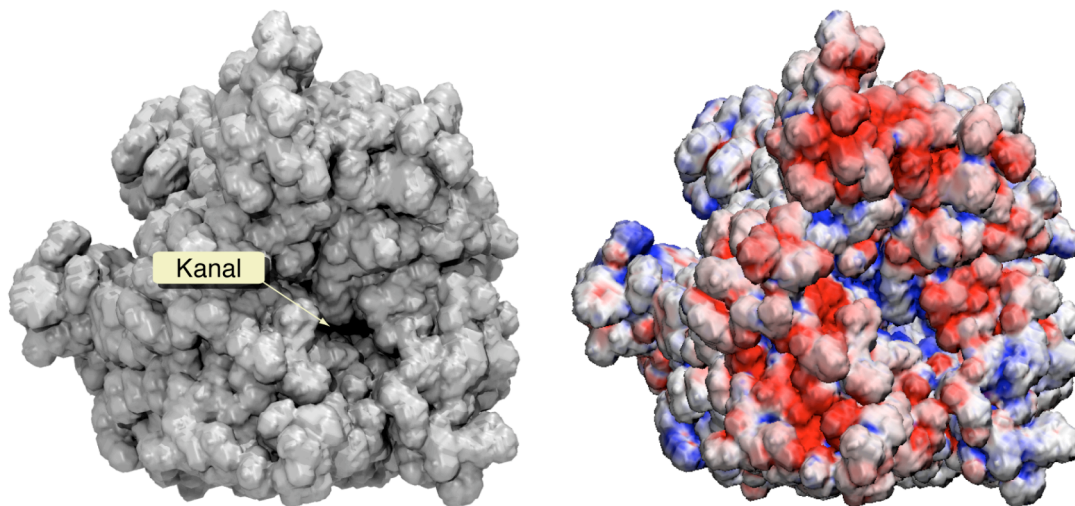
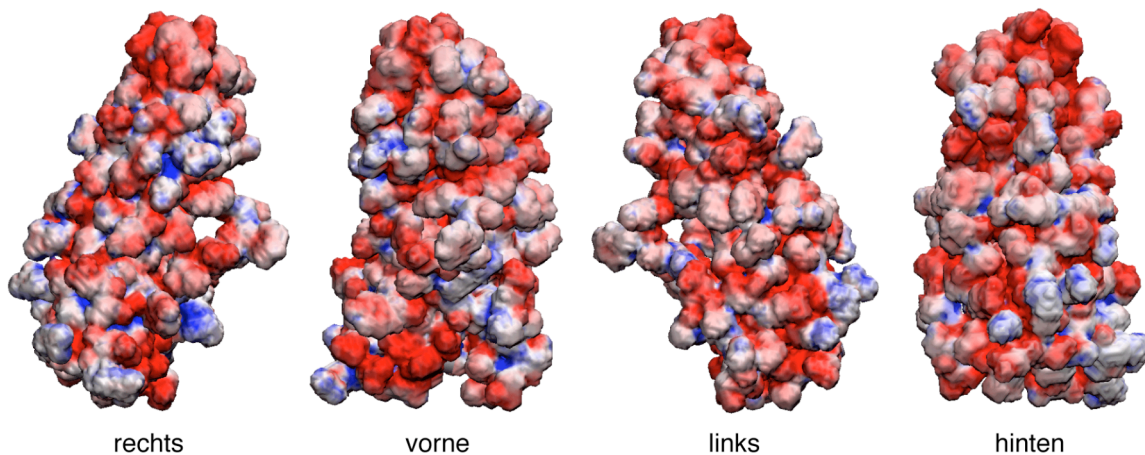
Schließlich wurden Versuche durchgeführt, in denen CtaG und die UE I simultan in *E. coli* exprimiert wurden. Im Rahmen dieser Koexpressionsexperimente sollte überprüft werden, ob CtaG vor einem leeren Hintergrund, also in Abwesenheit anderer möglicher

Assemblierungsfaktoren dazu in der Lage ist, Kupfer in die UE I der Cytochrom c Oxidase zu inserieren.

Um mögliche Kontaktflächen einer posttranslationalen Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I zu identifizieren, wurden die Strukturen und Sequenzen der potentiellen Interaktionspartner einer bioinformatischen Analyse unterzogen.

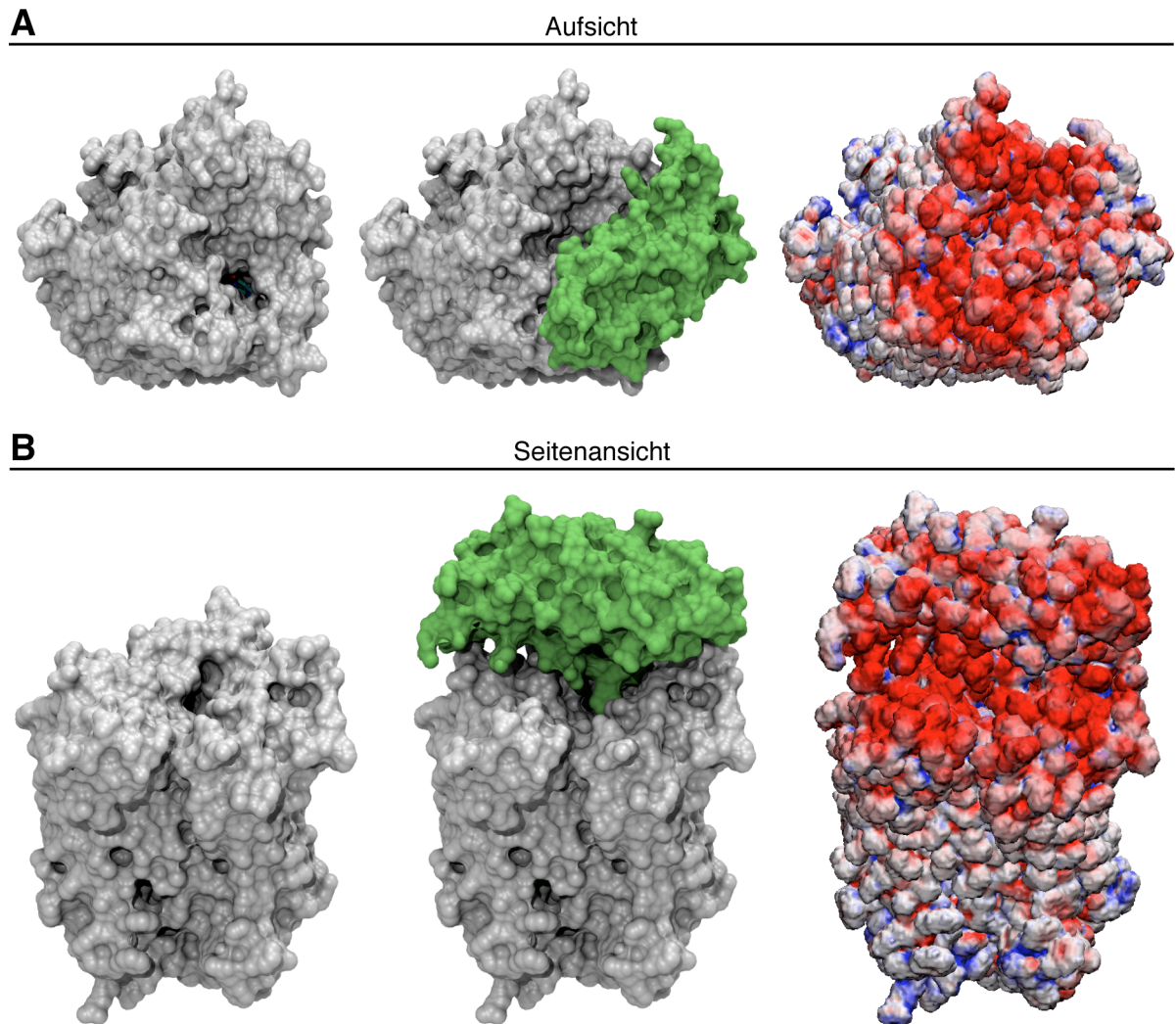
#### **8.2. Bioinformatische Analyse der Wechselwirkung zwischen CtaG und Untereinheit I**

Sollte eine direkte Wechselwirkung zwischen CtaG und der fertig synthetisierten UE I der Oxidase stattfinden, so müsste diese durch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt werden. Um diese Möglichkeit besser beurteilen zu können, wurden die Oberflächen von CtaG und UE I mit Hilfe bioinformatischer Methoden näher untersucht. Dafür wurden zunächst über eine Multiseq-Analyse (siehe auch Abschnitt 5.2 "Multiseq Analyse", S.109) besonders stark konservierte Oberflächenreste auf beiden Proteinen identifiziert, mit dem Ziel ein komplementäres Muster geladener Reste auf den Kontaktflächen zu identifizieren, welches für eine Interaktion verantwortlich sein könnte. Im Rahmen dieser Analyse zeigte sich jedoch, dass die konservierten ionischen Oberflächenreste sowohl bei CtaG als auch bei der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase fast ausschließlich anionisch sind. Ein komplementäres Muster geladener Aminosäuren auf den potentiellen Kontaktflächen liegt nicht vor. Da diese Analyse lediglich geladene Aminosäuren berücksichtigt, wurden daraufhin Elektrostatikberechnungen mit Hilfe des Programms APBS durchgeführt (Baker, Sept et al. 2001). Mit dieser Methode wird auch der Effekt von ungeladenen, aber polaren Aminosäuren auf das Oberflächenpotential von CtaG und UE I berücksichtigt.

**A** Oberflächenelektrostatik Untereinheit I (Ansicht von der periplasmatischen Seite)**B** Oberflächenelektrostatik CtaG**Abbildung 56 - Darstellung der Oberflächenelektrostatik von UE I und CtaG.**

Mit Hilfe des Programms APBS wurden die Oberflächenpotentiale von CtaG und der UE I der Cytochrom c Oxidase berechnet. Diese sind hier farblich dargestellt: negative Potentiale **rot**, positive Potentiale **blau**. Als "vorne" ist wieder die Seite von CtaG bezeichnet, in der sich das Kupferbindende CFCF-Motiv befindet (siehe auch Abbildung 33, S.110).

Wie aus den Darstellungen der Oberflächenelektrostatik hervorgeht, ist CtaG überwiegend negativ geladen, was auch mit dem theoretischen pI von etwa 4,9 übereinstimmt (Gasteiger, Hoogland et al. 2005). Auch die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase ist insbesondere in dem Bereich um den Kanal, der als Kontaktfläche für eine posttranslationale Kupferinsertion in Frage käme, fast ausschließlich negativ geladen. Die Ergebnisse der Elektrostatikkalkulationen bestätigen somit die Beobachtungen aus der Multiseq Analyse, und der Einfluss polarer Aminosäuren kompensiert die negative Ladung der ionischen Aminosäuren nicht. Auch ein hypothetischer Komplex, der durch ein manuelles *docking* der Strukturen von CtaG und UE I simuliert wurde, zeigt, dass sich die beiden Proteine gegenseitig abstoßen würden (Abbildung 57).



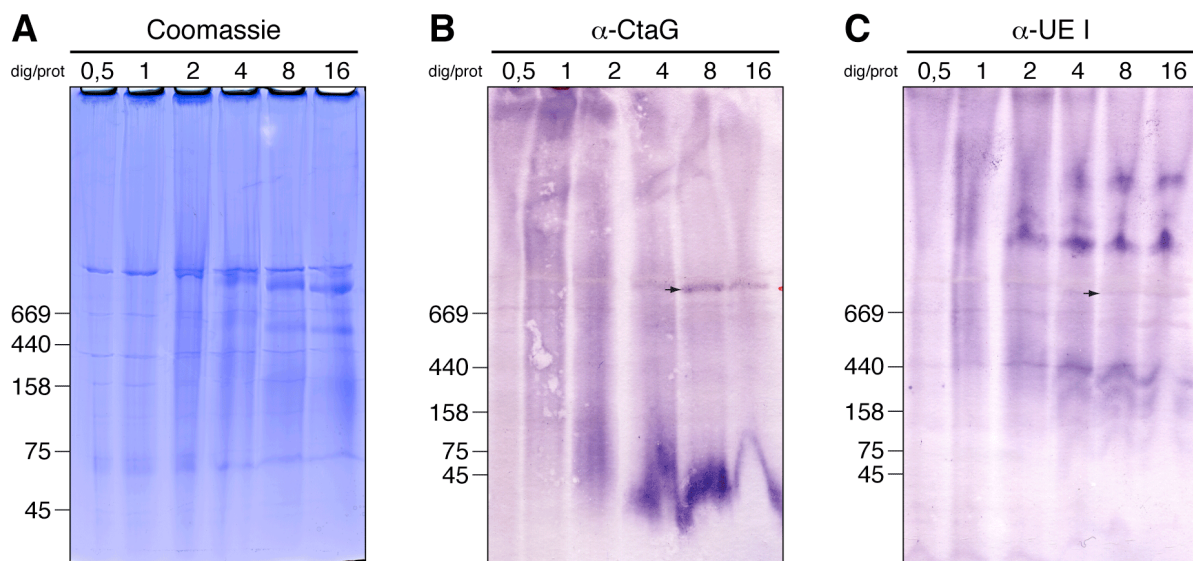
**Abbildung 57 - Oberflächenelektrostatik eines hypothetischen Komplexes aus CtaG und UE I, der transient auftreten müsste, wenn die Kupferinsertion posttranslational über den Kanal in UE I stattfindet.** Die Simulation eines Komplexes aus CtaG und UE I zeigt nach der Berechnung der Oberflächenelektrostatik mittels APBS, dass sich die beiden Proteine gegenseitig abstoßen würden. Eine posttranslationale Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I ist daher wenig wahrscheinlich.

Der Einfluss des Kupferions und eventuell vorhandener Häm-Kofaktoren konnte in den Elektrostatikberechnungen nicht berücksichtigt werden, da für diese Kofaktoren keine AMBER oder CHARMM Kraftfeldparameter vorliegen. Die tatsächlichen Oberflächenelektrostatiken von CtaG und UE I dürften daher ein wenig von den hier dargestellten Elektrostatiken abweichen. Es ist aber kaum möglich, dass der Effekt einer einzelnen positiven Ladung, die Oberflächenelektrostatik von CtaG, derart verändert, dass eine Interaktion zwischen CtaG und UE I plötzlich wahrscheinlicher würde. Die bioinformatische Analyse spricht also gegen eine posttranslationale Wechselwirkung zwischen CtaG und der Untereinheit I im Bereich um den Kanal.



### 8.3. Blau-Nativ Gele zum Nachweis möglicher Assemblierungskomplexe in *Paracoccus denitrificans*

Um eine mögliche Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I *in vivo* nachzuweisen, wurden einige Blau-Nativ Gelelektrophoresen mit *Paracoccus denitrificans* Membranen durchgeführt. Unter Verwendung von Digitonin zur Solubilisierung und Coomassie als Ladungsträger für die Elektrophorese können supramolekulare Komplexe sehr schonend aufgetrennt werden (Schägger 2003) und mit Hilfe dieser Methode konnten bereits Superkomplexe der Atmungskette, bestehend aus den Komplexen I, III und IV, in *Paracoccus denitrificans* Membranen nachgewiesen werden (Stroh, Anderka et al. 2004). Mit den geeigneten Antikörpern lassen sich auf diese Weise eventuell auch Assemblierungskomplexe, die beispielsweise CtaG und UE I enthalten, nachweisen. Hierfür wurden Membranen von *Paracoccus denitrificans* Pd1222 Wildtyp Zellen präpariert und in einer ersten Versuchsreihe mit Digitonin/Protein-Verhältnissen von 0,5 bis 16 (w/w) solubilisiert. Diese solubilisierten Membranen wurden über Blau-Nativ Gele (3,5-18 % Acrylamid) aufgetrennt und per Coomassie-Färbung und Western Blot analysiert (Abbildung 58). Hieraus wurde das optimale Digitonin/Protein-Verhältnis für weitere Experimente bestimmt.

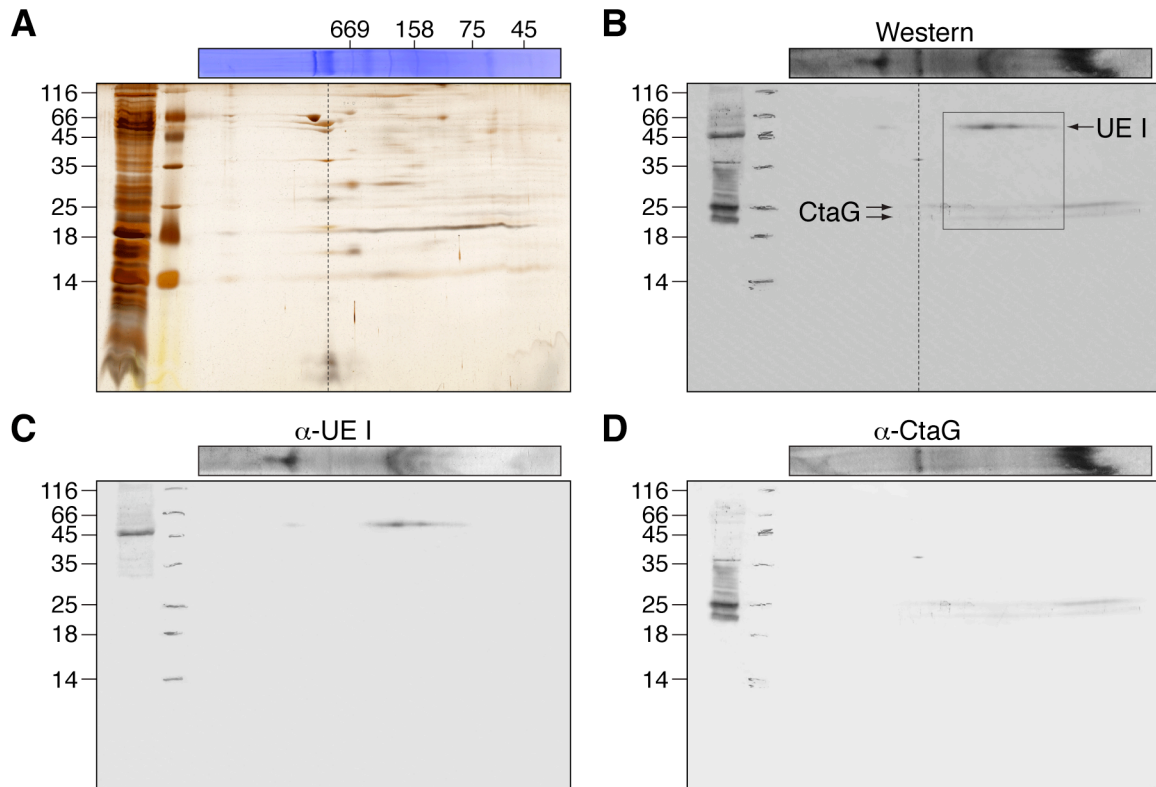


**Abbildung 58 - Blau-Nativ Gele von *Paracoccus denitrificans* Membranen**

*Paracoccus denitrificans* Pd1222 Membranen wurden mit verschiedenen Digitonin/Protein-Verhältnissen (w/w) solubilisiert und über ein 3,5-18 % Blau-Nativ Gel elektrophoretisch aufgetrennt. **A.** Coomassie-Färbung, **B.** Western Blot gegen CtaG, **C.** Western Blot gegen die UE I der Cytochrom c Oxidase. Pfeile: Bei einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8/1 zeigt sich oberhalb des 669 kDa Markers eine definierte Bande für CtaG. Auf derselben Höhe weist der UE I spezifische Western Blot ebenfalls eine Bande auf, wenn auch mit geringer Intensität.

In einem zweiten Schritt wurden *Paracoccus denitrificans* Pd1222 Membranen mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8 (w/w) solubilisiert und über ein 3,5-18 % Gradientengel aufgetrennt. Einzelne Bahnen dieser ersten Blau-Nativen Dimension wurden dann in der zweiten Dimension über ein 15 % Lämmli-Gel denaturierend

aufgetrennt, um die höhermolekularen Komplexe in ihre Einzelkomponenten aufzutrennen (Abbildung 59).



**Abbildung 59 - 2D-(Blau-Nativ/SDS)-Gele von Digitonin solubilisierten *P.d. Pd1222* Membranen**  
*Paracoccus denitrificans* Pd1222 Membranen wurden mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8 (w/w) solubilisiert, in der ersten Dimension über ein 3,5-18 % Blau-Nativ Gel, in der zweiten Dimension über ein 15%iges Lämmli Gel aufgetrennt und anschließend per Silberfärbung und Western Blot analysiert. **A.** Silberfärbung, **B.** Überlagerung der Western Blots gegen CtaG und UE I, **C.** Western Blot gegen die UE I der Cytochrom c Oxidase, **D.** Western Blot gegen CtaG. Als Positivkontrollen für die Western Blots wurden in der zweiten Dimension links neben dem Marker mit SDS-solubilierte Pd1222 Wildtyp Membranen aufgetragen. Die in der ersten Dimension beobachtete Kolokalisation von CtaG und UE I bestätigt sich hier nicht (vergleiche **gestrichelte Linien** hier und Pfeile aus Abbildung 58). Stattdessen zeigt sich eine Kolokalisation von CtaG- und UE I-spezifischen Western Blot Signalen über einen breiteren Molekulargewichtsbereich (**Kasten** Abbildung B).

### Diskussion

Die Solubilisierung mit verschiedenen Digitonin zu Protein-Konzentrationen zeigt erwartungsgemäß unterschiedliche Bandenmuster nach der Blau-Nativ Elektrophorese (Abbildung 58). In der Coomassie-Färbung sind bei höheren Digitonin/Protein-Verhältnissen (4 - 16 g/g) wesentlich mehr Banden mit höheren Intensitäten zu erkennen als bei niedrigeren Digitonin-Konzentrationen (Abbildung 58A). Bei niedrigen Digitonin/Protein-Verhältnissen (0,5 - 2 g/g) ist dagegen eine stärkere Färbung im Anfangsbereich des Gels zu sehen, was darauf hindeutet, dass bei diesen Digitonin-Konzentrationen noch viele hochmolekulare Assoziante vorliegen, welche zu groß sind, als dass sie sich durch ein 3,5 %iges Gel auftrennen ließen. Sie werden sofort nach dem Eintritt in das Gel von der Polyacrylamidmatrix festgehalten. Die Western Blots mit Antikörpern gegen CtaG und die UE I der Cytochrom c Oxidase sind konsistent mit diesen Beobachtungen. Während für niedrige Digitonin/Protein-Verhältnisse die Signale in den

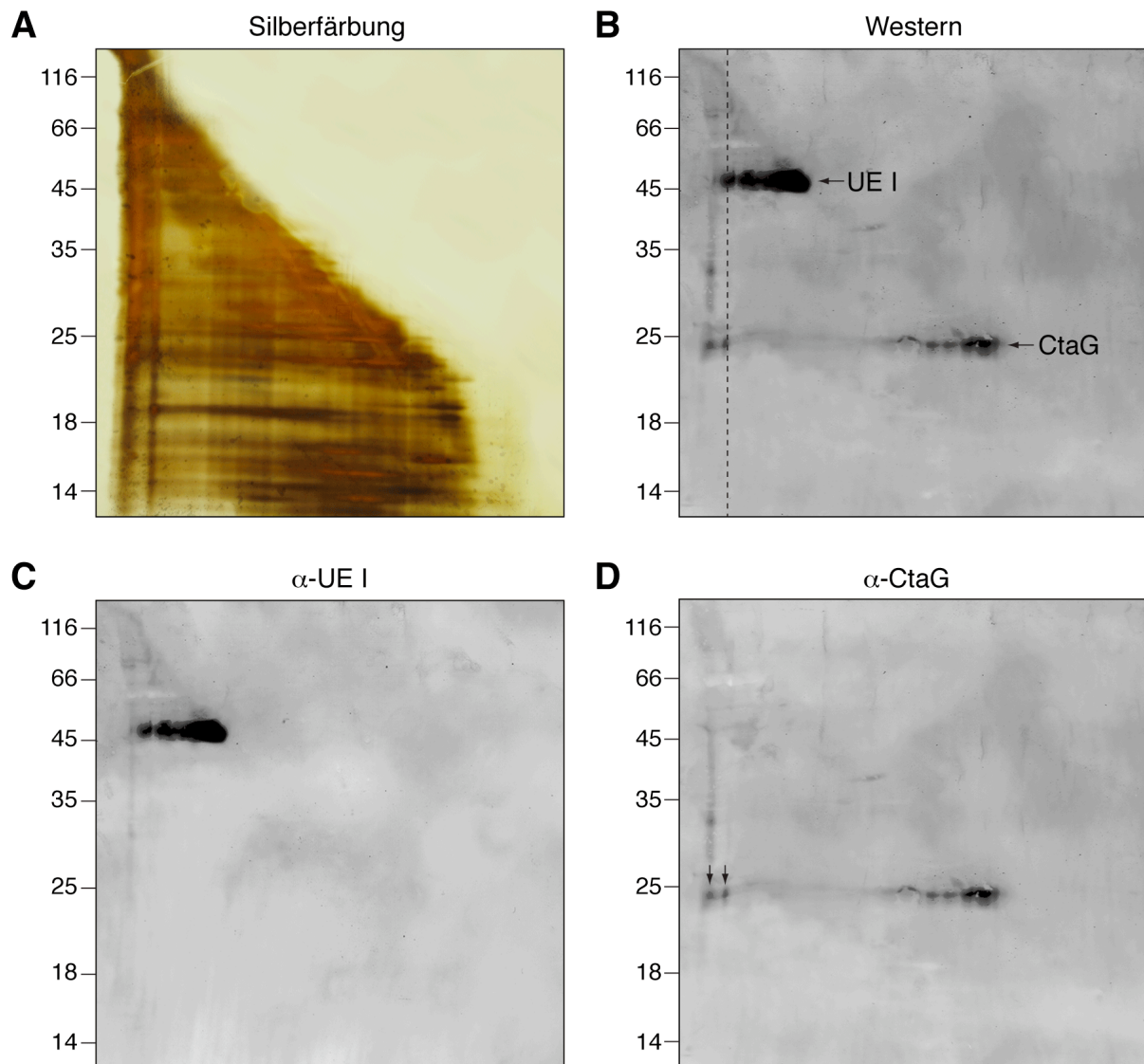
Western Blots überwiegend im hochmolekularen Bereich liegen, treten mit steigender Digitonin-Konzentration mehr Signale auf, und diese Signale befinden sich überwiegend in niedrigeren Molekulargewichtsbereichen. Insbesondere der Western Blot gegen CtaG (Abbildung 58B) zeigt dies deutlich: Während bei den Digitonin/Protein-Verhältnissen 0,5 und 1 g/g ausschließlich der oberste Bereich des Gels angefärbt wird, tritt ab 2 g/g eine Bande unterhalb des 45 kDa Markers auf, die vermutlich auf freies CtaG zurückzuführen ist und deren Intensität mit steigenden Digitonin-Konzentrationen zunimmt. Eine definierte CtaG-Bande im mittleren Molekulargewichtsbereich, kurz oberhalb des 669 kDa Markers, wird bei einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8 g/g besonders deutlich (Pfeil Abbildung 58B). Die Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen UE I zeigt auf derselben Höhe ebenfalls ein Signal, wenngleich dieses verglichen mit anderen UE I-Banden sehr schwach ausfällt (Pfeil Abbildung 58C). Da das Bandenmuster für die UE I der Cytochrom c Oxidase bei diesem Digitonin/Protein-Verhältnis gut mit dem von Stroh et al. beschriebenen Muster übereinstimmt und da unter diesen Bedingungen kongruente Signale für CtaG und UE I detektierbar sind, wurde dieses Verhältnis für weitere Experimente mit 2D-Gelen gewählt.

Die zweidimensionale Elektrophorese, bei der die Blau-Nativ aufgereinigten Superkomplexe durch eine zweite denaturierende Dimension in ihre Einzelkomponenten zerlegt werden, kann die kongruenten Banden aus der ersten Dimension jedoch nicht bestätigen (vergleiche Pfeile Abbildung 58 mit gestrichelter Linie Abbildung 59B). Zum einen befindet sich das CtaG-Signal nicht bei dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 21,4 kDa sondern zwischen 35 und 45 kDa und zum anderen zeigt der Western Blot gegen UE I auf der entsprechenden Höhe keinerlei Signal. Es ist zwar denkbar, dass es sich bei dem ca. 40 kDa CtaG-Signal um das Dimer handelt und die Probenkonzentration zu gering ist, um die UE I nachzuweisen. Da die Proben aber mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt wurden, müsste neben dem CtaG-Dimer auf der entsprechenden Höhe ebenfalls das CtaG-Monomer vorliegen. Da dies nicht der Fall ist, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem vermeintlichen CtaG-Signal, welches in der ersten Dimension oberhalb von 669 kDa (Pfeil Abbildung 58B) und in der zweiten Dimension bei ca. 40 kDa auftritt, um ein Artefakt handelt. Der weitaus größere Teil der CtaG-Signale befindet sich bei dem erwarteten Molekulargewicht von 21,4 kDa. Dieses Signal äußert sich in Form einer Doppelbande, was in *Paracoccus denitrificans* regelmäßig beobachtet wird und auf einer Degradation des Proteins beruhen könnte. Interessanterweise zieht sich die CtaG-Doppelbande über einen breiten Bereich des 2D-Gels und zeigt eindeutig eine Überlagerung mit den Signalen für die UE I der Cytochrom c Oxidase (siehe Kasten Abbildung 59B). Offensichtlich liegen die beiden Proteine nach der Blau-Nativ Elektrophorese im Molekulargewichtsbereich zwischen 75 und 440 kDa gemeinsam vor. Ob es sich hierbei um eine spezifische Wechselwirkung

handelt, läßt sich anhand der 2D-Gele nicht sagen. Für spezifische Komplexe würde man eher definierte *Spots* erwarten. Aber die Koloalisation von CtaG und UE I ist eindeutig und stellt einen ersten Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I dar.

#### **8.4. Crosslinking-Versuche in *Paracoccus denitrificans***

Die im Rahmen der Blau-Nativ Elektrophoresen erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *Paracoccus denitrificans* Membranen höhermolekulare Komplexe existieren, die sowohl CtaG als auch die UE I enthalten. Mit Hilfe von Crosslinking-Experimenten, könnten sich solche vermutlich nur kurzfristig auftretende Assemblierungskomplexe stabilisieren und nachweisen lassen. Für diese Crosslinking-Experimente wurden *Paracoccus denitrificans* Pd1222 Wildtyp Zellen in LB-Medium angezogen, nach der Ernte zügig mit Phosphatpuffer gewaschen und für 30 min mit 1 mM des membrangängigen, aminreaktiven Crosslinkers DSP inkubiert. Da zu erwarten ist, dass in der stationären Phase des Bakterienwachstums weniger Biogenese der Cytochrom c Oxidase stattfindet, wurden die Zellen für diese Experimente noch während der exponentiellen Wachstumsphase, bei einer  $OD_{600}$  von  $\sim 1$  geerntet, also zu einem Zeitpunkt, zu dem noch eine größere Wahrscheinlichkeit für die Assemblierung neuer Oxidasemoleküle besteht. Anschließend wurden die Membranen präpariert und per Western Blot untersucht. Da es sich bei DSP um einen spaltbaren Crosslinker handelt, konnten die Proben mit Hilfe von 2D-Gelen analysiert werden. In der ersten Dimension wurden die mit DSP quervernetzten Membranen über ein 12 %iges Lämmli-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde der Crosslinker durch Inkubation mit 50 mM DTT gespalten, sodass die quervernetzten Komplexe in der zweiten Dimension über ein 15 %iges Lämmli-Gel in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt werden konnten. Die resultierenden 2D-Gele wurden per Silberfärbung und Western Blot analysiert.



**Abbildung 60 - 2D-Gele nach Crosslinking-Experimenten in *Paracoccus denitrificans***

Mit DSP quervernetzte *Paracoccus denitrificans* Pd1222 Membranen wurden in der ersten Dimension über ein 12 % Lämmli-Gel aufgetrennt. Nach Spaltung des Crosslinkers wurden die quervernetzten Komplexe über ein 15 % Lämmli-Gel in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt. **A:** Silberfärbung, **B:** Überlagerung der Western Blots gegen UE I und CtaG; **C:** Western Blot gegen UE I; **D:** Western Blot gegen CtaG. Die **gestrichelte Linie** in Abbildung B zeigt einen Komplex, der sowohl CtaG als auch UE I enthält.

### Diskussion

Wie Abbildung 60A zeigt, führt die 30 minütige Inkubation der *Paracoccus denitrificans* Pd1222 Zellen mit 1 mM des membrangängigen Crosslinkers DSP zu einer Quervernetzung von Membranproteinen, und die quervernetzten Komplexe lassen sich mit Hilfe von DTT über 2D-Gele in ihre Einzelkomponenten zerlegen. Die Western Blot Analysen dieser 2D-Gele zeigen für UE I und CtaG Signale auf den erwarteten Höhen (Abbildung 60C und D): CtaG hat ein Molekulargewicht von 21,4 kDa und erscheint auch im Western Blot bei dieser Größe. Die UE I der Cytochrom c Oxidase ist zwar etwa 65 kDa groß, läuft aber aufgrund ihrer starken Hydrophobizität in der Regel bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 45 kDa, was mit den entsprechenden Western Blot Signalen übereinstimmt. Beide Proteine tauchen in mehreren Komplexen auf, was

auf die Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinkomponenten hindeutet. Bei der UE I könnten dies beispielsweise weitere Untereinheiten der vollständigen Oxidase, Assemblierungsfaktoren oder Proteinkomponenten anderer Atmungskettenkomplexe, welche sich im Zuge der Bildung von Superkomplexen mit der Cytochrom *c* Oxidase zusammenlagern, sein. CtaG liegt zu einem großen Teil in Komplexen niedrigen Molekulargewichts vor, was darauf hindeutet, dass es größtenteils frei, bzw. in Kontakt mit anderen, kleineren Proteinen vorliegt. Interaktionspartner von CtaG könnten beispielsweise weitere an der Assemblierung der Oxidase beteiligte Proteine, wie Surf1 und Sco1, oder – im Fall einer kotranslationalen Cu<sub>B</sub>-Insertion – ribosomale Proteine sein (Khalimonchuk und Rödel 2005). Ein signifikanter Anteil der CtaG-Proteine liegt aber auch in höhermolekularen Komplexen vor, die sich in zwei definierten Banden äußern (Pfeile Abbildung 60D). Vergleicht man die Western Blots gegen CtaG und UE I miteinander, so zeigt sich, dass der kleinere dieser beiden Komplexe sowohl CtaG als auch UE I enthält (gestrichelte Linie Abbildung 60B). Offensichtlich führt die Quervernetzung mit DSP zur Stabilisierung eines Komplexes, welcher sowohl CtaG als auch die UE I der Cytochrom *c* Oxidase enthält. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass aufgrund einer zu langen Inkubation mit dem Crosslinker große Konglomerate entstehen, die auch Komponenten enthalten, welche sich nur zufällig in räumlicher Nähe befinden und *in vivo* keine echte Wechselwirkung miteinander eingehen. Die Tatsache, dass definierte Banden beobachtet werden, spricht aber gegen eine zufällige Kolokalisation von CtaG und UE I. Auch die gleichmäßige Präsenz von kleinen und großen Crosslinking-Komplexen, die in der Silberfärbung zu beobachten ist (Abbildung 60A), spricht dafür, dass die Reaktion rechtzeitig abgestoppt wurde und es sich hier um einen realen Komplex handelt, welcher sowohl CtaG als auch die UE I der Cytochrom *c* Oxidase enthält. Das apparente Molekulargewicht des beobachteten Komplexes liegt bei etwa 100-120 kDa, was wesentlich größer ist als ein Komplex, der lediglich aus CtaG (21,4 kDa) und UE I (65 kDa) besteht. Es ist also wahrscheinlich, dass neben CtaG und UE I noch weitere Komponenten in diesem Assemblierungskomplex vorliegen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Interaktion zwischen CtaG und UE I nicht direkt stattfindet, sondern über andere Proteine vermittelt wird.

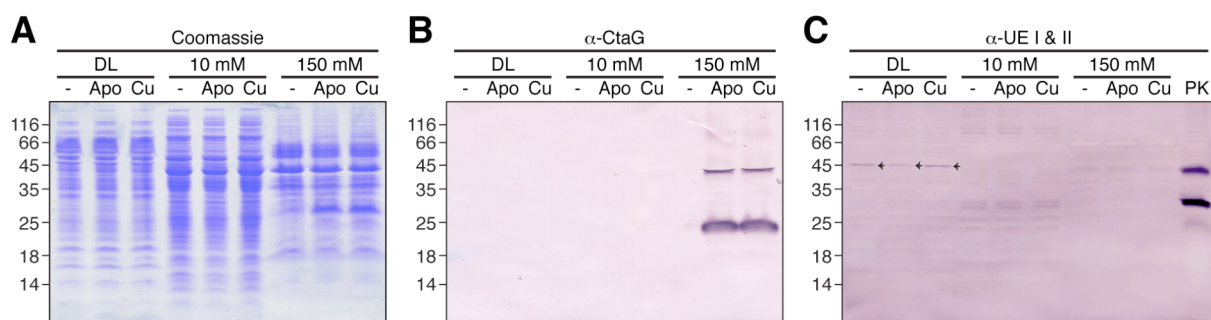
Um den potentiellen CtaG/UE I-Komplex näher zu untersuchen, müsste der Komplex in ausreichenden Mengen isoliert und charakterisiert werden. Denkbar wäre beispielsweise die homologe Expression eines His<sub>6</sub>-markierten CtaG in *Paracoccus denitrificans*. Nach der Crosslinking-Reaktion könnten CtaG-haltige Komplexe per Affinitätschromatographie isoliert und analog zu Abbildung 60 mit Hilfe der 2D-Elektrophorese in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt werden. Durch die selektive Analyse CtaG-haltiger Komplexe wird der Proteinhintergrund drastisch reduziert, und es könnten eventuell Einzelbanden aus dem Gel isoliert und per Massenspektrometrie untersucht werden. So

ließen sich möglicherweise die unterschiedlichen Komponenten des Komplexes identifizieren. Aus Zeitgründen konnte dieser Ansatz hier jedoch nicht weiter verfolgt werden. Stattdessen wurde der Fokus auf die *in vitro* Charakterisierung von CtaG gelegt und Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I sollten primär im Rahmen von heterologen Koexpressionsexperimenten und *in vitro* durchgeführt werden.

### 8.5. Koaffinitätsaufreinigung mit solubilisierten *Paracoccus denitrificans* ST4 Membranen

Ein Ansatz, Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen, ist die Koaffinitätsaufreinigung. Der *Paracoccus denitrificans* Stamm ST4 verfügt über eine Deletion des *cta*-Operons, durch die sowohl die Untereinheiten II und III der Cytochrom c Oxidase als auch die Assemblierungsfaktoren CtaB und CtaG fehlen (Steinrücke, Gerhus et al. 1991). In diesem Stamm kann die Untereinheit I also nicht zur vollständigen Oxidase assembliert werden, sondern liegt frei von weiteren Untereinheiten vor. An Säulenmaterial gebundenes CtaG könnte aus einem Solubilisat solcher ST4-Membranen selektiv die UE I der Cytochrom c Oxidase binden, wodurch eine Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I nachgewiesen wäre. Um dies zu testen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Zwei kleine NiNTA-Säulen mit einem Säulenvolumen von etwa 1 ml wurden mit kupferfreiem Apo-CtaG<sub>LF</sub> bzw. metallgebundenem Cu-CtaG<sub>LF</sub> beladen. Eine dritte NiNTA-Säule diente als Negativkontrolle und wurde nicht beladen. Um die Bindung der CtaG<sub>LF</sub>-Proben an das NiNTA-Material zu ermöglichen, wurde der His<sub>6</sub>-tag von CtaG<sub>LF</sub> für diesen Versuch nicht abgespalten.

Die Säulen wurden äquilibriert (50 mM NaPi, 50 mM NaCl, 0 mM Imidazol, 0,05 % DM, pH 8) und es wurden jeweils 100 mg solubilierte ST4-Membranen (10 mg/ml) aufgetragen. Anschließend wurde mit jeweils 20 Säulenvolumina 0 mM, 10 mM und 150 mM Imidazol gewaschen bzw. eluiert. 30 µg der ankonzentrierten Eluate wurden für eine Gelelektrophorese mit darauf folgender Coomassie-Färbung und Western Blot Analyse eingesetzt (Abbildung 61).



**Abbildung 61 - Western Blot Analyse der Koaffinitätsaufreinigungen**

Solubilierte *Paracoccus denitrificans* ST4-Membranen wurden auf drei NiNTA Säulen (-: unbeladen/ Negativkontrolle, **Apo**: mit Apo-CtaG<sub>LF</sub> beladen, **Cu**: mit Cu-CtaG<sub>LF</sub> beladen) aufgetragen und die Säulen wurden mit Auftragspuffer (**DL**: Durchlauf), 10 mM Imidazol (**10 mM**) und 150 mM Imidazol (**150 mM**) gewaschen. 30 µg der jeweiligen Eluate wurden für die Elektrophorese eingesetzt. **A**: Coomassie-Färbung, **B**: Western Blot gegen CtaG, **C**: Western Blot gegen die Untereinheiten I und II der Cytochrom c Oxidase (als Positivkontrolle (**PK**) dienten hier *P.d.* Pd1222 Wildtyp Membranen). Während CtaG an das NiNTA-Material bindet und erst bei 150 mM Imidazol eluiert, findet sich die UE I der Cytochrom c Oxidase lediglich in den Durchlauf- und 10 mM-Eluat-Fraktionen wieder (**Pfeile** Abbildung C).



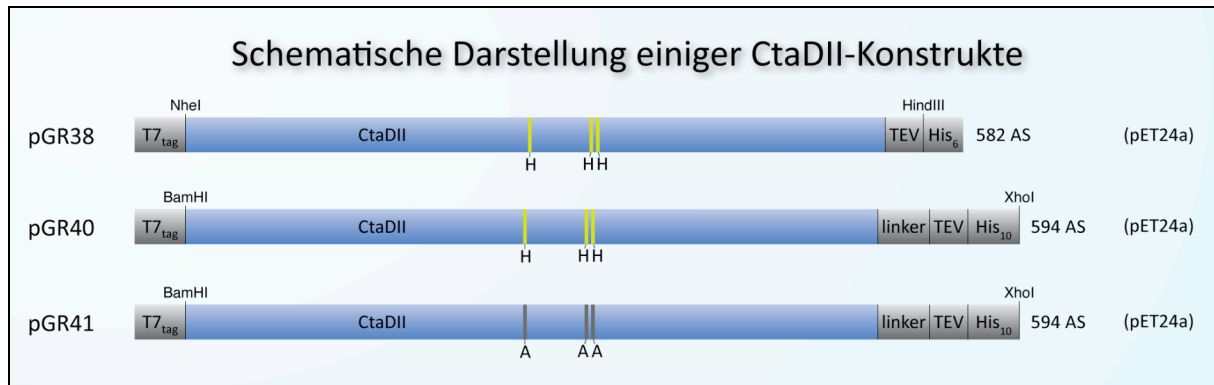
## Diskussion

Nach dem Auftrag von solubilisierten ST4-Membranen auf die drei Säulen und Wasch- bzw. Elutionsschritten bei 10 und 150 mM Imidazol zeigt der Western Blot gegen CtaG (Abbildung 61B) ausschließlich Signale in den Bahnen "Apo" und "Cu" des 150 mM Eluats. Dies entspricht den Erwartungen und bedeutet, dass die Beladung der NiNTA-Säulen mit Apo- und Cu-CtaG<sub>LF</sub> erfolgreich war und CtaG<sub>LF</sub> während der Auftrags- und Waschschrte an das Säulenmaterial gebunden bleibt. Bei dem 20 kDa Signal handelt es sich um monomeres CtaG<sub>LF</sub>. Das zusätzliche Signal bei etwa 40 kDa entspricht dem CtaG<sub>LF</sub>-Dimer. Der Blot gegen die UE I der Cytochrom c Oxidase hingegen zeigt auf der erwarteten Höhe (apparentes Molekulargewicht ~ 45 kDa) ausschließlich Signale im Durchlauf der drei Säulen (Pfeile Abbildung 61C). Die zusätzliche Bande bei etwa 30 kDa, die in der Positivkontrolle auftaucht entspricht der UE II der Cytochrom c Oxidase. Diese taucht in den solubilisierten ST4-Membranen nicht auf, da sie Teil des *cta*-Operons ist, welches in *P.d.* ST4 deletiert ist. Die Signalintensitäten für die UE I sind in allen Fraktionen sehr gering, was daran liegt, dass die Deletion des *cta*-Operons zu einer Herunterregulierung oder zu einem Abbau der Untereinheit I führt (Steinrücke, Gerhus et al. 1991). Da die Untereinheit I jedoch noch gut nachweisbar ist und sich die Signalintensitäten in keiner der drei Säulen voneinander unterscheiden, kann gefolgert werden, dass CtaG<sub>LF</sub> nicht dazu in der Lage ist, die UE I aus solubilisierten *Paracoccus* Membranen zu binden. Da CtaG<sub>LF</sub> über einen C-terminalen His<sub>6</sub>-tag an das Säulenmaterial gebunden ist, besteht zwar die Möglichkeit, dass die Interaktionsfläche nicht gut zugänglich ist. Das umgekehrte Experiment, der Versuch CtaG mit Hilfe einer an NiNTA gebundenen UE I aus solubilisierten *Paracoccus denitrificans* Membranen zu isolieren, lieferte jedoch dasselbe Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass der Komplex zwischen CtaG und UE I, wenn er denn existiert, eine so geringe Lebensdauer aufweist, dass er sich mit Hilfe der Koaffinitätschromatographie nicht nachweisen lässt. Schließlich ist es nicht Aufgabe des Kupferchaperons, einen stabilen Komplex mit dem Zielprotein einzugehen, diesen muss die Untereinheit I anschließend mit den übrigen Untereinheiten bilden. Stattdessen muss das Kupferchaperon das Zielprotein identifizieren, kurzfristig binden, sein Kupferion darauf übertragen und es anschließend für die Integration in die vollständige Oxidase wieder freigeben. Die Ergebnisse der Koaffinitätschromatographie sprechen daher eher gegen eine Wechselwirkung zwischen CtaG und der UE I der Cytochrom c Oxidase.

## 8.6. Heterologe Expression und Aufreinigung der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase

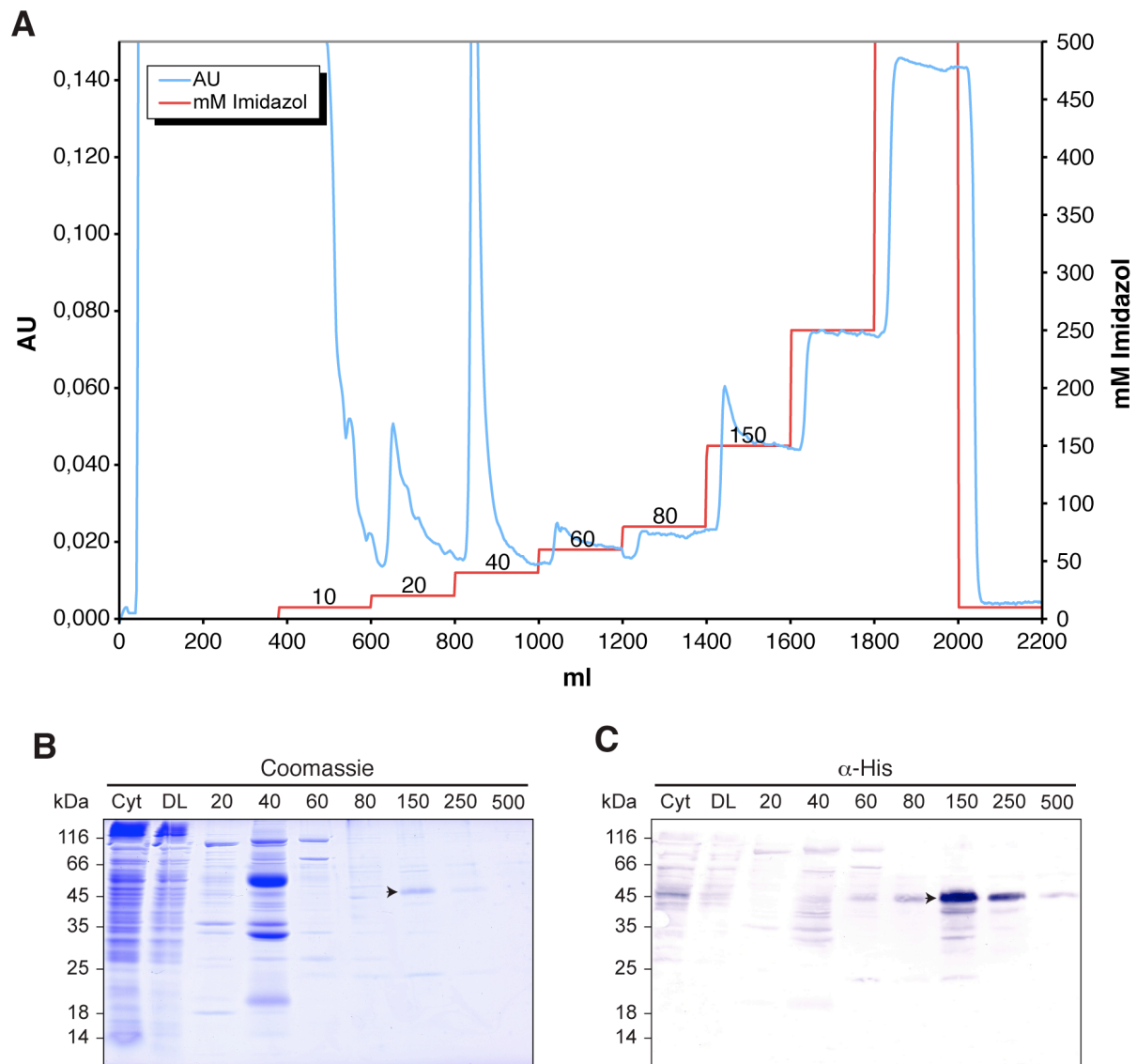
Eine weitere Möglichkeit, die Wechselwirkung zwischen CtaG und der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (UE I) nachzuweisen, wäre der Beweis, dass ein Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I stattfindet. Sollte CtaG dazu in der Lage sein, Kupferionen auf die UE I zu übertragen, wäre damit auch indirekt die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen bewiesen. Hierfür wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen sollte ein *in vitro* Assay etabliert werden, mit dem der Kupfertransfer von CtaG auf UE I verfolgt werden kann. Zum anderen wurden die beiden Proteine simultan in *E. coli* überexprimiert. *E. coli* stellt für diese beiden Ansätze den idealen Wirt dar, da *E. coli* weder über eine Cytochrom c Oxidase noch über eine Häm *a*-Synthase verfügt. Die UE I dürfte daher im Rahmen der heterologen Expression nicht von *E. coli* eigenen Biogenesesystemen erkannt und prozessiert werden und das aufgereinigte Protein sollte weder Häm *a* noch Kupferionen enthalten. Diese Apo-UE I kann dann in einem *in vitro* Kupfertransferassay als Akzeptor der Kupferionen von Cu-CtaG<sub>LF</sub> dienen. Gleichzeitig können vor dem Cytochrom c Oxidase freien Hintergrund in *E. coli* einzelne potentielle Assemblierungsfaktoren gezielt mit der UE I koexprimiert werden, um deren Effekt auf die UE I zu untersuchen. Sollte beispielsweise die Koexpression von CtaG und UE I zu einer Erhöhung des Kupfergehalts der UE I führen, wäre dies ein Beweis für die Rolle von CtaG als Kupferchaperon für die UE I der Cytochrom c Oxidase.

Für die erfolgreiche Expression und Aufreinigung der Untereinheit I wurde eine Reihe von Plasmiden mit unterschiedlichen Eigenschaften und Affinitätstags kloniert. Die letztlich am häufigsten verwendeten Konstrukte pGR38 und pGR40 basieren auf dem pET24a-Vektor (Abbildung 62), welcher zur Selektion ein Kanamycinresistenzgen trägt. Die Verwendung dieser Resistenz ermöglicht die Koexpression mit CtaG, welches auf einem pET-Vektor mit Ampicillinresistenz vorliegt. Für die Klonierung von pGR40 wurde das *ctaDII*-Gen, welches für die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase kodiert, mit Hilfe der PCR-Primer AH1F und 40R von dem Plasmid pSL1 amplifiziert (10 % DMSO erforderlich). Dabei wurde das native Stoppcodon des *ctaDII* Gens entfernt und mit Hilfe des 40R-Primers durch eine Sequenz ersetzt, welche für einen flexiblen GPGPG-*linker*, die TEV-Proteaseschnittstelle und einen His<sub>10</sub>-*tag* kodiert. Ebenfalls über die Primer wurden die für die Ligation in den pET24a-Vektor verwendeten Schnittstellen BamHI und XhoI eingeführt. Das resultierende Konstrukt pGR40 wurde für die Expression in kompetente *E. coli* C43(DE3) Zellen transformiert.



**Abbildung 62 - Schematische Darstellung einiger für die heterologe Expression der UE I klonierter Konstrukte.**

Um die Aufreinigung der UE I zu vereinfachen, wurden die zur Expression eingesetzten Konstrukte mit TEV-spaltbaren C-terminalen Polyhistidin-*tags* versehen. Da die Spaltung des His<sub>6</sub>-*tags* von pGR38 geringe Ausbeuten lieferte, wurde ein weiteres Expressionsplasmid (pGR40) konstruiert, welches einen flexiblen GPGPG-*linker* zwischen dem C-terminus der UE I und der Proteaseschnittstelle trägt. Dieser *linker* sollte die Zugänglichkeit der TEV-Schnittstelle verbessern. Desweiteren wurde der Hexahistidin-*tag* von pGR38 durch einen Decahistidin-*tag* ersetzt, um die Reinheit der UE I nach dem ersten Chromatographieschritt zu erhöhen. Das Konstrukt pGR41 kodiert für eine Mutante der UE I, in welcher die drei Liganden des Cu<sub>B</sub>-Ions die Histidine an den Positionen 276, 325 und 326 gegen Alanine ausgetauscht wurden.



**Abbildung 63 - Finales Aufreinigungsprotokoll für die heterolog exprimierte UE I der Cytochrom c Oxidase.**

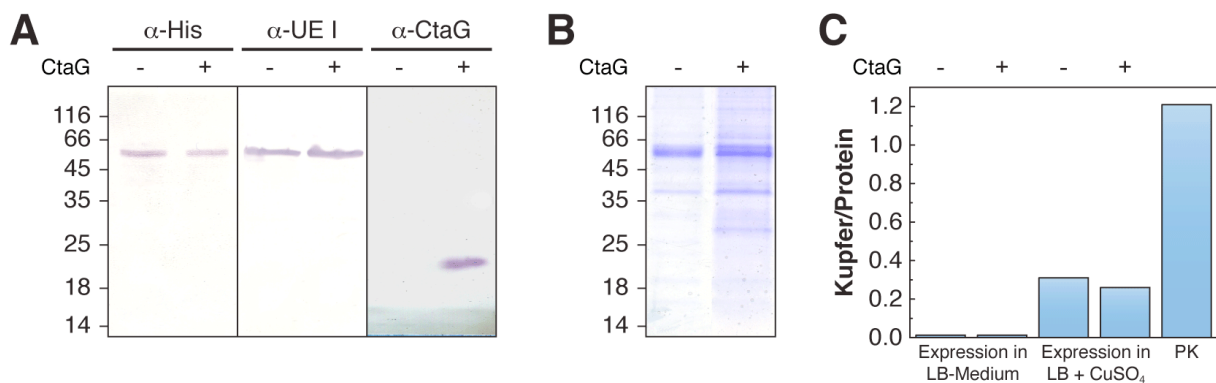
**A.** Elutionsprofil der NiNTA-Säule, **B.** Coomassie-Färbung der jeweiligen Peak-Fractionen und **C.** entsprechender  $\alpha$ -His-Western Blot. **Cyt:** Cytosolfraktion; **DL:** Durchlauf; **20-500:** 20-500 mM Imidazol Eluate.

Die Expression und Aufreinigung erfolgte, per NiNTA und mit einem Imidazol-Stufengradienten (siehe Material & Methoden 3.3.2 "Ni-NTA-Aufreinigung der UE I der Cytochrom c Oxidase", S.46). Die saubere Untereinheit I wurde aus dem 150 mM Imidazol Eluat gewonnen und mit Hilfe von Redoxspektren, dem BCA-Assay zur Kupferbestimmung und ICP-MS-Analysen auf die Anwesenheit von Kofaktoren hin untersucht. Diese Messungen ergaben, dass die heterolog exprimierte UE I tatsächlich in einer kofaktorfreen Form vorliegt. Das Protein wird also nicht durch das Biogenesesystem der homologen *bo*<sub>3</sub>-Chinoloxidase von *E. coli* erkannt und prozessiert. Somit stellt *E. coli* einen idealen Hintergrund dar, vor dem potentielle Assemblierungsfaktoren mit der UE I koexprimiert werden können, um den Effekt dieser Proteine auf die Biogenese der UE I zu untersuchen. Desweiteren kann die heterolog

exprimierte und aufgereinigte UE I als Apo-UE I für *in vitro* Experimente zum Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I eingesetzt werden.

### 8.7. Koexpression von CtaG und UE I in *E. coli*

Um zu überprüfen, ob CtaG dazu in der Lage ist, Kupferionen in die UE I der Cytochrom c Oxidase einzubauen, wurden die beiden Proteine simultan heterolog in *E. coli* überexprimiert. Neben dem Expressionsplasmid pGR38 für die His<sub>6</sub>-markierte UE I (siehe Abbildung 62) wurde für diesen Versuch ein weiteres Expressionsplasmid kloniert, welches für das vollständige CtaG ohne Affinitäts-tag kodiert und als pGR32 bezeichnet wird. Die aus pGR32 hervorgehende CtaG-Variante ist also aufgrund der Transmembranhelix membranständig und bindet nicht an NiNTA-Material. Somit kann die UE I entweder alleine oder in Gegenwart von CtaG exprimiert und anschließend per NiNTA aufgereinigt werden. Ein Vergleich des Kupfer/Protein-Verhältnisses der UE I mit und ohne Koexpression von CtaG könnte Aufschluss darüber geben, ob CtaG vor einem Cytochrom c Oxidase und Assemblierungsfaktor freien Hintergrund den Kupfergehalt der UE I erhöhen kann oder nicht. Hierfür wurden die *E. coli* Stämme C41(pGR38) bzw. C41(pGR38/pGR32) in jeweils 10 L LB-Medium wie für die Expression der UE I beschrieben (siehe Material & Methoden 3.1.3, S.40) angezogen, induziert und geerntet. Die Expression wurde einmal in gewöhnlichem LB-Medium durchgeführt und in einer zweiten Versuchsreihe wurden die Kulturen 30 min nach Induktion mit 1,4 mM CuSO<sub>4</sub> supplementiert. Aus den gewonnenen Zellen wurden Membranen präpariert, die zunächst per Western Blot auf die korrekte Expression und Membraninsertion von CtaG und UE I hin untersucht wurden und anschließend als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der UE I dienten. Schließlich wurden die Kupfer/Protein-Verhältnisse der aufgereinigten UE I-Varianten bestimmt und miteinander verglichen (Abbildung 64).



**Abbildung 64 - Ergebnisse der Koexpression von CtaG und UE I in *E. coli* C41(DE3)**

Die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase wurde alleine (-) oder in Gegenwart von CtaG (+) heterolog in *E. coli* C41(DE3) überexprimiert. **A:** Western Blots von *E. coli* Membranen. Hierfür wurden Antikörper gegen den His<sub>6</sub>-tag (**α-His**), gegen die UE I der Cytochrom c Oxidase (**α-UE I**) und gegen CtaG (**α-CtaG**) eingesetzt. **B:** Coomassie-Färbung von aufgereinigten UE I-Proben. **C:** Kupferbestimmung der aufgereinigten UE I-Proben (also Positivkontrolle **PK** für die Kupferbestimmung diente Cu-CtaG<sub>LF</sub>). Die Expression erfolgte einmal in reinem LB-Medium und in einer zweiten Versuchsreihe wurden 30 min nach Induktion 1,4 mM CuSO<sub>4</sub> supplementiert. CtaG und UE I werden zwar in die Membran inseriert und nur die UE I trägt einen His<sub>6</sub>-tag. Die Koexpression von CtaG kann aber keine Erhöhung des Kupfer/Proteinverhältnisses von UE I bewirken.

#### **Diskussion**

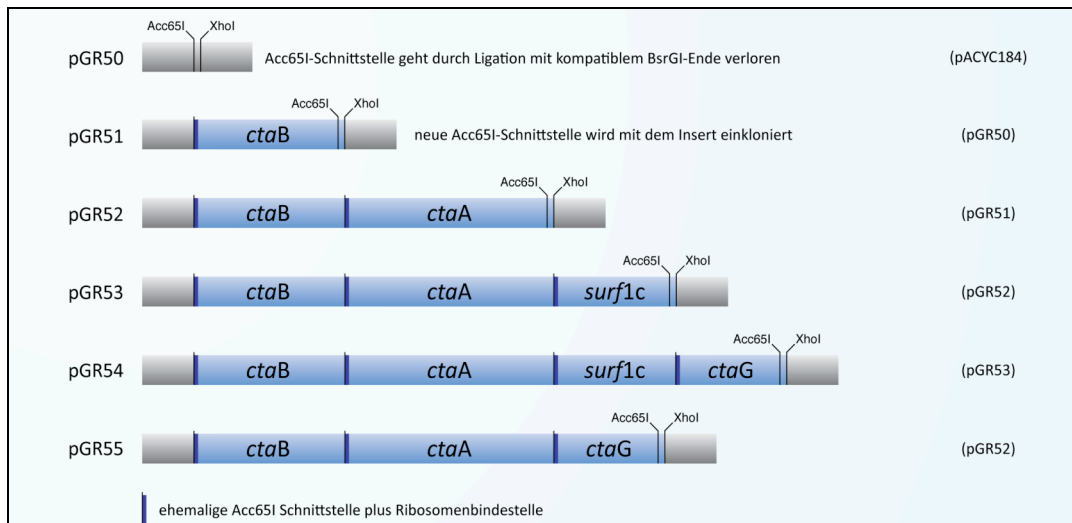
Wie aus Abbildung 64A hervorgeht, werden UE I und CtaG erfolgreich exprimiert und in die Membran des *E. coli*-Wirts inseriert. Während der Western Blot gegen den Polyhistidin-*tag* Signale bei etwas über 45 kDa, dem apparenten Molekulargewicht der UE I, aufweist, tritt in diesem Blot keine Färbung auf Höhe von CtaG (bei etwa 20 kDa) auf. Dies entspricht den Erwartungen und bedeutet, dass nur die UE I einen His<sub>6</sub>-*tag* trägt, während CtaG in seiner Wildtyp Form ohne Affinitätstag vorliegt. Entsprechend kann die UE I aus solubilisierten *E. coli* Membranen isoliert werden, ohne dass CtaG dabei mit aufgereinigt wird (siehe Coomassie-Färbung Abbildung 64B). Das Kupfer/Protein-Verhältnis der UE I liegt bei 0,012, wenn die UE I alleine exprimiert wird bzw. bei 0,013, wenn CtaG koexprimiert wird. Die Kupferbestimmung zeigt also, dass die Koexpression von CtaG in dem hier untersuchten System zu keiner nennenswerten Erhöhung des Kupfergehalts der UE I führt.

Um sicherzugehen, dass die Konzentration an verfügbaren Kupferionen nicht limitierend ist, wurde das Experiment wiederholt, indem die Kulturen 30 min nach Induktion mit 1,4 mM CuSO<sub>4</sub> supplementiert wurden. Die Kupfersupplementation während der Expression führt zwar zu einer Erhöhung des Kupfer/Protein-Verhältnisses der UE I auf 0,2-0,3. Die Koexpression von CtaG kann aber auch unter diesen Umständen keine Steigerung des Kupfergehalts der UE I hervorrufen. Während die alleine exprimierte UE I ein Kupfer/Protein-Verhältnis von 0,31 aufweist, enthält die nach der Koexpression von CtaG aufgereinigte Probe lediglich 0,26 Kupfer/Protein.

Offensichtlich ist CtaG in dem hier untersuchten System nicht dazu in der Lage, Kupferionen in die UE I der Cytochrom *c* Oxidase zu inserieren. Hierfür können verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden: (1) Die Bindung von Kupferionen an CtaG selbst, könnte in dem heterologen Wirt beeinträchtigt sein, wodurch ein Kupfertransfer auf die UE I unmöglich wäre. Während das im Cytosol von *E. coli* exprimierte CtaG<sub>LF</sub> tatsächlich kaum Kupferionen enthält, zeigt sich jedoch, dass eine membranständige Variante von CtaG, die per NiNTA aufgereinigt wurde, sehr wohl bereits während der Expression Kupfer bindet. Das Scheitern des Transfers muss daher eine andere Ursache haben. (2) Der His<sub>6</sub>-*tag* an UE I könnte bei der Interaktion mit CtaG stören und somit den Einbau von Kupferionen verhindern. Diese Möglichkeit kann jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Expression der UE I mit einem His<sub>6</sub>-*tag* an derselben Position im nativen Wirt *P. denitrificans* zu einer vollständigen und funktionalen Cytochrom *c* Oxidase führt (Dürr, Koepke et al. 2008). (3) Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die Orientierung und/oder Lokalisation von CtaG und UE I innerhalb der Membran von der nativen Situation abweicht und dazu führt, dass CtaG die UE I nicht erkennt. (4) Außerdem ist denkbar, dass weitere Proteine für die Assemblierung benötigt werden, um den Prozess zu koordinieren und beispielsweise

einzelne Chaperone und Untereinheiten an den potentiellen Assemblierungskomplex zu rekrutieren. (5) Darüber hinaus könnte es sein, dass die Anwesenheit von Häm *a* in Untereinheit I eine Voraussetzung für die Kupferinsertion ist, oder dass das Fehlen des Häm Kofaktors das Cu<sub>B</sub>-Zentrum derart instabil macht, dass die Kupferionen während der Aufreinigung verloren gehen. (6) Schließlich besteht die Möglichkeit, dass CtaG tatsächlich nicht unmittelbar für die Insertion von Kupferionen in die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase verantwortlich ist.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde das untersuchte System um eine Reihe von zusätzlichen Assemblierungsfaktoren erweitert. Hierfür wurde ein Reifungsoperon entwickelt, welches die Möglichkeit bietet der UE I während der heterologen Expression sämtliche bisher bekannten Assemblierungsfaktoren in unterschiedlichen Kombinationen anzubieten. Dieses Reifungsoperon enthält bisher neben dem Gen für CtaG Gene für die Häm *a* Biosynthesefaktoren CtaB (Farnesyltransferase) und CtaA (Häm *a* Synthase), sowie für den potentiellen Häm *a* Insertionsfaktor Surf1c. Das als pGR54 vorliegende Operon und seine verschiedenen Varianten (pGR51, pGR52, pGR53 und pGR55) sowie die dazugehörige Klonierungsstrategie, welche die Integration beliebig vieler weiterer Biogenesefaktoren ermöglicht, wurden von mir konzipiert und entwickelt (Abbildung 65). Ein Großteil der Klonierung, Expression und Analyse mit diesem System wurde jedoch von meinem Nachfolger Achim Hannappel durchgeführt, der dieses Projekt fortsetzt. Für die Ergebnisse dieses erweiterten Ansatzes sei daher auf seine zukünftigen Arbeiten verwiesen.



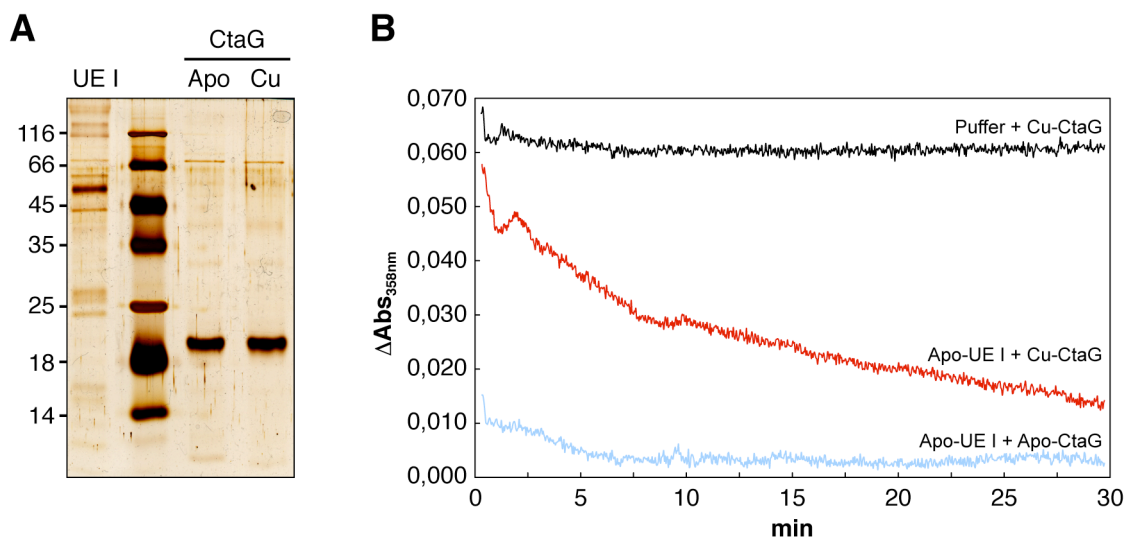
**Abbildung 65 - Schematische Darstellung der Reifungsvektoren für die heterologe Expression der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase**

Da die Koexpression von CtaG als einzigem Assemblierungsfaktor in *E. coli* zu keiner Erhöhung des Kupfergehalts in der UE I führt, wurde eine Reihe von Reifungsvektoren konzipiert und kloniert, welche die heterologe Koexpression weiterer an der Biogenese der Cytochrom c Oxidase beteiligter Proteine ermöglichen. Auf diese Weise könnte sich die Reihenfolge der Assemblierungsschritte ausfindig machen lassen. Das Reifungsoperon wurde so konzipiert, dass prinzipiell beliebig viele weitere potentielle Assemblierungsfaktoren hinzugefügt werden können. **CtaB**: Farnesyltransferase, **CtaA**: Häm *a* Synthase, **Surf1c**: am Einbau von Häm *a* beteiligter Assemblierungsfaktor, **CtaG**: das in dieser Arbeit untersuchte potentielle Kupferchaperon für das Cu<sub>B</sub>-Zentrum.

### 8.8. *in vitro* Assay zur Untersuchung des Kupfertransfers zwischen CtaG und UE I

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I ist der Versuch, einen möglichen Kupfertransfer zwischen den beiden Proteinen *in vitro* zu verfolgen. Hierfür kann das im Rahmen dieser Arbeit neu entdeckte kupferspezifische Absorptionssignal von CtaG bei 358 nm ausgenutzt werden (siehe Abschnitt 7.2, S.141). Analog zu den Kupfertransferexperimenten mit CtaG und EDTA soll in diesem Versuch die heterolog exprimierte kofaktorfreie UE I als Akzeptor für die Kupferionen dienen.

In einem ersten Versuch wurde die mit Hilfe des Plasmids pGR38 heterolog exprimierte UE I wie in Abschnitt 8.6 (S.168) beschrieben aufgereinigt. Die erhaltene Apo-UE I Lösung wurde auf 100  $\mu\text{M}$  verdünnt und um Trübungseffekten vorzubeugen wurden alle Proben (Apo-UE I, Apo-CtaG<sub>LF</sub>, Cu-CtaG<sub>LF</sub>) direkt vor der Messung durch Ultrazentrifugation (30 min, 100.000 g, 4 °C) von partikulären Substanzen befreit. Desweiteren wurden die verwendeten Küvetten mit einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 70/30) gründlich gereinigt. 100  $\mu\text{l}$  der 100  $\mu\text{M}$  Apo-UE I Lösung wurden in einer Quartzküvette vorgelegt und nach Messung einer Basislinie bei 358 nm (für ca. 5 min) mit 50  $\mu\text{M}$  (5  $\mu\text{l}$ ) Apo- bzw. Cu-CtaG versetzt (Abbildung 66). Als zusätzliche Kontrolle wurde die Veränderung der Extinktion von Cu-CtaG<sub>LF</sub> bei 358 nm in dem verwendeten Puffer (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 0,05 % DM, pH 8) verfolgt.



**Abbildung 66 - *In vitro* Assay zum Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I**

100  $\mu\text{l}$  einer 100  $\mu\text{M}$  Apo-UE I-Probe wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Cu- bzw. Apo-CtaG versetzt und die Abnahme der kupferspezifischen Extinktion von CtaG wurde bei 358 nm verfolgt. **A**. Silberfärbung der eingesetzten Proben (15 % Lämmli), **B**. Kinetiken bei 358 nm. Während die Inkubation von Apo-UE I mit Cu-CtaG (—) zu einer Abnahme des kupferspezifischen Signals von CtaG führt, zeigt sich für die Kontrollen, die Inkubation von Cu-CtaG mit dem verwendeten Puffer (—) bzw. die Inkubation von Apo-UE I mit Apo-CtaG (—), keine Veränderung der Extinktion bei 358 nm.



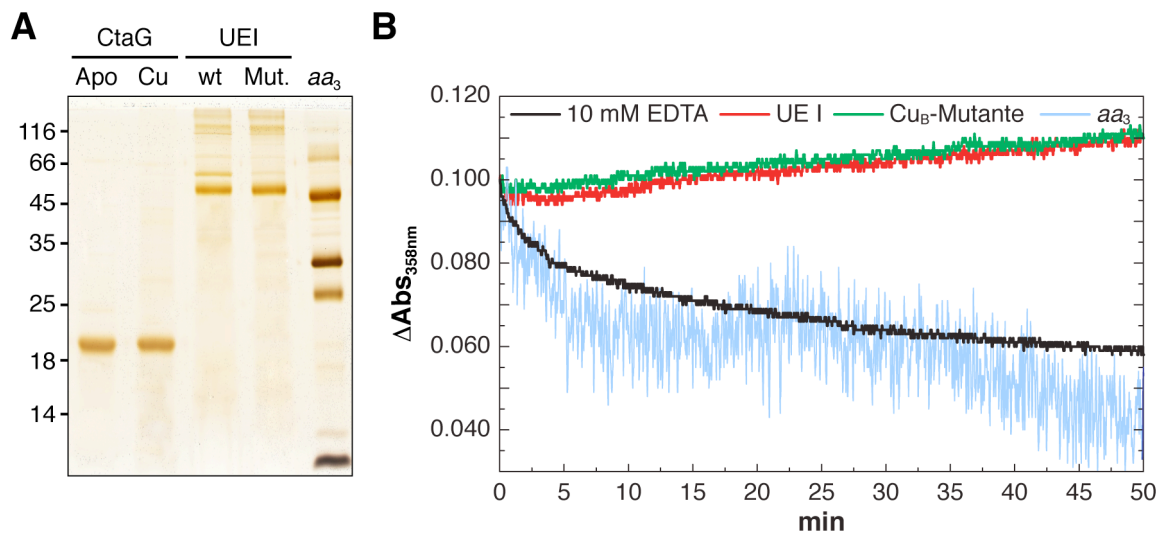
## Diskussion

Die Inkubation der Apo-UE I-Probe mit Cu-CtaG<sub>LF</sub> führt in diesem Experiment zu einer deutlichen Abnahme des kupferspezifischen CtaG-Signals bei 358 nm (Abbildung 66B). In den Kontrollversuchen tritt hingegen keine Veränderung der kupferspezifischen Absorption von CtaG<sub>LF</sub> auf: Weder bei der Inkubation von Apo-UE I mit kupferfreiem Apo-CtaG<sub>LF</sub> noch bei der Inkubation des kupferhaltigen Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit dem verwendeten Puffer. Offensichtlich ist die hier verwendete UE I-Probe dazu in der Lage, Kupferionen aus CtaG<sub>LF</sub> zu entziehen. Sollte dieser Transfer tatsächlich auf einem Einbau von Kupferionen in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Untereinheit I beruhen, so wäre damit erstens bewiesen, dass CtaG der unmittelbare Kupferdonor für das Cu<sub>B</sub>-Zentrum ist. Zweitens, dass keine weiteren Assemblierungsfaktoren für die Kupferinsertion notwendig sind, CtaG und UE I also direkt miteinander in Wechselwirkung treten können. Und drittens, dass der Kupfer einbau auch in Abwesenheit von Häm *a* als stabilisierendem Kofaktor ablaufen kann, CtaG also für einen sehr frühen Schritt in der Biogenese der Cytochrom c Oxidase verantwortlich sein könnte.

Allerdings muss das Ergebnis dieses Versuchs in einigen Punkten kritisch hinterfragt werden. Unzweifelhaft wird hier ein Entzug von Kupferionen aus Cu-CtaG<sub>LF</sub> beobachtet. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Kupferionen tatsächlich in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Untereinheit I eingebaut werden. Alternativ wäre beispielsweise denkbar, dass (1) die verwendete UE I Probe Kontaminationen, wie metallbindende Proteine oder organische Chelatoren enthält, welche Anstelle der UE I als Akzeptor für die Kupferionen von CtaG dienen oder (2) dass die Kupferionen zwar von UE I gebunden werden, die Koordination aber nicht durch die Cu<sub>B</sub>-Liganden H276, H325 und H326, sondern durch andere Reste vermittelt wird. Hierfür kämen beispielsweise die Histidine des C-terminalen His<sub>6</sub>-tags in Frage. Dieser konnte im Fall des hier verwendeten Konstrukts pGR38 trotz großer Bemühungen nicht effizient durch die TEV-Protease entfernt werden. Offensichtlich ist die Proteaseschnittstelle in diesem Konstrukt schlecht zugänglich. Auch ist wenig über den Faltungszustand der hier verwendeten Apo-UE I bekannt. Es ist gut möglich, dass die UE I nach der heterologen Expression oder durch die Solubilisierung mit Dodecylmaltosid in einem ungefalteten oder fehlgefalteten Zustand aufgereinigt wird. Das Fehlen stabilisierender Häm-Kofaktoren, weiterer Untereinheiten und/oder Assemblierungsfaktoren könnte dies erleichtern. Sollte die UE I tatsächlich in einem fehlgefalteten Zustand vorliegen, könnten die Kupferionen durch Aminosäuren koordiniert werden, welche in der nativen UE I nie in räumlicher Nähe vorliegen. Um diesen Fragen nachzugehen, mussten einige Kontrollen durchgeführt werden, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

### 8.8.1. Kontrollversuche zu dem beobachteten Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I

Da der beobachtete Kupfertransfer zwischen Cu-CtaG<sub>LF</sub> und UE I eine Reihe von Fragen aufwirft (siehe oben), wurden einige Kontrollexperimente durchgeführt. Hierfür mussten zunächst weitere Expressionsplasmide für die UE I kloniert werden. Zum einen wurde eine Tripelmutante der UE I erzeugt, in welcher die drei Cu<sub>B</sub>-Liganden H276, H325 und H326 durch Alanine ersetzt wurden. Zum anderen wurde zur Verbesserung der Probenreinheit nach dem ersten Chromatographieschritt ein Decahistidin-*tag* anstelle des Hexahistidin-*tags* an den C-terminus der UE I fusioniert. Schließlich wurde zur Verbesserung der Spaltbarkeit des His-*tags* eine flexible *linker*-Region in Form eines GP<sub>3</sub>PG-Oligopeptids zwischen den C-terminus der UE I und die TEV-Proteaseschnittstelle fusioniert. Die resultierenden Plasmide pGR40 und pGR41, für die unmutierte UE I und deren Cu<sub>B</sub>-Mutante respektive (Abbildung 62, S.169), wurden zur heterologen Expression und Aufreinigung der UE I eingesetzt. Da die Einführung des flexiblen *linkers* vor der TEV-Proteaseschnittstelle jedoch keine Verbesserung der Spaltbarkeit erbrachte, mussten die Apo-UE I Varianten auch in diesen Kontrollversuchen mit His-*tag* eingesetzt werden. Als weitere Kontrolle wurde Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit einer vollständig assemblierten Cytochrom c Oxidase inkubiert, die einen His<sub>6</sub>-*tag* am C-Terminus der UE I trägt. Die Transferreaktionen wurden durchgeführt wie oben beschrieben und die resultierenden Kinetiken sind in Abbildung 67 dargestellt.



**Abbildung 67 - Weitere Kontrollen zu dem beobachteten Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I.**

Ob das Kupferion von CtaG<sub>LF</sub> tatsächlich für die Bildung des Cu<sub>B</sub>-Zentrums verwendet wird, sollte mit Hilfe einer Cu<sub>B</sub>-Mutante der UE I (**Mut.**) sowie mit einer vollständig assemblierten Cytochrom c Oxidase, welche einen C-terminalen His<sub>6</sub>-*tag* trägt (**aa<sub>3</sub>**), kontrolliert werden. **A.** Silberfärbung der eingesetzten Proben (15 % Lämmli). **B.** 358 nm Kinetiken der Inkubation von 50 µM Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit 10 mM EDTA bzw. 100 µM Apo-UE I, 100 µM einer Cu<sub>B</sub>-Mutante der UE I oder 100 µM einer vollständig assemblierten Oxidase mit His<sub>6</sub>-*tag* (**aa<sub>3</sub>**). Trägt die UE I einen His<sub>10</sub>-*tag*, ist kein Kupferentzug aus CtaG zu beobachten. Die vollständig assemblierte Oxidase (**aa<sub>3</sub>**) kann hingegen mit ihrem His<sub>6</sub>-*tag* genauso gut Kupferionen aus CtaG<sub>LF</sub> entziehen wie EDTA.

## Diskussion

Die Einführung eines His<sub>10</sub>-tags anstelle des His<sub>6</sub>-tags an den C-Terminus der UE I ermöglicht eine bessere Ein-Schritt-NiNTA-Aufreinigung der Apo-UE I. Wie die Silberfärbung in Abbildung 67A zeigt, kann die Reinheit der UE I-Proben mit Hilfe des Decahistidin-tags deutlich verbessert werden. Allerdings zeigt sich für diese UE I-Proben in den Kinetiken keine Abnahme des Cu-spezifischen Signals von CtaG<sub>LF</sub>. Stattdessen ist eine lineare Zunahme der Extinktion bei 358 nm zu beobachten, deren Verlauf für die unmutierte UE I und die Cu<sub>B</sub>-Mutante gleich ist (Abbildung 67B, rote und grüne Kurven). Es findet also entweder gar kein Kupfertransfer zwischen CtaG und den His10-markierten UE I Proben statt, oder die Abnahme des kupferspezifischen Signals von CtaG<sub>LF</sub> wird durch eine zusätzliche Reaktion überlagert. In jedem Fall hat die Entfernung der Cu<sub>B</sub>-Liganden aus UE I keinen Effekt auf den Kurvenverlauf der *in vitro* Kupfertransferreaktion. Die Inkubation von Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit einer vollständig assemblierten, His<sub>6</sub>-markierten Cytochrom c Oxidase hingegen zeigt einen ähnlichen Verlauf, wie die Inkubation von Cu-CtaG<sub>LF</sub> mit 10 mM EDTA (Abbildung 67B, blau und schwarz). Die vollständig assemblierte, His<sub>6</sub>-markierte Cytochrom c Oxidase kann also Kupferionen aus Cu-CtaG<sub>LF</sub> entziehen. Da sie über mehrere chromophore Kofaktoren verfügt, ist die basale Absorption hier jedoch sehr hoch, weshalb diese Kinetik einem stärkeren Rauschen unterworfen ist als die der Häm-freien Proben.

Zusammengenommen lassen die Kontrollversuche folgende Interpretation zu: Der in Abbildung 66 beobachtete Kupfertransfer von CtaG<sub>LF</sub> auf UE I beruht nicht auf der Insertion von Kupferionen in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum der UE I, sondern auf der Bindung von Kupferionen an den His<sub>6</sub>-tag der Apo-UE I. Wichtigstes Argument hierfür ist die Tatsache, dass die vollständig assemblierte, His<sub>6</sub>-markierte Cytochrom c Oxidase, einen ähnlichen Kurvenverlauf hervorruft, wie die His<sub>6</sub>-markierte Apo-UE I. Trägt der Akzeptor einen His<sub>6</sub>-tag, kommt es also auch dann zu einem Kupfertransfer, wenn das Cu<sub>B</sub>-Zentrum bereits vollständig assembliert ist. Als weitere Kontrolle würde sich anbieten, eine weitere vollständig assemblierte Oxidase, die keinen tag trägt, mit Cu-CtaG<sub>LF</sub> zu inkubieren. Sollte tatsächlich der His<sub>6</sub>-tag als Akzeptor dienen, dürfte hier keine Abnahme der Extinktion bei 358 nm beobachtet werden.

Der lineare Anstieg, den die UE I-Proben mit Decahistidin-tag hervorrufen, beruht vermutlich auf Streuungseffekten, die im Fall von Proteinpräzipitationen auftreten können. Die Tatsache, dass die His<sub>10</sub>-markierte UE I nach der Inkubation mit Cu-CtaG<sub>LF</sub> nur noch in geringen Mengen in löslicher Form vorliegt spricht ebenfalls für Präzipitationen. Dies zeigte sich bei dem Versuch, UE I und CtaG nach dem Transferassay per NiNTA voneinander zu trennen, um den Kupfergehalt der Reaktionspartner zu bestimmen.

Da die UE I in den Transferexperimenten vorgelegt wird und vor der Zugabe von Cu-CtaG<sub>LF</sub> zunächst sichergestellt wird, dass die Absorption bei 358 nm konstant ist, muss die Präzipitation durch die Inkubation mit Cu-CtaG<sub>LF</sub> ausgelöst werden. Möglicherweise werden durch den Decahistidin-*tag* zwar Kupferionen aus CtaG<sub>LF</sub> entzogen, die Abnahme des kupferspezifischen CtaG-Signals wird aber durch die Streuung der präzipitierenden UE I Proben überlagert. Eine durch die Bindung von Kupferionen an den His<sub>10</sub>-*tag* vermittelte Quervernetzung einzelner UE I Moleküle ist als Auslöser für die Präzipitation denkbar.

Mit Hilfe der kupferspezifischen Absorption bei 358 nm lässt sich der Transfer von Kupferionen von CtaG<sub>LF</sub> auf mögliche Akzeptoren zwar untersuchen, die His<sub>10</sub>-markierte Apo-UE I ist als Akzeptor jedoch ungeeignet. Unter den vorliegenden Bedingungen ist der Einbau des Cu<sub>B</sub>-Ions durch CtaG also nicht möglich. Zum einen könnte dies bedeuten, dass die Kupferinsertion nicht posttranslational, sondern kotranslational stattfindet. Der posttranslationale Mechanismus kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden: Denkbar ist auch, dass die Präsenz der Häm-Kofaktoren eine Voraussetzung für die Kupferinsertion ist, oder dass weitere Assemblierungsfaktoren benötigt werden, um den Prozess zu koordinieren. Außerdem kann der Transmembranbereich von CtaG, welcher dem hier verwendeten löslichen CtaG-Fragment fehlt, für die korrekte Bindung und Erkennung der UE I von Bedeutung sein. Weitere *in vivo* und *in vitro* Experimente werden notwendig sein, um einen endgültigen Beweis für die Rolle von CtaG als unmittelbares Kupferchaperon für die Biogenese des Cu<sub>B</sub>-Zentrums der Cytochrom *c* Oxidase zu liefern.

## 8.9. Zusammenfassung

Obwohl allgemein davon ausgegangen wird, dass CtaG für den Einbau des Kupferions in das binukleäre  $\text{Cu}_B$  : Häm  $a_3$ -Zentrum der Cytochrom c Oxidase verantwortlich ist, fehlt bislang jeder Beweis für eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Kupferchaperon und der Untereinheit I (UE I) der Cytochrom c Oxidase. Um eine mögliche Interaktion und einen möglichen Kupfertransfer zwischen diesen beiden Proteinen zu untersuchen, wurden einige *in vivo* und *in vitro* Experimente sowie bioinformatische Analysen durchgeführt. Es wurden zwei Arbeitshypothesen aufgestellt, die es mit Hilfe der Experimente zu beweisen oder zu widerlegen galt. Eine Arbeitshypothese geht von einem posttranslationalen Mechanismus der Kupferinsertion aus, die zweite Hypothese sieht eine kotranslationale Insertion vor.

Im Rahmen der posttranslationalen Hypothese wurden mögliche Kontaktflächen von CtaG und UE I einer bioinformatischen Analyse unterzogen, um eventuelle komplementäre Muster geladener und polarer Aminosäuren auf beiden Seiten zu identifizieren. Sowohl die *Multiseq* Analyse als auch die Berechnung von Oberflächenpotentialen mit Hilfe von APBS spricht gegen eine posttranslationale Interaktion zwischen CtaG und UE I.

Koaffinitätschromatographische Versuche, bei denen die UE I oder CtaG aus solubilisierten *Paracoccus denitrificans* Membranen isoliert werden sollten indem sie an eine Säule mit dem jeweiligen Partner binden, deuten ebenfalls daraufhin, dass die beiden Proteine keine stabile, posttranslationale Wechselwirkung miteinander eingehen.

Um einen möglichen Kupfertransfer zwischen CtaG und UE I online zu verfolgen, wurde ein *in vitro* Assay etabliert, mit dessen Hilfe der Transfer von Kupferionen von CtaG<sub>LF</sub> auf geeignete Akzeptoren unmittelbar spektroskopisch verfolgt werden kann. Versuche, die mit diesem *in vitro* Assay durchgeführt wurden, zeigen, dass Cu-CtaG<sub>LF</sub> alleine nicht dazu in der Lage ist, Kupferionen in das  $\text{Cu}_B$ -Zentrum einer kofaktorfreen UE I zu inserieren. Entweder sind weitere Faktoren, wie die Häm *a* Kofaktoren oder zusätzliche Chaperone notwendig, um die Kupferinsertion zu ermöglichen, oder der Kupfertransfer findet *in vivo* nicht posttranslational sondern kotranslational statt.

Versuche, bei denen CtaG und UE I in einem heterologen Wirt, der weder eine Cytochrom c Oxidase noch deren Assemblierungsfaktoren enthält, koexprimiert wurden, beweisen, dass CtaG auch *in vivo* zusätzliche Faktoren benötigt, um Kupferionen in die UE I zu inserieren. Um diese Faktoren in zukünftigen Experimenten identifizieren zu können, wurde ein Ansatz entwickelt, der die Koexpression beliebiger weiterer Assemblierungsfaktoren über ein synthetisches Reifungsoperon ermöglicht.

Aussichtsreicher als die reine Fokussierung auf *in vitro*-, bzw. heterologe Expressionsversuche erweisen sich für den Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion jedoch Versuche im nativen Wirt. Sowohl Blau-Nativ Elektrophoresen mit Superkomplexen als auch 2D-Gele nach Crosslinking Experimenten deuten auf eine Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I im nativen Wirt *Paracoccus denitrificans* hin. Ein potentieller Assemblierungskomplex mit einem Molekulargewicht > 100-120 kDa, der sowohl CtaG als auch die UE I der Cytochrom c Oxidase enthält, kann mit Hilfe des Crosslinkers DSP stabilisiert werden. Eine Anreicherung und nähere Charakterisierung dieses Komplexes bietet sich für zukünftige Experimente an.

## IV. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein CtaG aus *Paracoccus denitrificans* eingehend charakterisiert. Es wurde überprüft, ob dieses 21 kDa große Membranprotein als Kupferchaperon und Assemblierungsfaktor für die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase, das heißt für die Biogenese des Cu<sub>B</sub>-Zentrums, in Frage kommt.

Eine bioinformatische Analyse zeigte zunächst, dass CtaG, ein Homolog des eukaryotischen Proteins Cox11, zu den am stärksten konservierten Assemblierungsfaktoren der Cytochrom c Oxidase gehört. Interessanterweise sind diese Proteine alle an der Biogenese der redoxaktiven Metallzentren beteiligt, und nur sie sind auch in *Paracoccus denitrificans* konserviert. Somit stellt *Paracoccus* ein ideales Modellsystem dar, um die essentiellen Schritte der Biogenese der Cytochrom c Oxidase zu untersuchen.

Ein lösliches Fragment von CtaG (CtaG<sub>LF</sub>) wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe eines spaltbaren His<sub>6</sub>-tags aufgereinigt. Es wurde ein Protokoll entwickelt, mit dessen Hilfe die Aggregation des löslichen Fragments minimiert und das Protein in hochreiner, aggregatfreier Form isoliert werden kann.

Rekonstitutionsversuche zeigten, dass CtaG<sub>LF</sub> ein spezifisch Cu(I)-bindendes Protein ist. Nach der heterologen Expression in *E. coli* ist CtaG<sub>LF</sub> kofaktorfrei. Ein Protokoll zur *in vitro* Rekonstitution mit Kupferionen wurde entwickelt, mit welchem ein stöchiometrisches Kupfer/Protein-Verhältnis erreicht wird. Gelfiltrations- und ICP-MS-Analysen zeigten, dass CtaG<sub>LF</sub> Kupferionen ausschließlich als Dimer bindet. Rekonstitutionen bei denen Cu(I), Cu(II), Co(II), Fe(II), Mn(II), Mg(II) und Ni(II) sowohl einzeln als auch simultan angeboten wurden, führten zwar zu wenig reproduzierbaren absoluten Stöchiometrien, bestätigten aber, dass CtaG<sub>LF</sub> bevorzugt Cu(I) bindet.

Mutagenesestudien bewiesen einerseits, dass drei Cysteinreste maßgeblich für die Kupferbindung verantwortlich sind und deuteten andererseits darauf hin, dass zwei identische, punktsymmetrische Bindungsstellen des CtaG<sub>LF</sub>-Dimers die Kupferionen koordinieren. Mit Hilfe einer *Multiseq*-Analyse wurden zunächst hochkonservierte Oberflächenreste von CtaG identifiziert. Eine Auswahl dieser Aminosäuren wurde per gerichteter Mutagenese ersetzt und der Effekt dieser Mutationen auf Stöchiometrie, Affinität und Dimerisierung von CtaG<sub>LF</sub> wurde untersucht. Die Affinitäten wurden dabei mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten mit dem Cu(I)-spezifischen Chelator BCA analysiert. Insgesamt vier mögliche Szenarien für die Kupferbindung von CtaG wurden postuliert und anhand der Datenlage diskutiert. Das Szenario III, welches die Datenlage am besten zu erklären vermag, sieht eine trigonale Koordination der Kupferionen vor, an welcher die Cysteine des hochkonservierten CFCF-Motivs einer Polypeptidkette ein gemeinsames Koordinationsfeld mit dem nahe der Transmembranhelix gelegenen Cystein 38 der jeweils anderen Polypeptidkette bilden.

Mit Hilfe von UV/Vis-spektroskopischen Messungen wurde gezeigt, dass die Bindung von Kupferionen an CtaG<sub>LF</sub> zu einer Absorption bei 358 nm führt. Diese kann mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\Delta 358 \text{ nm}} = 936 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  zur Beobachtung des Kupfertransfers von CtaG<sub>LF</sub> auf einen Akzeptor verwendet werden.

Um eine Beteiligung von CtaG bei der Insertion des  $\text{Cu}_B$ -Ions in die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase (UE I) zu beweisen, wurden zwei Arbeitshypothesen aufgestellt und empirisch untersucht:

Die erste Hypothese geht von einer posttranslationalen Kupferinsertion aus. Die UE I wird laut dieser Hypothese zunächst vollständig exprimiert und in die Membran inseriert, bevor das Kupferion über einen Kanal in das 13 Å unterhalb der Membranoberfläche gelegene aktive Zentrum der Oxidase inseriert wird. Drei Ansätze wurden zur empirischen Überprüfung dieser Hypothese verfolgt: Erstens wurde ein *in vitro* Transferassay etabliert, bei dem heterolog exprimierte, kofaktorfreie UE I als Akzeptor für Kupferionen von CtaG<sub>LF</sub> diente. Zweitens wurden bioinformatische Analysen durchgeführt um potentielle Interaktionsflächen zwischen CtaG und UE I zu identifizieren. Und drittens wurde mit Hilfe koaffinitätschromatographischer Versuche eine Interaktion zwischen CtaG und kofaktorfreier UE I untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen allesamt gegen eine posttranslationale CtaG-vermittelte Insertion von Kupferionen in die UE I der Cytochrom c Oxidase.

Die zweite Hypothese geht davon aus, dass die prosthetischen Häm- und Kupfergruppen bereits vor der vollständigen Membraninsertion, das heißt kotranslational auf die UE I übertragen werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden ebenfalls mehrere Ansätze verfolgt: Erstens wurde die UE I in Gegenwart und Abwesenheit von CtaG heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. In Abwesenheit weiterer Assemblierungsfaktoren ist CtaG in diesem System nicht dazu in der Lage den Kupfergehalt der UE I zu erhöhen. Zweitens wurde mit Hilfe von Blau-Nativ Gelen und Crosslinking-Versuchen im nativen Wirt *Paracoccus denitrificans* nach einer Wechselwirkung zwischen CtaG und UE I gesucht. Insbesondere die Ergebnisse der Crosslinking-Versuche deuten auf einen Assemblierungskomplex hin, der sowohl CtaG als auch die UE I der Cytochrom c Oxidase enthält. In einem dritten Ansatz wurde ein zellfreies Expressionssystem etabliert, welches direkten Zugang zu naszierenden Ketten der UE I ermöglicht. Dieses System erscheint vielversprechend und dient derzeit als Basis für weitere Biogenesestudien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass CtaG ein spezifisch  $\text{Cu(I)}$ -bindendes Protein ist, das im Zuge der Kupferbindung dimerisiert und in *Paracoccus denitrificans* in einem hochmolekularen Komplex gemeinsam mit UE I vorliegt. Die gegenwärtige Datenlage spricht dafür, dass CtaG als Kupferchaperon an der Biogenese der Cytochrom c Oxidase beteiligt ist und das  $\text{Cu}_B$ -Ion in einem kotranslationalen Mechanismus in die UE I der Cytochrom c Oxidase inseriert.



## V. Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
AU	<i>absorbance units</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
CtaG <sub>LF</sub>	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
CtaG <sub>LF</sub> -His	CtaG <i>long fragment</i> (AS 36-194)
CtaG <sub>LF</sub> -TEV	CtaG <sub>LF</sub> inkl. His <sub>6</sub> -tag
CtaG <sub>SF</sub>	CtaG <sub>LF</sub> nach Entfernung des His <sub>6</sub> -tags durch die TEV-Protease
Cu(I)-Acetonitril	CtaG <i>short fragment</i> (AS 53-194)
dNTP	Tetrakis(acetonitrilo)-Kupfer(I)-Hexafluorophosphat [Cu(I)(CH <sub>3</sub> CN) <sub>4</sub> ]PF <sub>6</sub>
DSP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiobis[succinimidylpropionat]
EDTA	Dithiothreitol
GST	Ethylendiamintetraacetat
GuHCl	Glutathion-S-Transferase
ICP-MS	Guanidiniumhydrochlorid
ITC	<i>inductively coupled plasma-mass spectrometry</i>
LMCT	<i>isothermal titration calorimetry</i>
MBP	<i>ligand to metal charge transfer</i>
MCS	Maltose-Binde-Protein
OD	<i>multiple cloning site</i>
PAG	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel
<i>P.d.</i>	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Paracoccus denitrificans</i>
PMSF	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RE	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Relative Einheiten
SDS	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro minute)
Seralpur	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
β-ME	hochreines Wasser (Leitfähigkeit < 0,05 μS)
TEV	β-Mercaptoethanol
Tris	<i>tobacco etch virus</i>
TXRF	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE I	Total-Relaxions-Röntgen-Fluoreszenz Spektroskopie
DM	Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase
	Dodecylmaltosid

## 2. Ausgewählte Konstrukte

### 2.1. pGR10

```
      10      20      30      40      50      60
MRGSHHHHHH GSENLVFQSM AWFCKVTGFA GTTNVAEAAAS DTVLDEKIRV RFDANADSNL

      70      80      90     100     110     120
GWTFRPMQRE MELKIGENAI AFYEAINNTD EPVTGTASYN VAPDAAGYFF NKIECFCFTE

     130     140     150     160     170     180
QTLQPGERVE MPVSFFVDAD LVNDRDAVIR DITLSYTFHR TDPAPAKQAA LDAKTEPTVN
```

Number of amino acids: 180

Molecular weight: 20199.4

Theoretical pI: 4.95

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 26

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 15

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is:

30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 30.15

This classifies the protein as stable.

## 2.2. pGR20

### 2.2.1. unprozessiert

```

      10      20      30      40      50      60
MAWFCKVTGF AGTTNVAEAA SDTVLDEKIR VRFDANADSN LGWTFRPMQR EMELKIGENA

      70      80      90     100     110     120
IAFYEAINTT DEPVTGTASY NVAPDAAGYF FNKIECFCT EQTLQPGERV EMPVSFFVDA

     130     140     150     160     170     180
DLVNRDAGR  IRDITLSYTF HRTDPPAPKQ AALDAKTEPT VNENLYFQGA KLAAALEHHH HHH

```

Number of amino acids: 183

Molecular weight: 20475.8

Theoretical pI: 4.97

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 27

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 16

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient      18575  
 Abs 0.1% (=1 g/l)    0.907, assuming ALL Cys residues appear as half  
 cystines

Ext. coefficient      18450  
 Abs 0.1% (=1 g/l)    0.901, assuming NO Cys residues appear as half  
 cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is:  
 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).  
 >20 hours (yeast, in vivo).  
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 26.47  
 This classifies the protein as stable.



### 3. Theorie zur Bestimmung von Bindungskonstanten

#### 3.1. Einfache Gleichgewichtstitration

Bei der einfachen Gleichgewichtstitration wird das Metallion in substöchiometrischen Mengen zu einer Lösung des Proteins titriert, und die Entstehung des Metalloproteinkomplexes verfolgt.

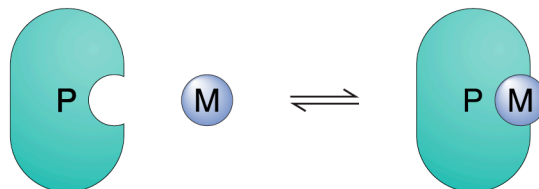


Abbildung 68 - Schematische Darstellung des Gleichgewichts bei Proteinen mit einer Bindungsstelle.

Voraussetzung für die Verfolgung der Titration mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie ist zunächst die Existenz einer Absorptionsbande im sichtbaren oder ultravioletten Bereich, mit deren Hilfe sich die Konzentration einer der Reaktionskomponenten bestimmen lässt. Entsteht durch die Bindung des Metallions an das Protein beispielsweise eine *ligand to metal charge transfer* (LMCT) Bande, so kann aus dieser die Konzentration des Metalloproteinkomplexes [MP] bestimmt werden. Trägt man die Menge des entstandenen Metalloproteinkomplexes [MP] gegen die zutitrierte Metallionenkonzentration  $[M_0]$  auf, so erhält man eine erste Titrationskurve (Abbildung 69), die jedoch, wie im folgenden erläutert wird, zur Auswertung abgewandelt werden muss.

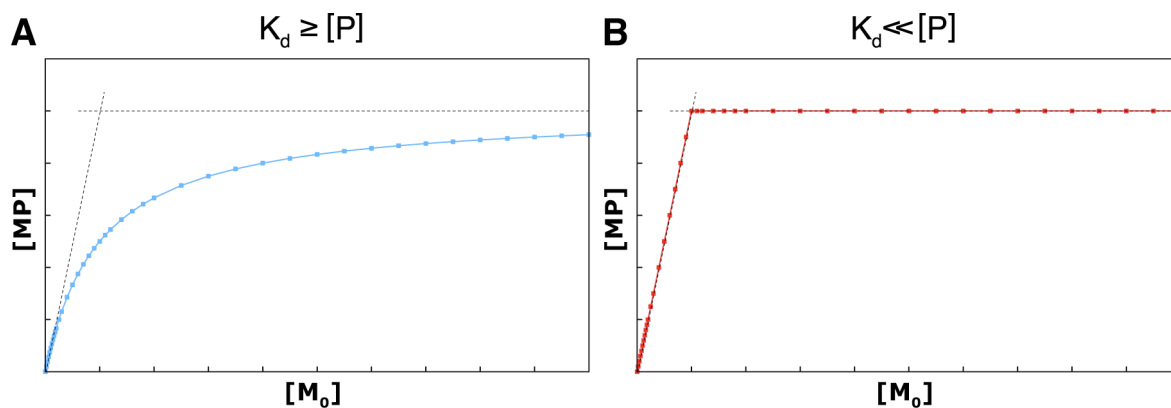


Abbildung 69 - Idealisierte Gleichgewichtstitrationskurven

Die Form der Titrationskurve hängt von der Affinität des Proteins ab. **A.** Proteine deren  $K_d$  sich im Bereich der untersuchten Proteinkonzentration oder darüber bewegt, weisen eine hyperbole Sättigungskurve auf, da das Protein mit dem Lösungsmittel um das Metallion konkurriert und zu nahezu jedem Zeitpunkt auch ungebundene Metallionen vorliegen. **B.** Ist die  $K_d$  hingegen wesentlich niedriger als die untersuchte Proteinkonzentration, so verhält sich die Titrationskurve nahezu linear. Die Affinität des Proteins ist sehr hoch und die zutitrierten Metallionen werden sofort gebunden, bis sämtliche Bindungsstellen besetzt sind. Es besteht quasi "kein" Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Metallionen mehr. In diesem Fall kann die  $K_d$  nicht aus der Titrationskurve bestimmt werden.

Da die eingesetzten Gesamtkonzentrationen für Protein  $[P_0]$  und Metallion  $[M_0]$  bekannt sind, können aus der Massenerhaltung für jeden Titrationschritt die Konzentrationen der einzelnen Komponenten bestimmt werden:

$$[P_0] = [P] + [MP] \quad [6.4]$$

$$[M_0] = [M] + [MP] \quad [6.5]$$

Aus der Kombination von Massenwirkung (Gleichung [6.3]) und Massenerhaltung (Gleichung [6.4]) erhält man die allgemeine Bindungsgleichung, mit deren Hilfe sich der Verlauf einer Titrationskurve (Abbildung 69) beschreiben lässt:

$$[MP] = \frac{[P_0] \cdot [M]}{K_d + [M]} \quad [6.6]$$

Hat ein Protein mehrere ( $n$ ) Bindungsstellen, die sich gegenseitig nicht beeinflussen, so wird Gleichung [6.6] zu:

$$[M_{\text{geb}}] = \frac{n \cdot [P_0] \cdot [M]}{K_d + [M]} \quad ([M_{\text{geb}}]/n = [MP]) \quad [6.7]$$

Um Ergebnisse aus verschiedenen Messungen besser miteinander vergleichen zu können, normiert man die Konzentration des Metalloproteinkomplexes auf die Gesamtkonzentration des Proteins. Dieses Verhältnis von gebundenem Metall zu Gesamtprotein wird auch als Sättigung  $r$  des Proteins bezeichnet:

$$r = \frac{[MP]}{[P_0]} = \frac{n \cdot [M]}{K_d + [M]} \quad [6.8]$$

Bindungskurven in denen  $r$  gegen  $[M]$  aufgetragen wird, lassen sich also mathematisch mit Hilfe der klassischen Michaelis-Menten Hyperbel beschreiben:

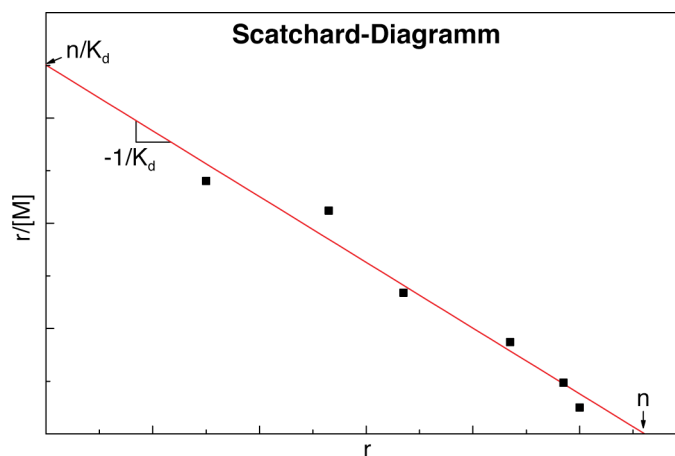
$$y = P_1 \cdot \frac{x}{P_2 + x} \quad [6.9]$$

Der Parameter  $P_1$  entspricht hier der Anzahl  $n$  der Bindungsstellen,  $P_2$  der Dissoziationskonstanten  $K_d$ . Mit Hilfe von Analyseprogrammen können diese Parameter iterativ aus den Messwerten bestimmt werden (*fitten*). Derartige iterative Berechnungen (*fits*) können beispielsweise mit dem Programm Origin<sup>®</sup> der Firma OriginLab durchgeführt werden.

Alternativ lässt sich die durch Gleichung [6.8] beschriebene Hyperbel auch durch veränderte Auftragsweisen linearisieren. Eine bei der Untersuchung von Bindungsgleichgewichten häufig verwendete Art der Linearisierung ist das Verfahren nach Scatchard (Scatchard 1949). Gleichung [6.8] lässt sich wie folgt zur Scatchard-Gleichung umformen:

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{n \cdot [M]}{K_d + [M]} & \parallel & \cdot \frac{K_d + [M]}{[M]} \\
 \frac{r \cdot K_d}{[M]} + \frac{r \cdot [M]}{[M]} &= n & \parallel & \div K_d \\
 \frac{r}{[M]} + \frac{r}{K_d} &= \frac{n}{K_d} & \parallel & - \frac{r}{K_d} \\
 \frac{r}{[M]} &= \frac{n}{K_d} - \frac{r}{K_d} & & [6.10]
 \end{aligned}$$

Trägt man also  $r/[M]$  gegen  $r$  auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung  $-1/K_d$  und dem Ordinatenschnittpunkt  $n/K_d$  (siehe Abbildung 70).



**Abbildung 70 - Scatchard Diagramm zur Linearisierung von Bindungskurven**

Trägt man  $r/[M]$ , also den Quotienten aus Sättigung ( $r = [M_{\text{geb}}]/[P_0]$ ) und freiem Metall ( $[M] = [M_0] - [M_{\text{geb}}]$ ) gegen die Sättigung  $r$  auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung  $-1/K_d$ , welche die y-Achse bei  $n/K_d$  und die x-Achse bei  $n$  schneidet.

Mit Hilfe des Scatchard-Diagramms lassen sich Dissoziationskonstanten also auch durch einfache lineare Regression berechnen. Desweiteren kann aus dem Kurvenverlauf eines Scatchard-Diagramms besser auf die Art der Bindung geschlossen werden. Enthält ein Protein mehrere, voneinander unabhängige Bindungsstellen für einen Liganden, und weisen diese Bindungsstellen unterschiedliche Affinitäten auf, so lässt sich dies mit bloßem Auge schwer aus der reinen Bindungskurve erkennen, da diese aus der Addition zweier Hyperbeln besteht und somit noch immer einen hyperbolen Verlauf aufweist. Das Scatchard-Diagramm hingegen zeigt bei zwei unabhängigen, nicht identischen Bindungsstellen keine einfache Gerade mehr, sondern zwei sich schneidende Geraden, bzw. einen kurvenförmigen Verlauf. Somit kann aus einem Scatchard-Diagramm oftmals bereits mit bloßem Auge erkannt werden, ob das Protein über mehrere, verschiedene Bindungsstellen für den Liganden verfügt.

Werten die nahe der Y-Achse des Scatchard-Diagramms liegen, sollte jedoch keine allzugroße Gewichtung bei der Auswertung beigemessen werden, da diese naturgemäß einer großen Streuung unterworfen sind: Diese Werte stammen aus dem Anfangsbereich

der Titrationskurve, in dem die zutitrierte Ligandenkonzentration noch sehr gering sind. Die sehr kleinen Werte für gebundenen und ungebundenen Liganden sind daher noch einem niedrigen Signal/Rausch-Verhältnis unterworfen, was den Fehler in dem Verhältnis aus gebundenem und ungebundenem Liganden groß werden lässt ( $y$ -Werte:  $r/[M] = [M_{\text{geb}}]/([M_{\text{frei}}][M_0])$ ). Bei der Betrachtung von Scatchard-Diagrammen sollte das Augenmerk daher hauptsächlich auf den mittleren bis hohen Bereich für  $r$  gelegt werden.

Neben der Existenz eines UV/Vis-spektroskopischen Signals, mit welchem sich die Konzentration eines der Reaktionspartner während der Titration verfolgen lässt, gibt es noch eine zweite entscheidende Voraussetzung für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten aus photometrischen Gleichgewichtstitrationen: Die für die Titration eingesetzte Proteinkonzentration muss im Bereich der  $K_d$  oder darunter liegen. Nur so ist gewährleistet, dass sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Metallionen einstellen kann. Liegt die Proteinkonzentration weit über der  $K_d$ , so findet sich für jedes Metallion sofort ein Proteinpartner und es kommt erst dann zum Vorliegen freier Metallionen, wenn sämtliche Bindungsstellen besetzt sind. Es besteht also kein wirkliches Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Metallionen, und die Titrationskurve verläuft bis zur Sättigung nahezu linear (Abbildung 69B). In diesem Fall kann die Dissoziationskonstante nicht mit Hilfe der Gleichgewichtstitration bestimmt werden. Bei Proteinen mit sehr hoher Affinität läge die zur Gewährleistung von Gleichgewichtsbedingungen nötige Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze der UV/Vis-Spektroskopie, weshalb zur Bestimmung der  $K_d$  für diese Proteine auf andere Methoden zurückgegriffen werden muss.

### 3.2. Kalorimetrie

Eine Alternative zur Bestimmung von Bindungskonstanten ist beispielsweise die Kalorimetrie, welche die Messung von minimalen Temperaturänderungen ermöglicht. Damit eine Reaktion freiwillig abläuft, muss die freie Gibbs-Enthalpie  $\Delta G$  ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ) der Reaktion kleiner null sein, das heißt, das System muss Wärme abgeben ( $\Delta H < 0$ ; enthalpischer Beitrag) und/oder ungeordneter werden ( $\Delta S > 0$ ; entropischer Beitrag). Im Falle der Bindung zweier Partner nimmt die Ordnung des betrachteten Systems zu (die Entropie nimmt ab), daher muss, wenn die Bindung freiwillig abläuft, Wärme freigesetzt werden. Diese Bindungswärme lässt sich mit Hilfe der Kalorimetrie bestimmen und aus der thermodynamischen Größe der freien Reaktionsenthalpie  $\Delta G$  kann anschließend über  $\Delta G = -RT \ln K$  die Gleichgewichtskonstante der Reaktion berechnet werden, welche nichts anderes ist als die Bindungskonstante. Für diese Methode muss bewusst außerhalb der Gleichgewichtsbedingungen gearbeitet werden, d.h. die Proteinkonzentration muss um einige Größenordnungen über der  $K_d$  liegen (Abbildung 69B), damit der zutitrierte Ligand



quantitativ an das Protein bindet und die gemessene Bindungswärme dem gesamten zutitrierten Liganden zugeordnet werden kann.

### 3.3. Konkurrenztitration

Eine weitere Alternative zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten ist die Konkurrenztitration. Für hochaffine Proteine besteht im photometrisch beobachtbaren Konzentrationsbereich quasi "kein" Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Metallionen (Abbildung 69B). Das Protein konkurriert also nicht mit dem Lösungsmittel um die Metallionen und die Affinität lässt sich für diese Proteine photometrisch nicht mit Hilfe der einfachen Gleichgewichtstitration bestimmen. Bei der Konkurrenztitration beobachtet man daher stattdessen ein komplexeres Gleichgewicht, und zwar zwischen dem Protein [P], dem Metallion [M] und einem geeigneten Chelator [C]. Titriert wird in diesem Fall also beispielsweise der Chelator zu einer definierten Menge des Metalloproteins, oder der metallhaltige Chelator [MC] zu einer definierten Menge des Apo-Proteins (Bisswanger 1994).

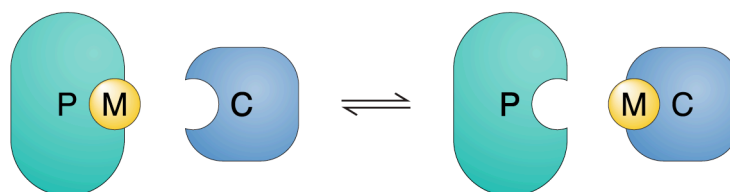


Abbildung 71 - Schematische Darstellung zur Konkurrenztitration

Es handelt sich hierbei also um zwei kombinierte Gleichgewichte:



Für die Gleichgewichte zwischen Protein und Metallion, bzw. Chelator und Metallion gelten die Dissoziationskonstanten

$$K_{d_{\text{Protein}}} = \frac{[P] \cdot [M]}{[MP]} \quad \text{und} \quad K_{d_{\text{Chelator}}} = \frac{[C] \cdot [M]}{[MC]} .
 \quad [6.12]$$

Die Gesamtmenge an Metallionen ist:

$$[M_0] = [M] + [MP] + [MC]
 \quad [6.13]$$

Löst man nun die Gleichungen [6.12] nach [MP] bzw. [M] auf

$$[\text{MP}] = \frac{[\text{P}] \cdot [\text{M}]}{K_{\text{dProtein}}} \quad [\text{M}] = \frac{[\text{MC}] \cdot K_{\text{dChelator}}}{[\text{C}]} \quad [6.14]$$

und setzt die erhaltenen Terme in Gleichung [6.13] ein, so erhält man

$$[\text{M}_0] = \frac{[\text{MC}] \cdot K_{\text{dChelator}}}{[\text{C}]} \left( 1 + \frac{[\text{P}]}{K_{\text{dProtein}}} \right) + [\text{MC}] \quad [6.15]$$

Durch Umstellung ergibt sich daraus eine erweiterte Form der allgemeinen Bindungsgleichung [6.6]:

$$[\text{MC}] = \frac{[\text{M}_0] \cdot [\text{C}]}{[\text{C}] + K_{\text{dChelator}} \left( 1 + \frac{[\text{P}]}{K_{\text{dProtein}}} \right)} \quad [6.16]$$

Beziehungsweise normiert auf die Sättigung  $r$  und unter Berücksichtigung von mehreren potentiellen Bindungsstellen  $n$  (analog zu Gleichung [6.8]):

$$r = \frac{[\text{MC}]}{[\text{C}_0]} = \frac{n \cdot [\text{C}]}{K_{\text{dChelator}} \left( 1 + \frac{[\text{P}]}{K_{\text{dProtein}}} \right) + [\text{C}]} \quad [6.17]$$

Trägt man nach einer Konkurrenztitration also  $r$  gegen die Konzentration des freien Chelators [C] auf, so erhält man wieder eine Kurve, die sich mathematisch mit der klassischen Michaelis-Menten Hyperbel beschreiben lässt:

$$y = P_1 \cdot \frac{x}{P_2 + x} \quad [6.9]$$

Im Endeffekt wird die Titrationskurve einer Konkurrenztitration also analog der Gleichgewichtstitration ausgewertet, mit dem entscheidenden Unterschied, dass  $P_2$  eines Michaelis-Menten *fits* oder die Steigung des Scatchard Diagramms (bzw. ihr negativer Kehrwert) nicht der  $K_d$  des Proteins oder des Chelators entspricht, sondern einer Kombination aus den beiden Dissoziationskonstanten für Protein und Chelator:

$$P_2 = K_{\text{dChelator}} \left( 1 + \frac{[\text{P}]}{K_{\text{dProtein}}} \right) \quad [6.18]$$

Ist die  $K_d$  des Chelators bekannt, lässt sich somit auch die Affinität des Proteins für das Metallion aus dem Konkurrenzexperiment bestimmen.

## 4. Literaturverzeichnis

- Abajian, C. and A. C. Rosenzweig (2006). "Crystal structure of yeast Sco1." J Biol Inorg Chem 11(4): 459-66.
- Abajian, C., L. A. Yatsunyk, B. E. Ramirez and A. C. Rosenzweig (2004). "Yeast cox17 solution structure and Copper(I) binding." J Biol Chem 279(51): 53584-92.
- Abriata, L. A., L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, P. Gkazonis, G. A. Spyroulias, A. J. Vila and S. Wang (2008). "Mechanism of Cu(A) assembly." Nat Chem Biol 4(10): 599-601.
- Ahn, T., S. K. Yim, H. I. Choi and C. H. Yun (2001). "Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes." Anal Biochem 291(2): 300-3.
- Allègre, C. J. and S. H. Schneider (1994). "The evolution of the earth." Scientific American 271(4): 44.
- Amersham (2002). Superdex 30/75/200 prep grade, Wikströms Sweden.
- Anderka, O. (2005). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am Cytochrom bc1-Komplex aus *Paracoccus denitrificans*. Institut für Molekulare Genetik, Johann-Wolfgang-Goethe Universität. Dr. phil. nat.: 241.
- Baker, N. A., D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst and J. A. McCammon (2001). "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A 98(18): 10037-41.
- Balatri, E., L. Banci, I. Bertini, F. Cantini and S. Ciofi-Baffoni (2003). "Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein Involved in cytochrome c oxidase assembly." Structure 11(11): 1431-43.
- Banci, L., I. Bertini, F. Cantini, S. Ciofi-Baffoni, L. Gonnelli and S. Mangani (2004). "Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in Cu<sub>B</sub> site formation of cytochrome c oxidase." J Biol Chem 279(33): 34833-9.
- Banting, G. S. and D. M. Glerum (2006). "Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p." Eukaryot Cell 5(3): 568-78.
- Basumallick, L., R. Sarangi, S. DeBeer George, B. Elmore, A. B. Hooper, B. Hedman, K. O. Hodgson and E. I. Solomon (2005). "Spectroscopic and density functional studies of the red copper site in nitrosocyanin: role of the protein in determining active site geometric and electronic structure." J Am Chem Soc 127(10): 3531-44.
- Beers, J., D. M. Glerum and A. Tzagoloff (1997). "Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle." J Biol Chem 272(52): 33191-6.
- Belevich, I. and M. I. Verkhovskiy (2008). "Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase." Antioxid Redox Signal 10(1): 1-29.
- Bellingham, S. A., D. K. Lahiri, B. Maloney, S. La Fontaine, G. Multhaup and J. Camakaris (2004). "Copper depletion down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid-beta precursor protein gene." J Biol Chem 279(19): 20378-86.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne and S. Brunak (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." J Mol Biol 340(4): 783-95.
- Bisswanger, H. (1994). Enzymkinetik, Theorie und Methoden. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.

- Brenner, A. J. and E. D. Harris (1995). "A quantitative test for copper using bicinchoninic acid." Anal Biochem 226(1): 80-4.
- Carr, H. S., G. N. George and D. R. Winge (2002). "Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein." J Biol Chem 277(34): 31237-42.
- Carr, H. S., A. B. Maxfield, Y. C. Horng and D. R. Winge (2005). "Functional analysis of the domains in Cox11." J Biol Chem 280(24): 22664-9.
- Carr, H. S. and D. R. Winge (2003). "Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion." Acc Chem Res 36(5): 309-16.
- Castresana, J., M. Lübben, M. Saraste and D. G. Higgins (1994). "Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen." Embo J 13(11): 2516-25.
- Chen, P., I. Cabrito, J. J. Moura, I. Moura and E. I. Solomon (2002). "Spectroscopic and electronic structure studies of the  $\mu(4)$ -sulfide bridged tetranuclear Cu(Z) cluster in N(2)O reductase: molecular insight into the catalytic mechanism." J Am Chem Soc 124(35): 10497-507.
- Chinenov, Y. V. (2000). "Cytochrome c oxidase assembly factors with a thioredoxin fold are conserved among prokaryotes and eukaryotes." J Mol Med 78(5): 239-42.
- Cleveland, D. W., S. G. Fischer, M. W. Kirschner and U. K. Laemmli (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis." J Biol Chem 252(3): 1102-6.
- Culotta, V. C., M. Yang and T. V. O'Halloran (2006). "Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal." Biochim Biophys Acta 1763(7): 747-58.
- Dameron, C. T., D. R. Winge, G. N. George, M. Sansone, S. Hu and D. Hamer (1991). "A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A 88(14): 6127-31.
- Davidson, D. E. and B. C. Hill (2009). "Stability of oxidized, reduced and copper bound forms of Bacillus subtilis Sco." Biochim Biophys Acta 1794(2): 275-81.
- Davis, A. V. and T. V. O'Halloran (2008). "A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking." Nat Chem Biol 4(3): 148-51.
- Dürr, K. L., J. Koepke, P. Hellwig, H. Müller, H. Angerer, G. Peng, E. Olkhova, O. M. Richter, B. Ludwig and H. Michel (2008). "A D-pathway mutation decouples the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase by altering the side-chain orientation of a distant conserved glutamate." J Mol Biol 384(4): 865-77.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. The Proteomics Protocols Handbook. J. M. Walker, Humana Press: 571-607.
- Glerum, D. M., A. Shtanko and A. Tzagoloff (1996). "Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase." J Biol Chem 271(24): 14504-9.
- Glerum, D. M., A. Shtanko and A. Tzagoloff (1996). "SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem 271(34): 20531-5.
- Greiner, P. (2003). Heterologe Expression des *Paracoccus denitrificans* CtaG-Gens in *Escherichia coli*. Institut für Biochemie, Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Johann-Wolfgang-Goethe Universität. Diplom: 97.

- Hannappel, A. (2007). Biogenesis of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase Subunit I: A Cell-free Expression Approach. Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Johann-Wolfgang-Goethe Universität. Diplom: 101.
- Hannappel, A. (2007). Biogenesis of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase Subunit I: A Cell-free Expression Approach Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Goethe-Universität. Diplomarbeit: 101.
- Harrison, M. D., C. E. Jones and C. T. Dameron (1999). "Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties." J Biol Inorg Chem 4(2): 145-53.
- Herrmann, J. M. and S. Funes (2005). "Biogenesis of cytochrome oxidase - sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane." Gene 354: 43-52.
- Hiser, L., M. Di Valentin, A. G. Hamer and J. P. Hosler (2000). "Cox11p is required for stable formation of the Cu<sub>B</sub> and magnesium centers of cytochrome c oxidase." J Biol Chem 275(1): 619-23.
- Hornig, Y. C., P. A. Cobine, A. B. Maxfield, H. S. Carr and D. R. Winge (2004). "Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome c oxidase." J Biol Chem 279(34): 35334-40.
- Hornig, Y. C., S. C. Leary, P. A. Cobine, F. B. Young, G. N. George, E. A. Shoubridge and D. R. Winge (2005). "Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins." J Biol Chem 280(40): 34113-22.
- Hosler, J. P., S. Ferguson-Miller and D. A. Mills (2006). "Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes." Annu Rev Biochem 75: 165-87.
- Humphrey, W., A. Dalke and K. Schulten (1996). "VMD: visual molecular dynamics." J Mol Graph 14(1): 33-8, 27-8.
- Hussain, F., J. S. Olson and P. Wittung-Stafshede (2008). "Conserved residues modulate copper release in human copper chaperone Atox1." Proc Natl Acad Sci U S A 105(32): 11158-63.
- Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel (1995). "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Nature 376(6542): 660-9.
- Kaim, W. and B. Schwederski (2004). Bioanorganische Chemie - Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen. Wiesbaden, Teubner.
- Khalimonchuk, O., K. Ostermann and G. Rödel (2005). "Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu<sub>B</sub> site formation of cytochrome c oxidase." Curr Genet 47(4): 223-33.
- Khalimonchuk, O. and G. Rödel (2005). "Biogenesis of cytochrome c oxidase." Mitochondrion 5(6): 363-88.
- Kim, B. E., T. Nevitt and D. J. Thiele (2008). "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation." Nat Chem Biol 4(3): 176-85.
- Kuhn, A., R. Stuart, R. Henry and R. E. Dalbey (2003). "The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion?" Trends Cell Biol 13(10): 510-6.
- Lamb, A. L., A. S. Torres, T. V. O'Halloran and A. C. Rosenzweig (2001). "Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone." Nat Struct Biol 8(9): 751-5.
- Leary, S. C. and D. R. Winge (2007). "The Janus face of copper: its expanding roles in biology and the pathophysiology of disease. Meeting on Copper and Related Metals in Biology." EMBO Rep 8(3): 224-7.

- Legerski, R. J. and D. L. Robberson (1985). "Analysis and optimization of recombinant DNA joining reactions." J Mol Biol 181(2): 297-312.
- Lippard, S. J. and J. M. Berg (1995). Bioanorganische Chemie. Heidelberg, Spektrum.
- Lode, A., M. Kuschel, C. Paret and G. Rodel (2000). "Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p." FEBS Lett 485(1): 19-24.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-75.
- Malmstrom, B. G. and J. Leckner (1998). "The chemical biology of copper." Curr Opin Chem Biol 2(2): 286-92.
- Margraf, S. (2006). Etablierung eines bakteriellen in vitro Expressionssystems für Biogenesestudien. Institut für Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Johann-Wolfgang-Goethe Universität. Diplom: 105.
- Margraf, S. (2006). Etablierung eines bakteriellen in vitro Expressionssystems für Biogenesestudien. Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Goethe-Universität. Diplomarbeit: 105.
- Markwell, M. A., S. M. Haas, L. L. Bieber and N. E. Tolbert (1978). "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." Anal Biochem 87(1): 206-10.
- Martell, A. E. and R. M. Smith (1974). Critically selected stability constants. New York, Plenum Press. 1: xi-xii.
- Maxfield, A. B., D. N. Heaton and D. R. Winge (2004). "Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane." J Biol Chem 279(7): 5072-80.
- McEwen, J. E., C. Ko, B. Kloeckner-Gruissem and R. O. Poyton (1986). "Nuclear functions required for cytochrome c oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of mutants in 34 complementation groups." J Biol Chem 261(25): 11872-9.
- Melcher, K. (2000). "A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors." Anal Biochem 277(1): 109-20.
- Michel, H. (1998). "The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A 95(22): 12819-24.
- Miller, J. H. (1992). Section 24, Transformation. A short course in bacterial genetics: 24.2-24.6.
- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol 260(3): 289-98.
- Mohanty, A. K., C. R. Simmons and M. C. Wiener (2003). "Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents." Protein Expr Purif 27(1): 109-14.
- Nijtmans, L. G., J. W. Taanman, A. O. Muijsers, D. Speijer and C. Van den Bogert (1998). "Assembly of cytochrome c oxidase in cultured human cells." Eur J Biochem 254(2): 389-94.
- Nittis, T., G. N. George and D. R. Winge (2001). "Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein." J Biol Chem 276(45): 42520-6.
- Nose, Y., B. E. Kim and D. J. Thiele (2006). "Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function." Cell Metab 4(3): 235-44.
- Novagen (2006). pET System Manual, EMD Biosciences Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

- O'Halloran, T. V. and V. C. Culotta (2000). "Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions." J Biol Chem 275(33): 25057-60.
- Ohgami, R. S., D. R. Campagna, A. McDonald and M. D. Fleming (2006). "The Steap proteins are metalloreductases." Blood 108(4): 1388-94.
- Osterberg, R., R. Ligaarden and D. Persson (1979). "Copper(I) complexes of penicillamine and glutathione." J Inorg Biochem 10(4): 341-55.
- Palumaa, P., L. Kangur, A. Voronova and R. Sillard (2004). "Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase." Biochem J 382(Pt 1): 307-14.
- Pena, M. M., J. Lee and D. J. Thiele (1999). "A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution." J Nutr 129(7): 1251-60.
- Peterson, C. W., S. S. Narula and I. M. Armitage (1996). "3D solution structure of copper and silver-substituted yeast metallothioneins." FEBS Lett 379(1): 85-93.
- Pfützner, U. (2000). Protonentranslokation in der Häm  $aa_3$  Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* - eine Mutagenesstudie. Institut für Biochemie, Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Johann-Wolfgang-Goethe Universität. Dissertation: 157.
- Qiagen (2003). The QIAexpressionist. Qiagen Handbooks, Qiagen.
- Rasia, R. M., C. W. Bertocchini, D. Marsh, W. Hoyer, D. Cherny, M. Zweckstetter, C. Griesinger, T. M. Jovin and C. O. Fernandez (2005). "Structural characterization of copper(II) binding to alpha-synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 102(12): 4294-9.
- Richter, O. M. and B. Ludwig (2003). "Cytochrome c oxidase - structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine." Rev Physiol Biochem Pharmacol 147: 47-74.
- Rigby, K., P. A. Cobine, O. Khalimonchuk and D. R. Winge (2008). "Mapping the functional interaction of Sco1 and Cox2 in cytochrome oxidase biogenesis." J Biol Chem 283(22): 15015-22.
- Roberts, E., J. Eargle, D. Wright and Z. Luthey-Schulten (2006). "MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis." BMC Bioinformatics 7: 382.
- Rossi, L., M. F. Lombardo, M. R. Ciriolo and G. Rotilio (2004). "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance." Neurochem Res 29(3): 493-504.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Scatchard, G. (1949). "Attractions of proteins for small molecules and ions." Annals of the New York Academy of Sciences 51: 660-672.
- Schägger, H. (2003). Blue Native Electrophoresis, Elsevier.
- Schwarzenbach, G. and H. Flaschka (1965). Die komplexometrische Titration. Stuttgart, Enke.
- Steinrücke, P., E. Gerhus and B. Ludwig (1991). "*Paracoccus denitrificans* mutants deleted in the gene for subunit II of cytochrome c oxidase also lack subunit I." J Biol Chem 266(12): 7676-81.
- Stroh, A., O. Anderka, K. Pfeiffer, T. Yagi, M. Finel, B. Ludwig and H. Schägger (2004). "Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*." J Biol Chem 279(6): 5000-7.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res 22(22): 4673-80.
- Treiber, C., A. Simons and G. Multhaup (2006). "Effect of copper and manganese on the de novo generation of protease-resistant prion protein in yeast cells." Biochemistry 45(21): 6674-80.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science 272(5265): 1136-44.
- Turchin, A. and J. F. Lawler, Jr. (1999). "The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis." Biotechniques 26(4): 672-6.
- Tzagoloff, A., N. Capitanio, M. P. Nobrega and D. Gatti (1990). "Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of COX11, a homolog of the P. denitrificans protein encoded by ORF3." Embo J 9(9): 2759-64.
- van Dijk, A. D., S. Ciofi-Baffoni, L. Banci, I. Bertini, R. Boelens and A. M. Bonvin (2007). "Modeling protein-protein complexes involved in the cytochrome c oxidase copper-delivery pathway." J Proteome Res 6(4): 1530-9.
- Warburg, O. H. (1928). Über die katalytischen Wirkungen der lebenden Substanz. Berlin, Springer.
- Werner, C. (2005). Heterologe Expression und Aufreinigung der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* in *E. coli*. Molekulare Genetik. Frankfurt am Main, Goethe Universität. Diplomarbeit: 88.
- Wernimont, A. K., L. A. Yatsunyk and A. C. Rosenzweig (2004). "Binding of copper(I) by the Wilson disease protein and its copper chaperone." J Biol Chem 279(13): 12269-76.
- White, A. R., T. Du, K. M. Laughton, I. Volitakis, R. A. Sharples, M. E. Xilinas, D. E. Hoke, R. M. Holsinger, G. Evin, R. A. Cherny, A. F. Hill, K. J. Barnham, Q. X. Li, A. I. Bush and C. L. Masters (2006). "Degradation of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity." J Biol Chem 281(26): 17670-80.
- Wobruschek, P. (1994). "Use of total reflection X-ray fluorescence analysis in the life sciences." Biol Trace Elem Res 43-45: 65-71.
- Yatsunyk, L. A. and A. C. Rosenzweig (2007). "Cu(I) binding and transfer by the N terminus of the Wilson disease protein." J Biol Chem 282(12): 8622-31.
- Zee, J. M. and D. M. Glerum (2006). "Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast." Biochem Cell Biol 84(6): 859-69.



## 5. Curriculum vitae

Peter Greiner  
 Diplom-Biochemiker  
 Gartenstraße 16  
 65520 Bad Camberg  
 Deutschland  
 mobil +49-177-6999745  
 labor +49-69-798-29243  
 privat +49-6434-903000  
 fax +49-69-798-29244  
 greiner@em.uni-frankfurt.de



### **Persönliche Informationen**

---

Geboren	am 20.12.1978 in Würzburg
Nationalität	Deutsch
Familienstand	feste Beziehung/ein Sohn (geb. 2008)

### **Beruflicher Werdegang**

---

seit 01/2009	Graduate Development Trainee im Inhouse Consulting der <b>Merck KGaA</b> in Darmstadt.
--------------	--

### **Ausbildung**

---

11/2003-12/2008	<b>Promotion</b> bei Prof. Dr. Bernd Ludwig am Insitut für Biochemie der Goethe-Universität in Frankfurt am Main Projekt: „CtaG – Kupferchaperon und Assemblierungsfaktor für die Cytochrom c Oxidase in <i>Paracoccus denitrificans</i> ?“
10/1998 - 07/2003	<b>Studium der Biochemie</b> (Biochemie, Biophysik & Zellbiologie) an der Goethe-Universität in Frankfurt am Main Diplomarbeit: „Heterologe Expression des <i>Paracoccus denitrificans</i> ctaG-Gens in <i>E. coli</i> “ Abschluss: <b>Diplom-Biochemiker</b> <b>Note:</b> 1.0 mit Auszeichnung
10/2000 - 09/2002	Zweitstudium der <b>Betriebswirtschaftslehre</b> Fernuniversität Hagen
03/1996 - 07/1998	Georg-Büchner-Gymnasium, Bad Vilbel, <b>Abitur</b> Note: 1.7
08/1992 - 03/1996	Colegio Alemán, Cali, Kolumbien (Deutsche Auslandsschule vom Typ „ <b>spanischsprachige Begegnungsschule</b> “)
08/1989 - 06/1992	Georg-Büchner- <b>Gymnasium</b> , Bad Vilbel
08/1985 - 06/1989	<b>Grundschule</b> , Schöneck, Deutschland

### **Sprachkenntnisse & Auslandserfahrung**

---

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift
Spanisch	fließend in Wort und Schrift
1992 - 1996	Cali, Kolumbien Auslandsentsendung meines Vaters für die ehem. Hoechst AG
1981 - 1982	Houston, TX, USA (s.o.)

### **Industrieerfahrungen, Praktika & Forschungsaufenthalte**

---

2007	Forschungsaufenthalt am Leiden Institute of Chemistry Elektrochemische Messungen bei Prof. Gerard W. Canters August 2007 Leiden, Niederlande
2006	Praktikum im <b>Intellectual Property Management</b> eines großen Spezialchemie Unternehmens Januar-März 2006 Degussa AG, Hanau (heute Evonik)
2004	<i>summer school</i> des Center for Membrane Proteomics (CMP) Workshop „blue native- and 2D-electrophoresis“, H. Schägger März 2004, Frankfurt
2002	Praktikum am Institut für Zellbiologie und Neurowissenschaft der Johann Wolfgang Goethe-Universität Februar-April 2002 Biozentrum, Frankfurt
2001-2003	Im Rahmen unseres Studiums wurden etliche Praktika an verschiedenen universitätseigenen und -fremden Instituten durchgeführt ( <b>Max-Planck-Institut</b> (MPI) für Biophysik, <b>Paul-Ehrlich- Institut</b> (PEI), <b>Georg-Speyer-Haus</b> (GSH))
2001	Arbeit im <b>Logistikbereich</b> eines Elektronikkonzerns Juni/Juli 2001 Brother Inc., Bad Vilbel
1996 - 2001	Nebenerwerbstätigkeit als freier Mitarbeiter in der <b>Marktforschung</b> Durchführung und in Einzelfällen Leitung von Befragungen zu Kundenbedürfnissen/Produktakzeptanz im Automotive- und Einzelhandelssektor Infratest Burke, Frankfurt (heute TNS Infratest)

---

**Publikationen**

---

**P. Greiner**, A. Hannappel, C. Werner and B. Ludwig. "Biogenesis of cytochrome c oxidase – *in vitro* approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 2008

**P. Greiner**, A. Hannappel, F. A. Bundschuh and B. Ludwig. "Assembly of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*". Plenary lecture, *FASEB Summer research conference* 2007, Tucson, Arizona, USA


A. Hannappel, S. Margraf, **P. Greiner** and B. Ludwig. "Biogenesis of cytochrome c oxidase subunit I: a cell-free expression approach". Poster, *FASEB Summer research conference* 2007, Tucson, Arizona, USA

**P. Greiner**, C. Werner, S. Margraf, O.M.H. Richter and B. Ludwig. "Biogenesis of the Cu<sub>B</sub>-center in cytochrome c oxidase". Poster. *European Bioinorganic Chemistry conference* (Eurobic8) 2006, Aveiro, Portugal

**P. Greiner**, O.M.H. Richter and B. Ludwig. „CtaG – copper chaperone and assembly factor for the Cu<sub>B</sub>-center of the *aa*<sub>3</sub>-type cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*?". Poster. *European Bioenergetics Conference (EBEC)* 2004, Pisa, Italy

**P. Greiner**. "Heterologe Expression des *Paracoccus denitrificans* ctaG-Gens in *Escherichia coli*". Diplomarbeit. Institut für Biochemie, Goethe-Universität, Frankfurt, 2003.

**P. Greiner**, O.M.H. Richter and B. Ludwig. "Heterologous Expression of the *Paracoccus denitrificans* ctaG-gene in *E. coli*". Poster. *International Symposium on Copper in Biology* 2003, Konstanz, Germany



Frankfurt am Main, den 4. April 2009

## 6. Danksagung

Mein Dank gilt:

An erster Stelle Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen und für die ausgezeichnete Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Herbert Zimmermann für die Begutachtung der Arbeit.

Der gesamten Gruppe "Molekulare Genetik" für das sehr angenehme und produktive Arbeitsklima, sowie für eine unvergessliche Zeit.

Hans-Werner E. Müller für die exzellente technische Unterstützung und für sein ansteckendes Lachen.

Claudia Rittmeyer und Prof. Dr. Kolbesen, für die TXRF-Messungen. Dr. Yann Lahaye und Dr. Michael Seitz für die großartige Unterstützung bei den ICP-MS Messungen.

Meinen Diplomanden Carolin Werner, Stefanie Margraf und Achim Hannappel für die hervorragende Zusammenarbeit und insbesondere Achim dafür, dass er meine Nachfolge angetreten hat.

Meiner Familie in Schöneck und Bad Camberg danke ich für alles, was sie mir in meinem bisherigen Leben ermöglicht, beigebracht und geschenkt hat.

Imke und Jacob für die unendliche Geduld und Unterstützung und für das größte Geschenk überhaupt: Meine über alles geliebte Chaos-Familie.