

# **Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* und *Thermus thermophilus***

Funktionelle und kinetische Charakterisierung  
der Interaktionen anhand von löslichen Fragmenten

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**



**vorgelegt dem Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main**

**von Julia Janzon  
aus Hamburg**

**Frankfurt am Main 2006**

**(D30)**



vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Erstgutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Zweitgutachter: Prof. Dr. E. Bamberg

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





meiner Familie



# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Atmungskette</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Der <i>bc</i><sub>1</sub>-Komplex</b>	<b>2</b>
<b>1.3 <i>Paracoccus denitrificans</i></b>	<b>4</b>
1.3.1 Die Atmungskette von <i>P. denitrificans</i>	5
1.3.2 Der <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex aus <i>P. denitrificans</i>	6
1.3.3 Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> aus <i>P. denitrificans</i>	7
1.3.4 Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub> aus <i>P. denitrificans</i>	8
<b>1.4 <i>Thermus thermophilus</i></b>	<b>10</b>
1.4.1 Die Atmungskette von <i>T. thermophilus</i>	11
1.4.2 Die Cytochrom <i>caa</i> <sub>3</sub> -Oxidase aus <i>T. thermophilus</i>	13
<b>1.5 Transiente Elektronentransferkomplexe</b>	<b>14</b>
1.5.1 Interaktion zwischen Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> und Cytochrom <i>c</i> in Hefe	15
1.5.2 Elektronentransfer löslicher Redoxfragmente aus <i>P. denitrificans</i>	16
1.5.2.1 ET zwischen Cytochrom <i>c</i> <sub>552F</sub> und dem Cu <sub>A</sub> -Fragment	17
1.5.2.2 ET zwischen Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> und seinen physiologischen Redoxpartnern	18
1.5.3 Elektronentransfer löslicher Fragmente aus <i>T. thermophilus</i>	18
1.5.3.1 ET zwischen Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub> und dem Cu <sub>A</sub> -Fragment	18
1.5.3.2 ET zwischen Cytochrom <i>c</i> <sub>bc</sub> und Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub>	19
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>21</b>
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Fluorophore	22
2.1.3 Lösungen	22
2.1.4 Chromatographiematerialien	22
2.1.5 Größenstandards und Kits	22
2.1.5.1 Größenstandards	22
2.1.5.2 Kits	22
2.1.6 Proteine und Enzyme	22
2.1.6.1 DNA modifizierende Enzyme	23
2.1.6.2 Antikörper	23
2.1.6.3 Sonstige Proteine	23
2.1.7 Antibiotika	23

---

2.1.8 Primer	23
2.1.8.1 Mutagenese-Primer Cytochrom $c_{1CF}$ aus <i>P. denitrificans</i>	24
2.1.8.2 Mutagenese-Primer Cytochrom $c_{552F}$ aus <i>P. denitrificans</i>	24
2.1.8.3 Sequenzier-Primer	24
2.1.8.4 Primer zur Klonierung des Cytochrom $c_{caa3}$ -Fragmentes	25
2.1.8.5 Primer zur Einführung eines His <sub>10</sub> -tags in den $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex	25
2.1.9 Plasmide	25
2.1.9.1 Bezogene Plasmide	25
2.1.9.2 Hergestellte Plasmide	26
2.1.10 Mikroorganismen und Phagen	26
2.1.10.1 <i>Escherichia coli</i> K12	26
2.1.10.2 <i>Paracoccus denitrificans</i>	26
2.1.10.3 Hergestellte Expressionsstämme	27
2.1.10.4 Bakteriophagen	27
2.1.11 Nährmedien	27
2.1.12 Anzucht und Lagerung	28
2.1.12.1 <i>Escherichia coli</i>	28
2.1.12.2 <i>Paracoccus denitrificans</i>	28
2.1.13 Programme und Datenbanken	28
<b>2.2 Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>29</b>
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)	29
2.2.2 Isolierung genomischer DNA	29
2.2.3 Restriktion von DNA	30
2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	30
2.2.5 Gelextraktion	31
2.2.6 Ligation	31
2.2.7 Herstellung kompetenter Zellen	31
2.2.7.1 Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter Zellen	31
2.2.7.2 Herstellung RbCl-kompetenter Zellen	32
2.2.8 Transformation	32
2.2.9 Phosphorylierung von Oligonukleotiden	32
2.2.10 Gerichtete Mutagenese	33
2.2.10.1 <i>Altered-sites</i> -Mutagenese	33
2.2.10.2 <i>QuikChange</i> -Mutagenese	34
2.2.11 DNA-Sequenzierung	35
2.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.13 Triparentales Mating (Konjugation)	36
2.2.14 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	37
2.2.14.1 Testexpression des Cytochrom $c_{1CF}$ aus <i>P. denitrificans</i>	38
2.2.14.2 Testexpression des Cytochrom $c_{552F}$ aus <i>P. denitrificans</i>	38

---

2.2.14.3 Testexpression des Cytochrom $c_{caa3}$ aus <i>T. thermophilus</i>	38
2.2.14.4 Expression des <i>P. d.</i> Cytochrom $c_{1CF}$ in großem Maßstab	39
2.2.14.5 Expression des <i>P. d.</i> Cytochrom $c_{552F}$ in großem Maßstab	39
2.2.14.6 Expression des <i>T. th.</i> Cytochrom $c_{caa3}$ in großem Maßstab	39
2.2.15 Homologe Expression in <i>Paracoccus denitrificans</i>	39
<b>2.3 Proteinbiochemische Arbeiten</b>	<b>40</b>
2.3.1 Periplasmapräparation	40
2.3.2 Membranpräparation	40
2.3.2.1 Membranpräparation in analytischem Maßstab	40
2.3.2.2 Membranpräparation in großem Maßstab	41
2.3.3 Membransolubilisierung	42
2.3.4 Säulenchromatographie	42
2.3.4.1 Aufreinigung des Cytochrom $c_{1CF}$ aus <i>P. denitrificans</i>	42
2.3.4.2 Aufreinigung des Cytochrom $c_{552F}$ aus <i>P. denitrificans</i>	43
2.3.4.3 Aufreinigung des Cytochrom $c_{caa3}$ aus <i>T. thermophilus</i>	43
2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	44
2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	44
2.3.6.1 Laemmli-PAGE	44
2.3.6.2 Schägger-PAGE	45
2.3.6.3 Ahn-PAGE	46
2.3.7 Nativ-Gelelektrophorese nach Maurer	46
2.3.8 Gelfärbung	47
2.3.8.1 Coomassie-Färbung	47
2.3.8.2 Silberfärbung	47
2.3.9 Hämfärbung	48
2.3.10 Westernblot	48
<b>2.4 Biophysikalische Methoden</b>	<b>49</b>
2.4.1 Redoxdifferenzspektren	49
2.4.2 Pyridinhämochromspektren	49
2.4.3 Messungen von Enzymaktivitäten	50
2.4.4 Stopped-Flow <i>pre-steady state</i> -Kinetiken	50
2.4.4.1 Probenvorbereitung	50
2.4.4.2 Doppelsektor-Differenzspektren	51
2.4.4.3 Reduktion mit Ascorbat	51
2.4.4.4 Messungen der Ionenstärkeabhängigkeit	52
2.4.4.5 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten	52
2.4.5 Laserflash <i>pre-steady state</i> -Kinetiken	53
2.4.5.1 Bestimmung der isosbestischen Wellenlängen	53
2.4.5.2 Laserflash-Experimente	54
2.4.5.3 Kinetisches Differenzspektrum	55

2.4.5.4 Messung der Ionenstärkeabhängigkeit	55
2.4.5.5 Messungen der Temperaturabhängigkeit	55
2.4.6 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET)	56
2.4.6.1 SH-Assay	56
2.4.6.2 Fluorophor-Kopplung	57
2.4.6.3 Bestimmung der Quantenausbeute	58
2.4.6.4 Bestimmung des Überlappungsintegrals	59
2.4.6.5 FRET-Messungen	59
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Cytochrom <math>c_{1CF}</math> aus <i>P. denitrificans</i></b>	<b>61</b>
3.1.1 Optimierung der Expression und Aufreinigung	62
3.1.2 Biochemische Charakterisierung	63
3.1.3 Spektroskopische Charakterisierung	64
3.1.4 Cytochrom $c_{1CF}$ -Abbaufragment	66
3.1.4.1 MALDI-MS	67
3.1.4.2 N-terminale Sequenzierung	68
<b>3.2 Cytochrom <math>c_{1CF}</math>-Interaktionsmutanten</b>	<b>68</b>
3.2.1 Konstruktion der Interaktionsmutanten	69
3.2.1.1 Sequenzalignment	70
3.2.1.2 Strukturalignments	72
3.2.2 Mutagenese	75
3.2.3 Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung	76
3.2.4 Spektroskopische Charakterisierung	76
<b>3.3 Cysteinmutanten des <math>c_{1CF}</math> und <math>c_{552F}</math></b>	<b>78</b>
3.3.1 Konstruktion der Cysteinmutanten	78
3.3.2 Herstellung und biochemische Charakterisierung	80
3.3.3 Spektroskopische Charakterisierung	81
3.3.4 SH-Assays (Fluorescein-5-maleimid)	83
3.3.5 Aktivitätstest	85
<b>3.4 Das Cytochrom <math>c_{caa3}</math>-Fragment aus <i>T. thermophilus</i></b>	<b>86</b>
3.4.1 Klonierung	86
3.4.2 Heterologe Expression und Aufreinigung	87
3.4.3 Biochemische Charakterisierung	88
3.4.4 Spektroskopische Charakterisierung	88
3.4.5 MALDI-MS	89
<b>3.5 Redoxpotentiale</b>	<b>90</b>
<b>3.6 Stopped-Flow-Kinetiken im <i>pre-steady state</i>-Bereich</b>	<b>91</b>
3.6.1 Doppelsektorküvetten-Differenzspektren	92

Inhalt	V
3.6.2 Reduktion mit Ascorbat	94
3.6.3 Etablierung des Mess- und <i>non-PFO</i> -Auswertungsprotokolls	94
3.6.4 Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen Cytochrom $c_{1CF}$ und $c_{552F}$	96
3.6.5 Gleichgewichtskonstante $K_{eq}$	105
3.6.6 Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen $c_{caa3}$ und $c_{bc}$ oder $c_{552}$	108
3.6.6.1 ET zwischen Cytochrom $c_{caa3}$ und $c_{bc}$	108
3.6.6.2 ET zwischen Cytochrom $c_{caa3}$ und $c_{552}$	109
<b>3.7 Laserflash-Kinetiken im <i>pre-steady state</i>-Bereich</b>	<b>110</b>
3.7.1 Ruthenium-Kopplung von $c_{552F}$ -N23C	110
3.7.2 Bestimmung der isosbestischen Wellenlängen	111
3.7.3 Mediatoren	112
3.7.4 Detektionswellenlängen und kinetisches Differenzspektrum	115
3.7.5 Standard-Flashprotokoll und Auswertung	116
3.7.6 Ionenstärkeabhängigkeiten	118
3.7.6.1 Ionenstärkeabhängigkeit der $c_{1CF}$ -WT-Reaktion	118
3.7.6.2 Ionenstärkeabhängigkeit der Interaktionsmutanten	120
3.7.7 Ionenstärkeabhängigkeit der Cysteinmutanten	124
3.7.8 Temperaturabhängigkeit	126
<b>3.8 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer</b>	<b>127</b>
3.8.1 Auswahl und Charakterisierung der Fluorophore	127
3.8.2 Fluorophor-Kopplung	129
3.8.3 Bestimmung der Quantenausbeute	131
3.8.4 Bestimmung des Überlappungsintegrals	133
3.8.5 FRET-Messungen	134
3.8.6 Dockingberechnungen und ET-Komplex	136
<b>3.9 Der <math>bc_{1\Delta ac}</math>- Komplex aus <i>P. denitrificans</i></b>	<b>137</b>
3.9.1 Klonierungen	137
3.9.2 Einführen eines His <sub>10</sub> -tags	140
3.9.3 Homologe Expression und erste Charakterisierung	141
3.9.4 Ausblick	141
<b>4 Diskussion</b>	<b>143</b>
<b>4.1 Lösliche Redoxfragmente aus <i>P. denitrificans</i> und <i>T. thermophilus</i></b>	<b>143</b>
4.1.1 Lösliche Redoxfragmente als Modellsystem für ET-Prozesse	143
4.1.2 Herstellung löslicher c-Typ Cytochrome	144
4.1.3 Cytochrom $c_1$ core-Fragment und Interaktionsmutanten	145
4.1.3.1 Cytochrom $c_{1CF}$ WT	145
4.1.3.2 Cytochrom $c_{1CF}$ Abbaufragment	146
4.1.3.3 Cytochrom $c_{1CF}$ Interaktionsmutanten	147

---

4.1.4 Cysteinmutanten des Cytochrom $c_{1CF}$ und des $c_{552F}$	148
4.1.5 Cytochrom $c_{caa3}$ aus <i>T. thermophilus</i>	150
<b>4.2 Kinetische Untersuchungen des ET zwischen Komplex III und IV der Atmungskette von <i>P. denitrificans</i> und <i>T. thermophilus</i> anhand löslicher Redoxfragmente</b>	<b>152</b>
4.2.1 ET-Untersuchungen mittels Stopped-Flow-Spektroskopie	153
4.2.2 ET-Untersuchungen mittels Laserflash-Spektroskopie	154
4.2.3 ET zwischen Cytochrom $c_{1CF}$ WT und $c_{552F}$	156
4.2.4 Charakterisierung des ET durch $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten	160
4.2.4.1 Region I: E243K, V244Q/T und A247N	161
4.2.4.2 Region II: A314S, K315E/T und G319A	165
4.2.4.3 Region III: S378A und Q381V	169
4.2.4.4 ET-Interaktionen zwischen Cytochrom $c_{1CF}$ und $c_{552F}$	171
4.2.5 ET zwischen $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten und Ru <sub>z</sub> -H39C-Cc	172
4.2.6 ET zwischen $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten und $c_{552F}$	173
4.2.7 ET zwischen Cytochrom $c_{caa3}$ und potentiellen Redoxpartnern	175
4.2.8 Temperaturabhängigkeit und Vergleichbarkeit der beiden Methoden	178
<b>4.3 Charakterisierung der ET-Komplexbildung von <math>c_{1CF}</math> und <math>c_{552F}</math></b>	<b>179</b>
4.3.1 Cysteinmutanten	180
4.3.2 Fluorophore	181
4.3.3 FRET-Parameter	182
4.3.4 FRET-Distanzen und Docking	183
<b>4.4 Der <math>bc_{1\Delta ac}</math>- Komplex und funktionelle ET-Untersuchungen</b>	<b>185</b>
<b>4.5 Generelle Aspekte des ET von <i>P. denitrificans</i> und <i>T. thermophilus</i></b>	<b>186</b>
4.5.1 Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV in <i>P. denitrificans</i>	186
4.5.2 Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV in <i>T. thermophilus</i>	188
4.5.3 Methodische Aspekte und Ausblick	189
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>191</b>
<b>6 Summary</b>	<b>193</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>197</b>
<b>8 Abkürzungen</b>	<b>209</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>212</b>
<b>10 Danksagung</b>	<b>214</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>217</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Atmungskette

Adenosintriphosphat (ATP) ist das universelle Energie-Äquivalent der Zelle. Durch die Hydrolyse von ATP werden energetisch ungünstige Reaktionen angetrieben. ATP wird durch die ATP-Synthase aus ADP und anorganischem Phosphat in einem Prozess gebildet, der als oxidative Phosphorylierung bezeichnet wird. Hierbei wird die in den Reduktionsäquivalenten  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  gespeicherte Energie über gekoppelte Redoxreaktionen in einen elektrochemischen Protonengradienten umgewandelt (chemiosmotische Kopplung (Mitchell 1961)), dessen Energie wiederum genutzt wird, um die ATP-Synthase anzutreiben. Die Reduktionsäquivalente  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  entstehen bei der oxidativen Verstoffwechslung der Nahrung während der Glykolyse, dem Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, wobei die bei diesen Prozessen entstehende Energie in Form von Elektronen und Protonen in diesen Reduktionsäquivalenten gespeichert wird. Über die Atmungskette (siehe Abbildung 1.1), einer Redoxkette von vier hintereinandergeschalteten Transmembran-Proteinkomplexen und zwei beweglichen Elektronen-Carriern, die den Transfer zwischen den Redoxkomplexen vermitteln, werden die Elektronen entlang eines elektrochemischen Gefälles auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor unter Entstehung von Wasser transferiert. Bei den Redoxprozessen der Komplexe I, III und IV wird die frei werdende Energie ( $\Delta E = 1,13 \text{ V}$ ) der gekoppelten Elektronentransferprozesse genutzt, um Protonen über die Membran zu pumpen und so den Protonengradienten über der Membran aufzubauen. Die Energie dieses Gradienten wird von der ATP-Synthase (Komplex V) genutzt, um ADP und  $\text{P}_i$  zu ATP zu phosphorylieren.

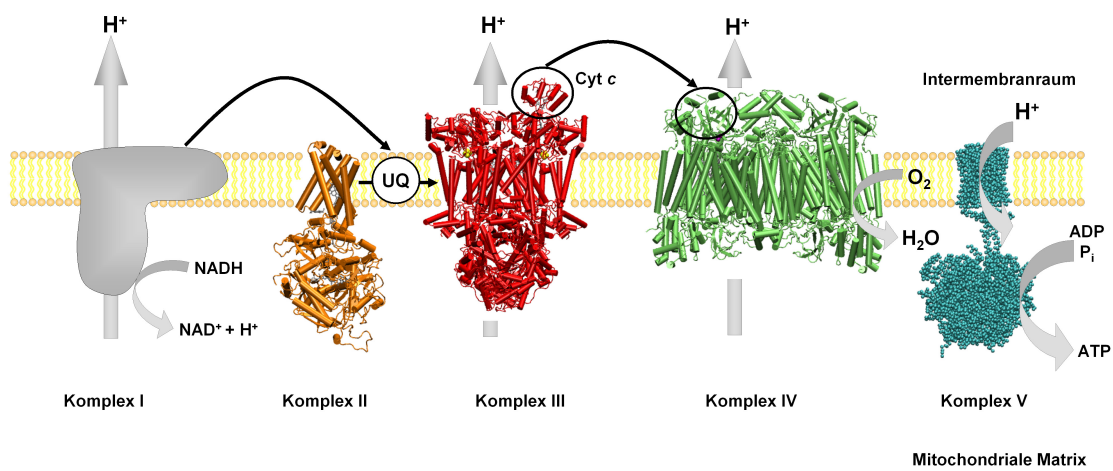
Die Proteine der Atmungskette sind bei Eukaryonten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, während sie sich bei Prokaryonten in der Cytoplasmamembran befinden. Sie enthalten als aktive Redoxkomponenten Flavinmononukleotide (FMN), Flavinadenindinukleotide (FAD), Eisen-Schwefel-Cluster (FeS), Hämgruppen und Kupferzentren, durch die die Redoxreaktionen vermittelt werden.

NADH wird von Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase) oxidiert, wobei die Elektronen über FMN und eine Reihe von FeS-Clustern auf das in der Membran lösliche Ubichinon übertragen werden. Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) ist ein Protein des Citratzyklus und überträgt die Elektronen der Oxidation von Fumarat zu Succinat auf ein internes FAD und nachfolgend ebenfalls auf Ubichinon.

Der in den Membranen gelöste Elektronencarrier Ubichinon (UQ) wird durch Komplex I und Komplex II somit zu Ubichinol ( $\text{UQH}_2$ ) reduziert. UQ und  $\text{UQH}_2$  bilden

zusammen den Chinonpool in der Membran und vermitteln durch Diffusion den Elektronentransfer zwischen Komplex I bzw. II und Komplex III.

Komplex III ( $bc_1$ -Komplex; Ubichinol: Cytochrom *c*-Oxidoreduktase) oxidiert UQH<sub>2</sub> über den sogenannten Q-Zyklus (siehe Abschnitt 1.2) wieder zu UQ, das in den Chinonpool eingeht und erneut von Komplex I und II reduziert werden kann. Die Elektronen werden vom  $bc_1$ -Komplex auf ein lösliches Cytochrom *c* übertragen, das als Elektronenshuttle zwischen Komplex III und Komplex IV, der Cytochrom *c*-Oxidase, fungiert. Die Cytochrom *c*-Oxidase katalysiert über Hämgruppen und Cu-Zentren den terminalen Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff, wobei Wasser entsteht.



**Abbildung 1.1: Die mitochondriale Atmungskette**

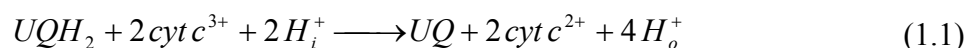
Elektronen werden über Komplex I (grau) und Komplex II (orange) in den Chinonpool (UQ) überführt und durch den Q-Zyklus über den  $bc_1$ -Komplex (Komplex III, rot) auf das lösliche Cytochrom *c* (rot, eingekreist) übertragen. Dieses überführt die Elektronen zu Komplex IV, der Cytochrom *c*-Oxidase (grün), die unter Sauerstoffverbrauch Wasser bildet. Der Elektronentransport ist über die Komplexe I, III und IV an einen Protonentranslokation über die Membran gekoppelt, die zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten führt. Dieser Gradient wird durch Komplex V (ATP-Synthase, blau) genutzt, um aus ADP und Phosphat ATP zu synthetisieren. Es wurden folgende pdb-Strukturen verwendet: 1ZOY, 1KY0, 1OCR und 1QO1; Komplex I ist schematisch dargestellt, da es bislang keine hochaufgelöste Struktur gibt.

## 1.2 Der $bc_1$ -Komplex

Der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex gehört zur Familie der Cytochrom *bc*-Komplexe, die sowohl an der zellulären Atmung als auch an der Photosynthese beteiligt sind (Berry, Guergova-Kuras *et al.* 2000; Breyton 2000). Prokaryontische  $bc_1$ -Komplexe bestehen lediglich aus den drei essentiellen, katalytischen Untereinheiten (UE) (Gabellini, Bowyer *et al.* 1982; Gabellini and Sebald 1986; Kurowski and Ludwig 1987) während eukaryontische  $bc_1$ -Komplexe bis zu 8 zusätzliche Untereinheiten aufweisen können, denen Aufgaben der Stabilität, Komplex-Assemblierung oder Regulation zukommen. Dies wurde unter anderem durch die Lösung der Kristallstrukturen diverser pro- und eukaryontischer  $bc_1$ -Komplexe bestätigt (Yu, Xia *et al.* 1996; Xia, Yu *et al.* 1997; Iwata, Lee *et al.* 1998; Berry, Guergova-Kuras *et al.* 2000; Hunte, Koepke *et al.* 2000). Zu den katalytischen Untereinheiten gehören Cytochrom *b*, das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (ISP), und Cytochrom *c*<sub>1</sub>. Sie tragen die katalytischen Redoxzentren, die den

Elektronentransfer von Ubichinol auf Cytochrom *c* vermitteln: Cytochrom *b* bildet das Zentrum des  $bc_1$ -Komplexes und ist mit acht Transmembranhelices (TMH) in der Membran verankert. Es besitzt zwei *b*-Typ Hämgruppen, die sich durch ihre Redoxpotentiale unterscheiden und dementsprechend mit Häm  $b_L$  und Häm  $b_H$  (für *low* und *high potential*) bezeichnet werden. Das ISP ist mit einer TMH in der Membran und innerhalb des  $bc_1$ -Komplexes verankert und trägt als redoxaktive Gruppe ein FeS-Cluster. Cytochrom  $c_1$  ist ebenfalls mit einer TMH in der Membran lokalisiert und besitzt eine cytosolische, lösliche Kopfgruppe, die ein kovalent gebundenes *c*-Typ Häm trägt. Die in Eukaryonten zusätzlich vorhandenen Untereinheiten sind den katalytischen in der Peripherie angelagert und teilweise ebenfalls über TMH in der Membran verankert. Erwähnenswert unter diesen zusätzlichen Untereinheiten ist die Untereinheit 6 (QCR6 im *S. cerevisiae*  $bc_1$ -Komplex) bzw. Untereinheit 8 im Komplex aus Rinderherzmitochondrien (das sogenannte *hinge*-Protein), die als kleine, saure Untereinheit mit der löslichen Kopfdomäne des Cytochrom  $c_1$  assoziiert ist und unterstützend an der Wechselwirkung des Cytochrom  $c_1$  zum Cytochrom *c* beteiligt zu sein scheint (Schmitt and Trumpower 1990; Nakai, Endo *et al.* 1993). Die Strukturen der  $bc_1$ -Komplexe zeigen, dass die funktionelle Einheit ein Homodimer ist, in dem das Rieske-ISP des einen Monomers mit Cytochrom  $c_1$  des anderen in Wechselwirkung tritt. Des weiteren konnte aus Vergleichen der Röntgenstrukturen geschlossen werden, dass die extrinsische Kopfgruppe des ISP, die das FeS-Cluster trägt, beim Elektronentransfer vom Ubichinol auf das Cytochrom  $c_1$  eine relativ große Bewegung durchführt (Zhang, Huang *et al.* 1998), die essentiell für die Katalyse der Reaktion ist (Crofts, Hong *et al.* 1999; Tian, White *et al.* 1999; Darrouzet, Valkova-Valchanova *et al.* 2000; Nett, Hunte *et al.* 2000; Xiao, Yu *et al.* 2000).

Der  $bc_1$ -Komplex oxidiert Ubichinol zu Ubichinon und überträgt Elektronen auf Cytochrom *c*, wodurch dieses reduziert wird. Die Nettoreaktion des  $bc_1$ -Komplex lautet:



$UQH_2/UQ$  = Ubichinol/Ubichinon

$\text{cyt } c^{3+}/c^{2+}$  = Ferri-/Ferrocytochrom *c*

$H_i^+/H_o^+$  = Protonen der Matrix/Protonen des Intermembranraumes

Die Elektronentransferreaktion ist mit einer Protonentranslokation über die Membran durch den sogenannten Q-Zyklus (Mitchell 1975; Mitchell 1976; Crofts and Meinhardt 1982; Gutierrez-Cirlos and Trumpower 2002; Zu, Couture *et al.* 2003; Osyczka, Moser *et al.* 2005) verknüpft. Der Q-Zyklus zeichnet sich durch zwei unterschiedliche aktive Zentren für die Ubichinol-Oxidation ( $Q_o$ -Zentrum) und die Ubichinon-Reduktion ( $Q_i$ -Zentrum) sowie durch eine Gabelung der Elektronentransferprozesse in einen Hochpotential- und einen Niedrigpotentialweg aus. Während der Ubichinol-Oxidation am  $Q_o$ -Zentrum werden Protonen in den Intermembranraum abgegeben, während der Ubichinon-Reduktion am  $Q_i$ -Zentrum werden Protonen aus dem Matrixraum aufgenommen. So trägt der  $bc_1$ -Komplex zum Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten über der Membran bei. Wird Ubichinol am  $Q_o$ -Zentrum oxidiert, wird ein Elektron über das Rieske-ISP an Cytochrom  $c_1$  und von dort weiter an das Cytochrom *c* übertragen (Hochpotentialweg). Das zweite Elektron wird über Häm  $b_L$

und Häm  $b_H$  zum  $Q_i$ -Zentrum transferiert und dort zur Reduktion von Ubichinon zum Semichinonradikal (de Vries, Berden *et al.* 1980) eingesetzt. Eine zweite Runde der Ubichinol-Oxidation am  $Q_o$ -Zentrum liefert dann ein zweites Elektron über den Niedrigpotentialweg zur Reduktion des Semichinonradikals zum Ubichinol (Mitchell 1975; Mitchell 1976; Brandt and Trumpower 1994). Für den Ablauf des Q-Zyklus werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, die sich unter anderem in der Besetzung des  $Q_o$ -Zentrums durch ein oder zwei Ubichinole (Ding, Robertson *et al.* 1992; Brandt 1998; Bartoschek, Johansson *et al.* 2001) oder der Anwesenheit eines stabilen Semichinonradikals im  $Q_i$ -Zentrum unterscheiden (Link 1997; Crofts and Berry 1998; Hong, Ugulava *et al.* 1999; Palsdottir, Lojero *et al.* 2003; Mulkidjanian 2005).

Durch einen Cokristall des  $bc_1$ -Komplexes (QCR) aus Hefe mit seinem gebundenen Substrat Cytochrom  $c$  (CYC) (Hunte, Solmaz *et al.* 2002; Lange and Hunte 2002) konnten Einblicke in die direkte Wechselwirkung zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c$  gewonnen werden. Obwohl die Identifikation von sauren Aminosäureresten (Cytochrom  $c_1$ ) und positiv geladenen Lysinen (Cytochrom  $c$ ), die die Hämspalten umgeben, auf eine elektrostatisch getriebene Komplexbildung schließen lassen (Rieder and Bosshard 1980; Smith, Ahmed *et al.* 1981; Broger, Salardi *et al.* 1983; Yu, Steidl *et al.* 1983; Nakai, Endo *et al.* 1993; Tian, Sadoski *et al.* 2000), zeigt der Cokristall, dass die direkten Wechselwirkungen hauptsächlich durch hydrophobe Kontakte und eine Kation- $\pi$ -Interaktion vermittelt werden ((Lange and Hunte 2002); Details siehe Abschnitt 1.5.1). Zusätzlich weist der Co-Komplex ein weiteres besonderes Merkmal auf: Obwohl der Komplex ein Homodimer ist und zwei identische Cytochrom  $c$ -Bindungsstellen aufweist, die nicht durch Kristallkontakte sterisch blockiert werden, ist lediglich an eine dieser Bindungsstellen das Substrat Cytochrom  $c$  gebunden. Diese Cytochrom  $c$ -Bindung korreliert mit einem besetzten  $Q_i$ -Zentrum im selben Monomer, wohingegen im zweiten Monomer sowohl die Cytochrom  $c$ -Bindungsstelle als auch das  $Q_i$ -Zentrum unbesetzt sind. Dies könnte durch weitreichende Interaktionen des Hoch- und Niedrigpotentialweges vermittelt werden und legt einen *half of the sites*-Mechanismus (Gutierrez-Cirlos and Trumpower 2002) nahe, bei dem jeweils nur ein Monomer des dimeren Komplexes aktiv ist.

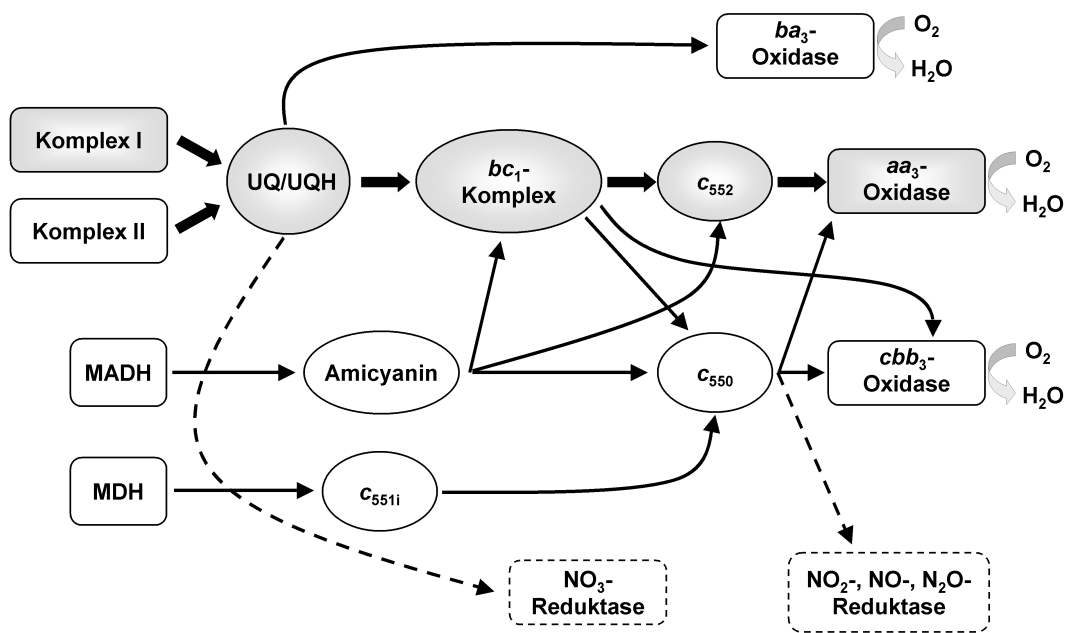
### 1.3 *Paracoccus denitrificans*

*P. denitrificans* ist ein Gram-negatives, kokkoides, unbewegliches Bodenbakterium, das aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen der  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet wird (Woese 1987). Nach der Endosymbiontentheorie (Margulis 1970) wird ein Vertreter dieser Untergruppe als Vorfahre der heutigen Mitochondrien in Eukaryontenzellen diskutiert (Yang, Oyaizu *et al.* 1985) und *P. denitrificans* dafür in Betracht gezogen (John and Whatley 1975; John and Whatley 1975). Unter aeroben Anzuchtbedingungen bildet *Paracoccus* eine Atmungskette aus, die der mitochondrialen Atmungskette sehr ähnlich ist, mit Homologen der Komplexe I, III und IV. Zwar ist der Aufbau dieser prokaryontischen Redoxkomplexe wesentlich einfacher als der der mitochondrialen Komplexe, die essentiellen katalytischen, Redoxcofaktor-tragenden Untereinheiten finden sich jedoch komplett wieder und weisen eine hohe

Sequenzhomologie auf. Wegen der ausgeprägten metabolischen Flexibilität (siehe Abschnitt 1.3.1), der einfachen mikrobiologischen Handhabung und genetischen Manipulation im Vergleich zu eukaryontischen Systemen und aufgrund der Homologie seiner aeroben Atmungskette zur mitochondrialen, kommt *P. denitrificans* als Modellsystem zur Untersuchung von Atmungskettenenzymen große Bedeutung zu.

### 1.3.1 Die Atmungskette von *P. denitrificans*

*P. denitrificans* als unbewegliches Bodenbakterium ist darauf angewiesen, sich schnell an die gegebenen Umweltbedingungen anpassen zu können. Dies wird mit einer weitverzweigten Atmungskette durch die Verwendung verschiedener Elektronendonoren und terminaler Akzeptoren sowie durch die Expression verschiedener Typen von Dehydrogenasen und terminaler Oxidasen gewährleistet. Die Gene für die verschiedenen Redoxenzyme werden überwiegend streng reguliert und nur unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen exprimiert. *P. denitrificans* kann heterotroph auf verschiedenen organischen Kohlenstoffquellen sowie autotroph unter Verstoffwechslung von Wasserstoff mit sogenannten C<sub>1</sub>-Substraten (Harms and van Spanning 1991; Stouthamer 1992; Van Spanning, de Boer *et al.* 1995; Baker, Ferguson *et al.* 1998) unter Verwendung der Hydrogenase, Methanol- oder Methylamin-Dehydrogenase wachsen. Unter aeroben Wachstumsbedingungen exprimiert *Paracoccus* eine Atmungskette, die der in Mitochondrien homolog ist (John and Whatley 1975; Stouthamer 1992). In dieser werden Elektronen aus den Reduktionsäquivalenten NADH und FADH<sub>2</sub> über Komplex I und Komplex II, den Chinon-/Chinolpool, Komplex III, das membranständige Cytochrom *c*<sub>552</sub> und die terminale Cytochrom *aa*<sub>3</sub>-Oxidase (Komplex IV) auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen (siehe Abbildung 1.2, graue Elemente). *P. denitrificans* kann jedoch je nach Sauerstoffpartialdruck drei verschiedene terminale Oxidasen exprimieren (Raitio, Jalli *et al.* 1987; Raitio, Pispä *et al.* 1990; de Gier, Lubben *et al.* 1994; Richter, Tao *et al.* 1994; de Gier, Schepper *et al.* 1996). Die Cytochrom *aa*<sub>3</sub>-Oxidase wird unter aeroben Sauerstoffbedingungen exprimiert und hat eine relativ geringe Sauerstoffaffinität (Ludwig and Schatz 1980; Preisig, Zufferey *et al.* 1996; Riistama, Puustinen *et al.* 2000). Die Cytochrom *cbb*<sub>3</sub>-Oxidase dagegen weist eine hohe Sauerstoffaffinität auf und wird bei geringer Sauerstoffkonzentrationen exprimiert (Bosma, Braster *et al.* 1987; de Gier, Schepper *et al.* 1996; Preisig, Zufferey *et al.* 1996). Die *ba*<sub>3</sub>-Chinoloxidase wird bei hohem Reduktionsniveau des Q-Pools exprimiert und wirkt diesem durch die schnelle Oxidation des Ubichinols und Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff als terminalem Akzeptor entgegen (Ludwig 1992; Otten, Reijnders *et al.* 1999). Unter anaeroben Bedingungen exprimiert *Paracoccus* vier verschiedene Stickstoffoxid-Oxidoreduktasen, die sequentiell Nitrat zu molekularem Stickstoff reduzieren (Denitrifikation). Nitrat dient hierbei anstelle von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor. Die entsprechenden Reduktasen werden nur bei Vorhandensein von Nitrat als Substrat und der Abwesenheit von Sauerstoff exprimiert (Berks, Page *et al.* 1995; Baker, Ferguson *et al.* 1998),(Stouthamer 1992; Ferguson 1994).



**Abbildung 1.2: Elektronentransferwege von *P. denitrificans***

Graue Unterlegung: aerobe und zur mitochondrialen Atmungskette homologe ET-Wege; durchgezogene Linien: aerober ET; gestrichelte Linien: anaerober ET/Denitrifikation; MADH = Methylamin-Dehydrogenase, MDH = Methanol-Dehydrogenase

### 1.3.2 Der bc<sub>1</sub>-Komplex aus *P. denitrificans*

Während mitochondriale bc<sub>1</sub>-Komplexe aus bis zu 11 Untereinheiten aufgebaut sind, weist der Komplex aus *P. denitrificans* eine wesentlich einfachere Struktur auf. Er besteht lediglich aus den drei essentiellen Untereinheiten, die die Redoxzentren tragen. Anfänglich wurde der bc<sub>1</sub>-Komplex als Superkomplex zusammen mit Cytochrom *c*-Oxidase und dem membranständigen Cytochrom c<sub>552</sub> isoliert und zeigte hohe ET-Raten (Berry and Trumpower 1985). Die Klonierung und Sequenzierung der bc<sub>1</sub>-Gene offenbarte eine Operon-Struktur (*fbcFBC*), in dem die Gene der drei Untereinheiten jeweils aufeinanderfolgen und nur durch Lücken von 10 bis 12 Nukleotiden voneinander getrennt vorliegen (Kurowski and Ludwig 1987). Das Rieske-ISP wird durch *fbcF* kodiert, ist ein aus 190 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und trägt ein FeS-Zentrum. Aus den Strukturdaten der bereits kristallisierten mitochondrialen und bakteriellen bc<sub>1</sub>-Komplexe (Iwata, Lee et al. 1998; Berry, Huang et al. 1999; Hunte, Koepke et al. 2000; Lange and Hunte 2002) und Hydrophobizitätsanalyse der Rieske-ISP-Sequenz von *P. denitrificans* kann abgeleitet werden, dass dieses aus einer Transmembranhelix und einer periplasmatischen das FeS-Cluster tragenden Kopfdomäne besteht. Cytochrom *b* wird durch *fbcB* kodiert und besteht aus 440 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 50 kDa und den beiden Häm *b*-Redoxzentren. Aus einem Hydropathie-Diagramm lassen sich acht verschiedene hydrophobe Domänen unterscheiden, die wahrscheinlich als Transmembranhelices die Membran durchspannen (Kurowski and Ludwig 1987). Cytochrom *b* weist eine hohe Sequenzhomologie mit den Cytochrom *b*-Sequenzen anderer bakterieller (90 %

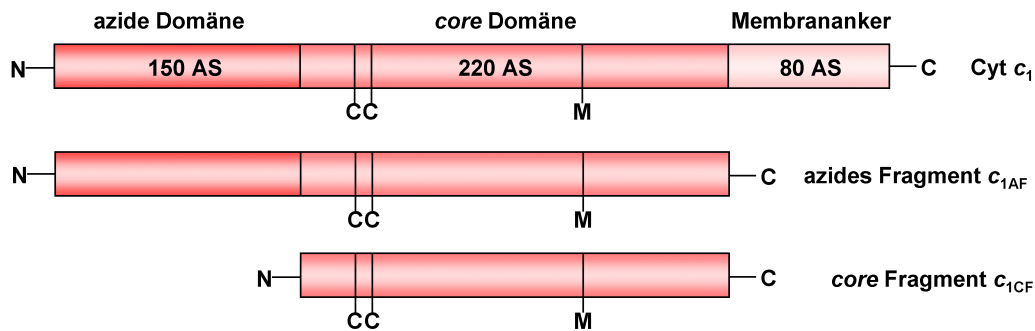
identische Aminosäurereste mit der *Rhodobacter*-Sequenz) und mitochondrialer Untereinheiten auf (Knaff 1990; Trumpower 1990; Thony-Meyer 1997). Cytochrom  $c_1$  als dritte katalytische Untereinheit überträgt Elektronen auf Cytochrom  $c_{552}$  und weist eine für *Paracoccus* einzigartige saure Domäne am N-Terminus auf (siehe Abschnitt 1.3.3), deren Funktion noch ungeklärt ist. Um die Funktion dieser sauren Extensionsdomäne näher untersuchen zu können, ist ein  $bc_1$ -Komplex kloniert worden, dem durch eine *in frame*-Deletion der Aminosäuren 46-197 diese saure Extensionsdomäne fehlt (Gerhus, Dissertation 1992).

### 1.3.3 Cytochrom $c_1$ aus *P. denitrificans*

Das *fbcC*-Gen des *fbc*-Operons kodiert für das Cytochrom  $c_1$ , ein Polypeptid von 450 Aminosäuren und einem apparenten Molekulargewicht von 60-68 kDa, das ein kovalent gebundenes *c*-Typ Häm trägt. Die spektralen Eigenschaften des Cytochrom  $c_1$  ( $\alpha$ -Bande bei 553 nm und Soret-Bande bei 417 nm im reduzierten Spektrum, (Ludwig, Suda *et al.* 1983) ähneln denen des mitochondrialen Cytochrom  $c_1$  (Ross and Schatz 1976; Ross and Schatz 1976; Tervoort, Schilder *et al.* 1981), wobei aus Pyridinhämochromspektren ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{\text{red-ox}, 553-535} = 22,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt wurde (Ludwig, Suda *et al.* 1983). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen Cytochrom  $c_1$  aus *S. cerevisiae* mit *Paracoccus c\_1* reagieren und umgekehrt (Ludwig, Suda *et al.* 1983). Durch Hydropathie-Analyse konnte das Cytochrom  $c_1$  in drei Domänen unterteilt werden: den C-terminalen Membrananker, eine globuläre, periplasmatische, Häm-tragende *core*-Domäne und eine N-terminale saure Extensionsdomäne von 150 Aminosäuren, die in *Paracoccus* einzigartig ist (Kurowski and Ludwig 1987). Diese saure Domäne (Aminosäuren 46-197) ist aufgrund ihrer besonderen Aminosäurezusammensetzung verantwortlich für die ungewöhnlich hohe apparente Masse des Cytochrom  $c_1$  (Cytochrom  $c_1$  läuft im SDS-Gel bei 60 bis 68 kDa, hat aber eine aus der Aminosäuresequenz errechnete Masse von 47 kDa). Sie besteht zu 40 % aus Alanin, 14 % Prolin und zu 38 % aus sauren Aminosäuren (hauptsächlich Glutamat), wobei keine einzige basische Aminosäure in diesem Sequenzabschnitt zu finden ist (Kurowski and Ludwig 1987). Sie ähnelt in ihrer Aminosäurekomposition kleinen, sauren Untereinheiten der mitochondrialen  $bc_1$ -Komplexe, die eng mit der hydrophilen, globulären, hämtragenden Cytochrom  $c_1$ -Domäne assoziiert sind (Kim and King 1983; Kim and King 1987; Ohta, Goto *et al.* 1987; Kim and Zitomer 1990). Mitochondrialen Untereinheiten, wie dem *hinge*-Protein (Untereinheit 8) des  $bc_1$ -Komplexes aus Rinderherz (Stonehuerner, O'Brien *et al.* 1985) oder der Untereinheit 6 (QCR6) des  $bc_1$ -Komplexes aus *S. cerevisiae* (Hunte, Koepke *et al.* 2000), wird aufgrund ihrer hohen negativen Ladungsdichte eine Beteiligung an der Wechselwirkung des Cytochrom  $c_1$  zum basischen Cytochrom *c* zugeschrieben.

Für eine dynamische Untersuchung der Wechselwirkung des Cytochrom  $c_1$  zu seinen Redoxpartnern mittels schneller *pre-steady state*-Kinetiken sind zwei lösliche Fragmente des Cytochrom  $c_1$  kloniert worden, die heterolog in *E. coli* überexprimiert werden konnten (Eichhorn, Dissertation 2003). Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Konstruktion der beiden löslichen  $c_1$ -Fragmente.





**Abbildung 1.3: Cytochrom  $c_1$  aus *P. denitrificans* und lösliche Fragmente**

Das native Cytochrom  $c_1$  besteht aus der N-terminalen sauren Extensionsdomäne, der *core*-Domäne und dem C-terminalen Membrananker; dem aziden Fragment ( $c_{1AF}$ ) fehlt der Membrananker, wohingegen das *core*-Fragment ( $c_{1CF}$ ) lediglich aus der redoxaktiven *core*-Domäne besteht. C und M innerhalb der Domänen stellen die Cysteine des Hämbindemotivs und den distalen Methioninliganden der Hämgruppe dar; AS = Aminosäuren

Das *core*-Fragment ( $c_{1CF}$ ) mit einem aus der Sequenz errechneten Molekulargewicht von 23,7 kDa, besteht lediglich aus der globulären, periplasmatischen *core*-Domäne, die die Hämgruppe trägt, und kann als Minimalfragment des Cytochrom  $c_1$  angesehen werden. Es wurde in dieser Arbeit verwendet, um Mutanten herzustellen und den Elektronentransfer und die Komplexbildung zum/mit Cytochrom  $c_{552}$  zu untersuchen. Das azide Fragment ( $c_{1AF}$ ) besitzt neben der *core*-Domäne ebenfalls die N-terminale saure Extensionsdomäne und wurde hergestellt, um den Einfluss der sauren Domäne auf die Wechselwirkung zum Cytochrom  $c_{552}$  zu untersuchen.

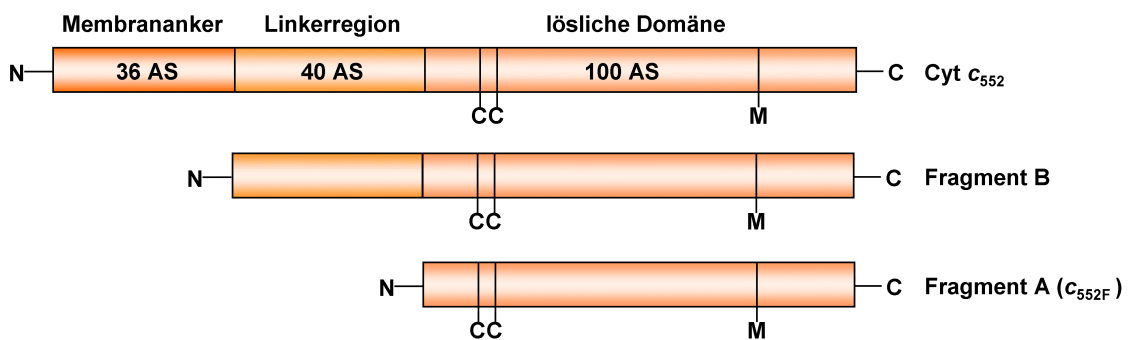
Kinetische Untersuchungen mittels *pre-steady state*-Stopped-Flow-Techniken ergaben sehr schnelle bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten von  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Reaktion von  $c_{1AF}$  und  $c_{1CF}$  mit Cytochrom  $c_{552F}$  (einem klonierten löslichen Fragment des Cytochrom  $c_{552}$ , siehe Abschnitt 1.3.4) und Cytochrom  $c_{550}$ , einem weiteren löslichen Cytochrom der Atmungskette aus *P. denitrificans*. Es konnte keine Präferenz des aziden Fragmentes gegenüber dem *core*-Fragment festgestellt werden, jedoch eine erhöhte Affinität des Cytochrom  $c_{550}$  gegenüber dem Cytochrom  $c_{552F}$  zu beiden  $c_1$ -Fragmenten. Messungen der Ionenstärkeabhängigkeit ergaben 2-3 effektive Ladungen pro Redoxpartner, die an der Wechselwirkung zwischen  $c_{1AF}/c_{1CF}$  mit  $c_{552F}$  oder  $c_{550}$  beteiligt sind (Eichhorn, Dissertation 2003). Kinetische Messungen an Mutanten des  $c_{1CF}$ , bei denen saure Aminosäuren gegen neutrale oder basische ausgetauscht worden waren, erbrachten keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse.

### 1.3.4 Cytochrom $c_{552}$ aus *P. denitrificans*

Das membranständige Cytochrom  $c_{552}$  ist der Elektronenmediator zwischen dem  $bc_1$ -Komplex und der Cytochrom  $c$ -Oxidase. Unter bestimmten Bedingungen konnte Cytochrom  $c_{552}$  in einem Superkomplex mit Komplex III und IV (Berry and Trumpower 1985; Haltia, Puustinen *et al.* 1988) und zusätzlich mit Komplex I (Stroh, Anderka *et al.* 2004) isoliert werden, wobei diese Superkomplexe hohe interne ET-Raten aufwiesen, die auf die Elektronenübertragung durch das Cytochrom  $c_{552}$  zurückzuführen sind. Des



weiteren konnte durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Cytochrom  $c_{552}$  oder mit speziellen Deletionsstämmen (Turba, Dissertation 1993) der ET in Membranen zwischen NADH und Oxidase inhibiert werden (Turba, Jetzek *et al.* 1995). Das *cycM*-Gen ist kloniert und sequenziert worden (Turba, Jetzek *et al.* 1995) und kodiert für das aus 176 Aminosäuren bestehende, membranständige Cytochrom  $c_{552}$ , das ein Molekulargewicht von 18,2 kDa aufweist und bei neutralem pH-Wert negativ geladen ist. Anhand einer Sequenzanalyse wurde Cytochrom  $c_{552}$  in drei Domänen unterteilt, den N-terminalen Membrananker, eine hydrophile, flexible Linkerdomäne, die eine hohe negative Ladungsdichte aufweist, und die C-terminale globuläre, lösliche Domäne, die eine kovalent gebundene *c*-Typ Hämgruppe trägt. Spektroskopisch wird Cytochrom  $c_{552}$  über seine  $\alpha$ -Bande bei 551 nm charakterisiert (der Name „ $c_{552}$ “, der sich zuvor aus der Bestimmung der  $\alpha$ -Bande bei 552 nm ergab, wurde dennoch beibehalten). Es konnten zwei lösliche Fragmente des Cytochrom  $c_{552}$  kloniert und heterolog in *E. coli* überexprimiert werden (Reincke, Thony-Meyer *et al.* 1999), die in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt sind.



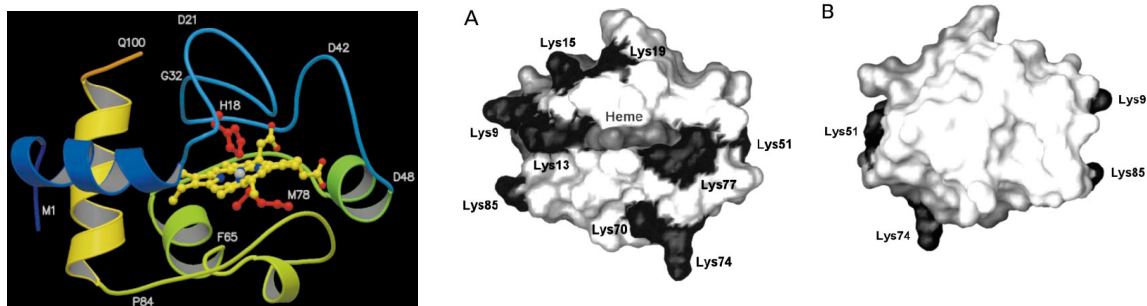
**Abbildung 1.4: Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* und lösliche Fragmente**

Das native Cytochrom  $c_{552}$  besteht aus dem N-terminalen Membrananker, der hydrophilen und negativ geladenen Linkerregion und der C-terminalen hydrophilen Domäne, die das kovalent gebundene *c*-Typ Häm trägt. Fragment B besteht aus der Linkerregion zusammen mit der hydrophilen Domäne, wohingegen Fragment A (im Folgenden mit  $c_{552F}$  bezeichnet) lediglich aus der löslichen Domäne besteht. C und M innerhalb der Domänen stellen die Cysteine des Hämbindemotivs und den distalen Methioninliganden der Hämgruppe dar; AS = Aminosäuren

Fragment B besteht aus den 140 Aminosäuren der Linkerregion zusammen mit der hydrophilen, Häm-tragenden Domäne. Fragment A, das in dieser Arbeit verwendet wurde und im Folgenden mit  $c_{552F}$  bezeichnet wird, besteht lediglich aus der C-terminalen hydrophilen und redoxaktiven Domäne von 100 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 10,5 kDa und weist einen pI von 6,32 auf.

Es konnten die Lösungsstrukturen mittels multidimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopie (Lucke, Reincke *et al.* 2000; Pristovsek, Lucke *et al.* 2000; Pristovsek, Lucke *et al.* 2000) sowie die Kristallstrukturen mit hoher Auflösung (Harrenga, Reincke *et al.* 2000) beider Redoxzustände des  $c_{552F}$  erfolgreich bestimmt werden. Diese zeigen keine größeren redoxabhängigen Strukturunterschiede. Cytochrom  $c_{552F}$  ist ein kompaktes, globuläres *c*-Typ Cytochrom, das fünf  $\alpha$ -Helices aufweist (Abbildung 1.5, links). Die Hämgruppe ist über Cys14 und Cys17 (Nummerierung bezieht sich auf das  $c_{552F}$ -Fragment) kovalent mit dem Cytochrom verknüpft und wird durch His18 und

Met78 in 5. und 6. Koordinationsstelle ligandiert. Obwohl Cytochrom  $c_{552F}$  mit 11 basischen und 12 sauren Aminosäuren ein nahezu ausgeglichenes Ladungsverhältnis aufweist, sind diese geladenen Aminosäuren auffallend auf der Oberfläche des Cytochroms verteilt (Abbildung 1.5, rechts A und B). Alle Lysine befinden sich auf der Hemisphäre der Hämspalte, wobei Lys77 und Lys13 direkt an deren Kanten angeordnet und die restlichen Lysine wie ein Ring um diese herum gruppiert sind. Auf der Hemisphäre, die der Hämspalte abgewandt ist, befindet sich kein einziges positiv geladenes Lysin. Der Ring aus Lysinen vermittelt die Wechselwirkung zur Cytochrom *c*-Oxidase (Drosou, Reincke *et al.* 2002), deren Interaktion zum basischen Pferdeherz Cytochrom *c* ebenfalls durch elektrostatische Anziehung vermittelt wird (Witt, Zickermann *et al.* 1995; Witt, Malatesta *et al.* 1998).



**Abbildung 1.5: NMR-Struktur des Cytochrom  $c_{552F}$**

Sekundärstrukturdarstellung (links) und Oberflächendarstellung (rechts) des  $c_{552F}$ ; **A:** Hemisphäre mit Blick auf die Hämspalte und Interaktionsfläche; **B:** Häm-abgewandte Hemisphäre; positiv geladenen Oberflächen-Lysine sind hervorgehoben (Pristovsek, Lucke *et al.* 2000)

## 1.4 *Thermus thermophilus*

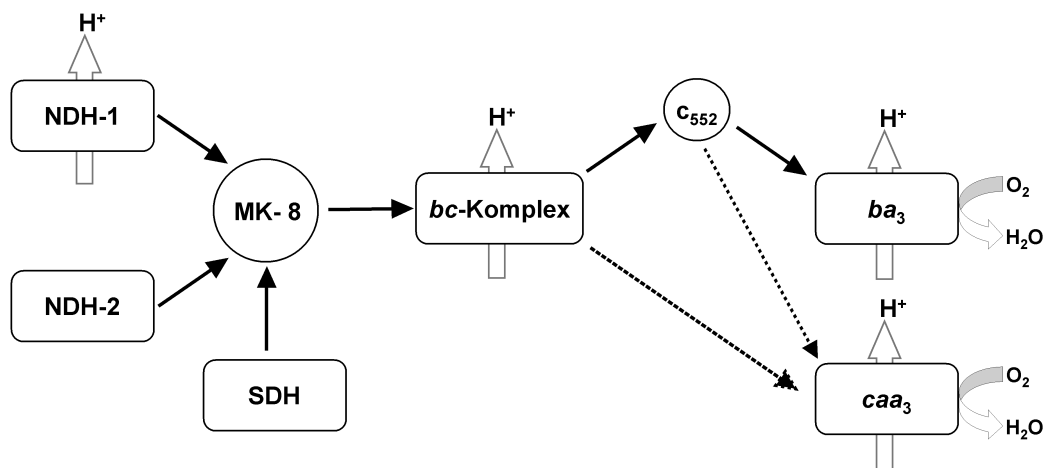
*T. thermophilus* ist ein Gram-negatives, extrem thermophiles Bakterium, das ein Wachstumsoptimum bei 75-80 °C besitzt (Williams 1989) und als unbewegliches Stäbchen wächst, das lange Filamente ausbildet. Durch die Synthese von Carotinoiden weist *T. thermophilus* eine gelbe bis orange Färbung auf (Armstrong 1997). Aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen wird *T. thermophilus* innerhalb der Eubakterien dem Phylum *Deinococcus-Thermus* zugeordnet (Chung, Kim *et al.* 2000). *Thermus aquaticus* wurde als erste Spezies dieses Genus 1969 aus heißen Quellen im Yellowstone Nationalpark isoliert (Brock and Freeze 1969). *T. thermophilus* wurden zunächst als *Flavobacterium thermophilum* isoliert (Oshima and Imahori 1974) und später umbenannt.

*T. thermophilus* ist in das Interesse der Forschung gerückt, da seine thermostabilen Enzyme ein hohes biotechnologisches Potential aufweisen und Einsatz im Labor- und Industriealltag finden (z.B. *Taq*-Polymerase aus *T. aquaticus*, die in der PCR eingesetzt wird (Kaledin, Sliusarenko *et al.* 1980). Es hat sich weiter gezeigt, dass diese thermostabilen Proteine ebenfalls unempfindlicher gegenüber extremen pH-Werten und dem Abbau durch Proteasen sind (Daniel, Cowan *et al.* 1982), was eine leichtere Handhabung im Labor erlaubt. Zusätzlich zum großen Interesse an der Aufklärung der Ursache für die erhöhte Thermostabilität dieser Proteine gegenüber denen aus

mesophilen Organismen, sind diese Proteine durch eine erleichterte Kristallisation aufgrund einer erhöhten Rigidität bei niedrigen Temperaturen für die Strukturaufklärung sehr attraktiv. So konnten unter anderem die Strukturen der ribosomalen 30S Untereinheit (Wimberly, Brodersen *et al.* 2000; Clemons, Brodersen *et al.* 2001), der membranständigen Cytochrom *ba*<sub>3</sub>-Oxidase (Soulimane, Buse *et al.* 2000) und des hydrophilen Fragmentes des Komplex I (Sazanov and Hinchliffe 2006) aufgeklärt werden. Mittlerweile sind die vollständigen Genomsequenzen der *T. thermophilus*-Stämme HB8 (Japan) und HB27 (Göttingen Genomic Laboratories) verfügbar und *E. coli*/*T. thermophilus*-Shuttle-Vektoren (Wayne and Xu 1997) mit einer hitzestabilen Kanamycinresistenz (Hoseki, Yano *et al.* 1999) entwickelt worden, so dass *T. thermophilus* für molekulargenetische Manipulationen sowie für homologe und heterologe Expressionsansätze eingesetzt werden kann.

#### 1.4.1 Die Atmungskette von *T. thermophilus*

*T. thermophilus* exprimiert eine aerobe Atmungskette, die generell der aus mesophilen Organismen ähnelt (siehe Abbildung 1.6). Die NADH-Oxidoreduktasen NDH-1 und NDH-2 oxidieren NADH und übertragen Elektronen auf Menachinon-8. NDH-1 nutzt die durch den Elektronentransfer freiwerdende Energie zum Pumpen von Protonen über die Membran und ähnelt damit generell dem mitochondrialen Komplex I, ist jedoch vergleichsweise einfacher aufgebaut und besteht nur aus 14 Untereinheiten (Yagi, Hon-nami *et al.* 1988; Yano, Chu *et al.* 1997). Die Struktur der hydrophilen, [FeS]-Cluster tragenden NDH-1-Domäne konnte kristallographisch gelöst werden (Hinchliffe and Sazanov 2005; Sazanov and Hinchliffe 2006). NDH-2 besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, der jegliche [FeS]-Cluster fehlen (Yagi, Hon-nami *et al.* 1988) und zeigt keine Protonenpump-Aktivität. Elektronen werden ebenfalls über die Succinat-Dehydrogenase (SDH) in den Menachinon-Pool eingeschleust (T. Soulimane & G. Buse 1999 Konferenz Abstract, GBM-Meeting, Hamburg Germany). Der Menachinon-Pool stellt den Elektronenüberträger zum *bc*-Komplex dar. Gegenüber dem Ubichinon/Ubichinol-Redoxpaar mit einem Mittelpunktspotential von  $E_0' = +100$  mV ist das Redoxpotential des Menachinon/Menachinol-Redoxpaares mit  $E_0' = -75$  mV erniedrigt. Es wird angenommen, dass ein phylogenetischer Vorläufer des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes einen Niedrigpotential-Mediator wie Menachinol oxidierte (Knoll 1992).



**Abbildung 1.6: Aerobe Atmungskette von *T. thermophilus***

*NDH-1*, *NDH-2*: NADH:Ubichinon-Oxidoreduktasen; *SDH*: Succinat-Dehydrogenase; *MK-8*: Menachinon-8-Pool; *bc*-Komplex: Komplex III; *c<sub>552</sub>*: lösliches Cytochrom *c<sub>552</sub>*, *ba<sub>3</sub>*- und *caa<sub>3</sub>*: terminale Oxidasen des *ba<sub>3</sub>*- und *caa<sub>3</sub>*-Typs; offene Pfeile ( $\Uparrow$ ) geben Protonenpump-Eigenschaften der Komplexe wieder; durchgezogene Pfeile ( $\rightarrow$ ) geben den Elektronentransfer wieder, gestrichelte Pfeile ( $\dashrightarrow$ ) weisen auf mögliche Elektronentransferwege hin.

Erst kürzlich konnte ein *bc*-Komplex aus *T. thermophilus* identifiziert und charakterisiert werden (Mooser, Maneg *et al.* 2005; Mooser, Maneg *et al.* 2006), auf dessen Anwesenheit es schon früher durch die Entdeckung und Charakterisierung der löslichen Rieske-Domäne (Fee, Findling *et al.* 1984; Gatti, Tarr *et al.* 1998; Zu, Fee *et al.* 2001; Hunsicker-Wang, Heine *et al.* 2003; Zu, Couture *et al.* 2003). Hinweise gab. Kodiert wird der *bc*-Komplex durch das *fbcCXFB*-Operon, in dem vier konsekutive ORFs (*open reading frames*; offenes Leseraster) aufeinanderfolgen, die nur durch 8-10 Nukleotide voneinander getrennt sind (Mooser, Maneg *et al.* 2006). Der *bc*-Komplex besteht aus vier Untereinheiten: einem konventionellen Cytochrom *b* und Rieske-ISP, Cytochrom *c* und dem Protein FbcX, dessen Funktion noch unklar ist. Cytochrom *c* ist ein Polypeptid aus 243 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26 kDa, das ein kovalent gebundenes *c*-Typ Häm trägt. Diese Untereinheit weist (abgeleitet aus der Aminosäuresequenz) im Vergleich zu anderen Cytochromen aus *bc*-Komplexen eine bemerkenswerte Struktur auf: zwei lösliche Domänen sind über eine Transmembranhelix miteinander verbunden, wobei sie sich auf verschiedenen Seiten der Membran befinden. Die C-terminale Domäne befindet sich auf der periplasmatischen Seite der Membran und weist das Häm-Bindemotiv CAACH (Position 171 bis 175) auf (Mooser, Maneg *et al.* 2006). Von dieser Domäne ist ein lösliches Fragment kloniert, heterolog in *E. coli* überexprimiert und charakterisiert worden (Mooser, Maneg *et al.* 2006). Das FbcX-Protein ist ein Polypeptid von 17,6 kDa und besteht aus vier (ebenfalls aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten) Transmembranhelices. Der N- und der C-Terminus befinden sich aller Wahrscheinlichkeit nach auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Bis jetzt sind keine Sequenzmotive zur Cofaktorbinding identifiziert worden, so dass die FbcX-Funktion unklar ist (Mooser, Maneg *et al.* 2006).

Ein lösliches Cytochrom  $c_{552}$  überträgt die Elektronen, die vom  $bc$ -Komplex kommen, auf die terminale  $ba_3$ -Oxidase. Dieses Cytochrom wurde schon früh identifiziert (Hon-Nami and Oshima 1977), seine Struktur konnte durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden (Than, Hof *et al.* 1997) und trägt zur Aufklärung der Frage nach dem strukturellen Mechanismus der Thermostabilität bei. Durch Stopped-Flow-Experimente konnte gezeigt werden, dass Cytochrom  $c_{552}$  sowohl mit Cytochrom  $c$  des  $bc$ -Komplexes (Mooser, Maneg *et al.* 2005) als auch mit einem klonierten löslichen  $Cu_A$ -Fragment der  $ba_3$ -Oxidase (Mooser, Maneg *et al.* 2005) spezifisch wechselwirkt (siehe Abschnitt 1.5.3).

*T. thermophilus* exprimiert zwei terminale Oxidasen. Unter semianaeroben Bedingungen wird eine  $ba_3$ -Oxidase exprimiert (Zimmermann, Nitsche *et al.* 1988), deren Struktur gelöst werden konnte (Soulimane, Buse *et al.* 2000). Es zeigte sich, dass diese Oxidase keine sehr enge Verwandtschaft zu den terminalen Oxidasen anderer Organismen aufweist (Pereira, Santana *et al.* 2001) und einige Aminosäuresequenzmotive fehlen, die in verwandten Oxidasen für Protonenkanäle und Elektronentransferwege essentiell sind. Des Weiteren weist die rekonstituierte  $ba_3$ -Oxidase eine verminderte Protonenpump-Aktivität auf (Kannt, Soulimane *et al.* 1998). Unter aeroben Bedingungen wird eine Oxidase des  $caa_3$ -Typs exprimiert (Fee, Choc *et al.* 1980; Hon-nami and Oshima 1980), die im folgenden Abschnitt (1.4.2) näher vorgestellt wird.

#### 1.4.2 Die Cytochrom $caa_3$ -Oxidase aus *T. thermophilus*

Unter aeroben Bedingungen wird in *T. thermophilus* die  $caa_3$ -Oxidase exprimiert (Fee, Choc *et al.* 1980; Hon-nami and Oshima 1980), die als Komplex aus zwei Untereinheiten aufgereinigt und charakterisiert wurde (Fee, Kuila *et al.* 1986) und Protonenpumpaktivität aufweist (Yoshida and Fee 1984; Hon-nami and Oshima 1984). Sie enthält die vier kanonischen für Cytochrom  $c$ -Oxidasen typischen Metallzentren (Cytochrom  $a$  und  $a_3$ ,  $Cu_A$  und  $Cu_B$ ) und ein zusätzliches Cytochrom  $c$  (Fee, Choc *et al.* 1980; Yoshida and Fee 1984). Die für die beiden Untereinheiten kodierenden Gene sind kloniert und sequenziert worden (Mather, Springer *et al.* 1991; Mather, Springer *et al.* 1993). Untereinheit I (früher als *Protein A* bezeichnet) mit einem Molekulargewicht von 55 kDa ist ein Fusionsprotein einer typischen Oxidase Untereinheit I, die das heterobinukleare Häm  $a_3/Cu_B$ -Zentrum und Häm  $a$  enthält, und einer typischen Oxidase UE III (Mather, Springer *et al.* 1993). Untereinheit IIc (früher als *Protein C* bezeichnet) mit einem Molekulargewicht von 33 kDa besteht aus einer typischen Oxidase Untereinheit II mit dem homonuklearen  $Cu_A$ -Zentrum, an die C-terminal ein Cytochrom  $c$  fusioniert ist (Mather, Springer *et al.* 1991). Eine ähnliche Fusion eines  $c$ -Typ Cytochroms an eine konventionelle Untereinheit II wird bei der  $caa_3$ -Oxidase aus *Bacillus* PS3 vorgeschlagen (Sone, Yokoi *et al.* 1988). Untereinheit IIc kann somit als ein Fusionsprodukt von Substrat (Cytochrom  $c$ ) und Enzym (Oxidase) angesehen werden, in dem Cytochrom  $c$  als Elektronenakzeptor dient und die Elektronen an die nachfolgenden Redoxzentren weitergibt. Abgeleitet aus Hydropathie-Analysen weist Untereinheit IIc zwei potentielle Transmembranhelices auf, mit denen sie in der Membran verankert ist. N- und C-Terminus sowie die hydrophilen  $Cu_A$ - und

Cytochrom *c*-Domänen befinden sich im Periplasma. Der isoelektrische Punkt für die lösliche Cytochrom *c*-Domäne liegt mit 4,7 unter dem für die gesamte Untereinheit IIc mit einem pI von 5,5. Des Weiteren fehlt Untereinheit IIc ab Position 162 eine Sequenz von 21 sauren, wenn auch nicht konservierten Aminosäureresten, die durch Sequenzvergleiche in allen sonstigen Oxidase Untereinheit II gefunden wurde (Mather, Springer *et al.* 1991) und die an der Wechselwirkung mit basischen Cytochromen beteiligt zu sein scheint. Eine Hypothese ist, dass die Funktion dieser Sequenz von dem an Untereinheit II fusionierten *c*-Typ Cytochrom übernommen werden könnte.

## 1.5 Transiente Elektronentransferkomplexe

Interprotein-Komplexe werden im Allgemeinen je nach Lebensdauer und Affinität in statische und transiente Komplexe eingeteilt. Während ein statischer Komplex eine feste Bindungsstelle aufweist und hochspezifisch mit seinem Partnerprotein einen stabilen Komplex mit definierter Struktur ausbildet, der eine langsame Dissoziationsrate aufweist (z. B. Antigen/Antikörper-Bindung), zeichnen sich transiente Proteinkomplexe durch eine kurze Lebensdauer und schnelle Dissoziationsraten aus. Sie besitzen nur eine vergleichsweise geringe Spezifität, die durch eine geringe Oberflächenkomplementarität und eine lockere Packung der Seitenketten innerhalb der Bindungsfläche zustande kommt. Transiente Komplexe kommen in Reaktionen zum Einsatz, die eine hohe Umsatzrate erfordern. Dies ist zum Beispiel in der Atmungskette der Fall, die einen andauernden, kontinuierlichen Elektronenfluss gewährleisten muss.

Redoxproteine erfüllen generell zwei Hauptaufgaben: Sie umgeben ihre prosthetische Gruppe mit einer Polypeptidkette und stellen durch diese Proteinmikroumgebung die Redoxeigenschaften ein. Zum anderen müssen sie Partnerproteine in der Zelle erkennen und mit ihnen in Wechselwirkung treten können. Die Natur der Wechselwirkungen zwischen Redoxproteinen wurde sowohl durch dynamische Ansätze (Mutagenese- und kinetische Studien, Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit von Reaktionsraten und Bindungsstudien) als auch durch strukturelle Ansätze mittels Cokristallisation der Redoxpartner oder *chemical shift perturbation mapping*-Experimente per NMR-Spektroskopie untersucht.

Die Untersuchung der Wechselwirkungen mittels dynamischer Ansätze zeigte, dass die Protein-Protein-Assoziation häufig durch elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst wird. So konnten komplementär geladene Bereiche auf beiden Redoxpartnern bestimmt werden (Koppenol and Margoliash 1982). Für das Redoxpaar Cytochrom *c*/Cytochrom *c*<sub>1</sub> wurden konservierte Lysinreste um die Hämspalte des Cytochrom *c* identifiziert, die mit sauren Resten des Cytochrom *c*<sub>1</sub> in Wechselwirkung treten, welche sich in der Peripherie um die Hämspalte befinden (Speck, Ferguson-Miller *et al.* 1979; Rieder and Bosshard 1980; Hall, Zha *et al.* 1987; Hall, Zha *et al.* 1989; Nakai, Endo *et al.* 1993). Elektrostatische Wechselwirkungen stellen die Triebkraft für die schnelle Proteinassoziation dar ( $k_{on} = 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und bewirken eine schnelle Präorientierung. Die Beteiligung an der direkten Komplexbildung ist allerdings ungünstig, da die Kosten für eine Dehydratisierung von geladenen Seitengruppen die Beteiligung von Salzbrücken aufwiegen (Waldburger, Schildbach *et al.* 1995). Durch

die strukturelle Untersuchung verschiedener Redoxkomplexe konnte gezeigt werden, dass die direkten Kontakte meist durch eine kleine, hydrophobe Fläche über apolare Wechselwirkungen, Van-der-Waals (VdW)-Kontakte und Wasserstoffbrücken vermittelt werden. Es konnten keine elektrostatischen Interaktionen über Salzbrücken detektiert werden (Pelletier and Kraut 1992; Axelrod, Abresch *et al.* 2002; Lange and Hunte 2002; Wienk, Maneg *et al.* 2003).

Die erste Kristallstruktur eines Interprotein-Elektronentransferkomplexes ist die des Komplexes von Cytochrom *c* und Cytochrom *c*-Peroxidase aus Hefe (Pelletier and Kraut 1992). Dieser weist eine kleine, apolare Kontaktfläche auf, über die direkte Interaktionen über Wasserstoffbrücken, hydrophobe und VdW-Wechselwirkungen vermittelt werden. Komplementär geladene Reste auf beiden Seiten der Partnerproteine sind nicht an der direkten Interaktion beteiligt (Pelletier and Kraut 1992).

Diese Erkenntnisse führten zu einem mehrstufigen Modell für die Komplexbildung zwischen Redoxproteinen (Ubbink, Ejdeback *et al.* 1998; Witt, Malatesta *et al.* 1998; Drosou, Malatesta *et al.* 2002; Drosou, Reincke *et al.* 2002; Maneg, Ludwig *et al.* 2003): weitreichende (8 bis 10 Å) elektrostatische Anziehungskräfte führen zu einer Annäherung und Präorientierung der beiden Redoxpartner in einem *Encounter*-Komplex. Dieser ist ein Ensemble von verschiedenen Orientierungen ohne definierte Struktur. Kommen sich zwei Proteine nahe genug, bilden sie eine gemeinsame Solvenshülle aus, die beide Partner umschließt. Dies führt zu einer zweidimensionalen Diffusion entlang der Proteinoberflächen, um eine genaue Orientierung für einen effizienten Komplex zu finden. Hydrophobe Kontakte, VdW-Interaktionen und Wasserstoffbrücken führen durch diese Feinjustierung des *Encounter*-Komplexes zum effizienten ET-Komplex. In diesem werden Wassermoleküle von den Kontaktflächen verdrängt (Chothia and Janin 1975). Dies führt zu einer Entropiezunahme, die den Verlust von Translations- und Rotationsfreiheitsgraden kompensiert und die Komplexbildung vorantreibt (Camacho, Weng *et al.* 1999; Camacho, Gatchell *et al.* 2000). Interaktionsflächen von Redoxproteinen sind generell klein (800 bis 1600 Å<sup>2</sup>) und apolar. Sie zeichnen sich durch eine geringe Oberflächenkomplementarität aus, die es den Proteinen ermöglicht, bei ausreichender Spezifität mit mehreren Redoxpartnern mit ähnlicher Affinität in Wechselwirkung zu treten. Des Weiteren weisen diese Kontaktflächen eine nur lockere Packung von Seitenketten auf, was eine Solvatisierung mit Wassermolekülen ermöglicht und die Dissoziation erleichtert (Jones and Thornton 1996; Crowley and Ubbink 2003).

### 1.5.1 Interaktion zwischen Cytochrom *c*<sub>1</sub> und Cytochrom *c* in Hefe

Die Untersuchung der Interaktion zwischen Cytochrom *c* und Cytochrom *c*<sub>1</sub> aus Hefe basiert größtenteils auf den Kristallstrukturen von Lange & Hunte (1KY0, 3 Å Auflösung (Lange and Hunte 2002)) und Solmaz (1,9 Å Auflösung, Solmaz, Dissertation, 2005). Beide Strukturen beschreiben einen homodimeren *bc*<sub>1</sub>-Komplex Cokristallisiert mit Antikörper F<sub>v</sub>-Fragmenten und nur einem gebundenen Cytochrom *c* als Substrat, obwohl beide Bindungsstellen nahezu identisch sind (*half of the sites*-Mechanismus, siehe Abschnitt 1.2). Der Komplex mit einer Auflösung von 1,9 Å

unterscheidet sich zudem noch in einem definierten Redoxzustand der beiden *c*-Typ Hämgruppen und des Rieske-ISP, die durch Ascorbat vollständig reduziert vorliegen. Die Interaktion zwischen beiden Redoxpartnern werden hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und eine zentrale Kation- $\pi$ -Interaktion vermittelt. Die Kontaktfläche weist lediglich unpolare Wechselwirkungen (3-4 Å) und keine Salzbrücken auf. Durch den Vergleich verschiedener  $bc_1$ -Co-Komplexe aus Hefe konnte eine Kernregion innerhalb dieser Kontaktfläche identifiziert werden, die vier Interaktionspärchen zwischen Cytochrom  $c_1$ /Cytochrom *c* aufweist: Ala103/Ala87, Ala168/Val34, Phe230/Arg19 und Phe230/Thr18. Hierbei gehen Phe230 und Arg19 eine sogenannte Kation- $\pi$ -Interaktion ein, bei der die Ladung des Kations das  $\pi$ -Elektronensystem des Aromaten polarisiert und durch diese Wechselwirkung den Komplex stabilisiert. Im Zentrum dieser Kern-Kontaktfläche befinden sich die beiden *c*-Typ Hämgruppen, die über ihre CBC-Atome eine Distanz von 4,1 Å aufweisen, die nah genug ist, um einen direkten Elektronentransfer zwischen den Hämgruppen mit einer errechneten Geschwindigkeitskonstanten von  $3,1 \cdot 10^6$  bis  $2,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  zu vermitteln (nach Page (Page, Moser *et al.* 1999) (Lange and Hunte 2002). Je nach Auflösung der Co-Komplexe bzw. verwendetem Substrat (iso-1-Cytochrom *c* oder iso-2-Cytochrom *c*) ergeben sich kleinere Unterschiede der Interaktionspärchen in der Kontaktfläche, die zu einer leichten Verschiebung der Interaktionsfläche und einer leicht veränderten Orientierung des Cytochrom *c* führen. Die Kontaktfläche ist mit  $957 \text{ Å}^2$  sehr klein und vergrößert sich durch Einbeziehung von Wassermolekülen auf  $1316 \text{ Å}^2$ . Durch die Analyse der gebundenen Wassermoleküle in der 1,9 Å-Struktur konnte gezeigt werden, dass die hydrophobe Kontaktfläche für Wasser zugänglich ist und sechs  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle direkt innerhalb dieser und 24 weitere in direkter Nähe zur Kontaktfläche gebunden werden. Von diesen 30 Wassermolekülen zeigten allerdings nur zwei H-Brücken zwischen polaren, aber ungeladenen Resten. So konnte demnach keine einzige direkte elektrostatische Wechselwirkung nachgewiesen werden. Da aus biochemischen Studien die Beeinflussung der Cytochrom  $c_1$ /Cytochrom *c*-Wechselwirkung durch die Ionenstärke bekannt war (Speck, Ferguson-Miller *et al.* 1979), aber keine Salzbrücken in den Strukturen detektiert werden konnten, wurden weitreichende, unspezifische elektrostatische Anziehungskräfte mit in die Analyse (Solmaz, Dissertation 2005) einbezogen. Als Distanzparameter diente eine Länge von 9,6 Å, welche die Debye-Länge zwischen zwei einfach geladenen Ionen bei einer Ionenstärke von 100 mM darstellt (Wedler 2004). So konnten acht komplementär geladene Ladungspärchen identifiziert werden, die in einem Halbkreis um die eine Seite der hydrophoben Bindungsstelle angeordnet sind. Die Einbeziehung von weitreichenden, elektrostatischen Wechselwirkungen und der direkten hydrophoben Kontakte legt auch hier einen mehrstufigen ET-Prozess nahe (Ubbink, Ejdeback *et al.* 1998).

### 1.5.2 Elektronentransfer löslicher Redoxfragmente aus *P. denitrificans*

Zur Untersuchung von Elektronentransferreaktionen zwischen Redoxproteinen der Atmungskette von *P. denitrificans* wurden eine Reihe löslicher Fragmente dieser Proteine verwendet. Die Verwendung von löslichen Modulen der ET-Proteine bringt den Vorteil der einfacheren Handhabung, da keine Detergenzien verwendet werden



müssen. Des weiteren wird die ET-Reaktion von Interesse weder funktionell noch spektroskopisch durch weitere Redoxgruppen oder Energieumwandlungsprozesse beeinflusst, so dass der experimentelle Fokus ausschließlich auf der ablaufenden ET-Reaktion liegt. Für *P. denitrificans* sind erfolgreich lösliche Fragmente des Cytochrom  $c_1$  des  $bc_1$ -Komplexes (siehe Abschnitt 1.3.3), des membranständigen Cytochrom  $c_{552}$  (siehe Abschnitt 1.3.4) und der  $aa_3$ -Oxidase (Lappalainen, Watmough *et al.* 1995) kloniert und sowohl biochemisch als auch kinetisch charakterisiert worden (Lappalainen, Watmough *et al.* 1995; Drosou, Malatesta *et al.* 2002; Drosou, Reincke *et al.* 2002; Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004).

### 1.5.2.1 ET zwischen Cytochrom $c_{552F}$ und dem $Cu_A$ -Fragment

Für die Reaktion des löslichen  $Cu_A$ -Fragmentes der  $aa_3$ -Oxidase mit dem löslichen Fragment des Cytochrom  $c_{552}$  ( $c_{552F}$ ) konnte gezeigt werden, dass die Reaktion diffusionskontrolliert abläuft, mit Geschwindigkeitskonstanten bei einer extrapolierten Ionenstärke  $I = 0$  von  $> 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Maneg, Ludwig *et al.* 2003). Durch frühere Studien konnten basische Lysine auf der Oberfläche des Cytochrom  $c_{552}$  identifiziert werden (Harrenga, Reincke *et al.* 2000; Drosou, Reincke *et al.* 2002), die mit sauren Aminosäureresten auf der Oberfläche der Untereinheit II der  $aa_3$ -Oxidase (Ferguson-Miller, Brautigan *et al.* 1978; Witt, Malatesta *et al.* 1998; Drosou, Malatesta *et al.* 2002; Drosou, Reincke *et al.* 2002) über elektrostatische Anziehung unspezifisch wechselwirken. Hydrophobe, konservierte Reste sind dann für die Feinjustierung zu einem effizienten ET-Komplex verantwortlich (Witt, Malatesta *et al.* 1998). Als Elektroneneintrittspunkt wurde Tryptophan 121 identifiziert, das in dieser Position essentiell ist und nicht durch einen anderen aromatischen Rest ausgetauscht werden kann (Drosou, Malatesta *et al.* 2002). Stopped-Flow-Kinetiken im *pre-steady state*-Bereich und Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit ergaben zwei bis drei effektiven Ladungen pro Redoxpartner, die an der Interaktion beteiligt sind (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004). Weiterhin konnte aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten eine Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 0,2 errechnet werden, so dass für die beiden löslichen Fragmente der Elektronentransfer in der physiologisch reversen Richtung thermodynamisch begünstigt zu sein scheint. *Chemical shift perturbation mapping*-NMR-Experimente wurden unter Verwendung von  $^{15}\text{N}$ -isotopenangereichertem Cytochrom  $c_{552F}$  durchgeführt (Wienk, Maneg *et al.* 2003), durch die Informationen über die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen bei der Komplexbildung erhalten werden konnten. Diese Experimente zeigten, dass unabhängig vom Redoxzustand ein Cluster von ungeladenen Aminosäuren um die Hämspalte direkt an der Wechselwirkung zum  $Cu_A$ -Fragment beteiligt ist, jedoch nur einer der neun Lysinreste des Cytochrom  $c_{552F}$  (Lys70). Aus der Fülle dieser Daten wurde auch hier auf einen zweistufigen Prozess der Komplexbildung geschlossen, bei dem sich beide Redoxpartner durch weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen annähern und die Bildung eines effizienten ET-Komplexes durch hydrophobe Kontakte vermittelt wird.

### 1.5.2.2 ET zwischen Cytochrom $c_1$ und seinen physiologischen Redoxpartnern

Für die ET-Reaktionen der löslichen Fragmente des Cytochrom  $c_1$  ( $c_{1CF}$  und  $c_{1AF}$ , siehe Abschnitt 1.3.3) mit ihren physiologischen Redoxpartnern Cytochrom  $c_{552F}$  und Cytochrom  $c_{550}$  wurden mittels Stopped-Flow-Spektroskopie im *pre-steady state*-Bereich hohe Elektronentransferraten von  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bestimmt, die eine diffusionskontrollierte Reaktion nahe legen. Es konnte keine Präferenz des sauren Fragmentes gegenüber dem Kernfragment nachgewiesen werden, allerdings eine erhöhte Affinität des Cytochrom  $c_{550}$  gegenüber dem Cytochrom  $c_{552F}$ , was die unterschiedlichen Aufgaben innerhalb der Atmungskette von *Paracoccus* widerspiegelt (Otten, van der Oost *et al.* 2001). Für die Ionenstärkeabhängigkeit ergeben sich wie im Falle des  $c_{552F}/\text{Cu}_A$ -Redoxpaares zwei bis drei effektive Ladungen, die über Coulombkräfte miteinander wechselwirken.

### 1.5.3 Elektronentransfer löslicher Fragmente aus *T. thermophilus*

In Analogie zum *Paracoccus*-System wurde der Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette von *T. thermophilus* ebenfalls mit Hilfe von löslichen Fragmenten von Redoxproteinen untersucht. So wurde das lösliche  $\text{Cu}_A$ -Fragment der  $ba_3$ -Oxidase (Slutter, Sanders *et al.* 1996) und das lösliche Fragment des Cytochrom  $c$  des  $bc$ -Komplexes ( Cytochrom  $c_{bc}$ , siehe Abschnitt 1.4.1; (Mooser, Maneg *et al.* 2005) verwendet, um den ET zum nativen, löslichen Cytochrom  $c_{552}$  (Fee, Chen *et al.* 2000) zu untersuchen.

#### 1.5.3.1 ET zwischen Cytochrom $c_{552}$ und dem $\text{Cu}_A$ -Fragment

Aus den Kristallstrukturen der  $ba_3$ -Oxidase (Williams, Blackburn *et al.* 1999; Soulimane, Buse *et al.* 2000) und des Cytochrom  $c_{552}$  (Than, Hof *et al.* 1997) konnten die Oberflächeneigenschaften der beiden Redoxpartner abgeleitet werden. Es wurden kaum geladene Aminosäurereste auf den potentiellen Interaktionsflächen gefunden, so dass man von der Annahme ausgeht, dass die Interaktionen zwischen diesen beiden Redoxpartnern hauptsächlich hydrophober Natur sind. Des weiteren kommt hydrophoben Interaktionen bei hohen Temperaturen eine größere Bedeutung zu, da elektrostatische Wechselwirkungen hier abgeschwächt werden. Maneg *et al.* (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004) konnten zeigen, dass der ET bei niedrigen Ionenstärken sowohl für die physiologische als auch für die reverse ET-Richtung Geschwindigkeitskonstanten von etwa  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ergibt. Aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten zueinander konnte eine Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 4,8 errechnet werden, so dass die physiologische ET-Reaktion gegenüber der reversen Richtung thermodynamisch bevorzugt ist. Die Brønsted-Analyse der Ionenstärkeabhängigkeit ergab ein Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -0,57, was eine Beteiligung von weniger als einer effektiven Ladung pro Redoxpartner an der Interaktion entspricht. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls durch *chemical shift perturbation mapping*-NMR-Experimente bestätigt werden (Muresanu, Pristovsek *et al.* 2006). Zusammen mit den Rückschlüssen von Giuffrè *et al.* (Giuffrè, Forte *et al.* 1999), die zeigten, dass die  $ba_3$ -Oxidase unter *turnover*-Bedingungen maximale Aktivität bei niedrigen Ionenstärken aufweist und deswegen einen hochaffinen, elektrostatisch stabilisierten Komplex

ausschließen, und der Tatsache, dass das *Thermus* Cytochrom  $c_{552}$  ein sehr schlechtes Substrat für die  $aa_3$ -Oxidase aus *P. denitrificans* darstellt (Drosou, Dissertation 2002), lassen diese Ergebnisse auf einen durch hydrophobe Wechselwirkungen getriebenen ET schließen.

### 1.5.3.2 ET zwischen Cytochrom $c_{bc}$ und Cytochrom $c_{552}$

In einem ähnlichen kinetischen Ansatz durch Stopped-Flow-Messungen unter *pre-steady state*-Bedingungen wurde der Elektronentransfer zwischen dem Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragment des  $bc$ -Komplexes und Cytochrom  $c_{552}$  untersucht (Mooser, Maneg *et al.* 2005). Auch zwischen diesen beiden Redoxpartnern bestätigte sich die Annahme einer hydrophob gesteuerten ET-Komplexbildung. Für den ET in beiden Richtungen ergaben sich Geschwindigkeitskonstanten von etwa  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , die keine große Ionenstärkeabhängigkeit zeigten. Das Ionenprodukt  $z_A z_B$ , das aus der Brønsted-Analyse erhalten wurde, ergab sich zu -1,4, was in etwa einer effektiven Ladung pro Redoxpartner entspricht, die an der Wechselwirkung beteiligt ist. Die Gleichgewichtskonstante für diese Reaktion wurde zu 1,1 aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten berechnet, so dass beide ET-Richtungen thermodynamisch in etwa gleichwertig sind.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Untersuchung des Elektronentransfers zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans*. Basierend auf den Erkenntnissen, die durch Kristallstrukturen der Co-Komplexe des  $bc_1$ -Komplexes mit seinem gebundenen Substrat Cytochrom  $c$  aus Hefe gewonnen werden konnten, sollte die Natur des ET und die Komplexbildung zwischen diesen beiden Redoxpartnern näher beleuchtet werden. Um der transienten Natur dieser ET-Komplexe gerecht zu werden, sollte im Gegensatz zum statischen, strukturellen Kristallisationsansatz eine dynamische Vorgehensweise unter Verwendung löslicher Fragmente dieser beiden Redoxpartner gewählt werden, bei der durch Mutagenesestudien und nachfolgende biochemische und kinetische Charakterisierung diejenigen Aminosäurepositionen auf dem Cytochrom  $c_1$  identifiziert werden sollten, die an der Wechselwirkung zum Cytochrom  $c_{552}$  beteiligt sind. Da weiterhin die Struktur des ET-Komplexes zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c_{552}$  bis jetzt nicht bekannt ist, sollten durch die Einführung von Oberflächencysteinen und kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen aus nachfolgenden Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET)-Experimenten Abstandsinformationen erhalten werden, die den ET-Komplex näher charakterisieren.

Um die generelle Aussagekraft der durch die oben aufgeführten Experimente erhaltenen Erkenntnisse über den ET eines mesophilen Organismus zu überprüfen, sollte zum Vergleich der ET in einem thermophilen Organismus herangezogen werden. Hierfür sollte ein lösliches Cytochrom  $c$ -Fragment der  $caa_3$ -Oxidase aus *T. thermophilus* in Analogie zum oben genannten Ansatz kloniert, charakterisiert und in einem kinetischen Ansatz die ET-Reaktion zu potentiellen Wechselwirkungspartnern untersucht werden.

Da in dieser Arbeit methodisch mit löslichen Fragmenten als Modellsystem für ansonsten membranständige Redoxproteine oder Redoxproteinkomplexe gearbeitet wurde, sollte die Übertragbarkeit der an diesen Fragmenten gewonnenen Erkenntnisse auf einen Membranproteinkomplex überprüft werden. Hierfür sollten die Interaktionsmutationen des Cytochrom  $c_1$ -Fragmentes in einen  $bc_1$ -Komplex überführt werden, dem die für *P. denitrificans* einzigartige saure Extensionsdomäne des Cytochrom  $c_1$  fehlt, um eventuell auftretende kinetische Effekte nicht durch die hohe negative Ladungsdichte zu überlagern. Dieser  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex sollte hierfür zunächst aus Gründen der leichteren Aufreinigung mit einem His-tag versehen und die Mutationen per Restriktion aus dem Cytochrom  $c_1$ -Fragment in das *fb $c\Delta ac$* -Operon überführt werden, gefolgt von der homologen Expression, Aufreinigung und kinetischen Charakterisierung der mutierten  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplexe.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Sämtliche hier nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Roth, Merck und Sigma in *p. a.* Qualität bezogen.

Acrylamid-Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Peqlab
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Bactotrypton	Becton-Dickinson
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Complete ® Protease-Inhibitormix	Roche
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethidiumbromid	Gibco BRL
Folin-Ciocalteu	Merck
Hefeextrakt	Bectont, Dickinson & Company
Imidazol	AppliChem
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol
Kanamycindisulfat	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Natriumascorbat	Merck
Natriumdithionit (DIT)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM)	Biomol
<i>New born calf serum</i> (NCS)	Biochrom
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD <sup>+</sup> /NADH)	AppliChem
Nitroblautetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Biomol
2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Biomol
N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Oligonukleotide	Biospring
Pefabloc SC	Biomol
Pepton	Bectont, Dickinson & Company
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Hampton
Ponceau S	Merck
Pyridin	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	NEB
Rifampicin	Fluka
RNAse	AppliChem
Stigmatellin	Sigma-Aldrich
Streptomycin	AppliChem
Tetracyclin	Fluka
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Roth
X-Gal	Biomol

### 2.1.2 Fluorophore

Fluorescein-5-maleimid (F5m)	Invitrogen/Molecular Probes
Alexa Fluor Dye AF594	Invitrogen/Molecular Probes
Alexa Fluor Dye AF633	Invitrogen/Molecular Probes

### 2.1.3 Lösungen

Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Herstellung der verwendeten Lösungen ist in den Abschnitten 2.2 bis 2.4 direkt unter der zugehörigen Methode angegeben.

### 2.1.4 Chromatographiematerialien

Alle Chromatographiematerialien wurden in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Q-Sepharose <i>fast flow</i>	Amersham
Sephacryl S-100	Amersham
Superdex 75	Amersham
Sephadex G-75	Amersham
Sephadex G-25	Amersham
Sephadex G-10	Amersham

### 2.1.5 Größenstandards und Kits

Alle molekularbiologischen Kits und Größenstandards wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

#### 2.1.5.1 Größenstandards

<i>EcoRI/HindIII</i> geschnittene $\lambda$ -DNA	Herstellung im Arbeitskreis
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs (NEB)
Proteingrößenstandard Roti-Mark 10-150	Roth
Proteingrößenstandard	MBI Fermentas

#### 2.1.5.2 Kits

Miniprep-Kit	Qiagen
Gel Extraktion Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen

### 2.1.6 Proteine und Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden vom Hersteller zusammen mit den jeweils spezifischen Puffern geliefert und zu molekularbiologischen Zwecken zusammen mit diesen eingesetzt. Alle Enzyme, Antikörper und sonstigen Proteine wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.1.6.1 DNA modifizierende Enzyme

Ampligase (thermostabile DNA-Ligase)	Epicentre
<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> (CIAP)	NEB
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas
<i>Phusion</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	Finnzymes
Ribonuklease A (RNAse)	AppliChem
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	MBI Fermentas
diverse Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs

### 2.1.6.2 Antikörper

anti-Cyt <i>c</i> <sub>552</sub> , P.d. Antikörper (BE, BA)	Prof. Ludwig
anti-Cyt <i>c</i> <sub>1</sub> , P.d. Antikörper (R)	Prof. Ludwig
anti- Cyt <i>b</i> P.d. Antikörper (AE)	Prof. Ludwig
anti-ISF <sub>P.d.</sub> Antikörper (AD)	Prof. Ludwig
Protein A-Alkalische Phosphatase (A-AP)	Sigma-Aldrich
anti-His-IgG (Maus)	Sigma-Aldrich
anti-Maus-IgG (Ziege)/AP	Sigma-Aldrich

### 2.1.6.3 Sonstige Proteine

Cytochrome <i>c</i> aus Pferdeherz	Sigma-Aldrich
iso-1 Cytochrom <i>c</i> aus <i>S.cerevisiae</i>	Sigma
Lysozym	Biomol
BSA	NEB

### 2.1.7 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in 50 % Glycerin	100 µg/ml
Chloramphenicol	60 mg/ml in Ethanol	60 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in 50 % Glycerin	25 µg/ml
Rifampicin	15 mg/ml in Methanol	60 µg/ml
Streptomycin	25 mg/ml in 50 % Glycerin	25 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % Ethanol	10 µg/ml

Wässrige Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Angebrochene Aliquots wurden bei -20 °C gelagert und allenfalls 4-6 Wochen verwendet. Stammlösungen von Chloramphenicol, Rifampicin und Tetracyclin wurden jeweils frisch angesetzt, da sie in Lösung instabil sind. Des weiteren sind Rifampicin und Tetracyclin lichtempfindlich und wurden dementsprechend geschützt. Alle Stammlösungen wurden in Kultur in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, mit Ausnahme von Rifampicin, das 1:250 verdünnt wurde.

### 2.1.8 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Biospring bezogen. Die mutagenen Basentriplets der Mutagenese-Primer sind durch Fettdruck hervorgehoben.

2.1.8.1 Mutagenese-Primer Cytochrom  $c_{1CF}$  aus *P. denitrificans*

Primer	Oligonukleotidsequenz
V244Q	5' -CAG GTC TAT ACC GAG <b>CAG</b> TGC TCG GCC TGC CAC-3'
V244Q_rev	5' -GTG GCA GGC CGA GCA <b>GGT</b> CTC GGT ATA GAC CTG-3'
V244T	5' -CAG GTC TAT ACC GAG <b>ACC</b> TGC TGC GCC TGC CAC-3'
V244T_rev	5' -GTG GCA GGC CGA GCA <b>GGT</b> CTC GGT ATA GAC CTG-3'
A247N	5' -ACC GAG GTC TGC TCG <b>AAC</b> TGC CAC GGC CTG CGC-3'
A247N_rev	5' -GCG CAG GCC GTG GCA <b>GTT</b> CGA GCA GAC CTC GGT-3'
Q271C	5' -CAG CTG CCC GAA GAT <b>TGT</b> GTC CGC GCC TAT GCC-3'
E304C	5' -CCC ACC GTC AGC GGT <b>TGC</b> GGT ATG GGA CCG GAC-3'
A314S	5' -GAC CTG TCG CTG ATG <b>TCA</b> AAG GCG CGC GCC GGG-3'
A314S_rev	5' -CCC GGC GCG CGC CTT <b>TGA</b> CAT CAG CGA CAG GTC-3'
K315E	5' -CTG TCG CTG ATG GCC <b>GAG</b> GCG CGC GCC GGG TTC-3'
K315E_rev	5' -GAA CCC GGC GCG CGC <b>CTC</b> GGC CAT CAG CGA CAG-3'
K315T	5' -CTG TCG CTG ATG GCC <b>ACG</b> GCG CGC GCC GGG TTC-3'
K315T_rev	5' -GAA CCC GGC GCG CGC <b>CGT</b> GGC CAT CAG CGA CAG-3'
G319A	5' -GCC AAG GCG CGC GCC <b>GCG</b> TTC CAT GGC CCC TAC-3'
G319A_rev	5' -GTA GGG GCC ATG GAA <b>CGC</b> GGC GCG CGC CTT GGC-3'
G319S	5' -GCC AAG GCG CGC GCC <b>AGT</b> TTC CAT GGC CCC TAC-3'
G319S_rev	5' -GTA GGG GCC ATG GAA <b>ACT</b> GGC GCG CGC CTT GGC-3'
A356C	5' -GAG GAA AAG GAA GAG <b>TGT</b> GGC GCC GTG CTT TAC-3'
S378A	5' -ATG GCG GCG CCC CTC <b>GCC</b> GAC GAC CAG GTC ACC-3'
S378A_rev	5' -GGT GAC CTG GTC GTC <b>GGC</b> GAG GGG CGC CGC CAT-3'
S378F	5' -ATG GCG GCG CCC CTC <b>TTC</b> GAC GAC CAG GTC ACC-3'
S378F_rev	5' -GGT GAC CTG GTC GTC <b>GAA</b> GAG GGG CGC CGC CAT-3'
Q381V	5' -CCC CTC AGC GAC GAC <b>GTG</b> GTC ACC TAT GAG GAT-3'
Q381V_rev	5' -ATC CTC ATA GGT GAC <b>CAC</b> GTC GTC GCT GAG GGG-3'
T383C	5' -AGC GAC GAC CAG GTC <b>TGC</b> TAT GAG GAT GGC ACC-3'

2.1.8.2 Mutagenese-Primer Cytochrom  $c_{552F}$  aus *P. denitrificans*

Primer	Oligonukleotidsequenz
N3C	5' -GCG ATG GCC ATG GCC <b>TGT</b> CCC GCC GCT GGC GAG-3'
N3C_rev	5' -CTC GCC AGC GCC AGC <b>ACA</b> GGC CAT GGC CAT CGC-3'
N21C	5' -GCC TGC CAC AGG CTG <b>TGC</b> GGC AAC GAT GGC GTC-3'
N21C_rev	5' -GAC GCC ATC GTT GCC <b>GCA</b> CAG CTT GTG GCA GGC-3'
N23C	5' -AAG CTG GAC GGC <b>TGC</b> GAT GGC GTC GGC CCG-3'
N23C_rev	5' -CGG GCC GAC GCC <b>ATC</b> GCA GCC GTC CAG GTT-3'
K51C	5' -TAT TCC GAC CCG ATG <b>TGC</b> GCG CAT GGC GGC GAC-3'
K51C_rev	5' -GTC GCC GCC ATG CGC <b>GCA</b> CAT CGG GTC GGA ATA-3'
T67C	5' -CTG CAG GAA TTC CTG <b>TGC</b> AAC CCG AAA GCG GTG-3'
T67C_rev	5' -CAC CGC TTT CGG GTT <b>GCA</b> CAG GAA TTC CTG CAG-3'
N68C	5' -GAA TTC CTG ACC <b>TGC</b> CCG AAA GCG GTG GTC-3'
N68C_rev	5' -GAC CAC CGC TTT CGG <b>GCA</b> GGT CAG GAA TTC-3'
N91C	5' -GAG GAT CGC GCA <b>TGC</b> CTG ATC GCC TAT CTG-3'
N91C_rev	5' -CAG ATA GGC GAT CAG <b>GCA</b> TGC GCG ATC CTC-3'

## 2.1.8.3 Sequenzier-Primer

Primer	Oligonukleotidsequenz
T7-Prom	5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7-Term	5' -GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'



2.1.8.4 Primer zur Klonierung des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes

Primer	Oligonukleotidsequenz
Tth caa3_NcoI_forw	5' -ATA ACC ATG GCC CCC GTG GCC GAT-3'
Tth caa3_Hind_rev	5' -ACT GAA GCT TTA GAA CTT GGG CAG GGC CC-3'

2.1.8.5 Primer zur Einführung eines His<sub>10</sub>-tags in den  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex

Primer	Oligonukleotidsequenz
SOEing1	5' -CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3'
SOEing4	5' -AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'
3'-5'-CytbCterm10His	5' -GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGCTCGGCAGGATGGGT-3'
5'-3'-CytbCterm10His	5' -CATCACVATCACCATCACCATCACCATCACCATCACTAAGGAGAGGCAAC-3'
3'-5'-CytbCterm10His_ext	5' -GTTGCCTCTCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGCTCGGCAGGATGGGT-3'
5'-3'-CytbCterm10His_ext	5' -ACCCATCCTGCCGAGCATCACVATCACCATCACCATCACCATCACTAAGGAGAGGCAAC-3'

## 2.1.9 Plasmide

## 2.1.9.1 Bezogene Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Resistenz	Herkunft/Referenz
pAlter-Ex1	Mutagenesevektor, f1 <i>ori</i>	Tet (Amp)	Promega
pAlter_Cyt $c_{1CFWT}$	<i>P. denitrificans</i> Cytochrom $c_1$ core fragment NcoI/HindIII in pAlter-Ex1 kloniert	Tet (Amp)	A. Eichhorn, 2003
pBluescript	Klonierungsvektor, f1 <i>ori</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i>	Amp	Stratagene
pBR2	<i>P. denitrificans</i> <i>cycM'</i> (funktionelle Domäne des Cytochrom $c_{552}$ ) NcoI/HindIII in pET-22b(+)	Amp	B. Reincke, 1996
pEC86	Hämreifungsplasmid, <i>ccm</i> ABCDEFGH in pACYC184	Cm	(Arslan, Schulz <i>et al.</i> 1998)
pEG471	<i>fbC<math>\Delta</math>ac</i> , <i>in-frame</i> Deletion der sauren Domäne des <i>P. denitrificans</i> Cytochrom $c_1$	Sm	E. Gerhus, 1992
pET-22b(+)	Expressionsvektor, T7 Promotor, <i>peB</i> leader, <i>lac</i> operator	Amp	Novagen
pET_Cyt $c_{1CFWT}$	<i>P. denitrificans</i> Cytochrom $c_1$ core fragment NcoI/HindIII in pET-22b(+)	Amp	A. Eichhorn, 2003
pRI2	<i>broad host range</i> -Vektor, pBBR1MCS-Derivat	Sm, Cm	O.M. Richter, 1995
pSL1180	Klonierungsvektor, Superlinker, pMB1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i>	Amp	Pharmacia
pUC18	Klonierungsvektor, <i>lacZ<math>\alpha</math></i>	Amp	(Yanisch-Perron, Vieira <i>et al.</i> 1985)
RP4-4	Helferplasmid für konjugativen DNA-Transfer, IncP1, <i>tra</i> <sup>+</sup>	Amp, Tet	(Hedges and Jacob 1974)

### 2.1.9.2 Hergestellte Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Resistenz
pJJ1	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>V244Q</b>	Amp
pJJ2	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>V244T</b>	Amp
pJJ3	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>A247N</b>	Amp
pJJ4	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>A314S</b>	Amp
pJJ5	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>K315E</b>	Amp
pJJ6	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>K315T</b>	Amp
pJJ7	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>G319A</b>	Amp
pJJ8	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>G319S</b>	Amp
pJJ9	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>S378A</b>	Amp
pJJ10	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>Q381V</b>	Amp
pJJ11	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>Q271C</b>	Amp
pJJ12	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>E304C</b>	Amp
pJJ13	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>A356C</b>	Amp
pJJ14	pET-22b(+)_Cyt $c_{1CF}$ - <b>T383C</b>	Amp
pJJ15	pBR2_ <b>N23C</b>	Amp
pJJ16	pBR2_ <b>K51C</b>	Amp
pJJ17	pET-22b(+)_Cyt $c_{caa3}$ <i>NcoI/HindIII</i> kloniert	Amp
pJJ18	pRI2 mit deletierter <i>Apal</i> -Schnittstelle	Sm, Cm
pJJ19	pRI2 mit deletierter <i>Apal</i> und <i>Psyl</i> -Schnittstelle	Sm, Cm
pJJ20	pJJ19_ <i>fbCΔac</i> ( <i>SacI/HindIII</i> )	Sm, Cm

## 2.1.10 Mikroorganismen und Phagen

### 2.1.10.1 *Escherichia coli* K12

Stamm	Genetische Marker/Phänotyp	Herkunft/Referenz
BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdSB</i> ( $rB^-$ , $mB^+$ ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
AE1	BI21(DE3) : pEC86 + pET-22b(+)_ $c_{1CF}$ WT	Anna Eichhorn, 2003
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> ( $rk^-$ , $mk^+$ ) <i>relA1 supE44 λ^- Δ(lac-proAB)</i> [F', <i>traD36</i> , <i>proA</i> <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , <i>lacIqZΔM15</i> ]	(Yanisch-Perron, Vieira <i>et al.</i> 1985)
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacΔM15</i> ) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan 1983)
BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi supE Δ(lac-proAB)</i> [ <i>mutS</i> ::Tn10] [F', <i>proA</i> <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , <i>lacIqZΔM15</i> ]	(Kramer, Kramer <i>et al.</i> 1984)
ES1301 <i>mutS</i>	<i>lacZ53(Am)</i> LAM- <i>mutS</i> 201::Tn5 <i>thyA36 IN(rrnD-rrnE)1 rha-5 metB1 deoC2</i>	Stratagene

### 2.1.10.2 *Paracoccus denitrificans*

Stamm	Genetische Marker/Phänotyp	Herkunft/Referenz
MK6	Pd1222-Derivat, $ΔfbC$ ::Km	Markus Korn, 1994

### 2.1.10.3 Hergestellte Expressionsstämme

Stamm	Charakterisierung	Resistenz
JU1	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ1	Amp/Cm
JU2	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ2	Amp/Cm
JU3	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ3	Amp/Cm
JU4	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ4	Amp/Cm
JU5	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ5	Amp/Cm
JU6	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ6	Amp/Cm
JU7	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ7	Amp/Cm
JU8	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ8	Amp/Cm
JU9	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ9	Amp/Cm
JU10	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ10	Amp/Cm
JU11	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ11	Amp/Cm
JU12	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ12	Amp/Cm
JU13	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ13	Amp/Cm
JU14	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ14	Amp/Cm
JU15	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ15	Amp/Cm
JU16	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ16	Amp/Cm
JU17	BL21(DE3) : pEC86 + pJJ17	Amp/Cm
JU18	BL21(DE3) : pEC86 + pBR2_N68C	Amp/Cm
JU19	BL21(DE3) : pEC86 + pBR2_N91C	Amp/Cm

### 2.1.10.4 Bakteriophagen

Stamm	Charakterisierung	Referenz
R 408	Helferphage zur Gewinnung von ss-Phagemid-DNA	Promega

### 2.1.11 Nährmedien

Für die Herstellung von Agar-Platten wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 1,5 % Agar-Agar versetzt. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren unter der Sterilbank in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben, wenn das Medium etwa auf 40 °C abgekühlt war. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert und konnten, je nach eingesetztem Antibiotikum, 4-6 Wochen verwendet werden.

#### Luria-Bertani-Medium (LB)

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

#### Succinat-Medium (Ludwig, 1986)

50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 mM NH<sub>4</sub>Cl  
1 mM Citrat  
40 mM Succinat  
0,2 mg/L Spurenelementlösung  
pH 6,2 mit KOH

#### TY-Medium

0,8 % Pepton pH 7  
0,5 % Hefeextrakt  
0,5 % NaCl

#### Gefrierkulturmedium

2 % Pepton  
1 % Hefeextrakt  
1 % NaCl  
15 % Glycerin

#### Spurenelementlösung

100 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM CoCl<sub>2</sub>  
5 mM CuSO<sub>4</sub>  
90 mM FeCl<sub>3</sub>  
5 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
25 mM ZnCl<sub>2</sub> in 18 % HCl  
pH 6,2 mit KOH

## 2.1.12 Anzucht und Lagerung

### 2.1.12.1 *Escherichia coli*

*E. coli*-Flüssigkulturen wurden über Nacht im Luftbadschüttler bei 37 °C und 240 rpm angezogen. Kulturen auf LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und können im Allgemeinen bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Für die Herstellung von Gefrierkulturen wurden 1,5 ml-Übernachtskulturen pelletiert, die Zellpellets in Gefrierkulturmedium vorsichtig resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.1.12.2 *Paracoccus denitrificans*

Kulturen von *P. denitrificans* wurden im Luftbadschüttler bei 32 °C und 240 rpm entweder in LB oder Succinatmedium angezogen. Kulturen auf Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 32 °C inkubiert und bis zu einer Woche bei RT gelagert. *P. denitrificans*-Gefrierkulturen wurden wie *E. coli*-Gefrierkulturen hergestellt. Für *Paracoccus*-Großanzuchten wurde zunächst eine 100 ml-LB-Vorkultur von einer Platte angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann eine 2 L-LB-Vorkultur 5 %ig angeimpft und nach 24 h in je 2,5 L -Kulturen Succinatmedium 4 %ig überimpft und bei 32 °C und 170 rpm inkubiert. Die Ernte erfolgte nach weiteren 20-24 h bei einer OD<sub>600</sub> von 3-5.

## 2.1.13 Programme und Datenbanken

<b>Buffer Design</b>	<a href="http://www.bi.umist.ac.uk/users/Buffers/Makebuf.asp">http://www.bi.umist.ac.uk/users/Buffers/Makebuf.asp</a>
<b>Clone Manager</b>	Scientific & Educational Software
<b>ClustalX v1.81</b>	(Thompson, Higgins <i>et al.</i> 1994)
<b>CPHmodels</b>	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/">www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/</a>
<b>Esypred3D</b>	(Lambert, Leonard <i>et al.</i> 2002)
<b>ExpASY Molecular Biology Server</b>	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
<b>EndNote 9.0</b>	Thompson ResearchSoft
<b>Genbank</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>
<b>HADDOCK</b>	(Dominguez, Boelens <i>et al.</i> 2003; van Dijk, Boelens <i>et al.</i> 2005)
<b>Jasco Spectra Manager</b>	Jasco
<b>Jigsaw3D</b>	(Bates and Sternberg 1999; Bates, Kelley <i>et al.</i> 2001; Contreras-Moreira, Fitzjohn <i>et al.</i> 2002)
<b>OriginPro 7.5</b>	OriginLab Corporation
<b>Primer Generator</b>	<a href="http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi">http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi</a>
<b>Protein Data Bank</b>	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>
<b>PyMOL</b>	Delano Scientific
<b>Peptidcutter</b>	<a href="http://www.expasy.org/tools/peptidecutter">http://www.expasy.org/tools/peptidecutter</a>
<b>SIFitting 5.0</b>	University of Arkansas
<b>Swissmodel</b>	(Peitsch, Wells <i>et al.</i> 1995; Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp <i>et al.</i> 2003)
<b>UV-Visible Chemstation</b>	Agilent technologies 95-00
<b>VMD</b>	<a href="http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/">http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/</a>
<b>WebLab ViewerPro 3.7</b>	Molecular Simulations Inc.

## 2.2 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)

Die DNA-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräp) wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly 1979) durchgeführt, die auf alkalischer Lyse der Zellen und anschließender Fällung der Plasmid-DNA mit Ethanol basiert. Hierzu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 1 min bei 13000 rpm pelletiert und in 100 µl TEG-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl frisch angesetzter NaOH/SDS-Lösung. Natronlauge lysiert dabei zusammen mit dem SDS die bakteriellen Zellmembranen und denaturiert die DNA. Die Eppendorf-Gefäße wurden mehrmals invertiert (nicht gevortext, um Scherkräfte, die die genomische DNA fragmentieren könnten, zu vermeiden) und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung hinzugegeben und invertierend gemischt, was den alkalischen pH-Wert der Lösung neutralisiert und die genomische DNA, die aufgrund ihrer Größe nicht mehr korrekt renaturieren kann, zusammen mit DNA-assoziierten Proteinen und SDS in einem unlöslichen Komplex ausfällt. Anschließend wurde zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C), um Zelltrümmer, Proteine, denaturierte chromosomale DNA und SDS zu pelletieren. Der Überstand wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, gevortext und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um weitere Proteine zu extrahieren. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit ihr die Chloroformextraktion wiederholt. Danach wurde die wässrige Phase mit 2 Volumina 100 % Ethanol versetzt, gevortext und für 20 min bei -20 °C die Plasmid-DNA gefällt. Durch anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min wurde die präzipitierte Plasmid-DNA sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen, ohne es wieder zu resuspendieren, und erneut zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und die verbliebene RNA durch Zugabe von 1 µl RNase (2 mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37 °C abgebaut. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

<u>Puffer I (TEG-Puffer)</u>	<u>Puffer II (NaOH/SDS)</u>	<u>Puffer III (KAc-Lösung)</u>	<u>Chloroform/Isoamylalkohol</u>
25 mM Tris/HCl pH 8	0,2 M NaOH;	3 M Kaliumacetat	24:1 (v/v)
10 mM EDTA	1 % SDS w/v	11,5 % Eisessig v/v	
50 mM Glucose		pH 5 (4 °C)	

### 2.2.2 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *P. denitrificans* wurde eine 50 ml-Übernachtskultur auf Eis abgekühlt, in ein Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (Megafuge, 15 min, 6000 rpm) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 20 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, pH 8) vollständig resuspendiert und unter Schwenken 2 ml einer 20 % SDS-Lösung (w/v) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei 65 °C im Rollerschrank inkubiert und

anschließend unter Schütteln 6 ml einer 5 M NaClO<sub>4</sub>-Lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde mit 7 ml Chloroform bei 45 °C im Rollerschrank vermischt, bis beide Phasen emulgiert waren. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (Megafuge, 6000 rpm, 30 min, RT), wonach die wässrige Phase ohne die trübe Interphase abgenommen und in einem neuen Falcon-Röhrchen mit 0,7 Vol Isopropanol überschichtet wurde. Durch leichtes Schwenken wurden beide Phasen vermischt und das sich bildende fädige DNA-Präzipitat an einem Glasstab aufgespult oder mit einer Pipette in ein frisches Röhrchen überführt. War dies nicht möglich, konnte die DNA auch durch Zentrifugation sedimentiert werden. Anschließend wurde die DNA mit 4,9 ml TE-Puffer und 0,1 ml 20 % SDS versetzt und bei 68 °C vollständig wieder gelöst. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte ein RNase-Verdau (20 µl/ml) für 20 min bei 37 °C, eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung (300 mM Natriumacetat, 2 Vol Ethanol) mit abschließender Zentrifugation. Die pelletierte genomische DNA wurde unter leichtem Schwenken in 1 ml TE-Puffer bei 65 °C rückgelöst und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde normalerweise in einem 20 µl-Ansatz durchgeführt, wobei 100-300 ng Plasmid-DNA eingesetzt wurden. Die Menge der Restriktionsenzyme richtete sich nach der Menge der eingesetzten DNA und betrug für DNA-Mengen unter 500 ng meist 2-3 Units. Als Puffer wurden die nach Herstellerangaben em*PF*Ohlenen und mitgelieferten 10x-Puffer auf die entsprechende Verdünnung gebracht und der gesamte 20 µl-Ansatz für eine Stunde bei der für die gewählten Restriktionsenzyme optimalen Temperatur inkubiert. Wenn sich an die Restriktion noch weitere enzymatische Behandlungen anschlossen, wurden die Restriktionsenzyme für 10 min bei 65 °C inaktiviert. War dies nicht der Fall, wurde die Restriktion durch Zugabe von ¼ Vol DNA-Probenpuffer gestoppt und die Probe konnte entweder direkt zur elektrophoretischen Trennung eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente in Agarose-Gelen von 0,7 bis 2 % (w/v). Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge an Agarose in TBE-Puffer in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf Handwärme wurden 5 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Lösung hinzugegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Die Lösung wurde in eine abgedichtete und mit Kämmen für die Geltaschen versehene Flachbettkammer gegossen und härtete innerhalb von 30 min aus. Die Kämmen wurden vorsichtig aus dem erkalteten Gel entfernt und dieses mit den Taschen in Richtung Kathodenseite in eine Elektrophoresekammer überführt, welche mit TBE-Puffer gefüllt wurde. Die DNA-Proben (25 µl) konnten nun auf das Gel aufgetragen werden, als Größenstandard wurde meist *EcoRI/HindIII*-geschnittene λ-DNA verwendet (400 ng/20 µl). Der Lauf erfolgte bei konstanter Feldstärke von 5 V/cm Elektrodenabstand. Zur Detektion wurde das Gel mit UV-Licht

durchstrahlt, welches das interkalierende Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt. Für analytische Zwecke wurde „hartem“ UV-Licht von 254 nm, für präparative Zwecke wurde UV-Strahlung von 365 nm verwendet, um die DNA nicht zu schädigen.

<b>DNA-Probenpuffer</b>	<b>TBE-Puffer (10x)</b>	<b>Ethidiumbromid-Lösung</b>
0,02 % Bromphenolblau	1 M Tris pH 8	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
30 mM EDTA	1 M Borsäure	
5 % Glycerin in TBE-Puffer	25 mM EDTA	

### 2.2.5 Gelextraktion

Unter Bestrahlung mit UV-Licht von 365 nm wurden die zu extrahierenden DNA-Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorher tariertes Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Gelextraktion wurde das Gelextraktion-Kit der Firma Qiagen verwendet und die DNA mit 30-50 µl 1:10 verdünntem EB-Puffer eluiert.

### 2.2.6 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem 20 µl-Ansatz bestehend aus 2 µl 10x T4-Ligationspuffer, 1 µl T4-Ligase (1 U) und etwa äquimolaren Mengen an Vektor und Insert für eine Stunde bei 22 °C. Die Ligase wurde anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Für eine Ligation mit kohäsiven Enden (*sticky ends*) wurden 25 ng Vektor eingesetzt, für eine *blunt end*-Ligation mindestens 200 ng Vektor, wobei das Insert in dreifachem Überschuss eingesetzt und der Ansatz auch über Nacht inkubiert wurde. Zur Erhöhung der Ligationsausbeute wurde zum einen das Volumen auf 10 µl reduziert oder die Viskosität durch Zugabe von 10 % PEG 4000 erhöht. Des weiteren verringerte die Zugabe von Hexaminkobaltchlorid (HCTC) die Möglichkeit einer Religation des Vektors, indem es in einer Lösung mit geringer Ionenstärke die DNA-Fragmente in einer gestreckten Konformation hält, die durch Zugabe von KCl wieder rückgängig gemacht werden kann. Um intramolekulare Reaktionen zu verhindern, wurden Vektor und Insert durch CIAP-Behandlung dephosphoryliert.

### 2.2.7 Herstellung kompetenter Zellen

#### 2.2.7.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen

Zur Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen wurde eine *E. coli*-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>546</sub> = 0,3-0,4) für 15 min auf Eis abgekühlt und durch anschließende Zentrifugation (Megafuge, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in ½ Kulturvolumen eiskaltem TCM-Medium resuspendiert und für eine Stunde unter gelegentlichem Umschwenken auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (Megafuge, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 1/10 Kulturvolumen eiskalter TCM/Glycerin-Lösung (4:1, v/v) resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden in einer Testtransformation mit einem gut untersuchten Standardplasmid (z.B. pUC18) bekannter Konzentration auf ihre Transformationseffizienz und auf Platten mit

verschiedenen Antibiotika ohne vorherige Transformation auf Kontamination getestet. Die Lagerung erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**TCM-Medium**

10 mM Tris pH 7 ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ )  
 100 mM  $\text{CaCl}_2$   
 10 mM  $\text{MgCl}_2$

**2.2.7.2 Herstellung RbCl-kompetenter Zellen**

Die Herstellung von RbCl-kompetenten Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan 1983) Mit einer 2 ml-Übernachtskultur wurde 0,5 %ig eine 50 ml LB-Kultur angeimpft und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 240 rpm im Luftbadschüttler bis zu einer  $\text{OD}_{550} = 0,5$  inkubiert. Dann wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation (Megafuge, 10 min, 2000 g,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) geerntet. Das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml eiskaltem TFB-I-Puffer resuspendiert, dann mit weiteren 6,5 ml TFB-I-Puffer versetzt und durch Invertieren gemischt. Die Zellen wurden für eine Stunde auf Eis inkubiert und danach abzentrifugiert (Megafuge, 10 min, 3000 g,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem TFB-II-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis zu 100  $\mu\text{l}$  aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Wie oben beschrieben, wurde eine Testtransformation durchgeführt und durch die Verwendung verschiedener Antibiotika auf Kontamination getestet.

**TFB-I-Puffer**

30 mM Kaliumacetat pH 5,8  
 10 mM  $\text{CaCl}_2$   
 50 mM  $\text{MnCl}_2$   
 100 mM RbCl  
 15 % Glycerin

**TFB-II-Puffer**

10 mM MOPS/KOH pH 6,8  
 10 mM RbCl  
 75 mM  $\text{CaCl}_2$   
 15 % Glycerin

**TE-Puffer**

10 mM Tris/HCl pH 7,5  
 1 mM EDTA

**2.2.8 Transformation**

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde für 10 bis 20 Minuten auf Eis aufgetaut, mit 50 ng eines Ligationsproduktes oder 1 ng einer Plasmidpräparation versetzt und durch langsames Rühren mit der Pipettenspitze vorsichtig durchmischt. Danach wurde der Ansatz für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 60 Sekunden bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad ein Hitzeschock durchgeführt und die Zellen wieder auf Eis gestellt. 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium wurden in einem Kulturröhrchen vorgelegt, der Transformationsansatz dazugegeben und für 30 bis 60 Minuten, je nach auszubildender Antibiotikumresistenz, bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz pelletiert (6000 rpm, 1 min) und zu 10 % und 90 % auf Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

**2.2.9 Phosphorylierung von Oligonukleotiden**

Für die Phosphorylierung von Oligonukleotiden wurden in einem 20  $\mu\text{l}$ -Ansatz 100 pmol des zu phosphorylierenden Primers mit 2  $\mu\text{l}$  Polynukleotidkinase-10x-Reaktionspuffer, 4  $\mu\text{l}$  ATP-Lösung (5 mM), 1  $\mu\text{l}$  T4-Polynukleotidkinase und der



entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O gemischt, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 70 °C inaktiviert.

## 2.2.10 Gerichtete Mutagenese

### 2.2.10.1 *Altered-sites*-Mutagenese

Für die Mutagenese nach der *Altered-sites*-Methode (Promega) wurde der Mutagenesevektor pAlter-Ex1 verwendet. Dieser trägt, neben einer Tetracyclinresistenz, ein durch Rasterschub inaktiviertes Ampicillin-Resistenzgen und einen *fl ori*, der dem Vektor die Funktion eines Phagemids gibt. Mit Hilfe eines Helferphagen (hier R 408) wurde der Vektor in seiner für die Mutagenese relevanten Einzelstrangform gewonnen. Hierzu wurde von einer 2 ml-Vorkultur eine 20 ml-LB/Tet-Kultur 1,5 % angeimpft und 30 min bei 37 °C und 240 rpm geschüttelt. Dann erfolgte die Infektion mit dem Helferphagen. R408 infiziert nur Bakterienstämme, die das F-Plasmid tragen und repliziert sein Genom und das Phagemid über den *fl ori* in einzelsträngiger Form. Die Einzelstrang-DNA wird dann in Phagenpartikel verpackt und aus der Zelle ausgeschleust. Nach Wachstum über Nacht wurden die Zellen durch zweimalige Zentrifugation (Sorval, SS34-Rotor, 15 min bei 10000 rpm und 4 °C) entfernt und der Überstand, in dem sich die ausgeschleusten Phagenpartikel befinden, mit ¼ Vol Phagenpräzipitationslösung versetzt. Die Fällung der Phagenpartikel erfolgte für 30 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4 °C). Das ss-DNA-Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes an der Luft getrocknet. Das getrocknete ss-DNA-Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und der Erfolg der Einzelstrangpräparation anhand eines 1 %igen Agarosegels überprüft. Hierbei war zu beachten, dass Einzelstrang-DNA ein anderes Laufverhalten aufweist als Doppelstrang-DNA der gleichen Größe.

Das Prinzip der *Altered-sites*-Mutagenese besteht darin, dass neben dem mutagenen Oligonukleotid, welches die gewünschte Mutation in das Zielgen einbringt, gleichzeitig ein *Amp-repair*-Oligonukleotid zum Einsatz kommt, welches die Rasterschubinaktivierung des Ampicillinresistenzgens rückgängig macht. Der mutagene Primer wird in fünffachem Überschuss zum *Amp-repair*-Oligo eingesetzt, so dass die Wahrscheinlichkeit sehr groß ist, dass bei Wiedererlangen der Ampicillinresistenz, die als Selektionsmarker dient, auch die gewünschte Mutation eingeführt wurde.

Für die Mutagenese wurden etwa 100 ng ss-DNA als *Template* eingesetzt. In einem 20 µl-Ansatz wurde das mutagene Oligonukleotid in einem molaren Verhältnis von 25:1 zum *Template* und das *Amp-repair*-Oligonukleotid in einem Verhältnis von 5:1 zum *Template* in Annealing-Puffer eingesetzt, so dass das mutagene Oligonukleotid in fünffachem Überschuss zum *Amp-repair*-Oligonukleotid vorlag. Der Annealing-Ansatz wurde für 5 min bei 80 °C inkubiert, dann langsam in einem Heizblock auf ungefähr 30 °C abgekühlt und anschließend auf Eis gestellt.

Für den 30 µl-Synthese-Ansatz wurden 3 µl 10x-Synthesepuffer, der die vier verschiedenen dNTPs enthielt, T4-DNA-Polymerase (10 U) und T4-DNA-Ligase (3 U)

hinzugegeben, wobei darauf zu achten war, dass diese Reihenfolge unbedingt eingehalten wurde, da die T4-DNA-Polymerase in Abwesenheit von dNTPs eine ausgeprägte Exonuclease-Aktivität besitzt. Der Synthese-Ansatz wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert.

Die Hälfte des Synthese-Ansatzes wurde anschließend in den reparaturdefizienten *E. coli* Stamm BMH 71-18 *mutS* oder ES1301 *mutS* transformiert, in dem das Plasmid über Nacht (Wachstum und Selektion über Amp/Tet) repliziert und anschließend aus dieser 2 ml-Kultur isoliert wurde, um weitere *second-site* Mutationen zu verhindern. Das mutagene Plasmid wurde in JM109 oder DH5 $\alpha$  retransformiert und auf LB/Amp-Platten klonal vereinzelt. Klone dieser Vereinzellung wurden, wenn möglich, durch Restriktion und anschließende Sequenzierung überprüft.

<u>Phagenpräzitationslösung</u>	<u>Annealing-Puffer (10x)</u>	<u>Synthese-Puffer (10x)</u>
3,75 M Ammoniumacetat	200 mM Tris/HCl pH 7,5	100 mM Tris/HCl pH 7,5
20 % PEG 8000	100 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM dNTPs
pH 7,5	500 mM NaCl	10 mM ATP
		20 mM DTT

### 2.2.10.2 QuikChange-Mutagenese

Der *QuikChange*-Mutageneseansatz (Stratagene) bedient sich des Thermocyclings und benötigt zwei komplementäre mutagene Primer. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer einfachen Handhabung und darin, dass das zu mutierende Gen schon im Expressionsplasmid vorliegen kann und nicht mehr umklont werden muss.

Es wurde ein leicht modifiziertes Mutagenese-Protokoll verwendet. Für den Mutagenese-Ansatz wurden ca. 50 ng DNA-*Template*, 2,5  $\mu$ l 10x DNA-Polymerase-Puffer, 10  $\mu$ l dNTPs (2 mM), je 10 pmol der phosphorylierten, mutagenen Primer, 2,5  $\mu$ l einer 5 mM NAD<sup>+</sup>-Lösung sowie 1  $\mu$ l *Pfu*-DNA-Polymerase und 1  $\mu$ l Amp-Ligase (thermostabile DNA-Ligase) in PCR-Schraubdeckelgefäßen eingesetzt und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 25  $\mu$ l Endvolumen gebracht. Das *Template* wurde für 1 min bei 95 °C im Thermocycler denaturiert. Die Anlagerung der Primer erfolgte für 1 min bei 50-55 °C, abhängig von Primerlänge und Nukleotidsequenz. Die Synthesereaktion verlief bei 65 °C, wobei die an das *Template* angelagerten Primer durch die *Pfu*-Polymerase verlängert wurden. Die Dauer der Synthese richtete sich hierbei nach der verwendeten DNA-Polymerase und der *Templatelänge* (für die *Pfu*-DNA-Polymerase wurden 2 min pro Kilobase veranschlagt). Die thermostabile Amp-Ligase verknüpft nach beendeter Elongation das verlängerte 3'-Ende mit dem 5'-Ende des Primers und führt den Ringschluss herbei. Die Temperaturschritte wurden in 30 Zyklen wiederholt. Die Aufreinigung der amplifizierten Plasmid-DNA erfolgte über das QiaQuick Gelextraktion-Kit, wobei die DNA mit 30  $\mu$ l 1:10 verdünntem EB-Puffer eluiert wurde. Ein anschließender Verdau mit *DpnI* (25  $\mu$ l PCR-Gemisch, 1  $\mu$ l *DpnI* und H<sub>2</sub>O ad 40  $\mu$ l; 2 h bei 37 °C und anschließender Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C) führte zum Abbau der parentalen, nicht-mutierten Plasmid-DNA, da *DpnI* selektiv nur methylierte DNA schneidet. Nach Transformation in JM109 oder DH5 $\alpha$  und klonaler Vereinzellung wurden Einzelkolonien kultiviert, die Plasmid-DNA isoliert und der

Erfolg der Mutagenese, wenn möglich, über einen Restriktionsverdau überprüft und durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

### 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Scientific Research und Developement GmbH nach der Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren durchgeführt. Dafür wurde die DNA mit dem Qiagen Miniprep-Kit isoliert und mit entsprechenden Sequenzier-Primern an die Firma gegeben. Für *low copy*-Plasmide wurde in einigen Fällen das zu sequenzierende Fragment vorher per PCR amplifiziert.

### 2.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki, Gelfand *et al.* 1988) angewendet. Hierbei wurden für die Amplifikation von Plasmid-DNA typischerweise 1-2 ng als *Template* eingesetzt, des weiteren 10-20 pmol *forward*- und *reverse* Primer, 100 µM dNTPs, 2,5 U Polymerase, 5 µl Polymerase-10x-Puffer und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Als Polymerase wurde in den meisten Fällen *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, die eine *proofreading*-Funktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) besitzt und etwa 500 bp/min synthetisieren kann. Der PCR-Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert und erst bei einer Temperatur von 95 °C in den Thermocycler gestellt. Als erster Schritt der PCR erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für drei Minuten, um zu gewährleisten, dass das DNA-*Template* vollständig denaturiert vorlag. Für die nachfolgenden Denaturierungsschritte wurde eine Dauer von 30-60 sec veranschlagt. Nach der Denaturierung erfolgte das Primer-Annealing für 30-60 sec bei einer Temperatur zwischen 40 und 70 °C, abhängig von der jeweiligen Primerlänge und Basenzusammensetzung. Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit dem Programm CloneManager ermittelt und die Annealing-Temperatur etwa 10 °C unterhalb dieser angesetzt. Die Elongation erfolgte dann bei der für die *Pfu*-Polymerase optimalen Temperatur von 72 °C, wobei sich die Dauer der Elongationsphase nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes richtete. Diese Schritte wurden typischerweise 30 mal wiederholt. Abschließend erfolgte zusätzlich eine zeitlich ausgedehnte Elongationsphase, um zu gewährleisten, dass die Polymerase alle Elongationsschritte vollständig beendet. Die folgende Tabelle fasst das Temperatur-Zeit-Profil einer typischen PCR zusammen:

**Tabelle 2.1: Temperatur-Zeit-Profil einer typischen PCR**

Die Denaturierung erfolgt bei 95 °C, die Elongation bei 72 °C (Temperaturoptimum der *Pfu*-Polymerase). Die Annealing-Temperatur hängt von der Primerlänge und der Basenzusammensetzung ab.

Phase	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Denaturierung	3	95	1
Denaturierung	0,5-1	95	
Annealing	0,5-1	40-70	30
Elongation	x	72	
finale Elongation	5	72	1

Für die Einführung eines His-tags an den C-Terminus des Cytochrom *b* des *bc<sub>1</sub>Δac*-Komplexes wurde die sogenannte SOEing-PCR (*splicing by overlap extension*) unter Verwendung der *Phusion*-Polymerase durchgeführt (siehe Ergebnisse 3.9.1). Die Protokolle für die PCRs SOEing1 bis SOEing3 sind nachfolgend angegeben:

**Tabelle 2.2: PCR-Protokolle für SOEing1- und SOEing2-PCR**

SOEing1- und SOEing2-Protokoll zur Einführung des His-tags in das *fbcΔac*-Operon (Details siehe 3.9.2)

SOEing1	SOEing2	Ansatz Komponente	PCR-Programm			
			Funktion	Temp.	Zeit	Zyklen
10 µl	10 µl	<i>Phusion</i> Puffer HF	Denaturierung	98 °C	3 min	1
2,5 µl	2,5 µl	Primer P1, P2 (10 µM)	Denaturierung	98 °C	30 s	
2,5 µl	2,5 µl	Primer S1, S2 (10 µM)	Annealing	50 °C	1 min	30
1 µl	1 µl	pJJ21- <i>Template</i> (2 ng/µl)	Synthese	72 °C	20 s	
28 µl	28 µl	H <sub>2</sub> O	Denaturierung	98 °C	30 s	1
5 µl	5 µl	dNTPs (2 µM)	Annealing	50 °C	1 min	
1 µl	1 µl	<i>Phusion</i> Polymerase (1:4 verd.)	Synthese	72 °C	3 min	

**Tabelle 2.3: PCR-Protokoll für SOEing3-PCR**

SOEing3-Protokoll zur Einführung des His-tags in das *fbcΔac*-Operon (Details siehe 3.9.2)

SOEing3	Ansatz Komponente	PCR-Programm			
		Funktion	Temp.	Zeit	Zyklen
10 µl	<i>Phusion</i> Puffer HF	Denaturierung	98 °C	3 min	1
2,5 µl	Primer P1 (10 µM)	Denaturierung	98 °C	30 s	
2,5 µl	Primer P2 (10 µM)	Annealing	50 °C	1 min	15
4 µl	SOEing1-Fragment (587 bp)	Synthese	72 °C	40 s	
4 µl	SOEing2-Fragment (1287 bp)	Denaturierung	98 °C	30 s	1
21 µl	H <sub>2</sub> O	Annealing	50 °C	1 min	
5 µl	dNTPs (2 µM)	Synthese	72 °C	3 min	
1 µl	<i>Phusion</i> Polymerase (1:4 verd.)				

### 2.2.13 Triparentales Mating (Konjugation)

Da *P. denitrificans* keine natürliche Kompetenz besitzt und auch mit den herkömmlichen Verfahren nicht künstlich kompetent gemacht werden kann, kann *Paracoccus* auch nicht zur Aufnahme von DNA transformiert werden. Man bedient sich deshalb der Methode der Konjugation, die hier im Besonderen durch einen Helferstamm vermittelt wurde (Triparentales Mating, *triple mating*). Der *E. coli*-Helferstamm besitzt das mobilisierbare Plasmid RP4-4, welches die benötigten *tra*-Gene enthält und per Konjugation in den *E. coli*-Donorstamm (DH5α) geschleust wird. Dort mobilisiert es das Zielplasmid und überträgt dieses über ein weiteres Konjugationsereignis in den *Paracoccus*-Akzeptorstamm.

Für das *mating* wurden die drei Stämme aus 2 ml-ÜNK abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 6000 rpm) und in jeweils 500 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des *E. coli* Donor- und des Helferstammes und 300 µl des *P. denitrificans* Akzeptorstammes vermischt und abzentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden abgenommen, die pelletierten Zellen in den restlichen 100 µl resuspendiert und die Zellsuspension auf eine LB-Agar-Platte ohne Antibiotikum aufgetropft. Diese wurde dann für 6-12 h bei 32 °C im Brutschrank inkubiert, wobei die Konjugation stattfindet. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Mischkultur von der

Platte abgenommen, in 1 ml LB-Medium resuspendiert und Verdünnungen von 1:4 bis 1:32 hergestellt, die dann zu je 100 µl auf Selektionsplatten ausplattiert wurden. Die Selektionsplatten enthielten Antibiotika-Kombinationen, die den *E. coli* Donor- und Helferstamm abtöteten und die *Paracoccus*-Zellen auf Anwesenheit des zu übertragenden Plasmids selektierten. Einzelne Kolonien wurden auf Erhaltungsplatten umgestrichen und kultiviert. Von diesen konnten Flüssigkulturen angeimpft und über Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse der Erfolg des *matings* überprüft werden.

### 2.2.14 Heterologe Expression in *E. coli*

Zur heterologen Überexpression der klonierten Cytochrome aus *P. denitrificans* und *T. thermophilus* wurde ein durch IPTG-induzierbares T7-Expressionssystem gewählt. Komponenten dieses Expressionssystems sind der Vektor pET-22b(+) und der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (beide Novagen). Dieser Stamm trägt in seinem Genom den lysogenen Phagen DE3 stabil integriert. Auf dem Phagengenom befindet sich das Gen für die T7-RNA-Polymerase hinter dem *lac*-Promotor für die bakterielle RNA-Polymerase und dem *lac*-Operator, der durch den *lacI*-Repressor kontrolliert wird. Das Gen für den *lacI*-Repressor befindet sich auf dem Bakteriengenom und wird konstitutiv abgelesen. Das zu exprimierende Zielgen ist in den Vektor pET-22b(+) hinter den starken T7-Promotor kloniert, der ebenfalls unter der Kontrolle des *lac*-Operators steht und durch den *lacI*-Repressor blockiert wird. Eine zweite Kopie des *lacI*-Repressor-Gens befindet sich direkt auf dem pET-Vektor. Erfolgt nun die Induktion durch IPTG, bindet dieses künstliche Allolactose-Analogon an den *lacI*-Repressor und schaltet dadurch sowohl im *E. coli*-Genom den bakteriellen Promotor vor dem T7-RNA-Polymerase-Gen als auch auf Plasmid-Ebene den T7-Promotor vor dem Zielgen frei. Jetzt wird über die bakterielle RNA-Polymerase das T7-RNA-Polymerase-Gen abgelesen und diese exprimiert, die dann ihrerseits an den starken viralen T7-Promotor vor dem Zielgen bindet und dieses nun transkribieren kann. Durch den starken T7-Promotor und die effiziente virale T7-RNA-Polymerase werden hohe Transkriptionsraten erzeugt und das System zweifach kontrolliert: auf genomischer Ebene durch die zeitlich vorgeschaltete Transkription der T7-RNA-Polymerase durch die bakterielle RNA-Polymerase, und auf Plasmid-Ebene durch den T7-Promotor, der durch die bakterielle RNA-Polymerase nicht erkannt wird. Als gemeinsamer Induktor fungiert IPTG. Des Weiteren geht dem klonierten Zielgen eine *pelB*-Leader-Signalsequenz voraus, die eine Signalsequenz für den Transport des Zielproteins ins Periplasma darstellt. Nur im oxidierenden Milieu des Periplasmas kann der kovalente Häm-Einbau ins Apoprotein stattfinden und hier wird die *pelB*-Sequenz durch die Leader-Peptidase auch wieder abgespalten.

Da *E. coli* unter aeroben Bedingungen in nur geringem Umfang *c*-Typ Cytochrome exprimiert, wurde zusätzlich zum Expressionsvektor und Expressionsstamm das Hämreifungsplasmid pEC86 (Arslan, Schulz *et al.* 1998) verwendet, das durch sein *ccm*ABCDEF<sub>GH</sub>-Gencluster (*ccm* = *cytochrome c maturation*) zusätzlich alle Proteine zum kovalenten Einbau des Häms in das Apoprotein in *trans* bereitstellt.

### 2.2.14.1 Testexpression des Cytochrom $c_{1CF}$ aus *P. denitrificans*

Um vorab zu testen, ob und unter welchen Bedingungen ein Expressionsstamm das gewünschte Zielprotein überexprimiert, wurde eine Testexpression in kleinem Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden kompetente BL21(DE3)-Zellen hergestellt und anschließend mit dem pET-Vektor transformiert. Die Selektion und nachfolgende Kultivierung erfolgten über die pET-Ampicillinresistenz. Diese Zellen wurden nun ihrerseits kompetent gemacht, pEC-86 cotransformiert, über Amp/Cm auf das Vorhandensein beider Plasmide selektiert und klonal vereinzelt. Diese sequentielle Transformation wurde durchgeführt, weil eine gleichzeitige Cotransformation mit beiden Plasmiden zwar das gewünschte Ergebnis brachte, dass beide Plasmide in BL21 vorlagen, aber alle nachfolgenden Expressionsversuche scheiterten. Mehrere Klone wurden in 2,5 ml-LB-Flüssigkulturen, die sowohl Ampicillin (100 µg/ml) als auch Chloramphenicol (60 µg/ml) enthielten, von Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurden diese Kulturen mit 1 Volumen LB-Medium verdünnt, die entsprechende Menge an Antibiotika zugegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,4 mM IPTG und die Expression für 3 Stunden bei 37 °C. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und über einen groben, optischen Vergleich der Farbe des Zellpellets entschieden, welcher Klon für eine Anzucht in großem Maßstab in Frage kommt. Bei erfolgreicher Expression weisen die Zellpellets aufgrund des erhöhten Gehalts an exprimiertem Cytochrom  $c_1$  eine rötliche Färbung auf. Die positiven Klone wurden auf Amp/Cm-Erhaltungsplatten überimpft und von ihnen Gefrierkulturen angelegt.

### 2.2.14.2 Testexpression des Cytochrom $c_{552F}$ aus *P. denitrificans*

5 ml-LB/Amp/Cm-Kulturen wurden aus einer Gefrierkultur des  $c_{552}$ -Expressionstammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen, die Zelldichten von ungefähr  $OD_{600} \sim 3$  aufwiesen, mit 0,4 mM IPTG induziert und für 3 h bei 37 °C zur Expression inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (Megafuge, 5 min bei 6000 rpm und 4 °C) pelletiert und die Farbe der Zellpellets verglichen. Da die  $c_{552}$ -Expression sich als sehr zuverlässig erwies, wurde vor Großanzuchten meistens auf eine vorherige Testexpression verzichtet.

### 2.2.14.3 Testexpression des Cytochrom $c_{caa3}$ aus *T. thermophilus*

Für die Testexpression des in dieser Arbeit klonierten löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragment aus *T. thermophilus* wurde über Tag eine LB/Amp/Cm-Vorkultur von Platte angeimpft und bei 37 °C wachsen gelassen. Abends wurden dann vier 50 ml-LB/Amp/Cm-Kulturen 1 %ig aus der Übertagkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen konnten die Zellen durch Zentrifugation geerntet werden. Eine Induktion durch IPTG war nicht notwendig.

#### 2.2.14.4 Expression des *P. d.* Cytochrom $c_{1CF}$ in großem Maßstab

Für eine Anzucht in großem Maßstab wurden 20-40 Liter LB-Medium in 5 L-Kolben zu je 2,5 L vorbereitet und autoklaviert. Eine 100 ml-LB/Amp/Cm-Vorkultur wurde morgens von einer Platte mit frisch pEC86-transformierten und getesteten Zellen angeimpft und über Tag bei 37 °C kultiviert. Abends wurden dann 2,5 L LB-Kulturen mit Ampicillin und Chloramphenicol (100 µg/ml Amp, 60 µg/ml Cm) versetzt und 1 %ig aus der Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 150 rpm bis zu Zelldichten von  $OD_{600} \sim 3$ . Am nächsten Morgen wurden die Kulturen 1:1 mit LB-Medium verdünnt und die entsprechenden Antibiotika nachgelegt. Es folgte eine Regenerationsphase von 45 min bei 37 °C und 150 rpm, an die sich die Induktion mit 0,4 mM IPTG anschloss. Die Expression erfolgte für 3-4 Stunden bei 37 °C und 150 rpm. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Sorvall, 15 min, 5000 rpm, 4 °C) geerntet und die Cytochrome in der nachfolgenden Periplasmapräparation und chromatographischen Aufreinigung isoliert.

#### 2.2.14.5 Expression des *P. d.* Cytochrom $c_{552F}$ in großem Maßstab

Für die Expression des löslichen Cytochrom  $c_{552F}$ -Fragmentes aus *P. denitrificans* wurden 20 Liter LB/Amp/Cm zu je 2,5 L-Kulturen aus einer Vorkultur 1 %ig angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Kulturen wiesen am nächsten Morgen eine  $OD_{600}$  von ungefähr 3 auf, wurden mit 0,4 mM IPTG induziert und für weitere 3-4 h bei 37 °C zur Expression inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation (Sorvall, 15 min bei 5000 rpm und 4 °C) und die Zellpellets wurden in der nachfolgenden Periplasmapräparation weiterverarbeitet.

#### 2.2.14.6 Expression des *T. th.* Cytochrom $c_{caa3}$ in großem Maßstab

Für eine 20 Liter-Anzucht des löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$  aus *T. thermophilus* wurde eine LB/Amp/Cm-Kultur von Platte oder aus einer Gefrierkultur angeimpft und über Tag bei 37 °C kultiviert. Abends wurden die 2,5 Liter Hauptkulturen 1 %ig aus der Vorkultur überimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, 15 min bei 5000 rpm und 4 °C) geerntet und die roten Zellpellets in der nachfolgenden Periplasmapräparation weiterverarbeitet.

#### 2.2.15 Homologe Expression in *Paracoccus denitrificans*

Für die homologe Expression des nativen  $bc_1$ - und des  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex wurde entweder direkt von einer Platte oder mit einer 2 ml-LB-Vorkultur eine 100 ml LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 32 °C kultiviert. Von der 100 ml-Kultur wurden dann 2 Liter Succinatmedium angeimpft und schließlich 50 L Succinat-Hauptkulturen, die nach weiteren 24 h Wachstum bei 32 °C und einer  $OD_{600}$  zwischen 3-5 geerntet wurden (Sorvall RC36, 20 min, 5000 rpm, 4 °C).

## 2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.3.1 Periplasmapräparation

Um periplasmatische Proteine zu isolieren, wurde zunächst eine Periplasmapräparation nach Witholt (Witholt, Boekhout *et al.* 1976) in leicht modifizierter Weise durchgeführt. Die durch Zentrifugation pelletierten Zellen wurden vereinigt und auf Eis in ca. 200 ml kaltem Periplasmapuffer resuspendiert. 60 µg/ml Lysozym und 100 µM Pefabloc SC wurden hinzugegeben und dann für 30 min bei RT mit einem Magnetrührer gerührt. Durch das Lysozym wird das Peptidoglycangerüst der bakteriellen Zellwände angedaut und so auf den nachfolgenden osmotischen Schock vorbereitet. Durch die Zugabe von 1 Volumen kaltem H<sub>2</sub>O und erneutem Rühren bei 4 °C für 30 min erfolgte der osmotische Schock, bei dem optimaler nur das Periplasma freigesetzt wird. Intakte Sphäroplasten, Zell- und Zellwandtrümmer wurden anschließend durch eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Beckmann, 45 Ti-Rotor, 35000 rpm, 4 °C, 45 min) abgetrennt. Der Überstand, der aus dem rötlichen Periplasma besteht, wurde einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson Sonifier 250, Stufe 4, 40 % output, 5 min, 4 °C), wenn durch vorherige Zell-Lyse genomische DNA ausgetreten und das Periplasma aufgrund dessen viskos war. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft und bei Abweichung auf pH 8 bei 4 °C eingestellt, was den Bedingungen der nachfolgenden chromatographischen Aufarbeitung entsprach.

#### Periplasmapräp-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 8 (4 °C)  
0,5 M Saccharose  
1 mM EDTA

### 2.3.2 Membranpräparation

#### 2.3.2.1 Membranpräparation in analytischem Maßstab

Für eine Membranpräparation in analytischem Maßstab wurde eine 2 ml-LB Vorkultur mit den entsprechenden Antibiotika (1:1000 Verdünnung der Stammlösungen) angesetzt, mit *P. denitrificans* von Platte oder aus einer Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 32 °C kultiviert. Mit dieser ÜNK wurde dann 200 ml Succinatmedium in einem 2 L-Kulturkolben angeimpft und über Nacht bei 32 °C und 250 rpm kultiviert. Die Kultur wurde am nächsten Tag auf Eis abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, GS3-Rotor, 6000 rpm, 4 °C für 20 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5-10 ml 50 mM KP<sub>i</sub>, 10 mM EDTA, pH 7 resuspendiert. 100 µM Pefabloc SC und 0,1 mg/ml Lysozym wurden zugesetzt und die Zellsuspension für 30 min auf Eis inkubiert, was eine Lyse der Zellen bewirkte (festzustellen über die erhöhte Viskosität, die durch den Austritt genomischer DNA hervorgerufen wird). Die Suspension konnte auf dieser Stufe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt weiter verarbeitet werden. Mit dem Branson Sonifier 250 wurde die Suspension für 5-10 min auf Eis beschallt (duty cycle 30 %, output 40 %) und anschließend zentrifugiert (Sorvall, SS34-Rotor, 10 min,



10000 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde in 10 ml-UZ-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge, 70 Ti-Rotor, 1 h, 35000 rpm und 4 °C). Das resultierende Pellet enthielt die Membranen und wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Dort wurde es mit Hilfe eines Teflonstabes in 200 µl 20 mM  $KP_i$ , 1 mM EDTA, pH 8 resuspendiert, die Membranen dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>Lysepuffer</u>	<u>Membranpuffer</u>	<u>Membranspektrenpuffer</u>	<u>bc<sub>1</sub>-Membranpuffer</u>
100 mM $KP_i$ pH 8 1 mM EDTA	20 mM $KP_i$ pH 8 1 mM EDTA	50 mM $KP_i$ pH 8 0,5 % Triton X-100	50 mM MES/NaOH pH 6 300 mM Saccharose

### 2.3.2.2 Membranpräparation in großem Maßstab

Für eine Membranpräparation in großem Maßstab wurde entweder direkt von einer Platte oder von einer 2 ml-LB-Vorkultur eine 100 ml LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 32 °C kultiviert. Von der 100 ml-Kultur wurden dann 2 L Succinatmedium angeimpft und schließlich 50 L Succinat-Hauptkulturen, die nach 24 h Wachstum bei 32 °C und einer  $OD_{600}$  zwischen 3-5 geerntet wurden (Sorvall RC36, 20 min, 5000 rpm, 4 °C). Die Zellpellets wurden in 100-200 ml kaltem 100 mM  $KP_i$ , 1 mM EDTA, pH 8 resuspendiert und auf 100 µM Pefabloc SC gebracht. Zum Zellaufschluss wurde eine Manton-Gaulinpresse (APV Schröder, Lübeck) verwendet, die zunächst mit 2 L  $H_2O$  und dann mit 2 L 100 mM  $KP_i$ , 1 mM EDTA, pH 8 gespült wurde. Nach dem Einfüllen der Zellen wurde der überschüssige Puffer abgepumpt, der Pumpkreislauf geschlossen und die Zellen für 5 min bei 400 bar in der Kälte aufgeschlossen, wobei die entstehende Wärme über eine Kühlspirale an ein Eisbad abgegeben wurde. Die Presse wurde abschließend zur Reinigung mit 2 L 20 % Ethanol gespült. Die aufgeschlossenen Zellen wurden zentrifugiert (Sorvall, 15 min, 5000 rpm, 4 °C), wobei Zellfragmente und Speicherstoffe sedimentiert wurden. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand über Nacht erneut zentrifugiert (Sorvall, GS3-Rotor, 8000 rpm, 4 °C). Der rote, weiche Außenbereich des Pellets enthielt die Membranen, die vorsichtig mit einem Spatel abgenommen wurden und in 50 mM MES, 300 mM Saccharose, pH 6 mit Hilfe eines Ultra-Thorax-Homogenisators resuspendiert wurden. Nach erneuter Zentrifugation (UZ, 45 Ti-Rotor, 1 h, 35000 rpm, 4 °C) wurden von dem entstandenen Pellet wiederum nur die roten, Membranen-enthaltenen Außenbereiche genommen und in einem möglichst geringen Volumen 50 mM MES, 300 mM Saccharose, pH 6 resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde gleich darauf genommen, um die Proteinkonzentration mittels Lowry-Assay zu bestimmen und ein Membran-Redoxspektrum aufzunehmen.

<b><u>Lysepuffer</u></b>	<b><u>Membranpuffer</u></b>	<b><u>bc<sub>1</sub>-Membranpuffer</u></b>	<b><u>Membranspektrenpuffer</u></b>
100 mM KP <sub>i</sub> pH 8 1 mM EDTA	20 mM KP <sub>i</sub> pH 8 1 mM EDTA	50 mM MES/NaOH pH 6 300 mM Saccharose	50 mM KP <sub>i</sub> pH 8 0,5 % Triton X-100

### 2.3.3 Membransolubilisierung

Die Membranen wurden auf Eis aufgetaut und die Proteinkonzentration durch Verdünnen mit 50 mM MES, 300 mM Saccharose, pH 6 auf 30-35 mg/ml eingestellt. Des Weiteren wurde Pefabloc SC bis zu einer Endkonzentration von 50 µM zugegeben. Die Solubilisierung erfolgte nach von Jagow (von Jagow 1994) indem unter Rühren 1 Vol Solubilisierungspuffer zugetropft wurde, der die 1,15-fache Menge an DDM (w/w) relativ zur Menge an Gesamtprotein enthielt. Nach fünfminütigem Rühren bei RT wurde das Solubilisat abzentrifugiert (Beckmann UZ, 45 Ti-Rotor, 35000 rpm, 4 °C, 1 h), der Überstand mit 50 mM MES, 0,02 % DDM, pH 6 auf eine Salzkonzentration von 350 mM NaCl verdünnt und anschließend filtriert.

<b><u>Puffer I</u></b>	<b><u>Solubilisierungspuffer (2x)</u></b>	<b><u>Solubilisierungspuffer</u></b>
50 mM MES pH 6 300 mM Saccharose	2,4 M NaCl 600 mM Saccharose 100 mM MES, pH 6	50 % Solubil.puffer (2x) DDM-stock (1,15-fache Menge relativ zur Proteinmenge) in H <sub>2</sub> O
<b><u>Puffer II</u></b>	<b><u>DDM-stock</u></b>	
50 mM MES pH 6 0,02 % DDM	10 % in H <sub>2</sub> O (w/v)	

### 2.3.4 Säulenchromatographie

Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Proteine wurden unter Verwendung dreier unterschiedlicher chromatographischer Prinzipien aufgereinigt. Dabei erfolgte die Auftrennung nach der Oberflächenladung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (Q-Sepharose), nach der Proteingröße mittels Gelfiltration (Sephacryl, Sephadex, Superdex) und durch einen eingeführten His-tag mittels Affinitäts-Chromatographie (NiNTA-Agarose).

#### 2.3.4.1 Aufreinigung des Cytochrom c<sub>1CF</sub> aus *P. denitrificans*

Zur Aufreinigung des in *E. coli* heterolog überexprimierten löslichen Cytochrom c<sub>1CF</sub> wurde zunächst eine Periplasmapräparation durchgeführt. Daran schloss sich die chromatographische Auftrennung über eine Anionenaustauscher-Säule mittels Salzgradienten an, gefolgt von einer Auftrennung via Gelfiltration. Als Anionenaustauschermaterial diente Q-Sepharose *fast flow*. Die Säule wurde in Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8 bei 4 °C) äquilibriert und mit dem isolierten Periplasma beladen, wobei zu beachten war, dass der pH-Wert des Periplasmas mit dem des Waschpuffers übereinstimmte, um eine gute Bindung auf der Säule zu gewährleisten. Nach vollständigem Auftragen des Periplasmas wurde mit Waschpuffer für 2-3 Säulenvolumen nachgewaschen und dann der Gradient angelegt: 50-500 mM NaCl in 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8 bei 4 °C. Das eluierende Cytochrom wurde in Fraktionen von ca. 5 ml gesammelt und die Säule nach

vollständiger Elution mit Hochsalz-Puffer gewaschen (50 mM Tris/HCl, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) und erneut in Waschpuffer äquilibriert.

Die gesammelten Fraktionen wurden per SDS-PAGE auf das Vorhandensein des Cytochrom  $c_{1CF}$  überprüft, dementsprechend vereint und in Vivaspin-Konzentratoren auf ein Volumen von  $< 1$  ml eingeengt.

Der zweite chromatographische Auftrennungsschritt erfolgte über eine Gelfiltration mit einer Sephacryl S-100-Säule. Die Säule wurde mit Laufpuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8 bei 4 °C) äquilibriert und das ankonzentrierte  $c_1$ -Eluat der ersten Säule aufgetragen. Der Lauf erfolgte mit dem gleichen Puffer. Es wurden Fraktionen von ca. 0,5 ml gesammelt und diese per SDS-PAGE überprüft, vereinigt und ankonzentriert. Wenn die zweite Aufreinigung nicht zufriedenstellend verlief, schloss sich noch ein dritter Aufreinigungsschritt über eine weitere Gelfiltration (Sephadex G-75) an.

<u>Q-Sepharose-Waschpuffer</u>	<u>Q-Sepharose-Gradient</u>	<u>Gelfiltration-Laufpuffer</u>	<u>Hochsalz-Puffer</u>
50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl
50 mM NaCl	500 mM NaCl	150 mM NaCl	2 M NaCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA
pH 8 (4 °C)	pH 8 (4 °C)	pH 8 (4 °C)	pH 8 (4 °C)

#### 2.3.4.2 Aufreinigung des Cytochrom $c_{552F}$ aus *P. denitrificans*

Ähnlich der Aufreinigung des Cytochrom  $c_{1CF}$  wurden auch bei der Aufreinigung des löslichen Cytochrom  $c_{552}$ -Fragmentes die beiden chromatographischen Prinzipien des Anionenaustausches und der Gelfiltration eingesetzt. Nach der Periplasmapräparation wurde jenes auf eine Q-Sepharose-Säule, die in  $c_{552}$ -Waschpuffer äquilibriert worden war, aufgetragen, mit diesem nachgewaschen und dann ein Gradient von 0-350 mM NaCl angelegt. Die Fraktionen wurden zu ca. 5 ml gesammelt, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft, entsprechend vereinigt und ankonzentriert.

Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte über Gelfiltration mittels Sephacryl S-100 wie in 2.3.5. beschrieben. Eine weitere Aufreinigung war beim  $c_{552}$ -Fragment nicht notwendig.

<u>Q-Sepharose-Waschpuffer</u>	<u>Q-Sepharose-Gradient</u>	<u>Hochsalz-Puffer</u>	<u>Gelfiltration-Laufpuffer</u>
50 mM Tris/HCl pH 8 (4 °C)	50 mM Tris/HCl pH 8 (4 °C)	50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl pH 8 (4 °C)
1 mM EDTA	350 mM NaCl	pH 8 (4 °C)	150 mM NaCl
	1 mM EDTA	2 M NaCl	1 mM EDTA
		1 mM EDTA	

#### 2.3.4.3 Aufreinigung des Cytochrom $c_{caa3}$ aus *T. thermophilus*

Zur Aufreinigung des löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes aus dem Periplasma erfolgte der erste Aufreinigungsschritt über eine Q-Sepharose-Säule nach dem Anionenaustauscherprinzip. Diese wurde in Tth-Waschpuffer äquilibriert. Das isolierte Periplasma wurde auf einen pH-Wert von 8 bei 4 °C überprüft, gegebenenfalls eingestellt und dann auf die Säule geladen. Es wurde mit Waschpuffer nachgewaschen und ein Salzgradient von 0 bis 350 mM NaCl angelegt. Das Protein wurde in Fraktionen

zu ca. 5 ml gesammelt, die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft und entsprechend vereinigt wurden. Das Eluat wurde in Vivaspin-Konzentratoren auf ein Volumen von < 1 ml ankonzentriert und dann zur weiteren Aufreinigung auf eine Sephacryl S-100 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Äquilibration und der Lauf erfolgten mit Gelfiltration-Laufpuffer. Es wurden Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt, nach Kontrolle per SDS-PAGE dementsprechend vereinigt und ankonzentriert. Ein weiterer Aufreinigungsschritt war nicht notwendig.

<u>Tth-Waschpuffer</u>	<u>Q-Sepharose Gradient</u>	<u>Hochsalz-Puffer</u>	<u>Gelfiltration-Laufpuffer</u>
50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl	50 mM Tris/HCl
1 mM EDTA	350 mM NaCl	2 M NaCl	150 mM NaCl
pH 8 (4 °C)	1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA
	pH 8 (4 °C)	pH 8 (4 °C)	pH 8 (4 °C)

### 2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Bei der Konzentrationsbestimmung nach Lowry (Lowry, Rosebrough *et al.* 1951) wurden Proteinkonzentrationen photometrisch durch einen Vergleich zu einer parallel gemessenen BSA-Eichreihe bestimmt.

Hierzu wurde eine Lowry-Arbeitslösung frisch hergestellt: 20 ml Lowry-Puffer A, 0,5 ml 20 % SDS-Lösung sowie je 200 µl Lowry-Puffer B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. Die Eichreihe wurde aus einer 2 mg/ml BSA-Stammlösung in den Verdünnungen 0/0,2/0,4/0,6/0,8/1,0/1,5 und 2,0 mg/ml hergestellt. Eichreihe und Messproben wurden auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit je 850 µl der Arbeitslösung versetzt. Die Proben wurden gevortext und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Folinlösung, es wurde wieder gevortext und erneut 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde bei 750 nm im Photometer detektiert und mittels der BSA-Eichreihe über lineare Regression daraus die Proteinkonzentration der Messproben ermittelt.

<u>Lowry A</u>	<u>Lowry B1</u>	<u>Lowry B2</u>
2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> w/v	1 % CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O w/v	2 % Kalium-Natrium-Tartrat w/v
0,1 M NaOH		
<u>SDS-Lösung</u>	<u>Folin-Lösung</u>	
20 % SDS w/v	50 % Folin-Ciocalteu in H <sub>2</sub> O (v/v)	

### 2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proben von Membranproteinen wurden mit 2x-Probenpuffer versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, wohingegen Proben von Ganzzell-Lysaten und löslichen Proteinen in Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert wurden.

#### 2.3.6.1 Laemmli-PAGE

Die Glycin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Für zwei 12 bzw. 15 %ige Trenngele von 1,4 mm Dicke wurden der Tabelle (siehe unten) entsprechende Mengen an Acrylamidlösung, Trenngel-Puffer und

H<sub>2</sub>O zusammenpipettiert, gemischt, die Polymerisation durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet und die Mischung in die vorbereitete und abgedichtete Gelapparatur gegossen. Das gegossene Trenngel wurde in der Gießapparatur mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel zusammenpipettiert, über das Trenngel geschichtet und die Probenkämme für die Auftragstaschen in das Gel gesteckt.

<b><u>12 %iges Trenngel (1,4 mm)</u></b>	<b><u>Sammelgel</u></b>
3,6 ml Acrylamidlösung	700 µl Acrylamidlösung
2,25 ml Trenngel-Puffer	1 ml Sammelgel-Puffer
3 ml H <sub>2</sub> O	2,35 ml H <sub>2</sub> O
<b><u>15 %iges Trenngel (1,4 mm)</u></b>	<b><u>Sammelgel</u></b>
4,5 ml Acrylamid-Lösung	700 µl Acrylamidlösung
2,25 ml Trenngel-Puffer	1 ml Sammelgel-Puffer
2,1 ml H <sub>2</sub> O	2,35 ml H <sub>2</sub> O
-----	
15 µl TEMED	10 µl TEMED
75 µl 10 % APS	50 µl 10 % APS

Die Kämme wurden nach erfolgter Polymerisation gezogen und das Gel in die Laufkammer eingebaut. Die innere und äußere Kammer wurden mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt, die Proben aufgetragen und das Gel bei 200 V konstanter Spannung 45 min laufen gelassen.

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

### 2.3.6.2 Schägger-PAGE

Das Tricin-Gelsystem nach Schägger (Schagger and von Jagow 1987) wurde speziell für die Auftrennung von Proteinen < 20 kDa entwickelt. Für zwei Schägger-Trenngele wurden Acrylamid/H<sub>2</sub>O-Premix, Gelpuffer und Glycerin wie unten angegeben zusammenpipettiert und die Polymerisation mit TEMED und APS gestartet. Das gegossene Trenngel wurde für eine glatte Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Die Sammelgele wurden ebenfalls wie unten angegeben zusammenpipettiert und die Trenngele, nach Abgießen des Isopropanols, überschichtet.

<u>10 %iges Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
5,56 ml Acrylamid/H <sub>2</sub> O-Premix	6,5 ml Acrylamid/H <sub>2</sub> O-Premix
3,33 ml Gelpuffer	1,5 ml Gelpuffer
1 ml Glycerin	-
20 µl TEMED	20 µl TEMED
100 µl 10 % APS	100 µl 10 % APS

Nach Entfernen der Kämme und Einbau der Gele in die Laufkammer, wurde die äußere Kammer mit Anodenpuffer gefüllt, während in die innere Kammer Kathodenpuffer gegeben wurde. Nach Beladen des Gels erfolgte der Lauf bei 100 V konstanter Spannung für 100 min.

<u>Anodenpuffer (10x)</u>	<u>Acrylamidlösung</u>	<u>Probenpuffer</u>
1 M Tris/HCl pH 8,9	48 % Acrylamid	100 mM Tris/HCl pH 6,8
	1,5 % Bisacrylamid	4 % SDS
<u>Kathodenpuffer (5x)</u>	<u>Gelpuffer</u>	200 mM DTT
0,5 M Tris/HCl pH 8,3	3 M Tris/HCl pH 8,5	20 % Glycerin
0,5 M Tricin	0,3 % SDS	0,02 % Bromphenolblau
0,5 % SDS		
<u>Acrylamid/H<sub>2</sub>O-Premix (Trenngel)</u>	<u>Acrylamid/H<sub>2</sub>O-Premix (Sammelgel)</u>	
2,03 ml Acrylamidlösung	0,5 ml Acrylamidlösung	
3,53 ml H <sub>2</sub> O	6,0 ml H <sub>2</sub> O	

### 2.3.6.3 Ahn-PAGE

Das Gelsystem nach Ahn (Ahn, Yim *et al.* 2001) hat den Vorteil einer sehr einfachen Vorbereitung, da hier nicht mit Sammel- und Trenngel gearbeitet wird, sondern die Auftrennung innerhalb eines kontinuierlichen Gels erfolgt. Bis auf den Trenngelpuffer entsprechen alle Lösungen dem Laemmli-System. Für das Ahn-Gel wurden wie unten angegeben Acrylamidlösung, Trenngel-Puffer und H<sub>2</sub>O zusammengegeben und die Polymerisation mit TEMED und APS gestartet. Der Lauf erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V für 45 min.

<u>12 %iges Ahn-Gel</u>	<u>15 %iges Ahn-Gel</u>	<u>Trenngelpuffer (2x)</u>
4 ml Acrylamidlösung	5 ml	150 mM Tris/HCl
1 ml H <sub>2</sub> O	Acrylamidlösung	200 mM Serin
5 ml Trenngel-Puffer	5 ml Trenngel-Puffer	200 mM Glycin
18 µl TEMED	18 µl TEMED	200 mM Asparaginsäure
80 µl 10 % APS	80 µl 10 % APS	pH 7,4 mit NaOH

### 2.3.7 Nativ-Gelelektrophorese nach Maurer

Für das Maurer-Nativ-Gelelektrophoresesystem (Maurer & Dati, 1972, Anal Biochem 46) wurden Gele und Proteinproben ohne SDS und β-Mercaptoethanol vorbereitet. Es wurde ein leicht modifiziertes Maurer-Protokoll verwendet. Das Trenn- und das Sammelgel wurden wie unten angegeben zusammenpipettiert und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS gestartet.

<u>10 %iges Trenngel</u>	<u>3,5 %iges Sammelgel</u>
1,87 ml Lösung I	625 µl Lösung II
5 ml Lösung 3	600 µl Lösung III
8,13 ml H <sub>2</sub> O	3,725 ml H <sub>2</sub> O
-----	-----
25 µl TEMED	25 µl TEMED
110 µl 10 % APS	110 µl 10 % APS

Die Proteinproben wurden in Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol und ohne weitere Inkubation auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für 30 min bei 90 V und danach für ca. 45 min bei 110 V.

<u>Lösung I</u>	<u>Lösung II</u>	<u>Lösung III</u>
48 ml 1 M HCl	25 ml 1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30 % Acrylamid w/v
36,6 g Tris	5,7 g Tris	0,8 % Bisacrylamid w/v
ad 100 ml H <sub>2</sub> O		

<u>Laufpuffer</u>	<u>Probenpuffer</u>
6 g Tris/HCl	300 µl 50 % Glycerin v/v
28,4 g Glycin	50 µl 1 M Bis-Tris pH 7
H <sub>2</sub> O ad 1 L	0,02 % Bromphenolblau w/v
	H <sub>2</sub> O ad 1 ml

## 2.3.8 Gelfärbung

### 2.3.8.1 Coomassie-Färbung

Zum Anfärben der Gele wurden diese für 20 min bei 68 °C in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend entweder ebenfalls bei 68 °C oder über Nacht bei RT in Coomassie-Entfäber entfärbt.

<u>Färbelösung</u>	<u>Entfäber</u>
0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 w/v	10 % Essigsäure v/v
10 % Essigsäure v/v	20 % Methanol v/v
20 % Methanol v/v	

### 2.3.8.2 Silberfärbung

Bei dieser Färbemethode wurde das Gel für mindestens zwei Stunden unter langsamem Schütteln bei RT in Silberpräinkubationslösung inkubiert. Es folgten drei Waschschritte in 50 %igem Ethanol für jeweils 20 min und anschließend die Inkubation für 1 min in Silbergel-Vorbehandlungslösung. Das Gel wurde dreimal für 20 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für 20 min in Silberfärbelösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O für je 20 s wurde die Entwicklungslösung zugegeben und so lange inkubiert, bis die gewünschte Färbung erreicht war. Die Farbreaktion wurde mit 50 mM EDTA, pH 8 abgestoppt.

**Vorbereitungslösung**0,2 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**Silberfärbelösung**0,2 % AgNO<sub>3</sub>

0,75 ml/L 37 % Formaldehyd

**Präinkubationslösung**

50 % Ethanol

12 % Essigsäure

0,5 ml/L 37 % Formaldehyd

**Entwicklungslösung**60 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>0,2 mg/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

0,5 ml/L 37 % Formaldehyd

**2.3.9 Hämfärbung**

Mit Hilfe der Hämfärbung (Thomas, Ryan *et al.* 1976) werden im Gel *c*-Typ Cytochrome angefärbt, bei denen der Häm-Cofaktor kovalent mit dem Apoprotein verknüpft ist.

Dafür wurde ein Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen gefahren und die Proben mit Probenpuffer vorbereitet, der kein  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt. Das Gel wurde für eine Stunde in Häm-Färbelösung II inkubiert und anschließend mit Häm-Färbelösung III im Dunkeln angefärbt. Die Farbreaktion wurde mit Lösung IV abgestoppt.

**Häm-Färbelösung I**250 mM Natriumacetat  
pH 5**Häm-Färbelösung II**45 mg TMBZ  
gelöst in 30 ml MeOH  
70 ml Lösung I**Häm-Färbelösung III**780  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)  
in 30 ml MeOH  
70 ml Lösung I**Häm-Färbelösung IV**30 ml Isopropanol  
70 ml Lösung I**2.3.10 Westernblot**

Für das Blotting der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran wurden zunächst Gel, Membran und Filterpapiere, die auf die Größe der Membran zurechtgeschnitten worden waren, für 5 min in Semidry-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Semidry-Blot-Apparatur so zusammengesetzt, dass (von unten nach oben) auf zwei Filterpapiere die Membran, das Gel und wieder zwei Filterpapiere folgten, so dass bei Anlegen der Spannung von 15 V für 1 h die Proteine aus dem Gel auf die Membran geblottet wurden. Nach dem Blotting wurde die Membran kurz mit H<sub>2</sub>O abgespült und dann für 5 min in Ponceau S-Lösung inkubiert, so dass sämtliche Proteinbanden auf der Membran angefärbt wurden. Mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> wurde überschüssiger Farbstoff abgewaschen, bis der Membranhintergrund wieder weiß erschien, und die Banden des Proteinstandards mit einem Kugelschreiber gekennzeichnet. Die Membran wurde dann für 30 min in 10-20 ml NCS inkubiert, was alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockierte. Anschließend wurde das NCS abgegossen, der Antikörper (anti-his-IgG-Fraktion, *R* gegen *c*<sub>1</sub>, *BA/BE* gegen *c*<sub>552</sub>, *AE* gegen *b* oder *AD* gegen ISP) in einer 1:1000 Verdünnung in frischem NCS dazugegeben und über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschriffe für jeweils 10 min mit NCS, dann wurde das Protein A-Alkalische Phosphatase (A-AP)-Konjugat in einer 1:1000 Verdünnung in NCS auf die Membran gegeben und für 2-3 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend folgten verschiedene Waschschriffe steigender Stringenz, so dass nur spezifisch gebundenes A-AP bestehen bleibt: 10 min mit NCS, 10 min mit TBS-Triton und 10 min mit TBS. Daraufhin wurde die Membran für 5 min



in TNM-Puffer äquilibriert, der die optimalen Bedingungen für die nachfolgende Farbreaktion durch die alkalische Phosphatase gewährleistet. Der TNM-Puffer wurde gegen 10 ml frisches TNM mit 45 µl NBT und 45 ml BCIP ausgetauscht und der Blot im Dunkeln entwickelt. Abgestoppt wurde die Farbreaktion mit 50 mM EDTA, pH 8.

**Semidry-Puffer**

5,82 g Tris  
2,93 g Glycin  
20 % Methanol v/v  
H<sub>2</sub>O ad 1 L

**TBS-Tween**

0,5 % Tween-20 in TBS v/v

**NCS**

5 % in TBS w/v

**Ponceau-Färbelösung**

0,2 Ponceau S  
3 % TCA w/v

**NBT**

50 mg/ml in  
70 % DMF

**Stopp-Lösung**

50 mM EDTA pH 8

**Protein A-Alkalische Phosphatase**

1 mg Protein A-AP  
1 mg BSA  
1 ml Glycerin  
1 ml TBS

**TNM**

100 mM Tris/HCl pH 9,5  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>

**TBS**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,05 % Azid w/v

**BCIP**

25 mg/ml in DMF

## 2.4 Biophysikalische Methoden

### 2.4.1 Redoxdifferenzspektren

Um *c*-Typ Cytochrome zu charakterisieren, die Redoxaktivität zu überprüfen und Konzentrationen auszurechnen, wurden Redoxdifferenzspektren aufgenommen. Hierzu wurden die Cytochrome in Spektrenpuffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) verdünnt, mit einem Körnchen Kaliumhexacyanoferrat oxidiert und ein Oxidationsspektrum im Bereich von 500-650 nm aufgenommen. Anschließend wurde die Probe mit einer Spatelspitze Dithionit vollständig reduziert, das Reduktionsspektrum aufgenommen und das Redoxdifferenzspektrum durch Subtraktion des Oxidationsspektrums von dem Reduktionsspektrum generiert. Zur Berechnung der Konzentration wurde zunächst für alle in dieser Arbeit verwendeten löslichen Cytochrome ein Extinktionskoeffizient von  $\Delta\varepsilon_{\text{red-ox}, 550 \text{ nm}} = 19,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance and Sager 1957) und später die durch Pyridinhämochromspektren individuell bestimmten Extinktionskoeffizienten verwendet.

### 2.4.2 Pyridinhämochromspektren

Um die Absorption der *c*-Typ Häme unabhängig von ihrer Proteinumgebung zu messen und um für die klonierten löslichen Cytochrome die spezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmen zu können, wurden Pyridinhämochromspektren aufgenommen. Hierfür wurden die Cytochrome in 50 mM NaOH, 20 % Pyridin (v/v) denaturiert, wobei die fünfte und sechste Koordinationsstelle des Häms durch Pyridin besetzt wird. Anschließend wurden Redoxdifferenzspektren wie unter 2.4.1. beschrieben aufgenommen. Für die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten wurde über die Pyridinhämochromspektren mit einem Extinktionskoeffizienten für *c*-Typ Pyridinhämochrome von  $\Delta\varepsilon_{\text{red-ox}, 535-550 \text{ nm}} = 21,84 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Berry and Trumpower 1987) die Hämkonzentration ausgerechnet und mit dieser Konzentration über ein normales Redoxdifferenzspektrum derselben Cytochromverdünnung über das Lambert-Beersche-Gesetz der Extinktionskoeffizient ermittelt.

### 2.4.3 Messungen von Enzymaktivitäten

Die  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten wurden vergleichend zum  $c_{552F}$ WT als Substrat in Oxidase-Enzymaktivitätstest eingesetzt, um ihre Interaktion zur Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase zu testen. Hierfür wurde konzentrierte  $c_{552F}$ -Lösung (etwa 0,5 mM) mit Dithionit reduziert und über einer in Messpuffer (12,8 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) äquilibrierten G25-Säule das Reduktionsmittel abgetrennt. Eine Probe des Eluats wurde 1:100 in Messpuffer verdünnt und auf zwei Küvetten aufgeteilt. Ansatz 1 wurde mit Kaliumhexacyanoferrat oxidiert und gegen den unbehandelten Ansatz 2 gemessen, was Redoxspektrum A ergibt. Anschließend wurde, um zu überprüfen, ob  $c_{552F}$  vollständig reduziert ist, Ansatz 2 mit Dithionit nachreduziert und gegen den oxidierten Ansatz 1 das Redoxspektrum B gemessen. Die beiden Redoxspektren sollten bei vollständiger Reduktion des  $c_{552F}$  identisch sein. Aus den Spektren wurde dann über die individuellen Extinktionskoeffizienten die Konzentration der Lösung berechnet. Anschließend wurde das G25-Eluat mit Messpuffer auf eine Konzentration von 20  $\mu$ M gebracht.

Zum Messen der Enzymaktivität wurde in der Küvette 350  $\mu$ l der 20  $\mu$ M  $c_{552F}$ -Lösung vorgelegt und für eine Minute bei 551 nm eine Basislinie aufgenommen. Dann wurden 0,5 pMol Oxidase (in 5-10  $\mu$ l Volumen) zum Ansatz gegeben, schnell durchmischt und für 1 min gemessen. Der erhaltene Zeitverlauf wurde durch die nachstehende Formel ausgewertet:

$$WZ = \frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon \cdot n_{Oxidase} \cdot 60s} [s^{-1}] \quad (2.1)$$

wobei  $WZ$  die Wechselzahl in  $s^{-1}$ ,  $\Delta E$  die Absorptionsänderung in mOD,  $\epsilon$  der Extinktionskoeffizient des  $c_{552F}$  in  $mM^{-1}cm^{-1}$ ,  $n$  die Menge an eingesetzter Oxidase in nMol und  $V$  das Probenvolumen in ml ist.

### 2.4.4 Stopped-Flow *pre-steady state*-Kinetiken

Um den Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und dem löslichen  $c_{552}$ -Fragment aus *P. denitrificans* sowie zwischen dem löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$  und  $c_1$  bzw.  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* zu untersuchen, wurden schnelle *pre-steady state*-Kinetiken mittels Stopped-Flow-Spektroskopie durchgeführt. Alle Stopped-Flow-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. F. Malatesta im Labor von Prof. M. Brunori an der Universität „La Sapienza“ in Rom durchgeführt. Für die Messungen musste gewährleistet werden, dass einer der Redoxpartner vollständig reduziert, der andere vollständig oxidiert vorlag. Des weiteren musste eine Wellenlänge gefunden werden, bei der sich die beiden  $c$ -Typ Cytochrome spektroskopisch unterscheiden lassen.

#### 2.4.4.1 Probenvorbereitung

Um eine Autoxidation des reduzierten Redoxpartners zu verhindern, wurden anfänglich alle Puffer für mindestens 30 min mit Stickstoff begast, um anaerobe Bedingungen zu erreichen. Der Redoxpartner, der reduziert vorliegen sollte, wurde in Stickstoffbegastem Puffer verdünnt, mit Dithionit reduziert und durch eine chromatographische

Trennung über einer Sephadex G10-Säule vom überschüssigen Reduktionsmittel abgetrennt. Über die Aufnahme von Redoxspektren wurde die Konzentration des G10-Eluats bestimmt und die für die Kinetiken erforderliche Verdünnung mit entgastem Puffer in Gas-dichten Glasspritzen hergestellt. Anschließend wurde diese Lösung für weitere 15 min mit Stickstoff begast. Alle Spritzen wurden bis zum Gebrauch auf Eis gelagert.

#### 2.4.4.2 Doppelsektor-Differenzspektren

Da in den Stopped-Flow-Experimenten mit zwei spektroskopisch sehr ähnlichen *c*-Typ Cytochromen gearbeitet wurde, trat das Problem der spektralen Überlappung auf. Es musste eine Detektionswellenlänge gefunden werden, bei der spezifisch die Oxidation oder Reduktion eines der beiden Redoxpartner beobachtet werden konnte, die spektrale Überlappung also möglichst gering ist. Dies wurde durch die Aufnahme von Doppeldifferenzspektren unter Verwendung von Doppelsektorküvetten erreicht. Diese Küvetten bestehen aus zwei voneinander getrennten Sektoren. In die eine Küvettenhälfte wurde eine Lösung des reduzierten Cytochroms gefüllt, in die andere die des oxidierten Redoxpartners. Es wurden äquimolare Konzentrationen (ca. 3  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Nach dem Befüllen wurde ein *before-mixing* (bm)-Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 400-650 nm aufgenommen, das sich aus den überlagerten Oxidations- und Reduktionsspektren der einzelnen Cytochrome zusammensetzt. Dann wurden durch mehrmaliges Invertieren der Küvette die beiden Cytochrom-Lösungen durchmischt, der Elektronentransfer fand statt und ein *after-mixing* (am)-Spektrum wurde aufgenommen, das die Situation der beiden Cytochrome im ET-Gleichgewicht widerspiegelt. Das Doppeldifferenzspektrum wurde nun generiert, indem das *before-mixing*- vom *after-mixing*-Spektrum subtrahiert wurde. Die Wellenlängenminima und -maxima im Soret- und  $\alpha$ -Bandenbereich, sind diejenigen Wellenlängen, die die geringste spektrale Überlappung aufweisen und damit in den späteren ET-Kinetiken die Signale mit den größten Amplituden ergeben.

#### 2.4.4.3 Reduktion mit Ascorbat

Mit der Weiterentwicklung des Stopped-Flow-Protokolls wurde auf die Vorreduktion mit Dithionit verzichtet und Ascorbat als langsames Reduktionsmittel eingesetzt, um die Cytochrome im reduzierten Zustand zu halten. Hierfür wurde vorab getestet, wie schnell das Cytochrom  $c_{1CF}$  durch Ascorbat reduziert wurde, um sicherzustellen, dass diese Reaktion viel langsamer abläuft als der eigentliche Elektronentransfer zwischen den Cytochromen und diesen auf der vorgegeben Zeitskala im ms-Bereich nicht beeinflusst. Alle Puffer wurden vorab mit Stickstoff begast. Die Kinetiken wurden bei 4,8 °C und einer Gesamtionenstärke von 36 mM (20 mM Tris/HCl, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 8), mit einer Detektionswellenlänge von 420 nm auf einer Zeitskala von 200 s aufgenommen. Die Cytochrom  $c_1$ -Konzentration wurde hierbei konstant gehalten (1,45  $\mu\text{M}_{am}$ ) und gegen ansteigende Ascorbat-Konzentrationen von 0,5-2,5  $\text{mM}_{am}$  gemessen. Drei bis vier Zeitverläufe wurden gemittelt und mit einer monoexponentiellen Funktion mathematisch angepasst, um die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit  $k_{obs}$  zu erhalten. Diese wurden dann gegen die variierte

Ascorbatkonzentration aufgetragen und durch lineare Regression die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{asc}$  der  $c_1$ -Reduktion durch Ascorbat bestimmt.

#### 2.4.4.4 Messungen der Ionenstärkeabhängigkeit

Für die Messungen der Ionenstärkeabhängigkeit wurde der Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) für 30 min mit Stickstoff begast und die Ionenstärke über die Zugabe der entsprechenden Menge an KCl eingestellt. Die Cytochrome wurden verdünnt und das Cytochrom, das reduziert gehalten werden sollte, 15 min vor der Messung mit 1 mM Ascorbat reduziert. Die Konzentration des reduzierten Cytochroms wurde konstant gehalten (etwa 2-3  $\mu\text{M}_{\text{am}}$ ) und gegen ansteigende Konzentrationen des oxidierten Redoxpartners gemessen (0,5-10  $\mu\text{M}_{\text{am}}$ ). Die Messungen erfolgten bei 9,8 °C, wobei alle Stopped-Flow-Spritzen auf Eis gelagert und jeweils 3 min vor jeder Messungen in der Stopped-Flow-Apparatur äquilibriert wurden. Die Ionenstärke wurde in einem Bereich von 68-318 mM durch Zugabe von KCl variiert. Drei bis vier aufgenommene, kinetische Zeitverläufe pro individueller Salz- und Cytochromkonzentration wurden gemittelt und gemäß den von (Malatesta 2005) beschriebenen Gleichungen angepasst, die die vorherrschenden *non-pseudo first order (non-PFO)*-Bedingungen berücksichtigen.

Alle Cytochromkonzentrationen wurden abschließend durch die Aufnahme von Redoxdifferenzspektren und unter Verwendung der individuellen Extinktionskoeffizienten genau berechnet, der Anteil an nicht-oxidiertem Redoxpartner (im Falle des *P. d. c<sub>552F</sub>*) spektroskopisch untersucht und bei der Bestimmung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante  $k_{on}$  berücksichtigt. Der Logarithmus der apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten wurden anschließend gemäß der Brønsted-Gleichung (Brønsted. und La Mer 1924) gegen die Wurzel aus der Ionenstärke aufgetragen und durch lineare Regression mathematisch angepasst. Aus der Steigung dieser Geraden ließ sich die Anzahl der miteinander wechselwirkenden Ladungen auf beiden Proteinoberflächen bestimmen. Alle mathematischen Anpassungen wurden mit dem Programm OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation) durchgeführt, wobei die Standardabweichungen 10 % nicht überschritten.

#### 2.4.4.5 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten

Mit Hilfe von DSC-Differenzspektren konnte die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  für die ET-Reaktion vom Cytochrom  $c_{1CF}$  zum  $c_{552F}$  abgeschätzt werden. Hierfür wurden DSC-Differenzspektren bei 20 °C (temperierte Probenkammer) mit einer konstanten  $c_{1CF}$ -Konzentration (etwa 1,5  $\mu\text{M}_{\text{am}}$ ) gegen variierende  $c_{552F}$ -Konzentrationen (0,5-4  $\mu\text{M}_{\text{am}}$ ) aufgenommen. Dabei musste sichergestellt werden, dass das  $c_{1CF}$  vollständig reduziert vorlag und das  $c_{552F}$  komplett oxidiert war. Dies wurde durch eine besondere Probenvorbereitung gewährleistet. Das Cytochrom  $c_{1CF}$  wurde vorab mit Dithionit reduziert und das überschüssige Reduktionsmittel über eine G10-Säule abgetrennt. Der verwendete Puffer (20 mM Tris/HCl, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 8) wurde zuvor entgast und mit Stickstoff begast, um sauerstoff-arme Bedingungen zu erreichen und die Autoxidation des  $c_{1CF}$  zu minimieren. Nach der Säule wurde über die Aufnahme eines

Redoxdifferenzspektrums die Konzentration der Lösung bestimmt und diese anschließend auf ca. 3  $\mu\text{M}$  verdünnt. Es folgte die Zugabe von 2 mM Glucose und katalytischen Mengen an Glucose-Oxidase, die Glucose unter Sauerstoffverbrauch zu Gluconat und Wasserstoffperoxid umsetzt sowie die Zugabe von Katalase, die das angefallene  $\text{H}_2\text{O}_2$  abbaut. So sollte durch den Abbau des Restsauerstoffs die Autoxidation des  $c_{1\text{CF}}$  weiter minimiert werden. Das Cytochrom  $c_{552\text{F}}$  wurde in nicht-entgastem Puffer unter Luftsauerstoff-Bedingungen verdünnt, katalytische Mengen (100 nM)  $aa_3$ -Oxidase zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert, um das Cytochrom vollständig zu oxidieren. Um bei den späteren DSC-Messungen eine Umsatzreaktion zu vermeiden, wurde die Oxidase mit Cyanid (0,5 mM) für 20 min bei RT inkubiert, um diese zu blockieren. Die DSC-Differenzspektren wurden wie unter Abschnitt 2.4.4.2 beschrieben aufgenommen. Unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes wurden aus den DSC-Spektren die Absorptionsdifferenz des Minimums und Maximums im Soretbereich berechnet, gegen die Ferricytochrom  $c_{552\text{F}}$ -Konzentration (*after mixing*) aufgetragen und nach folgender Formel ausgewertet (Herleitung und Erklärung siehe 3.6.5):

$$\Delta\Delta A = \Delta\Delta\varepsilon \frac{K_{eq}(A_0 + B_0) - \sqrt{K_{eq}^2(A_0 + B_0)^2 - 4(K_{eq} - 1)K_{eq}A_0B_0}}{2(K_{eq} - 1)} \quad (2.2)$$

mit  $K_{eq}$  als Gleichgewichtskonstanten (von  $A+B \rightleftharpoons C+D$  im Gleichgewicht),  $A_0$  und  $B_0$  als initialen  $c_{1\text{CF}}^{\text{red}}$  und  $c_{552\text{F}}^{\text{ox}}$ -Konzentrationen,  $\Delta\Delta abs$  als Absorptionsdifferenz (erhalten aus den DSC-Spektren) und  $\Delta\Delta\varepsilon$  als Extinktionskoeffizienten aus dem Lambert-Beerschen Gesetz.

### 2.4.5 Laserflash *pre-steady state*-Kinetiken

Alle Laserflash-Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Quan Yuan im Labor von Prof. Dr. Francis Millett an der Universität von Arkansas durchgeführt.

#### 2.4.5.1 Bestimmung der isosbestischen Wellenlängen

Zur Bestimmung der isosbestischen Wellenlängen für Cytochrom  $c_{1\text{CF}}$  und  $c_{552\text{F}}$  wurden beide Cytochrome in Messpuffer (10 mM Tris, 25 mM KCl, pH 8) verdünnt und die Lösung jeweils auf drei Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz wurde durch Zugabe katalytischer Mengen  $aa_3$ -Oxidase und 15-minütiger Inkubation bei RT vollständig oxidiert und ein Oxidationsspektrum im Bereich von 350 bis 650 nm aufgenommen. Der zweite Ansatz wurde durch Zugabe von Ascorbat vollständig reduziert und ein Reduktionsspektrum aufgenommen (350-650 nm). Mit dem dritten Ansatz wurde ein normales Redoxspektrum (siehe 2.4.1.) aufgenommen und über das Lambert-Beersche Gesetz mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten die Cytochrom-Konzentration der verwendeten Lösung berechnet. Oxidations- und Reduktionsspektren wurden übereinandergelegt und die isosbestischen Wellenlängen bestimmt. Für diese Wellenlängen wurden dann mit der aus den Redoxdifferenzspektren ermittelten Cytochrom-Konzentration auf die jeweiligen Extinktionskoeffizienten zurückgerechnet.

### 2.4.5.2 Laserflash-Experimente

Für die Laserflash (LF)-Experimente wurde ein *Phase R model DL 1400* Farblaser verwendet, der mit Hilfe des Farbstoffs Coumarin LD 490 einen Anregungspuls von 480 nm und 0,5  $\mu$ s Dauer generierte. Das Detektionssystem wurde wie von (Heacock, Liu *et al.* 1993) beschrieben, verwendet. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: in einer Halbmikro-Glasküvette wurden 300  $\mu$ l Tris-Puffer (10 mM, pH 8), 5  $\mu$ M Ruthenium-markiertes Cytochrom  $c_{552F}N23C$  (im Folgenden mit  $Ru_z-c_{552}$  bezeichnet), 1  $\mu$ l 30 mM Ascorbat-Stammlösung, 0,43  $\mu$ l 1,4 mM TMPD-Lösung, 3  $\mu$ l 0,1 M Paraquat-Lösung zusammenpipettiert und ein Absorptionsspektrum (400-800 nm) aufgenommen. Die genauen Cytochrom-Konzentrationen wurden anhand der isosbestischen Wellenlängen und ihrer spezifischen Extinktionskoeffizienten aus den Absorptionsspektren berechnet. Das Cytochrom  $c_1$  wurde in einer Endkonzentration von etwa 10  $\mu$ M dazugegeben und wieder ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Nach jeder Flash-Serie und nach jeder weiteren Zugabe von KCl, Ascorbat oder Cytochrom wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um erstens zu überprüfen, ob das System vollständig reduziert vorlag, bzw. hinterher den Redoxzustand der einzelnen Cytochrome zu ermitteln (siehe 3.7.5) und die genaue Cytochrom-Konzentration bestimmen zu können. Nach jeder Salz- oder Cytochromzugabe vor jeder Flash-Serie wurde 1  $\mu$ l Ascorbat-Stammlösung hinzugegeben, um die Cytochrome reduziert zu halten. Die LF-Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zehn einzelne Laserflash-Transienten pro experimenteller Bedingungen wurden akkumuliert und zu einem Durchschnitt gemittelt, der dann gespeichert und ausgewertet wurde. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 550 nm und 558 nm sowie unter Verwendung verschiedener Zeitskalen, um zu gewährleisten, dass die ET-Reaktion vollständig detektiert wurde. Die Probenvorbereitung und das Flashprotokoll sind nachfolgend zusammengefasst.

**Tabelle 2.4: Probenvorbereitung und Protokoll für die Laserflash-Messungen**

Angegeben sind die Stammlösungen der einzelnen Komponenten und ihre Endkonzentrationen in der Küvette sowie die Reihenfolge ihrer Zusammenstellung und Laserflash-Messungen während der Vorbereitung

Volumen	Komponente	Endkonzentration in Küvette
300 $\mu$ l	Tris/HCl [10 mM, pH 8]	10 mM
div.	$Ru-c_{552}$	$\sim 5 \mu$ M
je 1 $\mu$ l	Ascorbat [30 mM]	100-1100 $\mu$ M
0,43 $\mu$ l	TMPD [1,4 mM]	2 $\mu$ M
3 $\mu$ l	Paraquat [0,1 mM]	1 mM
div.	Cytochrom $c_{1CF}$	$\sim 10 \mu$ M
<b>Laseranregung</b>		
div.	KCl [2 M]	0-400 mM
<b>Laseranregung nach jeder Ionenstärkeerhöhung</b>		

Die gemittelten Transienten wurden mit dem Programm SIFitting 5.0 ausgewertet und durch eine monoexponentielle Funktion mathematisch angepasst, um die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  zu erhalten. Die genauen Cytochrom-Konzentrationen, Verdünnungen und Ionenstärken wurden berechnet. Des Weiteren wurde aus den aufgenommenen Absorptionsspektren der jeweilige Redoxzustand des Cytochrom  $c_{1CF}$  bestimmt und die effektive Konzentration an reduziertem  $c_{1CF}$  daraus ermittelt. Die

beobachteten Geschwindigkeiten  $k_{obs}$  wurden nach Detektionswellenlängen (550 nm und 558 nm) getrennt ausgewertet und zusätzlich der Mittelwert berechnet. Die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  berechneten sich aus den  $k_{obs}$ -Werten und den effektiven Konzentrationen an reduziertem  $c_{1CF}$  (siehe 3.7.5) und wurden ebenfalls einzeln nach Detektionswellenlängen und Mittelwert bestimmt.

#### 2.4.5.3 Kinetisches Differenzspektrum

Für die ET-Reaktion des Cytochrom  $c_{1CF}$  mit  $Ru_z-c_{552F}$  wurde ein kinetisches Differenzspektrum aufgenommen. Dazu wurden in einer Halbmicro-Glasküvette zu 300  $\mu$ l Tris-Puffer (10 mM, pH 8) 150 mM KCl, 5  $\mu$ M  $Ru-c_{552F}$  und 5-10  $\mu$ M  $c_1$  sowie 100  $\mu$ M Ascorbat, 2  $\mu$ M TMPD und 1 mM Paraquat gegeben. Die Laserflash-Experimente wurden ebenfalls bei RT mit einem Laserpuls von 0,5  $\mu$ s Dauer und einer Anregungswellenlänge von 480 nm durchgeführt. Zehn Einzelflash-Transienten wurden jeweils gemittelt. Die Detektion erfolgte zwischen 538 nm und 562 nm in 2 nm-Schritten. Als Referenz diente die Reaktion bei 550 nm. Um das kinetische Differenzspektrum zu generieren, wurde der Absorptionsquotient bei den angegebenen Wellenlängen gegen die Wellenlängen aufgetragen. Der Absorptionsquotient berechnet sich aus dem Verhältnis der Absorptionszu- oder Abnahme bei der angegebenen Wellenlänge zur anfänglichen Absorptionsabnahme der Referenzwellenlänge von 550 nm.

#### 2.4.5.4 Messung der Ionenstärkeabhängigkeit

Für die Messung der Ionenstärkeabhängigkeit wurde das Standard-Protokoll aus 2.4.6.3. verwendet und die Ionenstärke durch Zugabe von 2 M KCl-Stammlösung in einem Bereich von 0-400 mM schrittweise erhöht.  $k_{obs}$  wurde durch monoexponentielle Datenanpassung aus den gemittelten Transienten erhalten und der Logarithmus von  $k_{obs}$  gemäß der Brønsted-Gleichung gegen die Wurzel aus der Ionenstärke aufgetragen, um die Ionenstärkeabhängigkeit auszuwerten (jeweils für 550 nm, 558 nm und den daraus gewonnenen Mittelwert getrennt). Die apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  berechneten sich aus den  $k_{obs}$ -Werten und den effektiven Konzentrationen an reduziertem Cytochrom  $c_{1CF}$  (siehe 3.7.5). Diese wurden ebenfalls getrennt nach Detektionswellenlängen und Mittelwert gemäß der Brønsted-Gleichung aufgetragen und ausgewertet.

#### 2.4.5.5 Messungen der Temperaturabhängigkeit

Zur Messung der Temperaturabhängigkeit wurde Phosphat-Puffer (10 mM, pH 8) anstelle des Tris-Puffers verwendet, da der pH-Wert von Tris-Puffer stark temperaturabhängig ist. Es wurde ein Mastermix angesetzt, der den Phosphat-Puffer, 5  $\mu$ M  $Ru-c_{552}$ , 100  $\mu$ M Ascorbat, 2  $\mu$ M TMPD, 1 mM Paraquat und 10  $\mu$ M Cytochrom  $c_{1CF}$  enthielt. Dieser wurde auf vier Ansätze aufgeteilt, die durch Zugabe von KCl-Stammlösung auf die folgenden Salzkonzentrationen gebracht wurden: 0, 50, 100, 200 mM KCl. Es wurde das LF-Standard-Protokoll aus 2.4.6.3. verwendet und die Transienten bei den folgenden Temperaturen gemessen: 3, 13, 17, 24 und 30 °C. Die Proben wurden jeweils 3 min vor jeder Flash-Serie in der Apparatur äquilibriert. Die

Transienten wurden wie beschrieben ausgewertet,  $k_{obs}$  und  $k_{on}$  ermittelt und über die Auftragung nach der Arrhenius-Gleichung die Temperaturabhängigkeit der Reaktion untersucht.

### 2.4.6 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET)

Die Bildung des ET-Komplexes zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  aus *P. denitrificans* wurde über die Methode des Fluoreszenzresonanz-Energietransfers (FRET) untersucht. Hierfür waren je vier Oberflächencysteinmutanten der beiden löslichen Cytochrome hergestellt worden, über deren exponierte SH-Gruppen kovalent Fluoreszenzmarker an die Proteine gekoppelt werden konnten.

#### 2.4.6.1 SH-Assay

Um die Zugänglichkeit und Reaktivität der durch gezielte Mutagenese eingeführten Oberflächencysteine vor der FRET-Fluorophorkopplung zu testen, wurde Fluorescein-5-maleimid (Molecular Probes) kovalent an die Cysteine gekoppelt und spektroskopisch die Kopplungsrate bestimmt. Maleimide reagieren selektiv mit Cystein-Thiolgruppen, allerdings nicht mit Histidinen und Methioninen. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 7. Für die Kopplung wurde der Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7) 30 min bei RT entgast und weitere 30 min mit Stickstoff begast, um möglichst Sauerstoff-arme Bedingungen zu gewährleisten. Des Weiteren wurden die Fluoresceinlösungen so weit wie möglich vor Licht geschützt, indem die Reaktionsgefäße mit Alufolie umwickelt wurden. Eine 50-100  $\mu\text{M}$  Cytochrom  $c_{1CF}$  oder  $c_{552F}$ -Lösung wurde in Reaktionspuffer hergestellt und mit einem 10-fach molarem Überschuss frisch angesetztem Dithiothreitol die SH-Gruppen reduziert, um die Bildung von Dimeren zu verhindern und sicher zu stellen, dass alle Oberflächencysteine in der reduzierten Form vorlagen. Das überschüssige Reduktionsmittel wurde mit Hilfe einer Sephadex G 25-Säule abgetrennt. Das Fluorescein-5-maleimid (F5m) wurde ca. 1 M in DMF angesetzt und dann unter ständigem Rühren langsam in maximal 10-fachem Überschuss zur Cytochrom-Lösung titriert. Die Reaktion wurde entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert, dann durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses an Glutathion abgestoppt und überschüssiges Glutathion sowie ungekoppeltes Fluorescein-5-maleimid über eine Sephadex G-25-Säule abgetrennt. Die Kopplungsrate wurde abschließend spektroskopisch über das Verhältnis der Absorption bei 492 nm und der Cytochrom  $c$ -Konzentrationen aus Redoxdifferenzspektren ermittelt. Die physikalischen Eigenschaften des Fluorescein-5-maleimids sind nachfolgend zusammengefasst:

**Tabelle 2.5: Physikalische und spektroskopische Eigenschaften des Fluorescein-5-maleimids**

Die Fluoreszenz- und Absorptionseigenschaften des F5m sind hier aus Gründen der Vollständigkeit ebenfalls aufgeführt, wurden aber zur Bestimmung der SH-Zugänglichkeit nicht gebraucht

<b>M<sub>w</sub></b>	427,37
<b>Lagerung</b>	bei -20 °C; Trocknen im Exsikator empfohlen; Schutz vor Licht
<b>Löslichkeit</b>	pH>6, DMF
<b>Absorptionsmaximum</b>	492 nm
<b>Extinktionskoeffizient</b>	83 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
<b>Emissionsmaximum</b>	515 nm



### 2.4.6.2 Fluorophor-Kopplung

Für die FRET-Messungen wurden die beiden Alexa Fluor Farbstoffe AF594 und AF633 (Molecular Probes) als Fluorophore verwendet. Diese Farbstoffe reagieren selektiv mit Thiolgruppen unter der Bildung von Thioetherprodukten. Sie reagieren nicht mit Histidin und Methionin und ließen sich damit selektiv und kovalent an die durch gerichtete Mutagenese eingeführten Oberflächencysteine der Cytochrome koppeln. Als unbedingte Voraussetzung für FRET müssen sich die Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorophore überlappen und durften sich in diesem Fall spektral nicht mit der Häm-Absorption und -Fluoreszenz überschneiden. In der nachfolgenden Tabelle sind die spektralen Eigenschaften der beiden Fluorophore zusammengefasst.

**Tabelle 2.6: Spektrale Eigenschaften der Alexa Fluorfarbstoffe AF594 und AF633**  
Alexa Fluor 594 wird als Donorfluorophor eingesetzt mit Alexa Fluor 633 als Akzeptor

	Alexa Fluor 594	Alexa Fluor 633
<b>Funktion gekoppelt an</b>	Donor Cytochrom $c_{1CF}$	Akzeptor Cytochrom $c_{552F}$
<b><math>M_w</math></b>	908,97	1300
<b>Absorptionsmaximum</b>	588 nm	621 nm (MeOH)
<b>Emissionsmaximum</b>	615 nm	641 nm (MeOH)
<b>Extinktionskoeffizient</b>	$\epsilon_{588} = 101,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in $\text{H}_2\text{O}$	$\epsilon_{621} = 158,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in MeOH

Da für AF633 nur ein Extinktionskoeffizient vorlag, der in Methanol gemessen worden war, musste ein Extinktionskoeffizient für wässrige Lösungen bestimmt werden, um die Konzentrationen in wässrigen Pufferlösungen bestimmen und die Kopplungsrate berechnen zu können. Dafür wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  einer AF633-Stammlösung in je 1 ml Methanol und 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und die Absorptionsspektren aufgenommen und anschließend mit dem angegebenen Extinktionskoeffizienten aus dem MeOH-Spektrum die Konzentration der Lösung berechnet. Diese Konzentration wurde danach in dem Spektrum in  $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt, um den Extinktionskoeffizienten in wässriger Lösung zu berechnen (siehe Ergebnisse 3.8.1).

Zur Kopplungsreaktion im Allgemeinen ist vorab anzumerken, dass Fluorophore und Cytochrom-Fluorophor-Konjugate soweit wie möglich vor Licht geschützt werden sollten. Zu diesem Zweck wurden Reaktionsgefäße und Säulen mit Alufolie umwickelt. Des weiteren sollte gerade zu Beginn der Reaktion möglichst sauerstoffarm gearbeitet werden, um die Oxidation der SH-Gruppen zu verhindern. Deswegen wurde der Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7 (RT)) 30 min entgast und für weitere 30 min mit Stickstoff begast. Die Cytochrome wurden mit einem 10-fach molaren Überschuss an frisch angesetztem Dithiothreitol für 20 min bei RT vorreduziert, um zu gewährleisten, dass die Cystein-SH-Gruppe in reduzierter Form vorlag und keine Dimere ausgebildet waren. Das überschüssige Reduktionsmittel wurde über eine Sephadex G25-Säule, die vorher mit entgastem Puffer gespült worden war, abgetrennt. Vom Protein-Eluat wurde ein Redoxspektrum aufgenommen und die Cytochromkonzentration der Lösung bestimmt. Die Alexa-Fluor-Farbstoffe wurden möglichst konzentriert in wenig DMSO gelöst und jeweils 1  $\mu\text{l}$  abgenommen, um ein Absorptionsspektrum in  $\text{H}_2\text{O}$  aufzunehmen und die Fluorophorkonzentration der DMSO-Stammlösung zu bestimmen. Anschließend wurde die Fluorophor-Lösung in

einem äquimolaren Verhältnis langsam und unter Rühren im Dunkeln zum Cytochrom titriert. Dieses 1:1 Verhältnis wurde gewählt, um unspezifische Bindung und Vielfachmarkierung zu verhindern. Es wurde darauf geachtet, dass die Fluorophorlösung möglichst konzentriert eingesetzt wurde, um den DMSO-Anteil in der Reaktionslösung zu minimieren und ein eventuelles Präzipitieren der Proteine zu verhindern. Es folgte eine Inkubation für 2 h unter Rühren bei RT, während der die Kopplungsreaktion stattfand. Durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses an frisch angesetztem Glutathion und 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Reaktion abgestoppt. Das überschüssige Glutathion und der ungekoppelte Fluorophor wurden über eine Sephadex G25-Säule abgetrennt. Das Konjugat wurde aufgefangen, in einem Vivaspin-Konzentrator stark ankonzentriert und dreimal mit je 20 ml Puffer gewaschen, um sicherzustellen, dass sämtlicher unspezifisch gebundener Fluorophor abgetrennt wurde. Abschließend wurde die Kopplungsrate bestimmt. Hierzu wurden Redoxspektren aufgenommen, um die Cytochrom-Konzentration zu bestimmen. Des Weiteren wurden Reduktionsspektren aufgenommen und die Fluorophorkonzentration bestimmt. Die Kopplungsrate wurde dann über das Verhältnis an Fluorophor zu Cytochrom  $\text{Mol}_F/\text{Mol}_{\text{Cyt}}$  berechnet.

#### 2.4.6.3 Bestimmung der Quantenausbeute

Um in den FRET-Experimenten aus den Fluoreszenzintensitäten letztendlich Abstandsinformationen gewinnen zu können, musste die Quantenausbeute des Donor-Fluorophors AF594 gekoppelt an die jeweilige Cytochrom  $c_1$ -Mutante gemessen werden. Hierzu war es erforderlich, eine Standardsubstanz mit bekannter Quantenausbeute zum Vergleich zu verwenden. Als Standardsubstanz wurde Rhodamin G6 mit einer Quantenausbeute von 0,95 (in Ethanol; Molecular Probes) eingesetzt. Für die Bestimmung der Quantenausbeute wurden in einem Jasco V-550-Spektrometer die Absorptionsspektren (400-700 nm) des Rhodamins und der einzelnen AF594-Cysteinmutanten gemessen und die Absorption bei 480 nm bestimmt. Des Weiteren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm in einem Jasco FP-6300 Fluoreszenzspektrometer die Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 500-700 nm detektiert und die Peakfläche jeweils durch numerische Integration bestimmt. Für die Berechnung der Quantenausbeute wurde folgende Formel verwendet:

$$QY_u = QY_s \cdot \left( \frac{A_u}{A_s} \right) \cdot \left( \frac{n_u^2}{n_s^2} \right) \quad (2.3)$$

- QY<sub>u</sub>** = zu untersuchende Quantenausbeute des gekoppelten Fluorophors  
**QY<sub>s</sub>** = Quantenausbeute der Standardsubstanz: Rhodamin G6 = 0.95  
**A<sub>u</sub>, A<sub>s</sub>** = normierte Peakflächen (= Fluoreszenzpeakfläche geteilt durch Absorption bei 480 nm)  
**n<sub>u</sub>** = Brechungsindex des Lösungsmittels für die zu untersuchende Substanz; für H<sub>2</sub>O = 1,3614)  
**n<sub>s</sub>** = Brechungsindex des Lösungsmittels für die Standardsubstanz; für Ethanol = 1,333

Um die normierten Peakflächen zu erhalten, wurde die durch Integration erhaltene Fläche unter dem Fluoreszenzpeak durch die Absorption bei 480 nm dividiert. Der Absorptionswert bei 480 nm musste allerdings zuvor um die Cytochromabsorption

korrigiert werden, so dass nur die reine Fluorophorabsorption bei 480 nm zur Berechnung der Quantenausbeute eingesetzt wurde (Details siehe 3.8.3).

#### 2.4.6.4 Bestimmung des Überlappungsintegrals

Weiterhin mussten für die Auswertung der FRET-Abstände die Überlappungsintegrale von Donor und Akzeptor bekannt sein, also die Fläche des Donoremissionsspektrums, die mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum überlappt. Hierfür wurden die Absorptionsspektren der AF633-*c*<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten und des ungekoppelten Akzeptor-Fluorophors aufgenommen. Des Weiteren wurden die Emissionsspektren des ungekoppelten AF594-Donor-Fluorophors und der AF594-*c*<sub>1CF</sub>-Cysteinmutanten aufgenommen. Mit Hilfe des Programms *jintegrl* (S. Mazumdar) wurden die Überlappungsintegrale berechnet.

#### 2.4.6.5 FRET-Messungen

Die FRET-Messungen wurden in einem Jasco FP-6300 Fluoreszenzspektrometer und einem Jasco V-550 UV/vis-Spektrometer bei 25 °C und dem folgenden Spektrometer-Set-up durchgeführt:

Spektrometer	Jasco FP-6300	Jasco V-550
Bandbreite (Ex.)	5 nm	-
Bandbreite (Em.)	5 nm	5 nm
Sensitivität	medium	-
Anregungswellenlänge	480 nm	-
Spektrum	500-700 nm	400-700 nm
Scangeschwindigkeit	200 nm/min	1000 nm/min
Datenerfassung	1 nm	1 nm
Nullabgleich	700 nm	700 nm
Temperatur	25 °C	RT

Es wurden jeweils die Emissionsspektren des Donors allein und des Donors mit Akzeptor aufgenommen, um die Fluoreszenzintensität  $F_{D600}$  des Donors und die Intensitätsabnahme des Donors mit Akzeptor  $F_{DA600}$  zu bestimmen. Als Detektionswellenlänge wurden 600 nm ausgewählt, da bei dieser Wellenlänge nur der Donor emittiert. Als Anregungswellenlänge wurden 480 nm gewählt, da die Quantenausbeuten der gekoppelten AF594-Cysteinmutanten im Vergleich zu Rhodamin G6 bei 480 nm bestimmt worden waren und der Alexa Fluor-Farbstoff AF594 bei 480 nm immer noch ausreichende Emissionsspektren zeigte. Die Konzentration des Donors in der 1 ml-Küvette wurde so gewählt, dass die Fluoreszenz ein Intensitätsmaximum von etwa 10-80 aufzeigte (Shyamal Mazumdar, persönliche Mitteilung). Von dieser Verdünnung wurde ebenfalls vor Zugabe des Akzeptors ein Absorptionsspektrum aufgenommen, um die Konzentration des Donors bestimmen zu können. Der Akzeptor wurde dann in einem 10-fachen Überschuss dazugegeben, da der Energietransfer dann unabhängig von der Akzeptorkonzentration ist. Die Messungen wurden jeweils in einem Puffer geringer Ionenstärke durchgeführt (10 mM Tris/HCl, pH 8), um eine Komplexbildung zu begünstigen. Durch Zugabe von NaCl wurde dann in einer zweiten Messung die Ionenstärke erhöht, um zu testen, ob diese einen Einfluss auf die Komplexbildung hat. Mit Hilfe der Programme *jintegrl* und *fret* (S. Mazumdar)

wurde der Förster-Radius  $R_0$ , die FRET-Distanzen  $R$  sowie die Transfereffizienz  $E$  der einzelnen FRET-Pärchen berechnet.

### 3 Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung des Elektronentransfers (ET) zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans*, um die folgenden Fragen zu klären: Welche Merkmale charakterisieren den ET zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c_{552}$  in der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans*? Welche Wechselwirkungen tragen zu einem effizienten ET bei und welche Aminosäurereste auf dem Cytochrom  $c_1$  sind direkt an der Wechselwirkung zum  $c_{552}$  beteiligt? Hierfür wurden aufgrund der einfacheren Handhabung und um die Beeinflussung durch nachfolgende ET-Reaktionen wie in einem Proteinkomplex zu vermeiden, heterolog exprimierte, lösliche Fragmente des  $c_1$  (*core*-Fragment,  $c_{1CF}$ ; siehe 1.3.3) und des  $c_{552}$  ( $c_{552F}$ , siehe 1.3.4) als Modellsystem verwendet. Des Weiteren wurden Mutanten des Cytochrom  $c_{1CF}$  hergestellt, die sich in Raumvolumen und/oder Polarität bzw. Ladung von Aminosäureresten in Positionen unterscheiden, die im *S. cerevisiae* QCR/CYC-Komplex direkte Wechselwirkungen zum Cytochrom  $c$  zeigten (Abschnitt 3.2). Diese Mutanten wurden vergleichend zum Wildtyp  $c_{1CF}$  eingesetzt, um in einem dynamischen Ansatz durch Stopped-Flow- (Abschnitt 3.6) und Laserflash-Messungen (Abschnitt 3.7) den ET zum löslichen Cytochrom  $c_{552F}$  kinetisch zu untersuchen. Um generelle Aussagen über den ET des mesophilen Bodenbakteriums *P. denitrificans* im direkten Vergleich zu einem thermophilen Organismus treffen zu können, wurde das lösliche Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragment der Cytochrom  $caa_3$ -Oxidase aus *Thermus thermophilus* kloniert und der ET ebenfalls kinetisch zu seinen potentiellen Wechselwirkungspartnern untersucht (Abschnitt 3.3.5).

Da es bisher weder vom Cytochrom  $c_1$  noch vom  $c_1/c_{552}$ -ET-Komplex aus *P. denitrificans* Strukturinformationen gibt, wurden für eine Untersuchung dieses transienten ET-Komplexes Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) -Messungen durchgeführt (Abschnitt 3.8). Für diesen Ansatz wurden sowohl vom  $c_{1CF}$  als auch vom  $c_{552F}$  Oberflächencysteinmutanten hergestellt (Abschnitt 0), an deren freie SH-Gruppen kovalent Fluorophore gekoppelt wurden, über die dann im FRET-Ansatz Abstandsinformationen der beiden Cytochrome im ET-Komplex erhalten werden sollten. Um die Übertragbarkeit der gewonnenen Aussagen über den ET des löslichen Cytochrom  $c_{1CF}$  auf den  $bc_1$ -Komplex überprüfen zu können, sollten die *core*-Fragment-Mutationen in einen  $bc_1$ -Komplex überführt werden, dem die für *P. denitrificans* einzigartige saure  $c_1$ -Extensionsdomäne fehlt (siehe 1.3.2). Dieser Komplex wurde für eine leichtere Aufreinigung mit einem His-tag versehen, homolog in *P. denitrificans* exprimiert, charakterisiert (Abschnitt 3.9) und soll weiterführend in einem kinetischen Ansatz über *steady state*-Messungen untersucht werden.

#### 3.1 Cytochrom $c_{1CF}$ aus *P. denitrificans*

Das aus 220 Aminosäuren bestehende lösliche *core*-Fragment des Cytochrom  $c_1$  aus *P. denitrificans* (Eichhorn, Dissertation 2003) steht in dieser Arbeit im Mittelpunkt fast

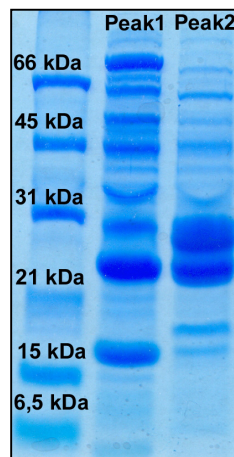
aller Fragestellungen. Dem 23 kDa-Fragment fehlt sowohl die N-terminale saure Extensionsdomäne als auch der C-terminale Membrananker, es besteht lediglich aus der Häm-tragenden und redoxaktiven *core*-Domäne und kann daher als minimales  $c_{1CF}$ -Fragment angesehen werden.

### 3.1.1 Optimierung der Expression und Aufreinigung

Da verlässliche Expressionsraten von 6 mg/Liter Kulturmedium bei Anwendung des herkömmlichen Expressionsprotokolls (Eichhorn, Dissertation 2003) nicht reproduziert werden konnten, wurden die Bedingungen für die heterologe Expression des Cytochrom  $c_{1CF}$  in *E. coli* optimiert. Kompetente BL21(DE3)-Zellen, die das pET-22b- $c_{1CF}$ -Konstrukt enthielten, wurden jeweils frisch mit pEC-86, dem Hämreifungsplasmid, transformiert und mit sechs bis acht Klonen des entstandenen  $c_{1CF}$ -Expressionsstammes eine Testexpression durchgeführt, um den Klon für eine Großanzucht auszuwählen, der die stärkste  $c_{1CF}$ -Expression aufwies. Die Hauptkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen 1:1 mit frischem LB-Medium verdünnt, frische Antibiotika zugesetzt und die Zellen für 45 min. bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Diese Phase diente der Erholung der Zellen nach dem Verdünnungsschritt. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,4 mM IPTG Endkonzentration und die Expression für drei bis vier Stunden bei 37 °C und 150 rpm. Eine weitere Verlängerung der Expressionszeit erhöhte die  $c_{1CF}$ -Ausbeute nicht, bewirkte allerdings eine verstärkte Zell-Lyse, was sich durch einen erhöhten Anteil an genomischer DNA in der Zellsuspension nach der Ernte bemerkbar machte. Da das  $c_{1CF}$  jedoch über eine Periplasmapräparation aufgereinigt werden sollte, führte eine erhöhte Zell-Lyse zu starken Verunreinigungen des Periplasmas und die Expressionszeit wurde so kurz wie möglich gewählt, ohne Expressionseinbußen zu bekommen. Die Zellernte erfolgte nach dem herkömmlichen Protokoll. Der Verdünnungsschritt gewährleistete, im Gegensatz zur Induktion bei einer OD von 1,2-1,4 wie im herkömmlichen Protokoll, eine zuverlässige Expression in allen Kulturkolben.

Die Periplasmapräparation wurde ebenfalls leicht modifiziert, um die  $c_{1CF}$ -Ausbeute zu maximieren. Die Zellpellets wurden in einem möglichst geringen Volumen Periplasmapräparations-Puffer auf Eis resuspendiert und mit 100  $\mu$ M Endkonzentration Pefabloc SC versetzt. Über Nacht wurde die Zellsuspension bei 4 °C in der Kältekammer ohne Lysozymzusatz gerührt, um eine vollständige Resuspendierung zu erreichen. Die Lysozymzugabe erfolgte erst am nächsten Tag, wobei das Enzym nicht als vorbereitete Stammlösung sondern als Feststoff/Lyophylisat in einer Endkonzentration von 60  $\mu$ g/ml zugegeben wurde. Anschließend wurde bei RT für 30 min. gerührt, um dem Lysozym geeignete Bedingungen für seine Enzymaktivität zu gewährleisten. Der osmotische Schock wurde dann durch Zugabe von 1 Vol kaltem H<sub>2</sub>O eingeleitet und für 15 min in der Kälte gerührt. Das rötliche Periplasma wurde durch Ultrazentrifugation von den Sphäroplasten und Zelltrümmern abgetrennt. Leider wies auch das Pellet nach der Ultrazentrifugation immer noch eine rötliche Färbung auf, die allerdings durch das eben beschriebene Verfahren minimiert werden konnte. Auf einen weiteren Aufschluss dieses Pellets wurde im Gegensatz zum herkömmlichen Protokoll aus Gründen der Periplasmaverunreinigung verzichtet. Da sich das Periplasma

teilweise aufgrund der aus lysierten Zellen stammenden genomischen DNA als sehr viskos erwies, wurde eine Ultraschallbehandlung angeschlossen, um es nachfolgend besser auf eine Säule auftragen zu können. Des Weiteren wurde der pH-Wert des Periplasmas überprüft und gegebenenfalls auf pH 8 eingestellt, was dem pH-Wert der nachfolgenden Q-Sepharose-Säule entsprach. Geschah dies nicht, wies  $c_{1CF}$  eine wesentlich schwächere Bindung auf der Anionenaustauschersäule mit breiten Elutionspeaks und einer schlechteren Auftrennung auf. Es stellte sich heraus, dass sich beim Durchlaufen des Salzgradienten (siehe 2.3.4.1) zwei rote Peaks auf der Anionenaustauschersäule bildeten, die getrennt aufgefangen und per SDS-PAGE, Hämefärbung und Redoxspektren überprüft wurden. Beide Fraktionen zeigten identische Redoxspektren aber unterschiedliche Bandenmuster im SDS-Gel und in der Hämefärbung.



**Abbildung 3.1: SDS-PAGE der Q-Sepharose-Aufreinigung**

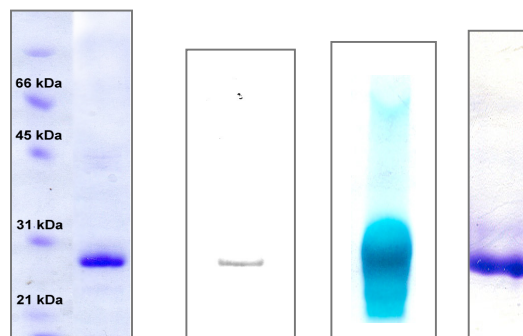
Dargestellt sind die ankonzentrierten Eluate der beiden Hauptpeaks; Peak1 eluiert im Gradienten früher als Peak2, beide zeigen die gleichen Redoxspektren, unterscheiden sich jedoch in der Doppelbande zwischen 21 und 31 kDa (siehe 3.1.4)

Der zweite Peak, der bei ungefähr 350 mM Salz eluierte und im SDS-Gel eine Doppelbande zwischen 25-30 kDa aufwies (siehe 3.1.4), wurde ankonzentriert, mit Pefabloc SC versetzt und weiter über eine Sephacryl-S100 Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Auch hier bildeten sich zwei rote Peaks, die getrennt aufgefangen und ebenfalls über Redoxspektren und SDS-PAGE charakterisiert wurden. Der zweite Peak, der im SDS-Gel eine Cytochrom-Bande bei ca. 26-28 kDa zeigte, wurde hier ebenfalls weiterverwendet, die Fraktionen vereinigt, ankonzentriert und bei -20 °C gelagert.

### 3.1.2 Biochemische Charakterisierung

Biochemisch wurde der Cytochrom  $c_{1CF}$  WT durch SDS-PAGE (2.3.6), Westernblot-Analyse (2.3.10) und Hämefärbung (2.3.9) charakterisiert. Das aufgereinigte  $c_{1CF}$  läuft im SDS-Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 28-30 kDa. Immunologisch konnte das Cytochrom  $c_{1CF}$  durch Westernblot-Analyse mit dem anti- $c_1$ -Antikörper R nachgewiesen werden. Der kovalente Einbau des  $c$ -Typ Häms wurde

mittels Häm-färbung überprüft und eine einheitliche Faltung über Maurer-Nativ-Gelelektrophorese kontrolliert.



**Abbildung 3.2: Biochemische Charakterisierung des  $c_{1CF}$**   
SDS-PAGE (links), Westernblot (Mitte, links), Häm-färbung (Mitte, rechts) und Maurer-Nativgel (rechts) des Cytochrom  $c_{1CF}$ -WT

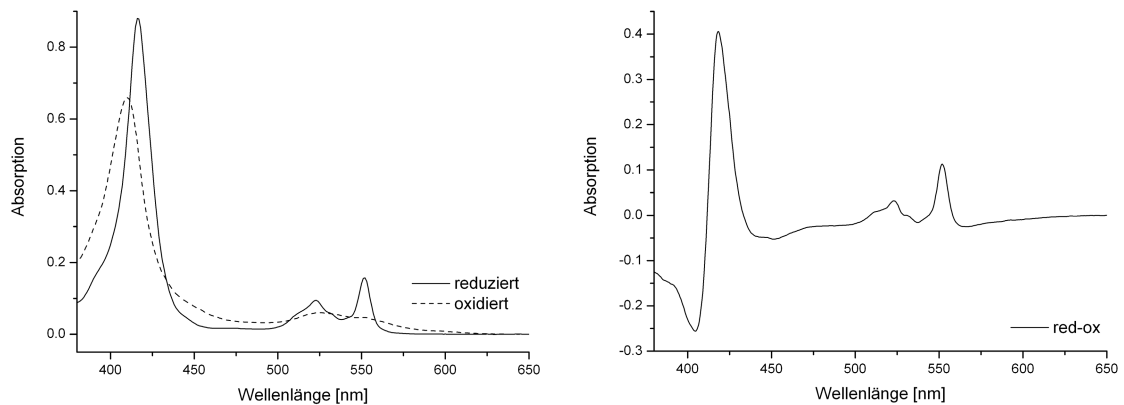
### 3.1.3 Spektroskopische Charakterisierung

Die spektralen Eigenschaften und Redoxaktivität des Cytochrom  $c_{1CF}$ -WT wurden über die Aufnahme von Redoxdifferenzspektren untersucht. Des Weiteren wurde ein spezifischer Extinktionskoeffizient über Pyridinhämochromspektren bestimmt und das Häm:Protein-Verhältnis untersucht, um sicherzugehen, dass der kovalente Hämeinbau ins Cytochrom-Apoprotein quantitativ verläuft. Die Koordination des Häms durch den axialen Methioninliganden wurde über die Aufnahme von *charge transfer*-Spektren untersucht.

#### Redoxdifferenzspektren

Durch Reduktion mit Ascorbat lässt sich Cytochrom  $c_{1CF}$  vollständig reduzieren und ein Reduktionsspektrum aufnehmen, mit einem Soret-Peak bei 418 nm, einem  $\alpha$ -Peak bei 553 nm und einem  $\beta$ -Peak bei 522 nm. Ein Oxidationsspektrum ohne störende Absorption von zum Beispiel Kaliumhexacyanoferrat lässt sich aufnehmen, indem man  $c_{1CF}$  unter aeroben Bedingungen für 30 min bei RT mit katalytischen Mengen an Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase inkubiert. Durch eine unspezifische Wechselwirkung wird das Cytochrom  $c_{1CF}$  langsam durch die Oxidase oxidiert. Das Oxidationsspektrum weist einen Soret-Peak bei 410 nm auf. Charakterisiert wird das Cytochrom  $c_{1CF}$  durch einen  $\alpha$ -Peak bei 553 nm im Redoxdifferenzspektrum.





**Abbildung 3.3: Absorptionsspektroskopische Charakterisierung des Cytochrom  $c_{1CF}$ -WT**

Gezeigt sind das Reduktions- und Oxidationsspektrum (links) und das Redoxdifferenzspektrum (rechts); die Reduktion erfolgte mit Ascorbat, die Oxidation durch Zusatz katalytischer Mengen an  $\alpha\alpha_3$ -Oxidase

### Bestimmung des Extinktionskoeffizienten

Ein für das *core*-Fragment spezifischer Extinktionskoeffizient wurde leicht modifiziert nach Berry und Trumpower (Berry and Trumpower 1987) mit Hilfe von Pyridinhämochromspektren bestimmt. Hierbei wird das Cytochrom in einer 50 mM NaOH/20 % Pyridin-Lösung verdünnt, die das Cytochrom denaturiert, dadurch das kovalent gebundene Häm aus seiner nativen Proteinumgebung löst und mit Pyridin in 5. und 6. Koordinationsstelle ligandiert, wodurch das Häm des  $c_{1CF}$  den gleichen Extinktionskoeffizienten wie alle *c*-Typ Pyridinhämochrome von  $\epsilon_{R-O, 550-535nm} = 23,97 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Berry and Trumpower 1987) erhält. Über das Pyridinhämochromspektrum wurde mit diesem Extinktionskoeffizienten die Hämkonzentration bestimmt und diese nach der Aufnahme eines normalen Redoxdifferenzspektrums nach Lambert-Beer eingesetzt, um den  $c_{1CF}$ -spezifischen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{R-O, 553-537nm} = 22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  zu berechnen.

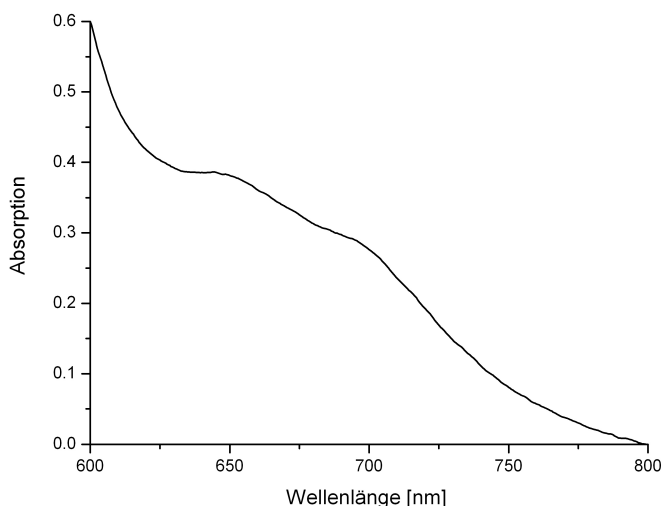
### Häm:Protein-Verhältnis

Das Häm:Protein-Verhältnis wurde durch den Vergleich der nach Lowry bestimmten Proteinkonzentration mit der aus Redoxspektren ermittelten Hämkonzentration berechnet. Hierfür wurde ein Extinktionskoeffizient für Cytochrom  $c_{1CF}$ -WT von  $\epsilon_{R-O, 553=557nm} = 22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und ein Molekulargewicht von 24,4 kDa (siehe Abschnitt 3.1.4.1) verwendet. Es ergab sich ein Häm:Protein-Verhältnis von 99 % und somit der Nachweis für einen quantitativen Hämeinbau ins  $c_{1CF}$ -Apoprotein.

### Charge transfer-Spektrum und Häm-Koordination

Zum Nachweis der Häm-Koordination können spektroskopisch sogenannte *charge transfer*-Übergänge detektiert werden. Dabei handelt es sich um Elektronenübergänge aus den Fe-Orbitalen in die Orbitale des axialen Liganden oder in die des Porphyringerüsts. Als Nachweis für die Häm-Koordination durch den axialen Methionin-Liganden dient die 695 nm-Bande (Theorell & Åkesson, 1941), die

charakteristisch für Klasse I *c*-Typ Cytochrome ist. Diese Bande ist pH-sensitiv und konformationsabhängig. Ein Verlust der 695 nm-Bande ist gleichbedeutend mit einer Deplazierung des axialen Methionin-Liganden (zum Beispiel durch Konformationsänderungen), weswegen sie als diagnostisches Hilfsmittel zur Überprüfung der Häm-Koordination eingesetzt wird. Zur Detektion der schwachen *charge transfer*-Bande wurde ein Absorptionsspektrum (600 bis 800 nm) einer konzentrierten  $c_{1CF}$ -Lösung (mM) aufgenommen.



**Abbildung 3.4: Charge transfer-Spektrum des  $c_{1CF}$ -WT**  
Nachweis der Häm-Koordination durch das distale Methionin durch die 695 nm-Bande

Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, weist  $c_{1CF}$ -WT eine Schulter bei 695 nm auf, die der schwachen *charge transfer*-Bande entspricht. Die Ergebnisse der Häm-Charakterisierung sind zusammenfassend in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.1: Spektroskopische Charakterisierung der  $c_{1CF}$ -WT-Hämgruppe**

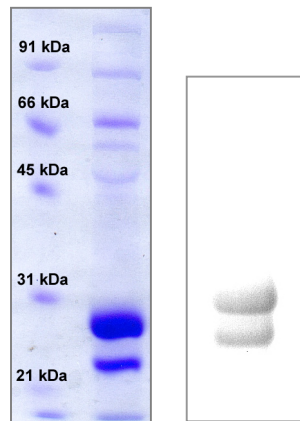
Die Charakterisierung erfolgte durch die Aufnahme von Redoxdifferenzspektren, Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten über Pyridinhämochromspektren, Untersuchung des Häm:Protein-Verhältnisses und Nachweis der Hämkoordination durch *charge transfer*-Spektren.

Methode	Ergebnis	Aussage/Nachweis
Redoxdifferenzspektrum	$\alpha$ -Peak bei 553 nm	Cytochrom-Charakterisierung über $\alpha$ -Peak bei 553 nm
Pyridinhämochromspektrum	$\epsilon_{r-o, 553-537nm} = 22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	spezifischer Extinktionskoeffizient zur genauen Berechnung von Konzentrationen über Redoxdifferenzspektren
Häm:Protein-Verhältnis	1:1	quantitativer Hämeinbau
<i>charge transfer</i> -Spektrum	Bande bei 695 nm	Häm-Koordination durch den axialen Met-Liganden

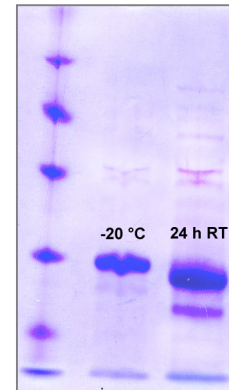
### 3.1.4 Cytochrom $c_{1CF}$ -Abbaufragment

Bei der Aufreinigung des Cytochrom  $c_{1CF}$  tauchte in den SDS-Kontrollgelen immer wieder eine relativ zum  $c_{1CF}$  tiefer laufende Bande auf, die sich nur schwer durch chromatographische Verfahren von der oberen abtrennen ließ. Beide Banden ließen sich

immunologisch durch Westernblot-Analyse mit dem anti- $c_1$ -Antikörper R und mittels Hämfärbung anfärben (Abbildung 3.5). Somit schien es sich bei der unteren Bande um ein verkürztes, Häm-tragendes Cytochrom  $c_{1CF}$  zu handeln, das vielleicht ein Abbauprodukt der oberen  $c_{1CF}$ -Bande darstellt.



**Abbildung 3.5: Doppelbande des  $c_{1CF}$ WT**  
SDS-Gel (links) und Westernblot (rechts)

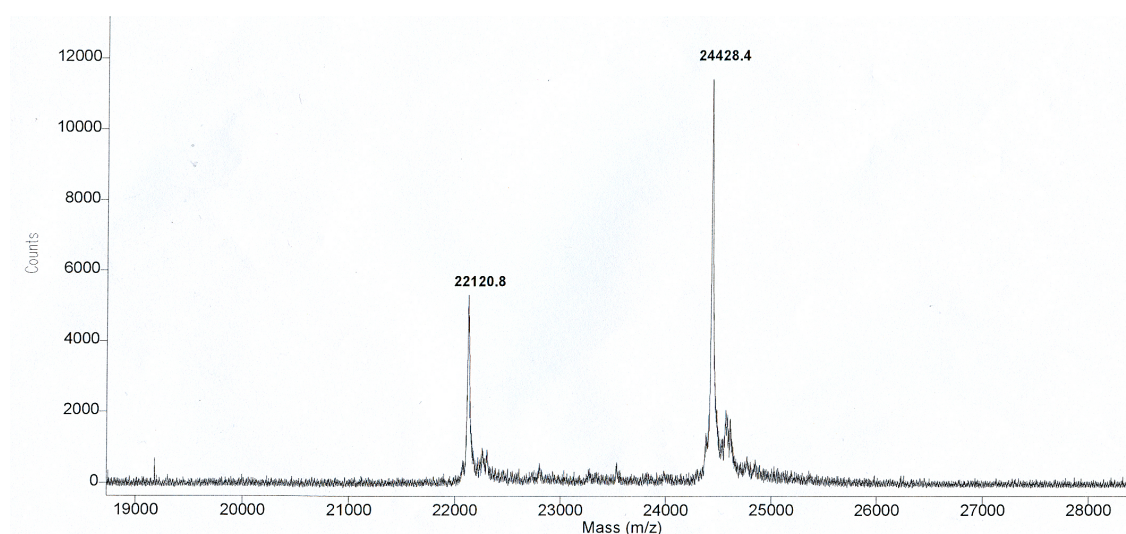


**Abbildung 3.6: Bildung der  $c_{1CF}$ -Abbaubande**  
SDS-Gel der Lagerung bei  $-20\text{ °C}$  (Bahn links) und  
Inkubation für 24 Stunden bei RT (Bahn rechts)

Um dies zu überprüfen, wurde eine aufgereinigte  $c_{1CF}$ WT-Probe genommen (die sich im SDS-Gel als eine Bande bei ungefähr 26-28 kDa darstellte) und ein Teil davon 24 h bei RT inkubiert, während die andere Hälfte bei  $-20\text{ °C}$  weggefroren wurde. Beide Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert, wobei sich herausstellte, dass schon nach 24-stündiger Inkubation bei RT die untere Bande wieder nachgebildet wurde. Somit scheint es sich bei dem Protein der unteren Bande um ein Abbauprodukt des Cytochrom  $c_{1CF}$  zu handeln.

#### 3.1.4.1 MALDI-MS

Da sich aus den SDS-Gelen ein Laufunterschied von ca. 2-3 kDa ergab, ließ sich daraus schließen, dass sich die beiden Cytochrome um 22-25 Aminosäuren unterscheiden mussten. Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein MALDI-MS-Massenspektrum von der Doppelbande aufgenommen (Björn Meyer, Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt), das zwei Peaks in einem Verhältnis von ungefähr 1:2 mit den Massen  $22120,8 (\pm 2)$  Da und  $24428,4 (\pm 3,2)$  Da zeigt (Abbildung 3.7). Daraus ergibt sich ein Masseunterschied von 2308 Da, der einer Differenz von ca. 22-25 Aminosäuren entspricht.



**Abbildung 3.7: MALDI-Massenspektrum der  $c_{1CF}$ -Doppelbande**

Massenspektrometrie der  $c_{1CF}$ -Doppelbande ergibt zwei Hauptpeaks mit einer Masse von 22,1 kDa und 24,4 kDa in einem Verhältnis 1:2

### 3.1.4.2 N-terminale Sequenzierung

Nun war zu klären, von welchem Terminus der Abbau ausgeht. Hierfür wurden beide Cytochrome einer N-terminalen Sequenzierung unterzogen (Tewfik Soulimane, University of Limerick). Diese bestätigte ein Verhältnis von 1:2 des Abbauproduktes zum  $c_{1CF}$  wie es durch das Massenspektrum erhalten worden war und ergab, dass der Abbau vom N-Terminus erfolgte. Das Abbaufragment ist gegenüber dem  $c_{1CF}$  um 24 Aminosäuren verkürzt, wobei die Schnittstelle zwischen Ile 220 und dem Serin 221 (bezogen auf die Sequenz des nativen Cytochrom  $c_1$ ) liegt.

*core*-Fragment an dieser Stelle spaltet. Eine Sequenz-Analyse (*Peptidecutter*; <http://au.expasy.org>) nach speziellen Protease-Schnittstellen erbrachte kein Ergebnis. Allerdings wird es sich bei der Protease aufgrund der heterologen Expression in *E. coli* um ein *E. coli*-spezifisches Enzym handeln. Bei allen nachfolgenden Präparationen wurde dementsprechend darauf geachtet, nach jedem Aufreinigungsschritt Protease-Inhibitor zuzugeben, in der Kälte bzw. auf Eis zu arbeiten und die Cytochrom-Lösungen möglichst schnell bei  $-20\text{ °C}$  wegzufrieren.

## 3.2 Cytochrom $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten

Zentrales Thema dieser Arbeit war es, die Interaktion und den Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $c_1$  und  $c_{552}$  aus *Paracoccus denitrificans* zu charakterisieren. Hierfür wurden als Modellsystem lösliche Fragmente der beiden Redoxpartner verwendet. Frühere ET-Studien mit löslichen Fragmenten des Cytochrom  $c_{552}$  ( $c_{552F}$ ) und der Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase ( $Cu_A$ -Fragment) hatten eine elektrostatische Komponente gezeigt, die für die Annäherung der beiden Redoxpartner zu einem *Encounter*-Komplex führt, gefolgt von einer durch hydrophobe Kontakte ausgeübten Feinjustierung zum effizienten ET-Komplex (Maneg, Ludwig *et al.* 2003). Die

elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  sind durch A. Eichhorn (Eichhorn, Dissertation 2003) untersucht worden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der hydrophoben Interaktionen, die zu einem aktiven und effizienten ET-Kopmplex führen. Dabei wurde auf die Informationen aufgebaut, die aus dem Cokristall des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes (QCR) mit Cytochrom  $c$  aus *Saccharomyces cerevisiae* über die direkten hydrophoben Kontakte zwischen beiden Redoxpartnern erhalten worden waren (Lange and Hunte 2002). Die Aminosäurereste, die in der Hefestruktur hydrophobe Kontakte zwischen Cytochrom  $c_1$  (CYT1) und Cytochrom  $c$  (CYC) ausbilden, wurden als Grundlage genommen, um äquivalente Positionen in der Sequenz des *P. denitrificans*  $c_{1CF}$  zu finden. Im Gegensatz zum statischen strukturellen Ansatz des Hefe-Cokristalls sollten diese Positionen des *Paracoccus*-Systems allerdings in einem dynamischen Ansatz mittels gerichteter Mutagenese und schnellen *pre-steady state*-Kinetiken untersucht werden. Im Folgenden wird die Auswahl der *P. denitrificans*-Positionen, die Konstruktion der Mutanten und deren Herstellung beschrieben.

### 3.2.1 Konstruktion der Interaktionsmutanten

Die direkten Interaktionen zwischen CYT1 und CYC im Hefe-Cokristall sind eindeutig unpolarer Natur, wobei die Hauptinteraktion durch eine Kation- $\pi$ -Wechselwirkung des Phe230 (CYT1) zum Arg13 (CYC) vermittelt wird. Weitere unpolare Kontakte werden durch die Paare Ala103 (CYT1)/Ala81 (CYC), Met233 (CYT1)/Arg13 (CYC) und Ala168 (CYT1)/Val28 (CYC) ausgebildet. Lediglich zwei potentiell polare Interaktionen konnten detektiert werden: Glu235 (CYT1)/Lys86 (CYC) und Ala164 (CYT1)/Lys79 (CYC), wobei die Orientierung der Lysin-Seitengruppen im Kristall uneindeutig war. Die Interaktions-Pärchen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst:

**Tabelle 3.2: Interaktionen und Abstände zwischen CYT1 und CYC**

Abstände zwischen Aminosäureresten des Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c$  im QCR/CYC-Cokristall aus *Saccharomyces cerevisiae*, die direkt miteinander wechselwirken (Lange and Hunte 2002)

Cytochrom $c_1$ (CYT1)	Cytochrom $c$ (CYC)	Abstand [Å]
<b>Unpolare Interaktionen</b>		
Ala-103 CB	Ala-81 CB	3,4
Phe-230 CD1	Arg-13 CD	3,6
Phe-230 CD1	Arg-13 NE	3,3
Phe-230 CE1	Arg-13 CG	3,8
Phe-230 CE1	Arg-13 CD	3,8
Phe-230 CE1	Arg-13 NE	3,8
Phe-230 CG	Arg-13 NE	4,0
Phe-230 CG	Arg-13 CD	4,0
Phe-230 CZ	Arg-13 CG	4,0
Phe-230 CZ	Thr-12 O	3,3
Met-233 CE	Arg-13 NH2	3,8
Ala-168 O	Val-28 CG1	4,0
<b>Potentielle polare Interaktionen</b>		
Glu-235 OE2	Lys-86 NZ	3,3
Ala-164 O	Lys-79 NZ	3,8

Zu diesen Positionen sollten nun die äquivalenten Reste in der *Paracoccus*  $c_{1CF}$ -Sequenz gefunden, diese durch gerichtete Mutagenese in ihrer Polarität bzw. Ladung und/oder ihrem Raumbedarf verändert und die Auswirkungen der Mutationen in einem dynamischen Ansatz mittels schneller Kinetiken vergleichend zum WT untersucht werden. Dabei sollten durch die Veränderung der Polarität/Ladung die Art der Interaktion untersucht werden, um festzustellen, welche Kräfte in der jeweiligen Position an der Wechselwirkung zum  $c_{552F}$  beteiligt sind, während eine Veränderung des Raumbedarfes den Aspekt der Sterik beleuchten sollte.

### 3.2.1.1 Sequenzalignment

Zum Auffinden der entsprechenden Positionen in *P. denitrificans* wurde ein Sequenzalignment mit fünf sowohl pro- als auch eukaryontischen  $c_1$ -Sequenzen erstellt (*R. capsulatus*, *R. sphaeroides*, *P. denitrificans*, *S. cerevisiae* und *Bos taurus*), das in Abbildung 3.8 gezeigt ist.

Ala103 aus Hefe entspricht Ala247 in *Paracoccus*. Dieser Rest liegt im konservierten Häm-Bindemotiv CxACH. Im Sequenzalignment zeigt sich, dass 3 von 5 Resten in dieser Position Alanine sind und die beiden anderen Serin und Threonin.

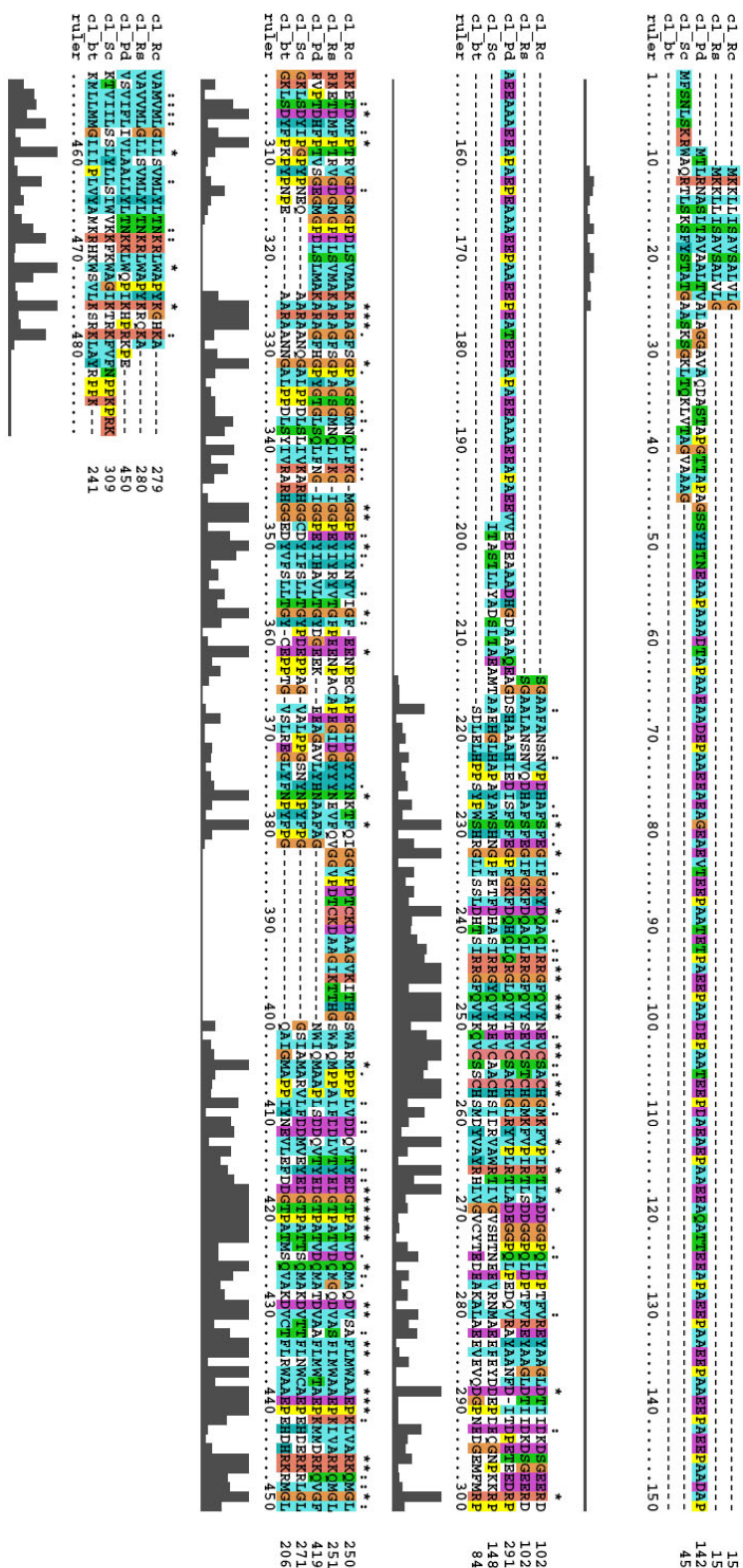
Dem Hefe Ala164 wurden die Positionen Lys315 und Ala314 in *Paracoccus* zugeordnet. Die Positionen beider Organismen liegen direkt vor einem konservierten ARA-Sequenzmotiv. Lys315 ist im Alignment direkt Ala164 zugeordnet. Allerdings weist das Alignment in den eukaryontischen Sequenzen direkt vor Position 164 eine Lücke auf und die Zuordnung von Lys315 zu einem Ala ist deshalb fraglich. Aus diesem Grund wurde Ala314 als Alternative zu Lys315 ebenfalls für die Mutagenese ausgesucht.

Ala168 (*S. c.*) wurde Gly319 (*P. d.*) zugeordnet. Beide Reste liegen unmittelbar hinter dem konservierten ARA-Motiv, wobei sich in dieser Position in den  $c_1$ -Sequenzen der Prokaryonten ausschließlich Glycine befinden, während sie bei den Eukaryonten durch Alanin besetzt ist.

Phe230 in Hefe, das die Kation- $\pi$ -Interaktion zum CYC eingeht, konnte in *Paracoccus* kein aromatischer Rest zugeordnet werden. Als direkter Partner geht Ser378 aus dem Alignment hervor. In Eukaryonten scheint ein aromatischer Rest in dieser Position konserviert zu sein (Y oder F), wohingegen diese Position in Prokaryonten nicht konserviert scheint.

Met233 aus Hefe wurde Gln381 zugeordnet. Auch diese Position scheint nicht konserviert, neben Gln und Met kommen in dieser Position ebenso die unpolaren Aminosäuren Val und Leu vor.

Glu235 und der entsprechende *Paracoccus*-Rest Thr383 liegen vor einem längeren konservierten Sequenzabschnitt (YEDGTPAT). Bei Prokaryonten tritt in dieser Position einheitlich Threonin auf, während sie bei Eukaryonten durch Glutamat besetzt ist.



**Abbildung 3.8: Cytochrom c<sub>1</sub>-Sequenzalignment**

Alignment von fünf verschiedenen Cytochrom c<sub>1</sub>-Sequenzen sowohl pro- als auch eukaryontischer Herkunft (Rc = *Rhodobacter capsulatus*, Rs = *Rhodobacter sphaeroides*, Pd = *Paracoccus denitrificans*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae* und bt = *Bos taurus*). Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm ClustalX (Thompson, Higgins *et al.* 1994) erstellt.



Als weitere Mutationsposition wurde in *P. denitrificans* Val244 ausgesucht, welches Val100 in Hefe entspricht. Dieser Rest zeigt eine ausgeprägte Oberflächenexposition in der Hefestruktur, allerdings keine direkte Wechselwirkung im Cokristall.

Die aus dem Sequenzalignment abgeleiteten Mutagenese-Positionen für das *P. denitrificans*  $c_1$ , die korrespondierenden Positionen im *S. cerevisiae* Cokristall sowie die geplanten Mutanten sind in Tabelle 3.3 in der Übersicht aufgeführt.

**Tabelle 3.3: Ausgewählte Positionen im  $c_{1CF}$  für die zielgerichtete Mutagenese**  
Die Positionen wurden anhand des *S. c.* Cokristalls (1KYO, (Lange and Hunte 2002) und anschließendem Sequenzalignment bestimmt.

Position in <i>S. c.</i>	Position in <i>P. d.</i>	Mutanten
A103	<b>A247</b>	A247N
A164	<b>K315</b>	K315E,T
	<b>A314</b>	A314S
A168	<b>G319</b>	G319A,S
F230	<b>S378</b>	S378A,F
M233	<b>Q381</b>	Q381V
E235	<b>T383</b>	T383C
V100	<b>V244</b>	V244Q,T

### 3.2.1.2 Strukturalignments

Da es bis jetzt keine Strukturinformationen für Cytochrom  $c_1$  aus *P. denitrificans* gibt, wurde versucht, die *P. d.*  $c_1$ -Struktur über vorausgehende Sequenzalignments auf die Cytochrom  $c_1$ -Struktur aus dem Hefe  $bc_1$ -Komplex (1KYO, *chain O*) zu modellieren, um einen Eindruck der Lage und der Orientierung der für die gerichtete Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste im *P. d.*  $c_1$  zu bekommen. Hierfür wurden Modellierungs-Programme verschiedener *Server* verwendet, um die modellierten Strukturen vergleichen und Unterschiede herausarbeiten zu können. Im Folgenden werden nun die Programme und Strukturen kurz vorgestellt, die Lage und Orientierung der Mutagenesereste beschrieben und die Unterschiede in den Strukturen herausgestellt. Es wurden die Programme Swissmodel (Guex and Peitsch 1997; Schwede, Kopp et al. 2003), Jigsaw3D (Bates and Sternberg 1999; Bates, Kelley et al. 2001; Lambert, Leonard et al. 2002) und Esypred3D (Lambert, Leonard *et al.* 2002) verwendet. Ein Versuch mit dem Programm CPHmodels ([www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/](http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/)) erbrachte kein verwertbares Ergebnis.

#### Swissmodel

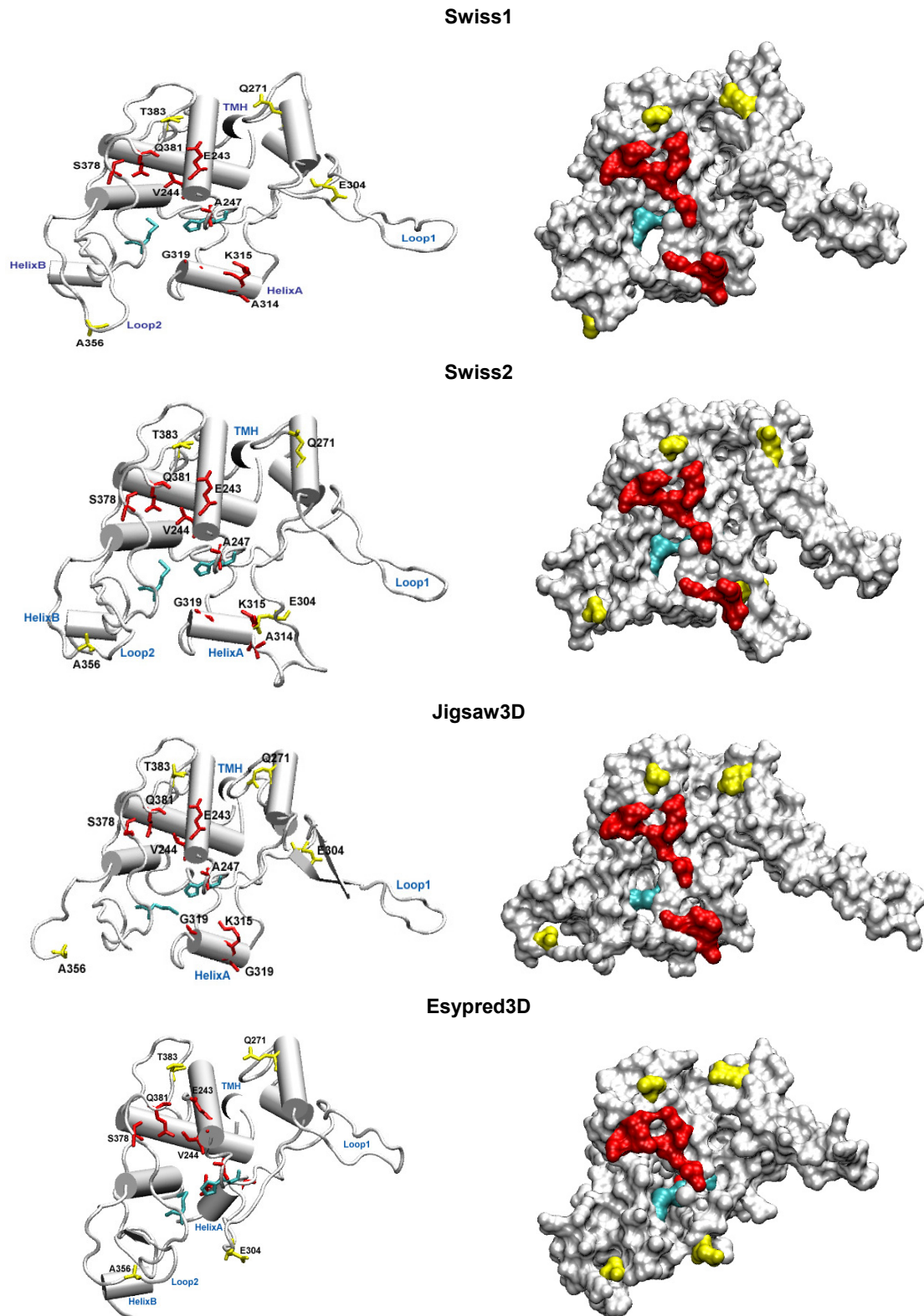
Als Grundlage für die Strukturberechnung diente ein selbsterstelltes Sequenzalignment und die Angabe der *Template*struktur, auf die die Zielsequenz modelliert werden sollte. Über diesen Server wurden zwei *P. d.*  $c_1$ -Strukturen erstellt. Das Strukturmodell *Swiss1* basiert auf einem Sequenzalignment von 14 verschiedenen  $c_1$ -Sequenzen, von denen der Großteil eukaryontischer Herkunft ist, während *Swiss2* auf dem Sequenzalignment der fünf verschiedenen  $c_1$ -Sequenzen basiert, das oben angegeben ist. Je nach Verhältnis von pro- zu eukaryontischen  $c_1$ -Sequenzen, wird die *Paracoccus*-Zielsequenz der Hefe-Sequenz angepasst und es entstehen unterschiedliche Lücken im Alignment, was nachfolgend leicht unterschiedliche Strukturmodelle ergibt. Abbildung 3.9 zeigt die



beiden Strukturen *Swiss1* und *Swiss2* mit Blick auf die Hämspalte und die potentielle Interaktionsfläche (die Transmembranhelix des nativen  $c_1$ , die im *core*-Fragment fehlt, ist mit TMH gekennzeichnet) in einer Sekundärstruktur- und einer Oberflächendarstellung. Die Interaktionsreste sind rot dargestellt. Die Positionen, die für FRET- und Ruthenium-Laserflash-Experimente zu Cysteinen mutiert werden sollen (Abschnitt 0), sind in gelb dargestellt. Da das Häm in den modellierten Strukturen nicht dargestellt werden konnte, sind zur besseren Orientierung die Hämliganden (cyan) abgebildet. Basierend auf den verschiedenen Sequenzalignments ergibt sich eine sehr ähnliche Gesamtstruktur. Der Bereich oberhalb der Hämspalte ist nahezu identisch in beiden Strukturen. Dieser Bereich beinhaltet die Positionen E243, V244, A247, S378, Q381 und T383. Diese Reste umgeben die Hämspalte direkt und sind Oberflächenexponiert. Die Ausnahme bildet hier die Position V244, die durch eine  $\alpha$ -Helix teilweise verdeckt wird und zur Innenseite der Hämspalte zeigt. Die Position Q271 unterscheidet sich in beiden Strukturen nur in ihrer räumlichen Orientierung, wohingegen die Position E304 sich in beiden Strukturen aufgrund einer anderen Positionierung des Loops (Loop1) unterscheidet und im *Swiss2*-Modell nahe Helix A lokalisiert ist. In der *Swiss1*-Struktur befindet sich E304 direkt auf Loop1, ist aber durch diesen anscheinend von der Interaktionsfläche abgeschirmt und nicht zugänglich, während sie im *Swiss2*-Modell nur partiell verdeckt wird. Helix A unterscheidet sich in beiden Strukturen in ihrer Länge, was eine leicht veränderte Orientierung der Positionen A314, K315 und G319 zur Folge hat. Auch Position A356 variiert in beiden Strukturen aufgrund einer unterschiedlichen Positionierung von Loop2. Insgesamt sind beide Strukturen also im oberen Bereich und direkt um die Hämspalte fast identisch und die Unterschiede entstehen durch die unterschiedliche Interpretation undefinierter Loopregionen.

### Jigsaw3D

Bei Angabe der Zielsequenz führt das Programm selbständig ein Alignment gegen alle Proteine aus, die eine Sequenzähnlichkeit aufweisen, auf das kein Einfluss genommen werden kann. Es ist aber möglich, anschließend eine *Template*struktur anzugeben, nach der die Zielsequenz modelliert werden soll (hier ebenfalls 1KYO). Der Bereich oberhalb der Hämspalte ist dem der Swissmodel-Strukturen sehr ähnlich und es ergeben sich nur kleinere Unterschiede in der Orientierung der Aminosäuren in dieser Region (Abbildung 3.9). Die Hauptunterschiede befinden sich wieder im Bereich des Loop1, Helix A, Helix B und Loop2. Loop1 scheint ausgedehnter als in den beiden Swissmodel-Strukturen zu sein und weist eine zusätzliche  $\beta$ -Faltblattstruktur auf. Die Position E304 ist ähnlich lokalisiert wie in *Swiss1*, wird aber auch hier von Loop1 verdeckt und ist von der Interaktionsfläche nicht zugänglich (siehe Oberflächendarstellung). Auch Helix A ist den Swissmodell-Strukturen sehr ähnlich. Helix B und Loop2 sind in dieser Struktur gar nicht definiert und es befindet sich an dieser Stelle sogar eine Lücke, so dass die Position A356 hier fraglich ist.



**Abbildung 3.9: Strukturmodelle des *P. denitrificans* Cytochrom  $c_{1CF}$**

Die modellierten Strukturen basieren auf der Struktur des Hefe Cokristalls (1KYO) und unterschiedlichen Sequenzalignments. Die Sekundärstrukturdarstellungen sind links, die Oberflächendarstellungen rechts abgebildet. Interaktionspositionen sind in rot, die Hämiliganden in cyan und die Cysteinmutanten (Abschnitt 3.3) sind in gelb dargestellt.

### EsyPred3D

Dieses Programm richtet nur die beiden vorgegebenen Sequenzen aus (hier also die *Paracoccus c*<sub>1</sub>- und die Hefe *c*<sub>1</sub>-Sequenz) und passt dann die Zielsequenz der *Template*sequenz strukturell an. Auch hier ist die Region oberhalb der Hämsspalte denen der anderen Modelle sehr ähnlich. Ein Hauptunterschied dieser Struktur besteht in der Position von Helix A, die in dieser Struktur unten in der Hämsspalte hinter den Aminosäuren der Hämligandierung verborgen ist (siehe Abbildung 3.9). Somit wären die Positionen A314, K315 und G319 direkten Wechselwirkungen zum *c*<sub>552</sub> gar nicht zugänglich (siehe Abbildung 3.9). Die Aminosäure E304 ist ähnlich lokalisiert wie im *Swiss2*-Modell und aufgrund der anderen Positionierung von Helix A auch Oberflächenexponiert. Loop2 und Helix B sind ebenfalls ähnlich orientiert wie im *Swiss2*-Modell.

### 3.2.2 Mutagenese

Die Mutagenese wurde mittels der *QuikChange*-Methode (Stratagene) durchgeführt (siehe 2.2.10.2). Als *Template* für die Mutagenesereaktion diente das *c*<sub>1CF</sub>-Fragment im pET-22b-Vektor (A. Eichhorn, 2003). Die Mutagenese-Primer wurden so konstruiert, dass sie 15 bp-Flanken auf der 3'- und 5'-Seite des mutagenen Triplets besitzen. Die Primer-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes *Primer Generator* analysiert und versucht, einzelne Basen so auszutauschen, dass durch Einführen einer stummen Mutation zusätzlich neue Restriktionsschnittstellen eingeführt oder vorhandene eliminiert werden, so dass der Erfolg der Mutagenese anhand einer Restriktionsanalyse überprüft werden konnte. Die Kontrollmöglichkeiten der Mutagenese durch Restriktion sind für die einzelnen Mutanten in Tabelle 3.4 angegeben. Es konnten nur ca. die Hälfte der Mutanten einer ersten Restriktionskontrolle unterzogen werden. Diese wurden nach positiver Restriktion zusätzlich sequenziert, während die Mutanten, bei denen eine Restriktionskontrolle nicht möglich war, gleich zur Sequenzierung gegeben wurden. Bis auf S378F, bei der die Mutagenese wiederholt nicht funktionierte, konnten alle Mutanten erfolgreich hergestellt werden.

**Tabelle 3.4: Restriktionskontrolle der *c*<sub>1CF</sub>-Mutagenese**

Durch Einführen einer stummen Mutation werden zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingeführt oder vorhandene eliminiert (Primeranalyse mit Hilfe des Programmes *Primer Generator*)

Mutante	Restriktionskontrolle durch		Restriktionsfragmente [bp]	
	Einführen einer Schnittstelle von	Eliminierung einer Schnittstelle von	WT	Mutante
V244Q	-	-	-	-
V244T	<i>Bsal</i>	-	6111	4086, 2025
A247N	-	-	-	-
A314S	-	<i>StyI</i>	357, 424, 5330	781, 5330
K315E	-	<i>StyI</i>	357, 424, 5330	781, 5330
K315T	-	<i>StyI</i>	357, 424, 5330	781, 5330
G319A	<i>NcoI</i>	-	6111	5754, 357
G319S	-	-	-	-
S378A	-	-	-	-
S378F	-	-	-	-
Q381V	<i>SexAI</i>	-	6111	-
T383C	-	<i>Eco91I</i>	4476, 1635	6111

### 3.2.3 Expression, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung

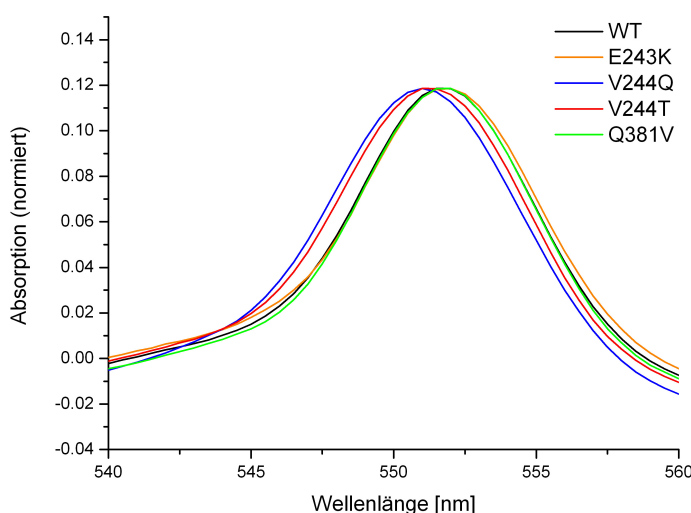
Die Expression und Aufreinigung wurde wie die des WT (Abschnitt 3.1.1) durchgeführt. Das pET- $c_{1CF}$ -Konstrukt wurde zunächst per Transformation in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) eingebracht und auf Ampicillin selektiert. Der Expressionsstamm wurde anschließend mit dem Hämreifungsplasmid pEC86 cotransformiert und auf Ampicillin und Chloramphenicol selektiert. Es folgte eine Testexpression und die Auswahl des zur Expression einzusetzenden Klons. Nachfolgend wurde unter Verwendung der optimierten Expressionsbedingungen eine 40 Liter-Anzucht durchgeführt und das Cytochrom über Periplasmapräparation, Q-Sepharose-Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration aufgereinigt.

Wie der  $c_{1CF}$ WT wurden die Mutanten per SDS-PAGE, Westernblot und Hämefärbung charakterisiert. Es zeigte sich kein vom WT abweichendes Verhalten: Das SDS-Gel wies die charakteristische Doppelbande zwischen 23-28 kDa auf, von der die untere Bande durch Gelfiltration abgetrennt wurde. Alle Mutanten ließen sich im Westernblot immunologisch mit dem anti- $c_1$ -Antikörper R nachweisen. Ein kovalent gebundenes  $c$ -Typ Häm ließ sich bei allen Mutanten in der Hämefärbung zeigen. Im Folgenden werden zusätzliche Charakterisierungsschritte beschrieben.

### 3.2.4 Spektroskopische Charakterisierung

#### Redoxdifferenzspektren

Da  $c$ -Typ Cytochrome über ihre  $\alpha$ -Bande aus dem Redoxdifferenzspektrum klassifiziert werden, wurden solche Spektren von allen Mutanten aufgenommen und mit dem des WT verglichen. Eine Auswahl ist exemplarisch in Abbildung 3.10 gezeigt.



**Abbildung 3.10:  $\alpha$ -Peaks der Redoxdifferenzspektren ausgewählter  $c_{1CF}$ -Mutanten**  
Die Mutanten E243K (orange), V244Q (blau), V244T (rot) und Q381V (grün) sind im Vergleich zum WT (schwarz) gezeigt; die Spektren wurden über den Absorptionswert des  $\alpha$ -Peak normiert.

Wie der WT zeigen die meisten Mutanten einen  $\alpha$ -Peak bei 553 nm, als Beispiel ist hier exemplarisch das Spektrum der Mutante Q381V dargestellt. Abweichungen treten bei

den Mutanten V244Q und V244T auf, die ein  $\alpha$ -Peakmaximum bei 552 nm aufweisen. Obwohl die Mutante E243K direkt zur Position V244 in der Sequenz benachbart ist, liegt das  $\alpha$ -Peakmaximum hier ebenfalls bei 553 nm.

### Pyridinhämochromspektren und Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Um die genauen Konzentrationen von  $c_{1CF}$ -Lösungen über Redoxdifferenzspektren bestimmen zu können, was unter anderem für die kinetischen Experimente von großer Bedeutung war, wurden die individuellen molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Mutanten, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, mittels Pyridinhämochromspektren bestimmt.

Die Extinktionskoeffizienten der Interaktionsmutanten im Vergleich zum WT sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

**Tabelle 3.5: Extinktionskoeffizienten der  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten**

Die Extinktionskoeffizienten wurden über Pyridinhämochromspektren bestimmt und sind vergleichend zum WT aufgeführt

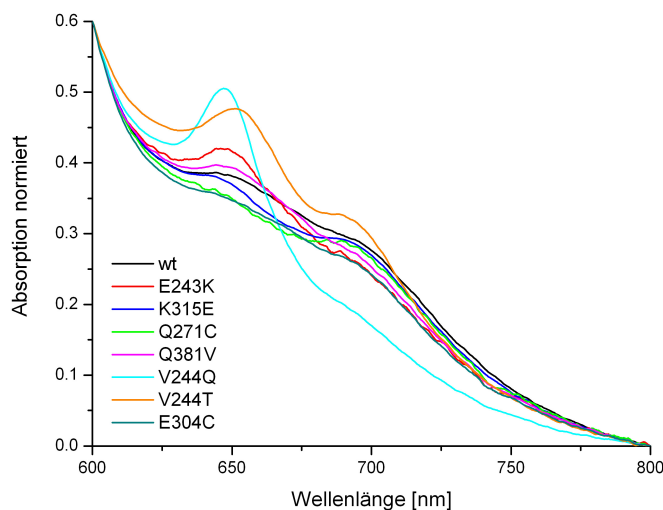
Cytochrom $c_{1CF}$	$\epsilon_{r-o, 553-537 \text{ nm}} [\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
WT	22,83
E243K	24,28
V244Q	16,78
V244T	20,77
A247N	21,93
A314S	21,95
K315E	20,55
K315T	22,64
G319A	22,13
S378A	20,70
Q381V	22,07

Die Werte der Extinktionskoeffizienten für die Mutanten variieren zwischen 16,78 und 24,28  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  mit einem WT-Koeffizienten von 22,83  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die Extinktionskoeffizienten der meisten Mutanten weichen nur leicht von diesem Wert ab. Die Mutante V244Q zeigt einen im Vergleich zu den anderen Mutanten niedrigeren Extinktionskoeffizienten von 16,78  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , wohingegen die Mutante V244T einen unauffälligen Wert von 20,77  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  aufweist. Die Mutante E243K weicht mit einem Wert von 24,28  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  nach oben vom WT-Wert ab.

### Häm-Koordination

Ausgewählte Mutanten wurden exemplarisch auf ihre Häm-Koordination durch den Methionin-Liganden mittels *charge transfer*-Spektren, wie unter 3.1.3 beschrieben, untersucht. Fast alle Mutanten weisen eine gut erkennbare 695 nm-Bande auf, so dass man von einer korrekten Häm-Koordination durch den Methionin-Liganden ausgehen kann. Auffällig ist das V244Q-Spektrum (cyan), das einen ausgeprägten Peak bei 645 nm und nur eine sehr flache Schulter bei 695 nm aufweist. Ebenfalls einen 645 nm-Peak weist die V244T-Mutante (orange) auf. Allerdings ist hier auch die 695 nm-Bande stärker ausgeprägt. E243K (rot) zeigt einen Peak bei 650 nm bei relativ schwacher 695 nm-Bande. Die Positionen E243 und V244 liegen direkt nebeneinander und die

Einführung eines polaren Restes mit relativ hohem Raumbedarf (Lys und Gln) scheint die Faltung leicht zu beeinflussen und zu Veränderungen der Häm-Mikroumgebung zu führen, die eine Deplazierung des distalen Methionin-Liganden zur Folge haben könnte.



**Abbildung 3.11: Charge transfer-Spektren des  $c_{1CF}$ WT und ausgewählten Mutanten**

Charakterisierung der Hämkoordination durch den distalen Methioninliganden über die 695 nm-charge transfer-Bande; gezeigt sind ausgewählte  $c_{1CF}$ -Mutanten im Vergleich zum WT

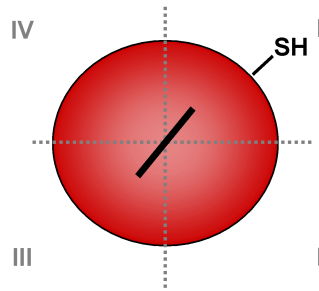
### 3.3 Cysteinmutanten des $c_{1CF}$ und $c_{552F}$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von Oberflächencysteinmutanten des Cytochrom  $c_{1CF}$  und des  $c_{552F}$  hergestellt, die zur Untersuchung des Elektronentransfers und der Komplexbildung in dynamischen Ansätzen eingesetzt wurden. Zum einen konnte ein photoaktiver Rutheniumkomplex kovalent über die SH-Gruppe der Oberflächencysteine an das Cytochrom  $c_{552F}$  gekoppelt und dieses Konjugat in *pre-steady state*-Laserflash-Kinetiken eingesetzt werden, um den Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  zu untersuchen (Abschnitt 3.7). Zum anderen wurden mit einem Satz verschiedener Cysteinmutanten des  $c_{1CF}$  und des  $c_{552F}$  Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-Messungen durchgeführt (Abschnitt 3.8), um Abstandsinformationen über den aktiven ET-Komplex zu gewinnen. Zur weiteren Untersuchung der Bedingungen für die Komplexbildung, sind Cysteinmutanten des  $c_{552F}$  genutzt worden, um dieses kovalent an eine Thiolsepharose-Affinitätssäule zu binden (Nina Schreglmann, Diplomarbeit 2003).

#### 3.3.1 Konstruktion der Cysteinmutanten

Im Hinblick auf die funktionellen, dynamischen Ansätze zur Untersuchung des ET und der Komplexbildung sollten die eingeführten Cysteine zwei Bedingungen erfüllen: Sie sollten sich in der Peripherie zur Hämspalte befinden, um die eigentliche Komplexbildung und einen effizienten Elektronentransfer nicht zu behindern und zusätzlich oberflächenexponiert sein, um die Solvenszugänglichkeit und damit eine problemlose Fluorophor- bzw. Rutheniumkopplung zu gewährleisten. Hierzu wurden die Röntgenstrukturdaten des  $c_{552F}$  (1QL3 und 1QL4 *protein data bank*) sowie die

modellierten Strukturen des  $c_{1CF}$  (siehe Abschnitt 3.2.1) herangezogen und die Cytochrome jeweils mit Blick auf die Hämspalte und die potentielle Interaktionsfläche in vier Quadranten aufgeteilt. In allen vier „Himmelsrichtungen“ wurden Aminosäurepositionen gesucht, die die Kriterien der Lokalisation in der Peripherie und Oberflächenexposition erfüllen und diese Positionen für die gerichtete Mutagenese ausgewählt. Das Konzept zur Bestimmung der Oberflächencystein-Positionen ist schematisch in Abbildung 3.12 dargestellt.

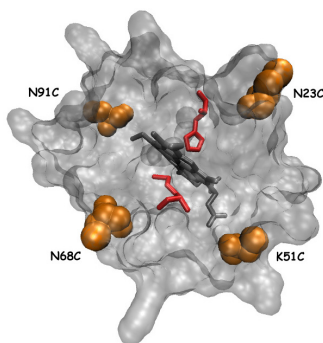


**Abbildung 3.12: Schematische Darstellung zur Konzeption der Oberflächencysteinmutanten**

Das Molekül wird mit Blick auf die Hämspalte in vier Quadranten unterteilt, in die jeweils ein Oberflächencystein durch gerichtete Mutagenese in eine Position eingebracht wird, die die Kriterien der Oberflächenexposition und Lage in der Häm-Peripherie erfüllt.

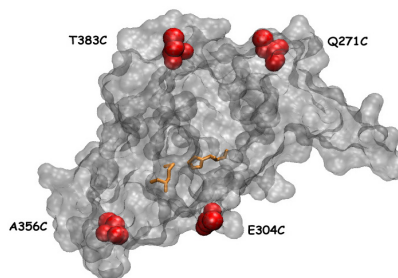
Sowohl Cytochrom  $c_{1CF}$  als auch  $c_{552F}$  weisen in ihren Aminosäuresequenzen nur die beiden Cysteine des Häm-bindemotivs auf. Für das lösliche Cytochrom  $c_{552F}$  wurden die Positionen D21, N23, K51, D67, N68 und N91 für den Austausch durch Cysteine ausgesucht. Die Herstellung und Charakterisierung der Mutanten N23C und K51C erfolgte in dieser Arbeit. Die Klonierung und Mutagenese der Positionen N68 und N91 wurde von Ilias Koutris unter Betreuung von Viktoria Drosou durchgeführt und die DNA-Konstrukte dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die heterologe Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der entsprechenden Proteine erfolgte in dieser Arbeit. Die Mutanten D21C und N67C wurden im Rahmen dieser Arbeit während der Diplomarbeit von Julia Metzner (Metzner, Diplomarbeit 2002) hergestellt, aufgereinigt und durch SDS-PAGE, Westernblot-Analyse und Häm-färbung biochemisch charakterisiert. Die  $c_{552F}$ -Mutanten für die nachfolgenden FRET- und Laserflash-Messungen sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Für das lösliche Cytochrom  $c_{1CF}$  wurden die Positionen Q271, E304, A356 und T383 für den Mutageneseansatz ausgewählt. Die Mutanten Q271C, E304C, A356C und T383C wurden im Rahmen dieser Arbeit während der Diplomarbeit von Nina Schreglmann hergestellt, aufgereinigt und durch SDS-PAGE, Westernblot-Analyse und Häm-färbung biochemisch charakterisiert (Schreglman, Diplomarbeit 2003). Die Cytochrom  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten sind in der Übersicht in Abbildung 3.14 dargestellt.





**Abbildung 3.13: c<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten**

Cytochrom c<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten in der Übersicht (mit Blick auf die Häm-Spalte); verwendet wurde die Röntgenstruktur 1QL3, die Cysteine wurden virtuell mit dem Programm PYMOL eingeführt und die Struktur mit Hilfe des Programms VMD dargestellt.



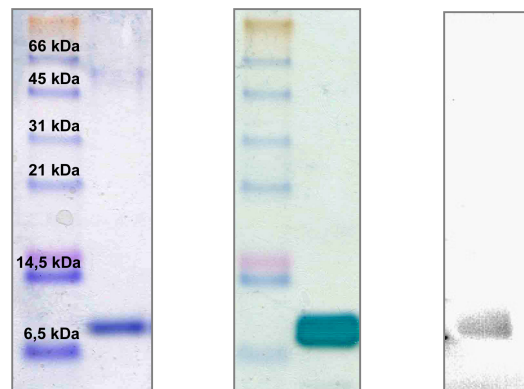
**Abbildung 3.14: c<sub>1CF</sub>-Cysteinmutanten**

Cytochrom c<sub>1CF</sub>-Cysteinmutanten in der Übersicht (mit Blick auf die Häm-Spalte); verwendet wurde die mit dem Programm Eyspred3D auf die *S. cerevisiae* Struktur (1KYO) modellierte *P. denitrificans* c<sub>1</sub>-Sequenz, die Cysteine wurden virtuell mit dem Programm PYMOL eingeführt und die Struktur mit Hilfe des Programms VMD dargestellt.

### 3.3.2 Herstellung und biochemische Charakterisierung

Die Mutagenese wurde nach dem QuikChange®-Prinzip (siehe 2.2.10.2) der Firma Stratagene durchgeführt. Als *Template* für die Mutagenese am Cytochrom c<sub>552F</sub> diente das Plasmid pBR2 (Klonierung des c<sub>552F</sub>-Strukturgens *cycM'* über *NcoI/BamHI* in pET-22b(+); Britta Reincke, 1996). Als *Template* für die Mutagenese am Cytochrom c<sub>1CF</sub> das pET\_c<sub>1CF</sub>-Konstrukt. Nach erfolgtem *DpnI*-Verdau wurden die mutierten Plasmide in DH5α oder JM109 transformiert, vermehrt und wieder isoliert. Der Erfolg der c<sub>1CF</sub>-Mutagenese konnte anhand von Restriktionsanalysen kontrolliert werden, da die Mutageneseprimer so konstruiert worden waren, dass sie neben der gewünschten Mutation eine stumme Mutation einführten, die zur Eliminierung einer vorhandenen oder Einbringen einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle führte (für Details siehe Schreglmann, Diplomarbeit 2003). Zur Verifizierung wurden alle Ansätze sequenziert. Anschließend wurden die Plasmide in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Es folgte die Co-Transformation mit dem Hämreifungsplasmid pEC86, eine Testexpression und nach Auswahl eines geeigneten Klons die Anzucht in großem Maßstab. Die Isolierung erfolgte durch eine Periplasmapräparation und nachfolgende Aufreinigung mittels Q-Sepharose-Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration. Charakterisiert wurden die Cysteinmutanten durch SDS-PAGE, Westernblot-Analyse (anti-c<sub>1</sub>-Antikörper *R* gegen die c<sub>1CF</sub>-Cysteinmutanten und anti-c<sub>552</sub>-Antikörper *BA* oder *BE* gegen die c<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten) und Häm-färbung, exemplarisch gezeigt für c<sub>552F</sub>N23C in Abbildung 3.15.





**Abbildung 3.15: Biochemische Charakterisierung von Cyt  $c_{552F}N23C$**   
SDS-PAGE (links), Häm-färbung (Mitte) und Westernblot (rechts)

### 3.3.3 Spektroskopische Charakterisierung

Wie im vorangegangenen Abschnitt für die Interaktionsmutanten beschrieben, wurden auch die Häm-Eigenschaften der Cysteinmutanten des Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  spektroskopisch untersucht. Die Charakterisierung erfolgte über die Aufnahme von Redoxdifferenzspektren, die Bestimmung der individuellen molaren Extinktionskoeffizienten über Pyridinhämochromspektren und die Untersuchung der Häm-Koordination durch den distalen Methionin-Liganden durch die Aufnahme von *charge transfer*-Spektren.

#### Redoxdifferenzspektren

Die Redoxdifferenzspektren aller Cysteinmutanten zeigten keine Abweichungen von den jeweiligen WT-Spektren, wobei die Cysteinmutanten des Cytochrom  $c_{552F}$  ein  $\alpha$ -Peakmaximum bei 551 nm und die Cysteinmutanten des  $c_{1CF}$  ein Peakmaximum bei 553 nm aufwiesen.

#### Pyridinhämochromspektren und Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Nach der leicht modifizierten Methode von Berry & Trumpower (Berry and Trumpower 1987) wurden mittels Pyridinhämochromspektren die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Cysteinmutanten bestimmt, die in Tabelle 3.6 aufgeführt sind:

**Tabelle 3.6: Extinktionskoeffizienten der Cysteinmutanten**

Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten der Cysteinmutanten von Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  über Pyridinhämochromspektren (Berry and Trumpower 1987)

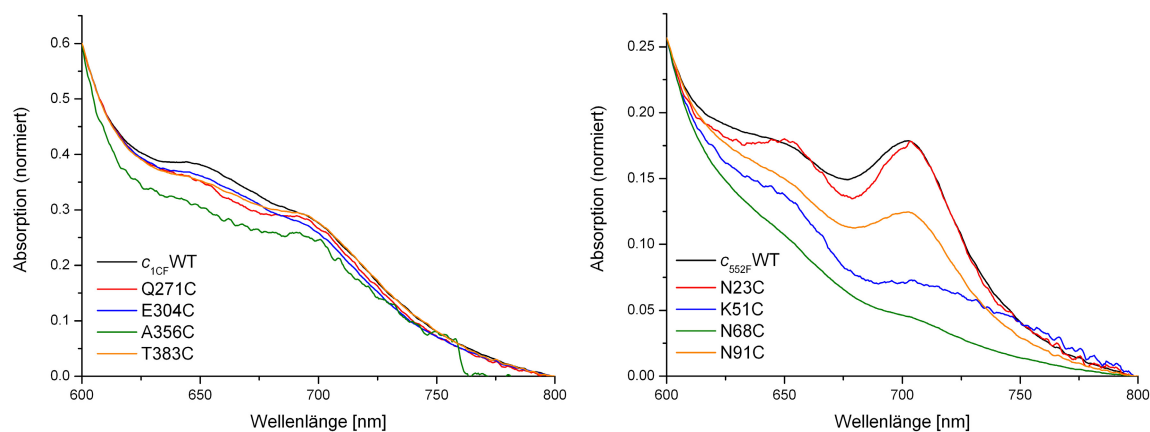
Cytochrom $c_{1CF}$	$\epsilon_{F-O, 553-537 \text{ nm}}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Cytochrom $c_{552F}$	$\epsilon_{F-O, 551-535 \text{ nm}}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]
WT	22,83	WT	21,16
Q271C	19,33	N23C	22,47
E304C	21,57	K51C	20,62
A356C	18,43	N68C	20,91
T383C	21,94	N91C	21,69

Die Mutanten Q271C und A356C des Cytochrom  $c_{1CF}$  zeigen mit  $19,33 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Q271C) und  $18,43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  größere Abweichungen vom WT-Koeffizienten. Die

Extinktionskoeffizienten der Cytochrom  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten zeigen dagegen keine großen Schwankungen und liegen alle im Bereich des WT-Koeffizienten mit  $21,16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### Charge transfer-Spektren und Häm-Koordination

Da die Einbringung zusätzlicher Cysteine neben denen des Häm-Bindemotivs zu Komplikationen in der Faltung durch Konkurrenzreaktionen zu den nativen Cysteinen in der Hämbindung führen könnte, wurden auch die Cysteinmutanten durch *charge transfer*-Spektren auf ihre Häm-Koordination durch das distale Methionin untersucht. Für einen Vergleich wurde der Nullabgleich bei 800 nm durchgeführt und die Spektren über die Absorption bei 600 nm normiert. Abbildung 3.16 zeigt die *charge transfer*-Spektren der  $c_{1CF}$ - und der  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten im Vergleich zum jeweiligen WT.



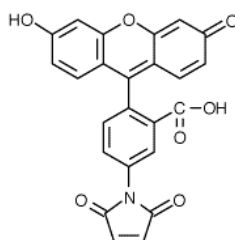
**Abbildung 3.16: Charge transfer-Spektren der  $c_{1CF}$ - und  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten**

links: Cytochrom  $c_{1CF}$  Q271C (rot); E304C (blau), A356C (grün) und T383C (orange) im Vergleich zum WT (schwarz); rechts: Cytochrom  $c_{552F}$  N23C (rot); K51C (blau), N68C (grün) und N91C (orange) im Vergleich zum WT (schwarz)

Die Cysteinmutanten des  $c_{1CF}$  weisen alle ähnliche Spektren zu dem des WT mit einer Schulter bei 695 nm auf (das A356C-Spektrum ist verrauscht, da es aus Gründen der Materialverfügbarkeit in geringerer Konzentration aufgenommen werden mußte), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Einbringung der Oberflächencysteine keine Auswirkungen auf die Hämkoordination hat. Obwohl die Redoxdifferenzspektren der  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten alle dem des WT gleichen, zeigen die *charge transfer*-Spektren klare Unterschiede. So hat der  $c_{552F}$ WT einen ausgeprägten Peak mit einem Maximum bei 703 nm, der somit um 8 nm zu der eigentlichen *Charge transfer*-Bande verschoben ist. Die Mutanten N23C und N91C weisen sehr ähnliche Spektren auf. Dagegen weichen die Spektren der Mutanten N68C und N91C stark von diesen ab, zeigen jeweils nur eine schwach ausgeprägte Schulter im Bereich um 703 nm, woraus geschlossen werden könnte, dass die Einführung der Cysteine in dieser Position den Häm-koordinierenden Methionin-Liganden deplaziert.

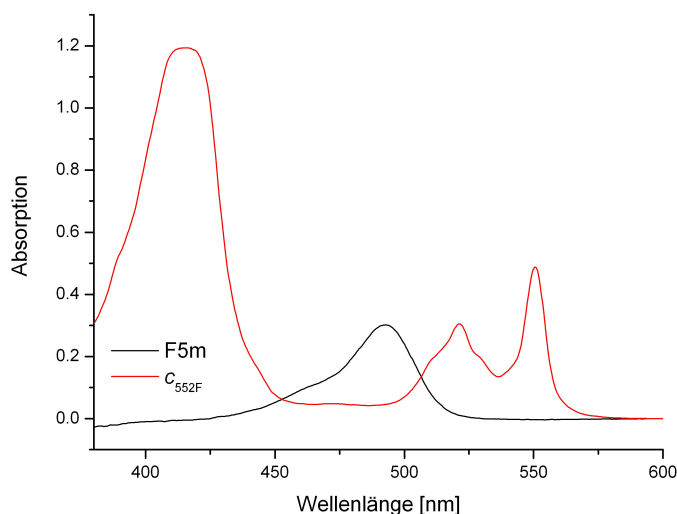
### 3.3.4 SH-Assays (Fluorescein-5-maleimid)

Um vor der Fluorophor- oder Rutheniumkopplung zu testen, wie zugänglich und reaktiv die SH-Gruppen der eingeführten Oberflächencysteine sind, wurde ein SH-Assay ausgeführt. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-maleimid (F5m) kovalent unter Bildung eines Thioetherproduktes an die SH-Gruppe des Oberflächencysteins gebunden und spektroskopisch die Kopplungsrate bestimmt. Die Strukturformel sowie die Reaktionsgleichung für die Kopplung des Maleimids an die SH-Gruppe der Oberflächencysteine sind in Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abbildung 3.17: Strukturformel des Fluorescein-5-maleimids**  
Die Thioetherbildung findet durch eine Additionsreaktion des Maleimids an eine Thiolgruppe statt.

Die Kopplung fand in mit Stickstoff gespülten Puffern statt, um den Sauerstoffgehalt und damit die Autoxidation der zuvor mit Dithiothreitol reduzierten SH-Gruppen möglichst gering zu halten. Es wurden Kopplungsansätze von 1:2 und 1:5 bezüglich Cytochrom:F5m getestet. Die Kopplungsreaktion fand unter Rühren im Dunkeln für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde das ungebundene F5m über eine lange Gelfiltrationssäule von dem Cytochrom-F5m-Konjugat abgetrennt. Auf der Säule ließen sich klar zwei Fraktionen unterscheiden: eine schneller laufende orangefarbene Fraktion des Konjugats und eine langsamer laufende gelbe Fraktion des ungekoppelten F5m. Als Positiv-Kontrolle wurde Iso-1-Cytochrom *c* aus Hefe verwendet, das neben den beiden im Hämbindemotiv vorhandenen Cysteinen ein zusätzliches enthält. Als Negativkontrolle diente *c*<sub>552F</sub>WT. Die Kopplungsrate wurde spektroskopisch bestimmt. Hierfür wurden zum einen Redoxdifferenzspektren aufgenommen, um mit den jeweils spezifischen Extinktionskoeffizienten die Cytochrom-Konzentrationen zu berechnen. Zum anderen wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um aus diesen die F5m-Konzentration zu ermitteln.



**Abbildung 3.18: Absorptionsspektren von  $c_{552F}$  und Fluorescein-5-maleimids**  
Die Absorptionsspektren von Cytochrom  $c_{552F}$  und ungebundenem Fluorescein-5-maleimid sind zur Veranschaulichung übereinandergelegt, Fluorescein-5-maleimid zeigt keine Verschiebung des Absorptionspeaks bei Kopplung an Cytochrom  $c_{552F}$ .

Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, birgt die Berechnung des gekoppelten F5m über die Absorption bei 492 nm das Problem, dass das Cytochrom hier selbst eine niedrige Absorption aufweist, die zudem redoxabhängig ist. Um diesen Absorptionsanteil muss die F5m-Absorption korrigiert werden, um die F5m-Konzentration berechnen zu können. Da zum Zeitpunkt der Spektrenaufnahme versäumt wurde, einen eindeutigen Redoxzustand des Cytochroms einzustellen, musste dieser nachträglich berechnet werden. Aus diesem Grund wurden Reduktions- und Oxidationsspektren des  $c_{1CF}$  und des  $c_{552F}$  aufgenommen und bei 600 nm abgeglichen. Aus diesen vollständigen Reduktions- und Oxidationsspektren wurde das prozentuale Verhältnis der Absorption bei 492 nm zur Soretabsorption bestimmt, was anteilig 2,23 % der Soretabsorption bei 492 nm für ein vollständig reduziertes  $c_{1CF}$  (Soretpeak bei 418 nm) und 4,47 % (410 nm) für ein vollständig oxidiertes  $c_{1CF}$  ergibt. Für Cytochrom  $c_{552F}$  ergeben sich bei 492 nm anteilig 1,75 % der Soretabsorption (416 nm) für ein vollständig reduziertes und 3,89 % der Soretabsorption (408 nm) für ein vollständig oxidiertes  $c_{552F}$ . Über die Lage des Soret-Peaks kann ungefähr der Redoxzustand bestimmt werden und mit diesem dann die prozentuale Soretabsorption bei 492 nm. Diese wird von der Gesamtabsorption bei 492 nm abgezogen, um die reine F5m-Absorption zu erhalten, über die dann die F5m-Konzentration ( $\epsilon_{F5m, 492nm} = 83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) berechnet und mit der Cytochrom-Konzentration verglichen werden kann. Sicherlich liegt in dieser Methode eine gewisse Fehlerrate, die sich zum Beispiel aus einem Basisliniendrift ergeben könnte. Es wurde darauf geachtet, dass alle Spektren bei 600 nm abgeglichen wurden, so dass hier der Fehler minimiert wurde. Da der Redoxzustand der Proben nicht genau bekannt war, ist dies die einzige Möglichkeit, ein Kopplungsverhältnis möglichst genau bestimmen zu können.

**Tabelle 3.7: F5m-Kopplungsraten**

Kopplungsraten für die Markierung verschiedener Cytochrome mit Fluorescein-5-maleimid (F5m)

Mutante	F5m/Protein [%]
<b>c<sub>1CF</sub>Q271C</b>	38
<b>c<sub>1CF</sub>E304C</b>	24
<b>c<sub>1CF</sub>A356C</b>	11
<b>c<sub>1CF</sub>T383C</b>	17
<b>iso-c</b>	70
<b>c<sub>552F</sub>N23C (1:2)</b>	53
<b>c<sub>552F</sub>N23C (1:5)</b>	50
<b>c<sub>552F</sub>K51C</b>	52
<b>c<sub>552F</sub>N68C</b>	82
<b>c<sub>552F</sub>N91C</b>	62
<b>c<sub>552F</sub>WT</b>	12

Die Auswertung zeigt sehr niedrige Kopplungsraten für die *c*<sub>1CF</sub>-Cysetinmutanten mit Werten zwischen 11 und 38 %. Die Kopplungsraten der *c*<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten liegen dagegen mit 50-82 % im Vergleich dazu wesentlich höher. Die Menge an eingesetztem F5m relativ zur Cytochromkonzentration scheint keinen Einfluss auf die Kopplungsrate zu haben, was bei der Kopplung an *c*<sub>552F</sub>N23C getestet wurde, bei der ein Cytochrom:Fluorophor-Verhältnis von 1:2 und 1:5 eingesetzt wurde und sich nahezu identische Kopplungsraten ergaben. Die Negativkontrolle zeigte eine unspezifische Kopplung von 12 %, so dass im Falle der *c*<sub>1CF</sub>-Cysteinmutanten A356C und T383C nicht eindeutig beurteilt werden kann, ob die Kopplung des F5m mit Raten von 11 % und 17 % wirklich spezifisch ist. Die niedrigen Kopplungsraten können zum einen bedeuten, dass die Kopplungsreaktion mit F5m unter den gegebenen Bedingungen allgemein nur schlecht funktioniert, oder die eingeführten Oberflächencysteine eine SH-Gruppe aufweisen, die nur schlecht zugänglich und damit nicht sehr reaktiv ist. Die Kopplung der iso-*c*-Positivkontrolle mit 70 % Ausbeute beweist jedoch, dass die Kopplungsreaktion generell funktioniert. Isocytochrom *c* ist ein Isomergemisch, das zu 95 % iso-1 *c* enthält (Healy, Helser *et al.* 1987), so dass man unter Berücksichtigung des Oberflächencysteingehalts eine 95 %ige Kopplung erwarten kann. Doch auch hier wurde nur ein Kopplungsgrad von 70 % erhalten.

### 3.3.5 Aktivitätstest

Da die Cysteinmutanten sich wie der WT verhalten und die Mutationen die Komplexbildung zum Redoxpartner nicht beeinflussen sollen, wurde für die *c*<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten ein Aktivitätstest mit der Cytochrom *aa*<sub>3</sub>-Oxidase durchgeführt. Es wird angenommen (Margoliash, Ferguson-Miller *et al.* 1976), dass die Interaktionsfläche des *c*<sub>552</sub> mit Cytochrom *c*<sub>1</sub> dieselbe ist wie mit der Oxidase. Daher kann durch diesen Test, in dem die *c*<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten im Vergleich zum WT als Substrat für die Oxidase eingesetzt werden, die Aktivität (bestimmt als Wechselzahl *WZ*) als Maß für das Verhalten mit dem Cytochrom *c*<sub>1</sub> angesehen werden. Zu einem 350 µl-Ansatz von 20 µM vollständig reduzierter *c*<sub>552F</sub>-Lösung mit einer Ionenstärke von *I* = 14,8 mM, die das Ionenstärkeoptimum für die Reaktion zwischen *c*<sub>552F</sub> und Oxidase darstellt (Reincke, Dissertation 2000), wurden 0,05 pMol *aa*<sub>3</sub>-Oxidase pipettiert und die Reaktion über einen Zeitraum von 120 s bei 551 nm detektiert. Die

Absorptionsabnahme pro Minute wurde bestimmt und über folgende Gleichung die Wechselzahl  $WZ$  der Reaktion berechnet:

$$WZ = \frac{\Delta E \cdot V_{Küvette}}{\varepsilon \cdot n_{Oxidase} \cdot 60} \quad (3.1)$$

wobei  $WZ$  die Wechselzahl in  $s^{-1}$ ,  $\Delta E$  die Absorptionsabnahme pro Minute,  $V_{Küvette}$  das Messvolumen in der Küvette in Liter,  $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient der jeweiligen  $c_{552F}$ -Mutante in  $mMol/L \cdot cm$  und  $n_{Oxidase}$  die Menge an zugegebener Oxidase in  $mMol$  ist.

Für den  $c_{552F}$ WT ergibt sich eine Wechselzahl von  $375 s^{-1}$ . Demgegenüber stehen die Wechselzahlen der Mutanten N23C mit  $177 s^{-1}$  und N91C mit  $183 s^{-1}$ , die damit unter den gegebenen Bedingungen nur 47 % (N23C) und 49 % der WT-Aktivität zeigen.

Die beiden Mutanten K51C und N68C zeigen Autoxidationsreaktionen und konnten während der Messungen nicht vollständig reduziert gehalten werden, weswegen eine Auswertung und Berechnung der Wechselzahl nicht möglich war.

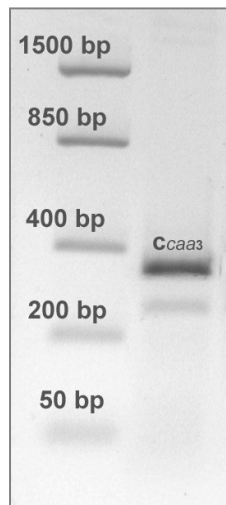
### 3.4 Das Cytochrom $c_{caa3}$ -Fragment aus *T. thermophilus*

In diesem Projekt wurde die Cytochrom  $c$ -Domäne der Untereinheit IIc der  $caa_3$ -Oxidase aus *Thermus thermophilus* in Analogie zu den vorgestellten *P. denitrificans* Cytochrom  $c$ -Fragmenten als lösliches Fragment kloniert, heterolog in *E. coli* überexprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. Des Weiteren wurde der ET zu den möglichen Redoxpartnern Cytochrom  $c_1$  und  $c_{552}$  in einem kinetischen Ansatz durch Stopped-Flow-Messungen im *pre-steady state*-Bereich untersucht.

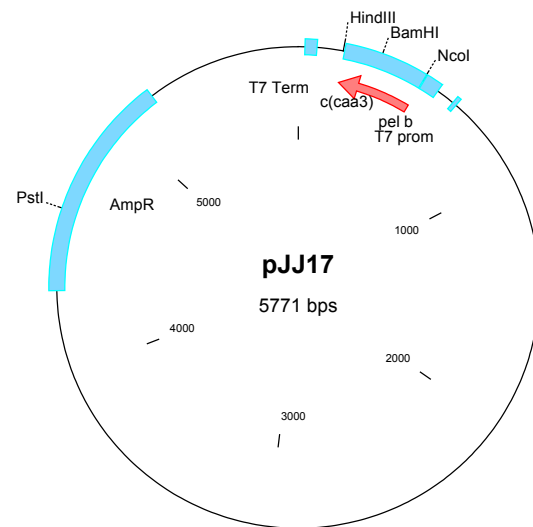
#### 3.4.1 Klonierung

Für die Klonierung des löslichen  $c_{caa3}$ -Fragmentes wurde zunächst genomische *T. thermophilus* HB8-DNA präpariert und als *Template* in einer PCR eingesetzt, um das  $c_{caa3}$ -Fragment zu amplifizieren. Hierfür wurden Primer verwendet, die auf der 5'-Seite sowohl eine *NcoI*-Schnittstelle als auch ein Startcodon und auf der 3'-Seite eine *HindIII*-Schnittstelle einfügten, um das Fragment nachfolgend in den Expressionsvektor pET-22b(+) (Novagen) klonieren zu können.

Es konnte ein 339 bp-Fragment amplifiziert werden (Abbildung 3.19), das über ein Agarosegel aufgereinigt wurde. Es folgte eine Restriktion mit *NcoI/HindIII* und die Ligation in den Expressionsvektor pET-22b(+) zum pJJ17-Konstrukt (Abbildung 3.20), das in  $CaCl_2$ -kompetente JM109-Zellen transformiert wurde.



**Abbildung 3.19: Das  $c_{caa3}$ -PCR-Fragment**  
Agarosegel des per PCR amplifizierten  
339 bp  $c_{caa3}$ -DNA-Fragmentes



**Abbildung 3.20: pJJ17**  
*NcoI/HindIII*-Klonierung des 339 bp  $c_{caa3}$ -DNA-  
Fragmentes in pET-22b(+)

Die Klonierung wurde zunächst über verschiedene Restriktionen kontrolliert und anschließend sequenziert. Nach erfolgreicher Sequenzierung wurde das pJJ17-Konstrukt (Abbildung 3.20) in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert, auf Amp/Cm selektiert und die Zellen erneut kompetent gemacht. Es erfolgte die Co-Transformation mit dem Häm-Reifungsplasmid pEC86 (Arslan, Schulz *et al.* 1998), die Selektion über Amp/Cm und die Vereinzelung einiger Klone für eine Testexpression.

### 3.4.2 Heterologe Expression und Aufreinigung

Um geeignete Expressionsbedingungen zu finden, wurden zunächst Testexpressionen bei 32 °C und 37 °C sowohl ohne als auch mit Induktion durch IPTG durchgeführt. Es zeigte sich, dass schon die nicht-induzierten Zellen eine tiefrote Färbung aufwiesen und die Induktion mit IPTG zur heterologen Überexpression des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes nicht notwendig war. Aus diesem Grund wurde bei der Großanzucht auf Induktion mit IPTG verzichtet.

Die Großanzucht erfolgte bei 37 °C über Nacht ohne Zusatz von IPTG. Die Zellen wurden am nächsten Morgen geerntet und eine Periplasmapräparation durchgeführt (Abschnitt 3.1.1). Das tiefrote Periplasma wurde nachfolgend über Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration aufgereinigt. Mittels Redoxdifferenzspektren unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{r-o, 549-517nm} = 21,71 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Abschnitt 3.4.4) wurde die Konzentration des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes im Periplasma bestimmt und aus dieser mit einem aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 11,5 kDa (siehe Abschnitt 3.4.5) eine Expressionsausbeute von 4 mg/Liter Kulturmedium berechnet.

### 3.4.3 Biochemische Charakterisierung

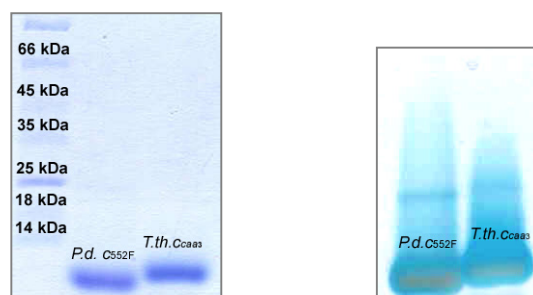
Mit dem Programm *Clone Manager* wurde basierend auf der DNA-Sequenz eine erste Charakterisierung durchgeführt. Nachfolgend ist die  $c_{caa3}$ -Aminosäuresequenz und die sich daraus ergebenden Charakteristika angegeben. Das aus 107 Aminosäuren bestehende Polypeptid hat ein errechnetes Molekulargewicht von 11,5 kDa (ohne Hämgruppe) und einen theoretischen pI von 5,04, ist also bei neutralem pH-Wert negativ geladen. Das Hämbindemotiv befindet sich an Position 17 bis 21 mit einem distalen Hämliganden in Position 73.

**Tabelle 3.8: Charakterisierung des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes**

Aminosäuresequenz (rechts) und Sequenz-spezifische Eigenschaften (links) des löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes aus *Thermus thermophilus*; die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programmes *Clone Manager*

Eigenschaften		Aminosäuresequenz
Mw (berechnet)	11,5 kDa	1 mapvadergg qvfqqn <b>caac</b> hgvarsmpa vigpelglwg 41 nrtslgagiv entpenkaw irdpagmkgp vkmpgfpqls 81 eedldalvry leglkvegfd fgalpki
pI (berechnet)	5,04	
Aminosäuren	107	
Hämbindemotiv	17-21	
Distales Methionin (Asp+Glu)	73	
(Arg+Lys)	10	

Die biochemische Charakterisierung erfolgte über SDS-PAGE und Hämfärbung. Leider konnte kein immunologischer Nachweis über Westernblot-Analyse durchgeführt werden, da kein Antikörper zur Verfügung stand. Abbildung 3.21 zeigt das Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragment aus *T. thermophilus* in direktem Vergleich zum *P. denitrificans*  $c_{552F}$  im SDS-Polyacrylamidgel und die Hämfärbung. Das *Thermus*-Fragment läuft im SDS-PAGE leicht oberhalb des *Paracoccus*-Fragmentes mit einem Molekulargewicht von 10,4 kDa. Das mittels *Clone Manager* aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht von 11,5 kDa entspricht dem Laufverhalten des  $c_{caa3}$ -Fragmentes im SDS-PAGE. Die Hämfärbung bestätigt den kovalenten Häm  $c$ -Einbau.



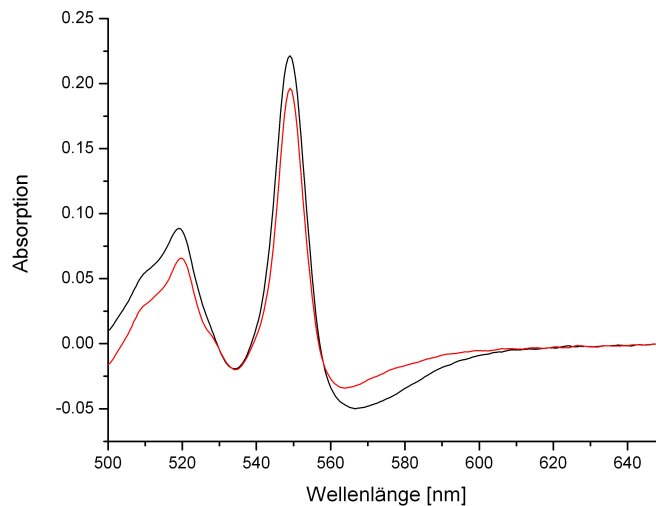
**Abbildung 3.21: SDS-PAGE und Hämfärbung des  $c_{caa3}$ -Fragmentes**  
SDS-PAGE (links) und Hämfärbung (rechts) des *T. th.*  $c_{caa3}$ -Fragmentes im Vergleich zu *P. d.* Cytochrom  $c_{552F}$

### 3.4.4 Spektroskopische Charakterisierung

Die spektralen Eigenschaften des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes wurden mittels Redoxdifferenz- und Pyridinhämochromspektren untersucht, die in Abbildung 3.22 dargestellt sind. Wie das Redoxdifferenzspektrum zeigt, befindet sich das  $\alpha$ -



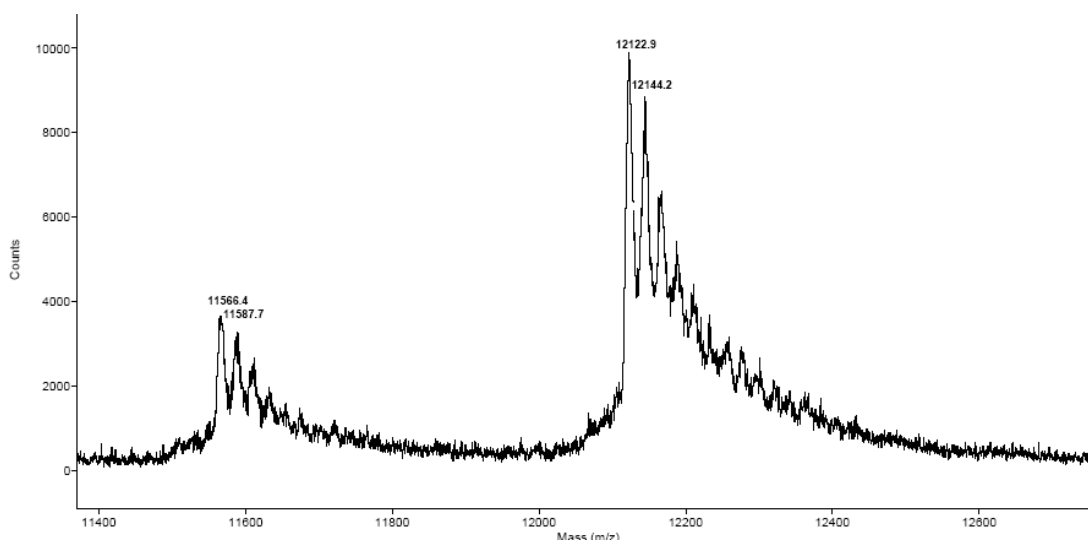
Peakmaximum bei 549 nm und ist im Vergleich zum *P. denitrificans*  $c_{1CF}$  mit 553 nm und dem  $c_{552F}$  mit 551 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte über das Pyridinhämochromspektrum und ergibt einen Koeffizienten von  $\epsilon_{r-o, 549-517nm} = 21,71 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Abbildung 3.22: Bestimmung des  $c_{caa3}$ -Extinktionskoeffizienten**  
Redoxdifferenz- (rot) und Pyridinhämochromspektrum (schwarz) des  
Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes aus *T. thermophilus*

### 3.4.5 MALDI-MS

Um das Molekulargewicht des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes zu bestimmen, wurden MALDI-Massenspektren aufgenommen (Abbildung 3.23; Björn Meyer, Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt).



**Abbildung 3.23: MALDI-Massenspektrum des Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes aus *T. thermophilus***  
Die beiden Hauptpeaks bei 12,12 kDa und 11,57 kDa repräsentieren die Massen des  $caa_3$ -Fragmentes  
inklusive Hämgruppe bzw. die des Apocytochrom ohne Hämgruppe

Der Hauptpeak bei 12,12 kDa stellt die Masse des  $c_{caa3}$ -Fragmentes inklusive Häm dar, wohingegen der Peak bei 11,57 kDa das Apocytochrom ohne Häm repräsentiert. Die

beiden anderen Peaks (11,59 und 12,14 kDa) sind die Fragmente mit Natriumanlagerungen (+21,3 Da). Die Fehlergenauigkeit wurde mit einem internen Standard auf 1-3 Da bestimmt.

### 3.5 Redoxpotentiale

Redoxpotentiale sind wichtige elektrochemische Eigenschaften von Redoxproteinen, da sie die Triebkraft für Elektronentransportprozesse definieren. Um zu überprüfen, ob durch die gerichtete Mutagenese bei der Herstellung der  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten das Redoxpotential verändert wurde, sind Redox titrationen zur Bestimmung des Mittelpunktspotentials  $E_0'$  durchgeführt worden (Dr. Petra Hellwig, Institut für Biophysik, Universität Frankfurt). Vergleichend zu den  $c_{1CF}$ -Mutanten wurden die Mittelpunktspotentiale des *P. denitrificans*  $c_{1CF}$ WT,  $c_{552F}$ WT, der  $c_{552F}$ N23C-Mutante, die in den Laserflash-Experimenten eingesetzt wurde, und des in dieser Arbeit hergestellten Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes aus *T. thermophilus* gemessen. Die Redoxpotentiale sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Die Potentiale wurden gegen eine Ag/AgCl-Elektrode gemessen und die Werte auf die Standardwasserstoff-Elektrode bei pH 7 (*SHE'*; Potentialdifferenz +208 mV) zurückgerechnet. Für den *P. d.*  $c_{1CF}$ WT ergibt sich ein Mittelpunktspotential von 189 mV. Somit resultiert eine Potentialdifferenz von ca. 80 mV zum  $c_{552}$ -Fragment mit einem Mittelpunktspotential von 263 bis 268 mV. Die  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten weisen eine breite Variation der Redoxpotentiale auf, wobei keine der Mutanten ein positiveres Redoxpotential als der WT besitzt. Die Mutanten K315T, A314S und Q381V haben mit 189 mV das gleiche Redoxpotential wie der WT. S378A hat ein um 30 mV reduziertes Redoxpotential (159 mV). Das Mittelpunktspotential der Mutanten G319A und K315E ist gegenüber dem des WT um 50 mV auf 139 mV reduziert. Es scheint also nicht nur die Position sondern auch die Art des Aminosäureaustausches einen großen Einfluss auf das Redoxpotential zu haben, da die Mutanten K315E und K315T unterschiedliche Redoxpotentiale zeigen. Die stärksten Abweichungen vom WT-Potential weisen die Mutanten A247N (133 mV), V244T (134 mV) und V244Q (30 mV) mit einer Differenz von 54, 55 bzw. 150 mV auf. Die Cysteinmutante N23C des  $c_{552F}$  hat in etwa dasselbe Redoxpotential (275 mV) wie der WT (266 mV), so dass durch die Einführung des Cysteins dieses nicht beeinflusst wurde.

**Tabelle 3.9: Redoxpotentiale der löslichen Cytochrom c -Fragmente**  
Die Potentiale wurden gegen die Ag/AgCl-Elektrode gemessen und sind für die Standard-Wasserstoffelektrode (*SHE'*) angegeben

Cytochrom		Redoxpotential $E_0'$ [mV]	
		Ag/AgCl	<i>SHE'</i>
<i>P. d.</i> $c_{1CF}$	WT	-19	189
	E243K	-19	189
	V244Q	-119	30
	V244T	-74	134
	A247N	-75	133
	A314S	-19	189
	K315E	-69	139
	K315T	-19	189
	G319A	-69	139
	S378A	-49	159
	Q381V	-19	189
<i>P. d.</i> $c_{552F}$	WT	+58	266
	N23C	+67	275
<i>T. th.</i> $c_{caa3}$	WT	-130	78

### 3.6 Stopped-Flow-Kinetiken im *pre-steady state*-Bereich

Zur Untersuchung des schnellen Elektronentransfers der löslichen Cytochrome aus *P. denitrificans* und *T. thermophilus* im *pre-steady state*-Bereich wurden Stopped-Flow (SF)-Messungen durchgeführt. Die Verwendung löslicher Fragmente als ET-Modellsystem anstelle von Membranproteinen oder Proteinkomplexen hat den Vorteil der einfacheren Handhabung, da hier zum Beispiel keine Detergenzien verwendet werden müssen, um die Cytochrome in Lösung zu bringen. Des Weiteren wird der Einfluss nachfolgender Elektronentransfer-Prozesse, wie sie in einem Komplex auftreten, ausgeschlossen und die Messung so ausschließlich auf die zu untersuchende ET-Reaktion fokussiert. Bei kinetischen Messungen im *pre-steady state*-Bereich ist zu erwähnen, dass lediglich die Assoziation der beiden Redoxpartner (also die Annäherung und die Komplexbildung) sowie die eigentliche ET-Reaktion detektiert werden, nicht jedoch die Dissoziation, der bei *steady state*-Messungen eine tragende Rolle zukommt.

Alle Stopped-Flow-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. F. Malatesta im Labor von Prof. M. Brunori an der Universität „La Sapienza“ in Rom durchgeführt. Für die Messungen wurde ein temperierbares *Applied Photophysics* Stopped-Flow-Spektrometer (Leatherhead, UK) mit einer 1 cm-Beobachtungskammer verwendet. Anfänglich wurde in dieser Arbeit mit einem Protokoll gearbeitet, das bei früheren kinetischen Messungen (Eichhorn, Dissertation 2003) etabliert worden war. Dieses Protokoll sah vor, dass bei niedrigen Temperaturen gemessen wurde (ca. 4 °C), da die ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und Cytochrom  $c_{552F}$  sehr schnell abläuft und Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  im Bereich von  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  aufwies. Des Weiteren wurde ein Puffer niedriger Ionenstärke verwendet (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8), um die Ionenstärke durch Zugabe adäquater Mengen KCl variieren zu können. Um den Elektronentransfer in physiologischer Richtung, also von Cytochrom  $c_{1CF}$  zu  $c_{552F}$ , messen zu können, musste  $c_{1CF}$  in reduzierter Form vorliegen, während  $c_{552F}$  oxidiert sein sollte. Hierfür wurde  $c_{1CF}$  vorab mit einem Überschuss an Dithionit (DIT) reduziert

und anschließend das überschüssige Reduktionsmittel per Gelfiltration abgetrennt. Alle Puffer wurden für 30 min mit Stickstoff gespült, um den Sauerstoffanteil möglichst niedrig zu halten und so die Autoxidation des  $c_{1CF}$  zu minimieren. Nach Verdünnen des reduzierten Cytochroms  $c_{1CF}$  (ca. 4-6  $\mu\text{M}$ ) in Tris-Puffer in gasdichten SF-Glasspritzen, wurde die Lösung erneut für 15 min mit Stickstoff gespült.

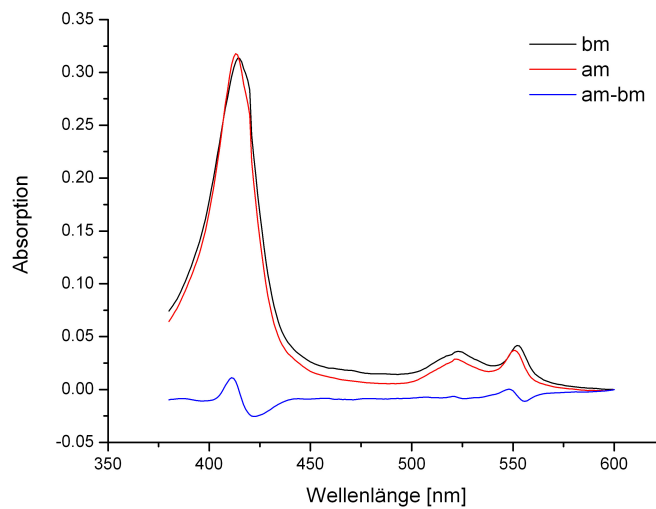
Für die Durchführung und Auswertung der ET-Messungen wäre es von Vorteil gewesen, unter sogenannten *pseudo first order (PFO)*-Bedingungen zu arbeiten, bei denen einer der Reaktionspartner in großem Überschuss eingesetzt wird. Die ET-Reaktion wäre so scheinbar unabhängig von der Konzentration des im Überschuss eingesetzten Redoxpartners und die detektierten Zeitverläufe einfach durch eine monoexponentielle Funktion anzupassen. In den Stopped-Flow-Experimenten musste allerdings unter *non-pseudo first order (non-PFO)*-Bedingungen gearbeitet werden: die beiden Redoxpartner wurden in äquimolaren Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) eingesetzt, da zum einen nicht genug Material vorhanden war, um eines der Cytochrome in 100-fachem Überschuss einzusetzen und zum anderen die Reaktion zu schnell würde, um sie über SF-Techniken noch auflösen zu können. Des Weiteren ergab sich das Problem der spektralen Überlappung, da beide *c*-Typ Cytochrome sehr ähnliche Absorptionsspektren aufweisen und eine Wellenlänge gefunden werden musste, bei der sie sich unterscheiden lassen. Diese Wellenlängen lagen im Soret- und  $\alpha$ -Bereich (siehe 3.5.1) und wiesen aufgrund der großen Extinktionskoeffizienten (siehe 3.2.7) eine sehr hohe Grundabsorption auf, die im Sättigungsbereich des Photomultipliers lag.

Im Folgenden ist nun dargestellt, wie die Probleme der spektralen Überlappung, der Autoxidation und der Abweichung von den *PFO*-Bedingungen umgangen und ein Arbeits- und Auswertungsprotokoll entwickelt wurde, das für die Messung des ET zweier spektroskopisch ähnlicher, löslicher *c*-Typ Cytochrome unter *non-PFO* Bedingungen optimiert ist.

### 3.6.1 Doppelsektorküvetten-Differenzspektren

Um den Elektronentransfer zwischen zwei spektroskopisch ähnlichen Cytochromen verfolgen zu können, musste eine Wellenlänge gefunden werden, bei der sich die Absorptionsspektren der beiden Cytochrome maximal unterschieden, d. h. deren spektrale Überlappung minimal ist. Hierfür wurden Differenzspektren mit Hilfe sogenannter Doppelsektorküvetten (*double sector cuvette*, DSC) aufgenommen (siehe auch 2.4.4.2). Diese speziellen Küvetten sind in zwei Sektoren aufgeteilt, die durch eine transparente Glaswand voneinander getrennt sind. In die eine Küvettenhälfte wurde reduziertes Cytochrom  $c_{1CF}$  gegeben und in die andere der oxidierte Redoxpartner Cytochrom  $c_{552F}$ . Beide Cytochrome wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. Es wurde ein *before-mixing* (bm)-Spektrum aufgenommen, das sich aus den überlagerten Absorptionsspektren des reduziertes  $c_{1CF}$  und des oxidierten  $c_{552}$  zusammensetzt. Nach Durchmischung der beiden Lösungen wurde das *after-mixing* (am)-Spektrum aufgenommen, das sich aus den überlagerten Spektren der beiden Cytochrome im ET-Gleichgewicht zusammensetzt. Das DSC-Differenzspektrum ergibt sich durch Subtraktion des *before mixing*-Spektrums vom *after mixing*-Spektrum (am-

bm). Die beiden DSC-Absorptionsspektren und das DSC-Differenzspektrum sind exemplarisch für das ET-System  $c_{1CF}K315E/c_{552F}$  in Abbildung 3.24 gezeigt.



**Abbildung 3.24: DSC-Spektren für  $c_{1CF}K315E/c_{552F}$**   
Generieren des Differenzspektrums (am-bm) durch Subtraktion des *before mixing* (bm)-Spektrums vom *after mixing* (am)-Spektrum

Die Peakmaxima und -minima im Soret- und  $\alpha$ -Banden-Bereich spiegeln die Wellenlängen der maximalen spektralen Unterschiede der Spektren der einzelnen Cytochrome und damit die Wellenlängen der minimalen spektralen Überlappung wider. Bei diesen Wellenlängen lassen sich beide Cytochrome am besten voneinander unterscheiden und der ET durch Signale maximaler Signalamplitude detektieren. Aus Abbildung 3.24 lässt sich leicht erkennen, dass das detektierte Signal der DSC-Soret-Wellenlängen eine geringe Amplitude vor dem Hintergrund einer sehr hohen Grundabsorption (Soret-Peaks) aufweist. Die DSC-Soret-Wellenlängen für die ET-Reaktion von Cytochrom  $c_{1CF}WT$  und der Interaktionsmutanten mit Cytochrom  $c_{552F}$  sind in Tabelle 3.10 wiedergegeben.

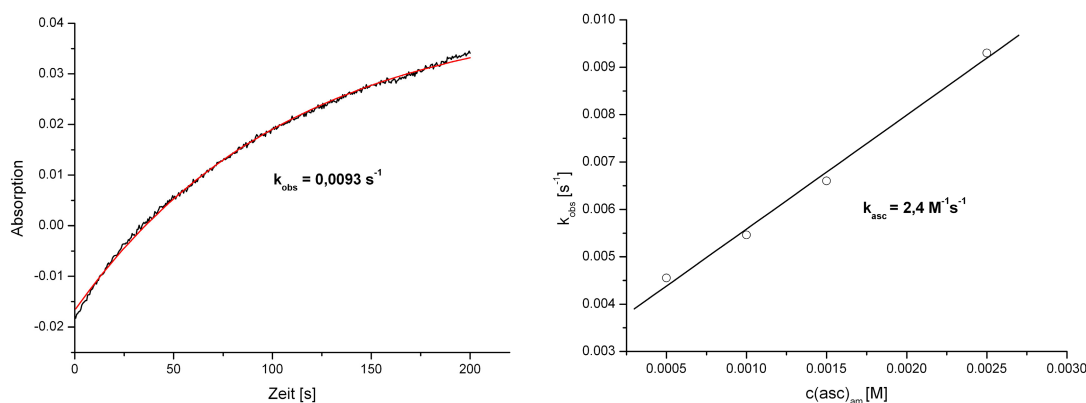
**Tabelle 3.10: DSC-Differenzwellenlängen**

Die DSC-Differenzwellenlängen sind angegeben für Cytochrom  $c_{1CF}$  und die Interaktionsmutanten aus *P. denitrificans* und die löslichen Fragmente aus *T. thermophilus* für den Soret-Bereich

Redoxpaar	DSC-Wellenlänge im Soret-Bereich	
	Max. [nm]	Min. [nm]
$c_{1CF}$ WT mit $c_{552F}$	412	424,6
V244Q	407	420
V244T	411	420
A247N	411,5	421
A314S	411	420,5
K315E	411	422
K315T	411	425
G319A	411	421
G319S	411	419
S378A	411,5	419
Q381V	411	419
<i>T. th.</i> $c_{caa3}$ mit $c_1$	406	420
<i>T. th.</i> $c_{caa3}$ mit $c_{552}$	-	419

### 3.6.2 Reduktion mit Ascorbat

Um die Autoxidation des reduzierten Redoxpartners zu minimieren und die Anfangskonzentrationen der reduzierten Cytochrome besser kontrollieren zu können, wurde in den SF-Experimenten Ascorbat als langsames Reduktionsmittel verwendet, um die Cytochrome in einem reduzierten Zustand zu halten. Dies hatte außerdem den Vorteil, dass auf eine Reduktion mit Dithionit und anschließende G25-Gelfiltration verzichtet werden konnte. Es musste vorab sichergestellt werden, dass die eigentlich ET-Reaktion durch die Reduktion mit Ascorbat nicht beeinflusst wird. Hierfür wurde die Reduktion von Cytochrom  $c_{1CF}WT$  durch Ascorbat unter *pseudo first order*-Bedingungen gemessen, wobei Ascorbat in einem 1000-fachen Überschuss ( $0,5$ - $2,5 \text{ mM}_{am}$ ) zum Cytochrom  $c_{1CF}$  ( $1,45 \text{ }\mu\text{M}_{am}$ ) eingesetzt und die Reaktion auf einer langen Zeitskala von  $200 \text{ s}$  detektiert wurde. Die gemittelten Zeitverläufe wurden den *PFO*-Bedingungen entsprechend mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst, um die beobachtete Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  zu erhalten (Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25: Ascorbat-Reduktion und Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{asc}$**   
Kinetischer Zeitverlauf der Reduktion von  $c_{1CF}WT$  ( $1,45 \text{ }\mu\text{M}_{am}$ ) durch Ascorbat ( $2,5 \text{ mM}_{am}$ ) und monoexponentielle Anpassung (links). Bestimmung der apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{asc}$  der Ascorbatreduktion durch lineare Regression (rechts).

Die Werte für  $k_{obs}$  liegen zwischen  $0,0045 \text{ s}^{-1}$  und  $0,0093 \text{ s}^{-1}$  für  $0,5 \text{ mM}_{am}$  bzw.  $2,5 \text{ mM}_{am}$  Ascorbat. Aus der Steigung der linearen Regression in der Auftragung von  $k_{obs}$  als Funktion der variierten *after mixing*-Ascorbatkonzentration lässt sich die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{asc}$  von  $2,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Reduktion von Cytochrom  $c_{1CF}WT$  mit Ascorbat berechnen (Abbildung 3.25). Damit liegt die Geschwindigkeitskonstante der ET-Reaktion zwischen  $c_{1CF}WT$  und  $c_{552F}$  um sechs Größenordnungen über der für die Ascorbatreduktion und kann dadurch auf der ms-Zeitskala nicht beeinflusst werden.

### 3.6.3 Etablierung des Mess- und *non-PFO*-Auswertungsprotokolls

Durch alle vorangegangenen Experimente konnte schließlich ein Mess- und Auswertungsprotokoll etabliert werden, das für die auftretenden systemspezifischen Probleme optimiert ist:

Die sehr hohen ET-Reaktionsgeschwindigkeiten im Bereich der Auflösungsgrenze des Stopped-Flow-Spektrometers (Totzeit: 1,3 ms) konnten durch eine Erniedrigung der Messtemperatur auf  $< 10\text{ °C}$  verlangsamt werden. Dabei wurden die SF-Spritzen auf Eis gelagert und die Lösungen jeweils für drei Minuten in der SF-Apparatur vor jeder Messung äquilibriert. Durch Begasen der Messpuffer mit Stickstoff wurden sauerstoffarme Bedingungen gewährleistet und die Autoxidation des reduzierten Cytochroms durch eine Vorreduktion mit 1 mM Ascorbat verhindert. Das Problem der spektralen Überlappung wurde umgangen, indem die für das jeweilige Redoxpaar ermittelten spezifischen DSC-Differenzwellenlängen zur Detektion des ET verwendet wurden. Es wurden die DSC-Wellenlängen des Soret-Bereichs gewählt, um Signale mit größtmöglicher Signalamplitude zu gewährleisten, die allerdings aufgrund der Verwendung einer Differenzwellenlänge vor dem Hintergrund einer sehr hohen Grundabsorption (durch die hohen Häm-Extinktionskoeffizienten in diesen Bereich) im mOD-Bereich lagen. Eine weitere Erhöhung der Cytochromkonzentration, um das Signal zu verstärken, war zum einen nicht möglich, da das Spektrometer durch die hohe Hämabsorption am Rande der Sättigung des Photomultipliers arbeitete, zum anderen, weil eine Erhöhung der Cytochromkonzentration eine Beschleunigung des Elektronentransfers bewirkt hätte, wodurch die ET-Reaktion nicht mehr durch Stopped-Flow-Techniken hätte aufgelöst werden können. Aus diesen und aus Gründen der Materialverfügbarkeit musste mit niedrigen, äquimolaren Konzentrationen der Cytochrome im  $\mu\text{M}$ -Bereich gearbeitet werden, was zu einer Abweichung von den *PFO*-Bedingungen führte. Diese Abweichung hatte zur Folge, dass sich die Kinetiken nicht mehr einfach durch eine monoexponentielle Funktion anpassen ließen, sondern ein mathematisch wesentlich komplexeres Verhalten aufwiesen. Dieses Problem konnte dadurch gelöst werden, dass eine Auswertungsmethode gewählt wurde, die die *non-pseudo first order*-Bedingungen berücksichtigte (Gleichungen (3.2) bis (3.7), (Malatesta 2005)). Für die mathematische Anpassung der Zeitverläufe unter *non-PFO*-Bedingungen wurde Gleichung (3.2) verwendet, um die beobachtete Geschwindigkeit  $\eta$  zu erhalten:

$$\Delta A_{\lambda} = \Delta A_{EQ} \frac{1 - e^{-\eta t}}{1 + \omega e^{-\eta t}} \quad (3.2)$$

wobei  $\Delta A_{\lambda}$  die gemessene Absorptionsänderung zu einem beliebigen Zeitpunkt  $t$  und  $\Delta A_{EQ}$  die Absorptionsänderung im Gleichgewichtszustand ist.  $\eta$  ist die beobachtete Geschwindigkeit der Reaktion (in  $\text{s}^{-1}$ ) und entspricht  $k_{obs}$  der monoexponentiellen *PFO*-Auswertung.  $\omega$  ist ein Parameter, der die Abweichungen des Systems von den *PFO*-Bedingungen beschreibt, und Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Nachfolgend wurden die beobachteten Geschwindigkeiten  $\eta$  gegen die variierten *after mixing*-Konzentrationen des Redoxpartners aufgetragen und mit Gleichung (3.3) ausgewertet, um die apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  zu erhalten :

$$\eta = \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma} \quad (3.3)$$

mit

$$\alpha = k_{for} - k_{rev} \quad (3.4)$$

$$\beta = k_{for}(A_0 + B_0) + k_{rev}(C_0 + D_0) \quad (3.5)$$

$$\gamma = k_{for}A_0B_0 - k_{rev}C_0D_0 \quad (3.6)$$

wobei  $A_0$  und  $B_0$  die Anfangskonzentrationen der Edukte und  $C_0$  und  $D_0$  die Anfangskonzentrationen der Produkte zum Zeitpunkt  $t = 0$  sind. Für  $\omega$  ergibt sich:

$$\omega = \frac{\eta - \beta}{\eta + \beta} \quad (3.7)$$

Abschließend wurde der Redoxzustand des nicht-reduzierten Redoxpartners berücksichtigt. Durch Vergleich des Absorptionsspektrums des als „oxidiert“ eingesetzten Cytochroms  $c_{552F}$  mit einem vollständig reduzierten und vollständig oxidierten  $c_{552F}$ -Spektrum konnte festgestellt werden, dass das verwendete  $c_{552F}$  im SF-Experiment bis zu 30 % reduziert vorlag. Dieser Anteil an reduziertem  $c_{552F}$  verringert die effektive Anfangskonzentration ( $B_0$ ) an oxidiertem und für den ET zur Verfügung stehenden  $c_{552F}$  auf 70 % bei gleichzeitiger Erhöhung der  $c_{552F}$ -Anfangskonzentration ( $D_0$ ) auf der Produktseite um 30 % und beeinflusst dadurch die Gleichgewichtslage und den Wert der apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten.

Gleichung (3.3) wurde dementsprechend modifiziert, um die realen Konzentrationen von Edukten und Produkten bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten zu berücksichtigen und ergibt Gleichung (3.8):

$$\eta = \sqrt{(k_{for}(A_0 + 0,7 \cdot B_0) + k_{rev}(0,3 \cdot D_0))^2 - 4(k_{for} - k_{rev})k_{for} \cdot A_0(0,7 \cdot B_0)} \quad (3.8)$$

In der nachfolgenden Tabelle 3.11 sind die wichtigsten Lösungsstrategien dieses Stopped-Flow-Protokolls in der Übersicht aufgeführt.

**Tabelle 3.11: Lösungsstrategien des optimierten SF-Protokolls**

Probleme und Lösungsstrategien für die Entwicklung eines optimierten SF-Mess- und non-PFO Auswertungsprotokolls

Problem	Strategie
hohe ET-Raten	Erniedrigung der Messtemperatur
Autoxidation der Häme	sauerstoffarme Pufferbedingungen, Vorreduktion eines Redoxpartners mit Ascorbat
spektrale Überlappung	Verwendung von DSC-Differenzwellenlängen
hohe Grundabsorption	niedrige, äquimolare Cytochrom-Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ]
non-PFO-Bedingungen	non-pseudo first order-Auswertung (Malatesta 2005)
Redoxzustand	modifizierte $\eta$ -Gleichung, die nur die effektive Cytochromkonzentration berücksichtigt

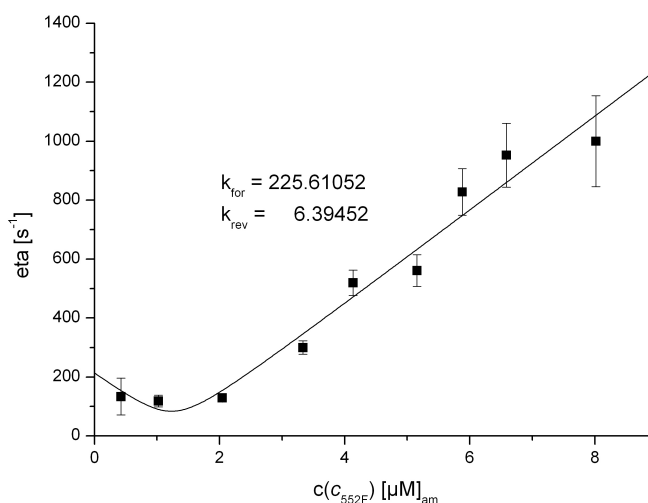
### 3.6.4 Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen Cytochrom $c_{1CF}$ und $c_{552F}$

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, welcher Natur der Elektronentransfer zwischen *P. denitrificans* Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  ist, welche Wechselwirkungen und welche Aminosäurepositionen auf der Oberfläche des  $c_{1CF}$  eine Rolle für einen effizienten



Elektronentransfer spielen. Hierfür wurde die Ionenstärkeabhängigkeit (*ionic strength dependency*, ISD) des Elektronentransfers untersucht und die ET-Reaktion der *core*-Fragment-Mutanten mit der des Wildtyps verglichen. Die Ionenstärke  $I$  wurde durch Zugabe der adäquaten Menge an KCl in einem Bereich von  $I = 68$ - $318$  mM mit dem Messpuffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) variiert. Die Auswertung der Kinetiken erfolgte für jede individuelle Salz- und Cytochrom  $c_{552F}$ -Konzentration durch Gleichung (3.2) und ergab die beobachteten Geschwindigkeitskonstante  $\eta$ . Diese wurden anschließend gegen die variierte Cytochrom  $c_{552F}$  *after mixing*-Konzentration aufgetragen und mit einer modifizierten  $\eta$ -Gleichung (3.8) mathematisch angepasst, um die bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  zu erhalten.

Die in Abschnitt 3.6.3 ausgeführte *non-PFO*-Auswertung ist nachfolgend exemplarisch für die Reaktion zwischen  $c_{1CF}WT$  und  $c_{552F}$  dargestellt (Abbildung 3.26):



**Abbildung 3.26: *non-PFO*-Auswertung der ET-Reaktion von  $c_{1CF}WT/c_{552F}$**   
 ET-Reaktion zwischen  $c_{1CF}WT$  ( $1,56 \mu M_{am}$ ) und  $c_{552F}$  ( $0,425$  bis  $8,02 \mu M_{am}$ ;  $c_{552F}$  zu 30 % reduziert) bei 50 mM KCl; Auswertung nach Gleichung (3.3)

Wie Abbildung 3.26 zeigt, fällt  $\eta$  linear zunächst mit steigender Konzentration, um dann nach Durchlaufen eines Minimums linear wieder anzusteigen. Das Abfallen der beobachteten Geschwindigkeit  $\eta$  wird durch die Gleichungen (3.3) und (3.8) definiert, da  $\eta$  proportional zu der Differenz der Anfangskonzentrationen der beiden Redoxpartner ist. Aus der Steigung des fallenden und steigenden Astes des Graphs lassen sich die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten bestimmen. Für die WT-Reaktion werden Geschwindigkeiten  $\eta$  von  $14 s^{-1}$  (300 mM KCl) bis  $1000 s^{-1}$  (50 mM KCl) erhalten, woraus sich bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  von  $2,25 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$  (300 mM KCl) bis  $2,25 \cdot 10^8 M^{-1}s^{-1}$  (50 mM KCl) ergeben, die in der Größenordnung eines Diffusions-kontrollierten Prozesses liegen. Aus den gemessenen Daten für den ET vom  $c_{1CF}$  zum  $c_{552F}$  lassen sich neben den direkt bestimmten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  der Hinreaktion auch die der Rückreaktion indirekt durch die mathematische Auswertung bestimmen. Für die WT-Reaktion werden  $k_{rev}$ -Werte von  $4,32 \cdot 10^5 M^{-1}s^{-1}$  (300 mM KCl) bis  $6,39 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$  (50 mM KCl) erhalten. Ein Vergleich der beiden Geschwindigkeitskonstanten ergibt je nach individueller

Bedingung eine Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 28-38, womit das Reaktionsgleichgewicht zur Seite der Produkte (also zur Reduktion des  $c_{552F}$ ) verschoben ist.

In Tabelle 3.12 sind die *after mixing*-Konzentrationen der Cytochrome und die kinetischen Parameter  $\eta$ ,  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  des ET der  $c_{1CF}$ -Mutanten mit  $c_{552F}$  im Vergleich zum  $c_{1CF}$ WT in Abhängigkeit von der Salzkonzentration zusammengestellt. Einige Kinetiken bei niedrigen Ionenstärken konnten aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit nicht ausgewertet werden, da die Signale zu geringe Amplituden bei hohem Grundrauschen aufwiesen. Des weiteren ist anzumerken, dass in einigen Fällen die Bestimmung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion  $k_{rev}$  nicht möglich war.

**Tabelle 3.12: Konzentrationen und kinetische Parameter der ET-Reaktion  $c_{1CF}$  /  $c_{552F}$**

$\eta$ ,  $k_{for}$ ,  $k_{rev}$  der *pre-steady state*-Kinetiken bei verschiedenen Ionenstärken für den ET von  $c_{1CF}$ WT und den Interaktionsmutanten zu  $c_{552F}$

$c_{1CF}$	$c(c_{1CF})$ [ $\mu$ M] <sub>am</sub>	$c(c_{552F})$ [ $\mu$ M] <sub>am</sub>	KCl [mM]	kinetische Parameter		
				$\eta$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{for} \cdot 10^6$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_{rev} \cdot 10^5$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]
<b>WT</b>	1,56	0,5-5,9	50-300	14-1000	<b>11 -226</b>	4-60
<b>E243K</b>	5,19	0,6-6,4	100, 200, 300	10 - 63	<b>8 - 29</b>	2-10
<b>V244T</b>	4,59	0,6-5,4	50-300	9 - 78	<b>22 - 57</b>	3- 9
<b>A247N</b>	6,56	0,2-5,7	150-300	17 - 117	<b>33 - 48</b>	1-12
<b>A314S</b>	4,04	0,4-7,2	50-300	34 - 598	<b>26 - 361</b>	6-18
<b>K315E</b>	3,8-4,2	0,8-6,5	100-200	23 - 392	<b>32 - 83</b>	3-16
<b>K315T</b>	3,9-5,0	0,4-8,9	50-300	18 - 979	<b>12 - 350</b>	2- 9
<b>G319A</b>	3,02	0,8-6,6	50-300	22 - 840	<b>23 - 314</b>	3- 9
<b>S378A</b>	3,02	0,6-6,4	50-300	9 - 674	<b>18 - 215</b>	2-15
<b>Q381V</b>	2,56	0,8-6,6	50-300	17 - 728	<b>12 - 259</b>	1-24

Wie erwartet nimmt die Geschwindigkeit  $\eta$  generell mit steigender  $c_{552F}$ -Konzentration bei konstanter Ionenstärke zu und bei konstanter  $c_{552F}$ -Konzentration mit steigender Ionenstärke ab. Insgesamt liegen die Werte für  $\eta$  je nach Ionenstärke, Mutante und  $c_{552F}$ -Konzentration in einem Bereich von 10 bis 1000  $s^{-1}$ .

Aus der Geschwindigkeit  $\eta$  werden mit Hilfe von Gleichung (3.8) die apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  bestimmt.  $k_{for}$  nimmt generell mit zunehmender Ionenstärke ab. Die  $k_{rev}$ -Werte für die Rückreaktion wurden indirekt aus den Kinetiken der Hinreaktion berechnet und sind dadurch in ihren Werten breiter gestreut als die  $k_{for}$ -Werte.  $k_{rev}$  ist insgesamt für alle  $c_{1CF}$ -Mutanten deutlich geringer als  $k_{for}$ , so dass auch bei allen ET-Reaktionen der Mutanten das Reaktionsgleichgewicht eindeutig zur Seite der  $c_{552F}$ -Reduktion verschoben ist. Eine weitere Abschätzung der Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}$  der ET-Reaktion von  $c_{1CF}$ WT mit  $c_{552F}$  mit Hilfe von DSC-Differenzspektren ist in Abschnitt 3.6.5 beschrieben.

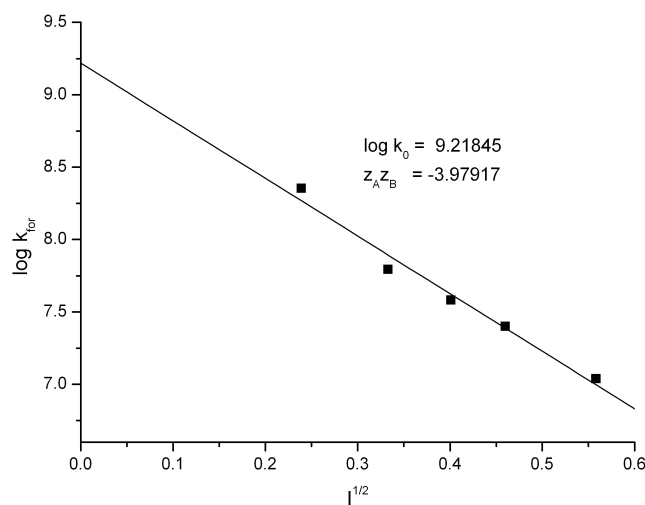
Sowohl die starke Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeit  $\eta$  als auch der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  von der Salzkonzentration lassen auf einen elektrostatischen Charakter der Reaktion schließen. Um die Ionenstärkeabhängigkeit der apparenten, bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten darzustellen und zu analysieren, wurde der Logarithmus von  $k_{for}$  als Funktion gegen die

Wurzel aus der Ionenstärke aufgetragen und gemäß dem Brønsted-Gesetz (Moore 1983; Brønsted und La Mer 1924) mit Gleichung (3.9) ausgewertet.

$$\log k = \log k_0 + 2B \cdot z_A z_B \sqrt{I} \quad (3.9)$$

$k$  ist die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante bei Ionenstärke  $I$  und  $k_0$  die hypothetische Geschwindigkeitskonstante bei  $I = 0$ .  $B$  ist ein Parameter, der sich aus dem Debye-Hückel-Grenzesetz ableitet und dessen Wert sowohl von der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels als auch von der Temperatur abhängt. Für die Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit in wässrigen Lösungen bei 10 °C wird für  $B$  ein Wert von 0,5 angenommen. Das Produkt  $z_A z_B$  gibt die auf den Proteinoberflächen direkt miteinander wechselwirkenden Ladungen an, so dass die Wurzel von  $z_A z_B$  die effektiven Ladungen pro Proteinmolekül reflektiert. Die beiden Parameter  $k_0$  und  $z_A z_B$  werden auch als Brønsted-Parameter bezeichnet und zur Beschreibung der Ionenstärkeabhängigkeit herangezogen.

Die Ionenstärkeabhängigkeit der WT-Reaktion ist im Brønsted-Diagramm in Abbildung 3.27 dargestellt und wird im Folgenden analysiert.



**Abbildung 3.27: Brønsted-Analyse der ET-Reaktion  $c_{1CF}WT / c_{552F}$**   
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit der ET-Reaktion von  $c_{1CF}WT$   
mit  $c_{552F}$

Das Brønsted-Diagramm zeigt die Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  mit steigender Ionenstärke  $I$  für den ET zwischen  $c_{1CF}WT$  und  $c_{552F}$ . Durch mathematische Anpassung mit Gleichung (3.9) lässt sich aus der Steigung das Ionenprodukt  $z_A z_B$  berechnen und aus dem Y-Achsenabschnitt  $k_0$ . Eine negative Steigung und somit ein negativer Wert für  $z_A z_B$  bedeutet eine Wechselwirkung von Ladungen gegensätzlichen Vorzeichens durch wechselseitige Ladungsanziehung. Für die WT-Reaktion ergibt sich ein Wert für  $z_A z_B$  von -3.98 und daraus zwei effektive Ladungen gegensätzlichen Vorzeichens auf beiden Proteinoberflächen der Redoxpartner. Die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_0$  ist ein extrapoliertes, hypothetischer Wert bei einer Ionenstärke  $I = 0$ , bei der keine Abschirmung der Proteinoberflächenladungen durch

Salzionen stattfindet. Für  $c_{1CF}WT$  errechnet sich ein  $k_0$  von  $1,65 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . In Tabelle 3.13 sind die Brønsted-Parameter der WT-Reaktion im Vergleich zu den  $c_{1CF}$ -Mutanten in der Übersicht zusammengestellt, wobei die extrapolierte Geschwindigkeitskonstante  $k_0$  des WT gleich 100 % gesetzt und relativ zu den  $k_0$ -Werten der Mutanten verglichen wird. Im Folgenden werden die Mutanten im Einzelnen direkt zum WT dargestellt und verglichen.

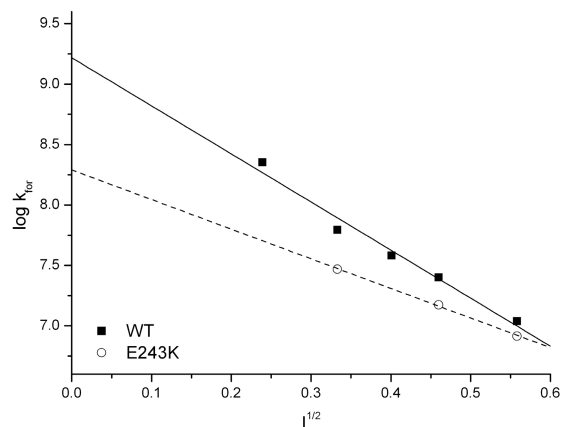
**Tabelle 3.13: Brønsted-Parameter der  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten im Vergleich zum WT**

Der  $k_0$ -Wert des WT wurde gleich 100 % gesetzt und die  $k_0$ -Werte der Mutanten relativ dazu verglichen; derselbe relative Vergleich wurde für die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  bei verschiedenen Ionenstärken in Prozent durchgeführt. Aus dem Ionenprodukt  $z_{AZB}$  lassen sich die effektiven Ladungen berechnen, die pro Redoxpartner an der Interaktion beteiligt sind. Die Anzahl der Datenpunkte, die zur Berechnung der Brønsted-Parameter verwendet wurden, sind aufgeführt

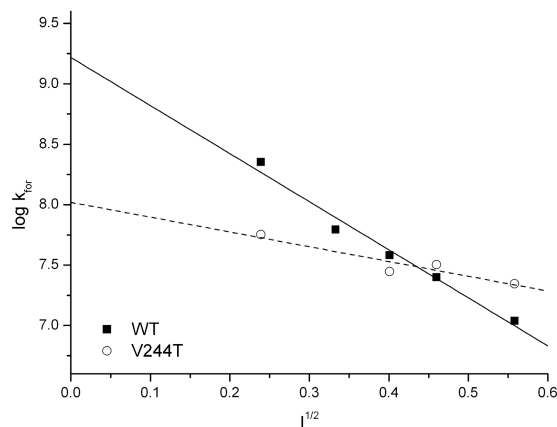
Cyt $c_{1CF}$	$k_0$	$k_0$ [%]	$z_{AZB}$	effektive Ladungen	$k_{on}$ [%]	@ / [mM]	Datenpunkte
WT	$16,54 \cdot 10^8$	100	-3,98	1,99	100	58-311	5
E243K	$1,94 \cdot 10^8$	12	-2,44	1,56	47-75	111-311	3
V244T	$1,05 \cdot 10^8$	6	-1,22	1,11	25-200	58-311	4
A247N	$10,34 \cdot 10^8$	62	-2,71	1,65	230-300	161-311	3
A314S	$33,51 \cdot 10^8$	203	-4,12	2,03	140-200	58-311	5
K315E	$10,05 \cdot 10^8$	61	-3,29	1,81	133-126	111-211	3
K315T	$30,50 \cdot 10^8$	184	-4,60	2,14	160-100	58-311	5
G319A	$29,30 \cdot 10^8$	177	-4,37	2,09	160-230	58-311	5
S378A	$14,64 \cdot 10^8$	86	-3,81	1,95	100-160	58-311	5
Q381V	$19,49 \cdot 10^8$	118	-4,08	2,02	115-111	58-311	5

### E243K

Die Mutante E243K wurde von Anna Eichhorn während ihrer Promotion (Eichhorn, Dissertation 2003) hergestellt und zeigte in vorangegangenen SF-Experimenten einen verlangsamten ET verglichen zum WT. Durch die Mutagenese wurde eine Ladungsumkehr von negativer zu positiver Oberflächenladung bewirkt. Des weiteren wurde durch die Mutation der Raumbedarf in dieser Position erhöht, da Lysin ein etwas größeres Raumvolumen als Glutamat einnimmt. Obwohl die extrapolierte bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_0$  auf 12 % des WT-Wertes reduziert ist, zeigt sich in einem direkten Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten zum WT, dass für E243K  $k_{for}^r$  bei niedrigen bzw. hohen Ionenstärken um den Faktor 0,47 bzw. 0,75 verringert ist (Abbildung 3.28). Dieses Verhalten spiegelt sich auch in dem zum WT unterschiedlichen Wert des Ionenproduktes  $z_{AZB}$  von -2,44 wider, der eine Anzahl von 1,56 effektiven Ladungen pro Proteinoberfläche ergibt und damit eine Reduktion um jeweils ein halbe Ladung pro Cytochrom im Vergleich zum WT. Somit bewirkt der Austausch des negativen geladenen Glutamats in Position 243 gegen ein positiv geladenes Lysin eine generelle Verlangsamung der Reaktion sowie eine Reduktion der effektiv wechselwirkenden Ladungen.



**Abbildung 3.28: Brønsted-Analyse E243K**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit der ET-Reaktion zwischen E243K/ $c_{552F}$  im Vergleich zur WT-Reaktion



**Abbildung 3.29: Brønsted-Analyse V244T**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit der ET-Reaktion zwischen V244T/ $c_{552F}$  im Vergleich zur WT-Reaktion

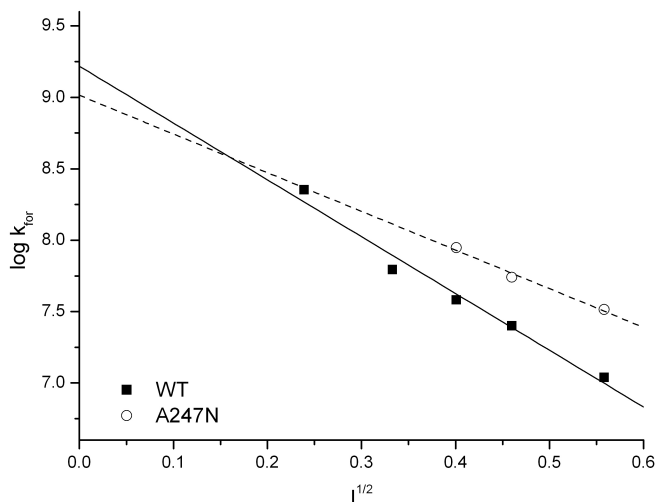
### V244T

Der zu Val244 adäquate Rest in der Hefe-Sequenz ist Val100, das zwar im Cokristall keinen direkten Kontakt zum CYC ausbildet, aber exponiert erscheint. Der Austausch von Valin nach Threonin bewirkt eine Erhöhung der Polarität durch die eingeführte OH-Gruppe, wobei das Raumvolumen in dieser Position gleich bleibt.  $k_0$  ist auf 6 % der WT-Aktivität reduziert, wobei der direkte Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten eine Verringerung auf 25 % WT-Aktivität bei niedrigen Ionenstärken (50 M KCl) bis zu einer Beschleunigung um den Faktor 2 bei hohen Ionenstärken (300 mM KCl) ergibt (Abbildung 3.29). Dies wird auch durch ein Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -1,22 reflektiert, woraus sich 1,11 effektive Ladungen pro Redoxpartner ergeben und somit eine Verringerung um eine ganze effektive Ladung im Vergleich zum WT. Da bei dieser Mutante keine Ladung eingeführt oder eliminiert, sondern ausschließlich die Polarität erhöht wurde, lässt sich die veränderte Ionenstärkeabhängigkeit nur durch eine Veränderung der Interaktionsfläche erklären.

### A247N

Ala247 entspricht in der Hefe-Sequenz direkt Ala103, das im Cokristall eine unpolare Wechselwirkung mit Ala81 von CYC eingeht. In Position 247 wurde ein unpolares Alanin durch ein polares Asparagin ersetzt und dadurch sowohl die Polarität als auch der Raumbedarf an dieser Stelle leicht erhöht. Diese Mutation bewirkt eine Abnahme von  $k_0$  auf 62 % WT-Aktivität, wobei insgesamt die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten um den Faktor 2,3 (150 mM KCl) bis 3 (300 mM KCl) größer sind als beim WT. Das Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -2,71 liefert 1,65 effektive Ladungen pro Redoxpartner und damit eine Reduktion um ein Drittel im Vergleich zum WT. Der Austausch eines unpolaren gegen einen hydrophilen Rest scheint in dieser Position eine Beschleunigung der Reaktion im Vergleich zum WT zu bewirken. Die Verringerung der effektiven Ladungen um 0,3 ist gering, was zu erwarten war, da keine Ladung eingeführt oder eliminiert wurde. Kritisch ist hier, dass für die Brønsted-

Auftragung nur drei Datenpunkte zur Verfügung standen und dadurch die mathematische Anpassung schwierig und mit einem relativ großen Fehler behaftet sein kann.

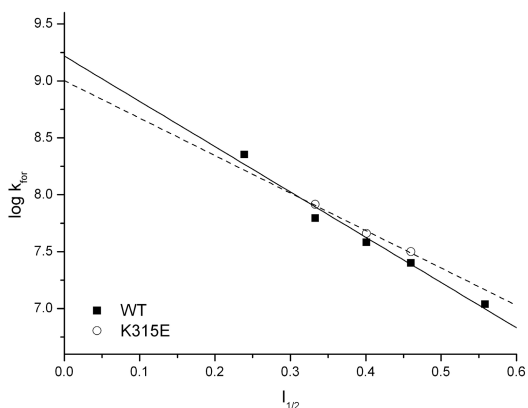


**Abbildung 3.30: Brønsted-Analyse A247N**

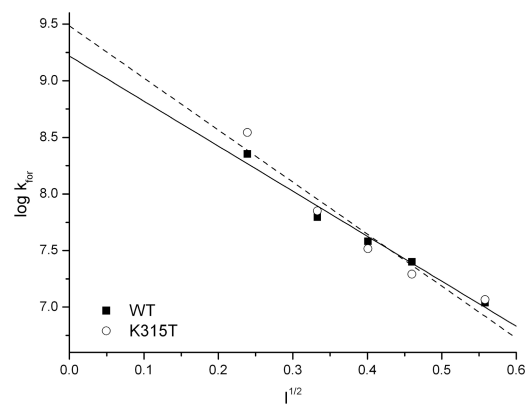
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit der ET-Reaktion zwischen A247N/C<sub>552</sub>F im Vergleich zur WT-Reaktion

### K315E

Die Mutanten K315E und K315T befinden sich exponiert in der Nähe der Hämsspalte (Abbildung 3.9). Sie stimmen direkt mit dem *S. c.* CYT1 Ala164 überein, das in der Co-Kristallstruktur eine schwache polare Wechselwirkung zu Lys86 des CYC eingeht. Bei K315E wurde eine positive Ladung zu einer negativen invertiert. Des Weiteren wurde durch den Austausch von Lysin nach Glutamat der Raumbedarf in dieser Position leicht erniedrigt.  $k_0$  ist auf 61 % der WT-Aktivität reduziert, wohingegen der direkte Vergleich der Werte für die Geschwindigkeitskonstanten eine Beschleunigung um den Faktor 1,33 (100 mM KCl) bis 1,26 (200 mM KCl) ergibt (Abbildung 3.31).  $z_{AZB}$  ist mit -3,29 gegenüber dem WT geringfügig erniedrigt, der Unterschied von 0,18 effektiven Ladungen allerdings vernachlässigbar. Der Austausch eines in der Wechselwirkung zum Cytochrom  $c_{552}$  potentiell repulsiv wirkenden positiven Lysins gegen ein negativ geladenes Glutamat, das die Interaktion günstig beeinflussen sollte, bewirkt hier eine leichte Beschleunigung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten. Allerdings hat die Ladungsumkehr in Position 315 keinen Einfluss auf das Ionenprodukt  $z_{AZB}$ , so dass die Beschleunigung gegenüber dem WT durch die Verringerung des Raumbedarfes verursacht werden könnte, da beide Redoxpartner sich so für einen effizienten ET leichter annähern können. Insgesamt scheint die Position K315 jedoch keinen großen Einfluss auf die Wechselwirkung zum  $c_{552}$  zu haben.



**Abbildung 3.31: Brønsted-Analyse K315E**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen K315E/C<sub>552F</sub> im Vergleich zur WT-Reaktion



**Abbildung 3.32: Brønsted-Analyse K315T**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen K315T/C<sub>552F</sub> im Vergleich zur WT-Reaktion

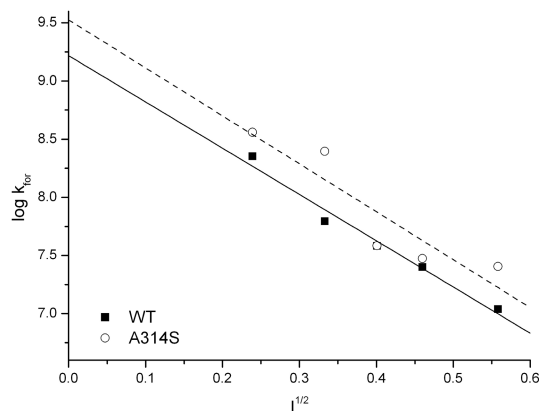
### K315T

Durch die Mutagenese wurde hier ein positiv geladenes, sperriges Lysin durch Threonin ersetzt, wobei eine positive Ladung eliminiert und stattdessen eine OH-Gruppe eingeführt wurde. Weiterhin wurde durch diesen Austausch der Raumbedarf in dieser Position erniedrigt.  $k_0$  ist im Vergleich zur WT-Aktivität auf 184 % erhöht (Abbildung 3.32) und der Vergleich der gemessenen Raten ergibt eine Erhöhung um den Faktor 1,6 (50 mM KCl) und WT-Aktivität bei hoher Ionenstärke (300 mM KCl). Das Ionenprodukt  $z_A z_B$  ist mit -4,60 geringfügig gegenüber dem WT-Wert erhöht, der Unterschied der effektiven Ladungen von 2,14 gegenüber 1,99 ist jedoch vernachlässigbar. Somit bewirkt die Eliminierung der positiven Ladung auch hier eine leichte Beschleunigung (bei niedrigen Ionenstärken), wohingegen  $z_A z_B$  nicht beeinflusst wird und die Ladung des Lysins keinen Einfluss auf die Wechselwirkung zu Cytochrom *c*<sub>552F</sub> zu haben scheint. Schlussfolgerung ist hier ebenso wie bei K315E, dass diese Position keinen großen Einfluss auf die Interaktion zum *c*<sub>552F</sub> zu haben scheint und die Beschleunigung durch Eliminierung der sterischen Hinderung durch das sperrige Lysin bewirkt wird.

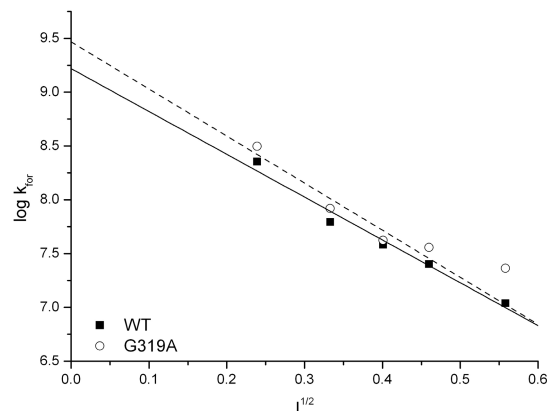
### A314S

Die beiden Aminosäurereste Ala314 und Gly319 liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Lys315 am Rande der Hämspalte. Ala314 ist das Gegenstück zu Ala164 in Hefe, wobei die beiden Reste im Sequenzalignment nicht direkt untereinander liegen (Abbildung 3.9), diese Position aber gewählt wurde, da es sich bei beiden Aminosäuren um Alanine handelt. Der Austausch von Alanin zu Serin bewirkt eine Erhöhung der Polarität bei ähnlichem Raumbedarf.  $k_0$  ist auf 203 % der WT-Aktivität erhöht und die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten weisen eine Erhöhung um Faktor 1,4 (50 mM KCl) bis 2 (300 mM KCl) gegenüber dem WT auf (Abbildung 3.33). Das Ionenprodukt  $z_A z_B$  mit -4,12 und die Anzahl der effektiven Ladungen mit 2,03 sind ähnlich denen des WT und die Differenz von 0,04 effektiven Ladungen vernachlässigbar. A314S weist

daher aufgrund der Erhöhung der Polarität einen insgesamt beschleunigten ET auf, wobei die Ionenstärkeabhängigkeit der des WT gleicht.



**Abbildung 3.33: Brønsted-Analyse A314S**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen A314S/C<sub>552F</sub> im Vergleich zur WT-Reaktion



**Abbildung 3.34: Brønsted-Analyse G319A**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen G319A/C<sub>552F</sub> im Vergleich zur WT-Reaktion

### G319A

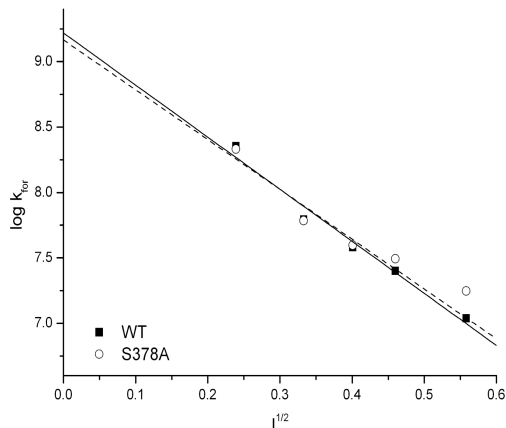
Gly319 ist der entsprechende Rest zu Hefe Ala168, das im Cokristall eine unpolare Wechselwirkung zum CYC Val28 eingeht. Da die Aminosäure Glycin als „Helix Brecher“ bekannt ist, wird sie in *P. denitrificans* abweichend von der gezeigten Struktur nicht in einer  $\alpha$ -Helix liegen, sondern an deren Anfang (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Der Austausch von Glycin nach Alanin erhöht in dieser Position den Raumbedarf, ändert aber die Polarität nicht.  $k_0$  ist im Vergleich zum WT auf 177 % erhöht, während die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten bei niedrigen Ionenstärken um den Faktor 1,6 (50 mM KCl) erhöht sind, bei mittleren Ionenstärken (100 und 150 mM KCl) ungefähr dem WT-Verhalten entsprechen und bei hohen Ionenstärken (300 mM KCl) um den Faktor 2,3 erhöht sind (Abbildung 3.34). Das Ionenprodukt  $z_A z_B$  und die entsprechenden effektiven Ladungen sind mit -4,37 bzw. 2,09 gegenüber den WT-Werten etwas erhöht, aber vernachlässigbar (die Differenz zum WT beträgt 0,1 effektive Ladungen). Da hier durch die Mutagenese keine Ladung verändert wurde, verhält sich die Ionenstärkeabhängigkeit wie die des WT. Die Gesamtreaktion ist jedoch gegenüber der WT-Reaktion beschleunigt, allerdings kann aufgrund der großen Streuung der Datenpunkte im Brønsted-Diagramm keine Aussage über das Maß der Beschleunigung gemacht werden.

### S378A

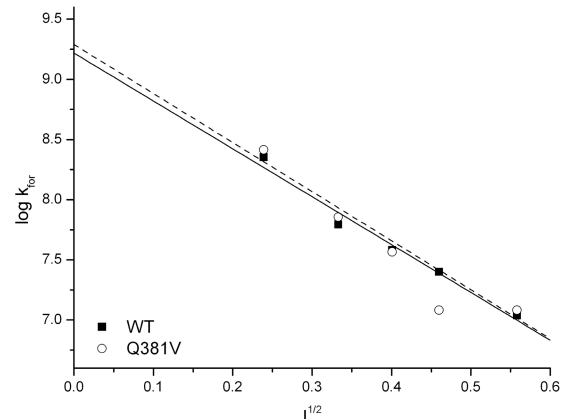
Ser378 ist das Gegenstück zu Phe230, das im QCR/CYC-Komplex aus Hefe die Kation- $\pi$ -Interaktion zu Arg13 im CYC eingeht. Der Austausch von Serin nach Alanin verringert die Polarität bei gleichbleibendem Raumbedarf in dieser Position.  $k_0$  ist auf 86 % der WT-Aktivität verringert (Abbildung 3.35). Der direkte Vergleich der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten ergibt etwa WT-Verhalten bei niedrigen und mittleren (50-200 mM KCl) und eine Erhöhung um den Faktor 1,6 bei hohen



Ionenstärken (300 mM KCl). Für das Ionenprodukt  $z_{AZB}$  errechnet sich ein Wert von -3,81, was 1,95 effektiven Ladungen pro Redoxpartner entspricht und somit im selben Bereich wie der WT liegt. Die Erhöhung der Polarität in dieser Position scheint also keine Auswirkung auf den ET zu haben, so dass diese Position nicht an den Wechselwirkungen zum  $c_{552F}$  beteiligt zu sein scheint.



**Abbildung 3.35: Brønsted-Analyse S378A**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen S378A/ $c_{552F}$  im Vergleich zur WT-Reaktion



**Abbildung 3.36: Brønsted-Analyse Q381V**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen Q381/ $c_{552F}$  im Vergleich zur WT-Reaktion

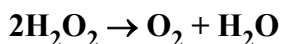
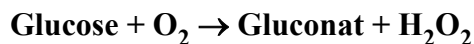
### Q381V

Gln381 in *P. denitrificans* entspricht Met233 in Hefe, das im Cokristall eine unpolare Wechselwirkung zum CYC Arg13 aufweist. Der Austausch von Glutamin nach Valin bewirkt sowohl eine Verringerung der Polarität als auch eine Erhöhung des Raumbedarfes.  $k_0$  ist 118 % der WT-Aktivität und die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten sind im Vergleich zum WT minimal erhöht (um den Faktor 1,15-1,11). Mit einem Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -4,08 und 2,02 effektiven Ladungen pro Molekül weist diese Mutante WT-Verhalten auf und diese Position scheint an der direkten Wechselwirkung zum  $c_{552F}$  nicht beteiligt zu sein.

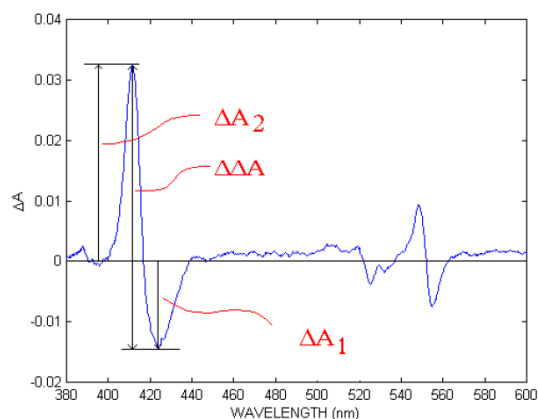
### 3.6.5 Gleichgewichtskonstante $K_{eq}$

Durch Messung von DSC-Differenzspektren mit konstanter  $c_{1CF}$ -Konzentration gegen steigende  $c_{552F}$ -Konzentrationen kann die Lage des Reaktionsgleichgewichts der ET-Reaktion von  $c_{1CF}$  zu  $c_{552F}$  abgeschätzt werden. Während der Messung muss sichergestellt sein, dass Cytochrom  $c_{1CF}$  vollständig reduziert vorliegt und das  $c_{552F}$  vollständig oxidiert ist. Dies wird durch eine entsprechende Probenvorbereitung und Hilfsreaktionen gewährleistet: Der Messpuffer für die  $c_{1CF}$ -Lösung wurde mit Stickstoff gespült, um den Sauerstoffgehalt möglichst gering zu halten und so die Autoxidation des Cytochroms zu minimieren. Es erfolgte eine Vorreduktion mit Dithionit und die Abtrennung des Reduktionsmittels per Gelfiltration. Der reduzierten  $c_{1CF}$ -Lösung wurden Glucose sowie Glucose-Oxidase und Katalase in katalytischen Mengen zugesetzt, die die Reaktion von Glucose zu Gluconat und Wasserstoffperoxid unter

Sauerstoffverbrauch und die weitere Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysieren, wodurch insgesamt der Restsauerstoff in der Lösung verbraucht wird:

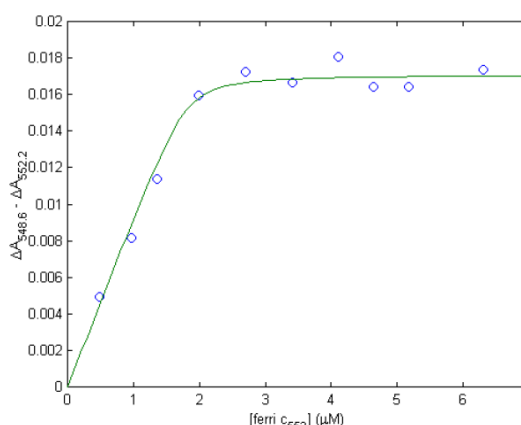


Cytochrom  $c_{552F}$  wird in Puffer ohne Stickstoffbegasung unter Luftsauerstoff-Bedingungen vorbereitet und katalytische Mengen an Cytochrom  $c$  Oxidase zugesetzt, um das  $c_{552F}$  vollständig zu oxidieren. Die Oxidase wird anschließend durch Cyanid blockiert, um *turnover*-Bedingungen während der DSC-Messungen zu verhindern. Die DSC-Differenzspektren wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.4.2) aufgenommen und die Gesamtabsorptionsänderung  $\Delta A$  über das Soretmaximum und -minimum bestimmt (Abbildung 3.37).



**Abbildung 3.37: Bestimmung von  $\Delta A$**

Bestimmung der Gesamtabsorptionsänderung im Soretbereich der DSC-Differenzspektren



**Abbildung 3.38: Bestimmung von  $K_{eq}$**

Auftragung von  $\Delta A$  gegen die Ferricytochrom  $c_{552F}$ -Konzentrationen (*after mixing*) und Auswertung nach Gleichung (3.18)

Die Beziehung zwischen Gesamtabsorptionsänderung  $\Delta A$  und der Gleichgewichtskonstanten  $K$  ergibt sich folgendermaßen:

Für eine Reaktion  $\mathbf{A} + \mathbf{B} \rightleftharpoons \mathbf{C} + \mathbf{D}$  ergibt sich im Gleichgewicht für  $K_{eq}$

$$K_{eq} = \frac{C \cdot D}{A \cdot B} \quad (3.10)$$

Ersetzt man nun die Produkte und Edukte durch eine Variable  $x$ , die die Reaktionsmenge der sich bildenden Produkte wiedergibt, erhält man einen Ausdruck für  $K_{eq}$ , der nur von den initialen Konzentrationen der Edukte  $A_0$  und  $B_0$  abhängt:

$$K_{eq} = \frac{x^2}{(A_0 - x)(B_0 - x)} \quad (3.11)$$

Lösen von Gleichung (3.11) und Auflösen nach  $x$  ergibt Gleichung (3.12), in der die Reaktionsmenge  $x$  durch die initialen Konzentrationen  $A_0$  und  $B_0$  und die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  definiert wird. Durch Messen von  $x$ ,  $A_0$  und  $B_0$  kann demnach  $K_{eq}$  berechnet werden.

$$x = \frac{K(A_0 + B_0) \pm \sqrt{K^2(A_0 + B_0)^2 - 4(K-1)KA_0B_0}}{2(K-1)} \quad (3.12)$$

Die Reaktionsmenge  $x$  kann über Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes aus den DSC-Differenzspektren erhalten werden, womit man für die Gesamtabsorption des *bevor mixing*-Spektrums ( $bm$ ) erhält:

$$bm = c_A \varepsilon_A + c_B \varepsilon_B \quad (3.13)$$

und für das *after mixing*-Spektrum ( $am$ ) nach Einsetzen von  $x$  und Zusammenfassen:

$$am = (c_A^0 - x)\varepsilon_A + (c_B^0 - x)\varepsilon_B + c_C \varepsilon_C + c_D \varepsilon_D = c_A^0 \varepsilon_A + c_B^0 \varepsilon_B + (\varepsilon_C + \varepsilon_D - \varepsilon_A - \varepsilon_B)x \quad (3.14)$$

Die Absorptionsänderung  $\Delta A_1$  ergibt sich also zu

$$\Delta A_1 = am - bm = (\varepsilon_C + \varepsilon_D - \varepsilon_A - \varepsilon_B)x = \Delta \varepsilon_1 \cdot x \quad (3.15)$$

und analog dazu

$$\Delta A_2 = am - bm = (\varepsilon_C + \varepsilon_D - \varepsilon_A - \varepsilon_B)x = \Delta \varepsilon_2 \cdot x \quad (3.16)$$

Daraus ergibt sich die Gesamtabsorptionsänderung  $\Delta \Delta A$  zu

$$\Delta \Delta A = \Delta A_2 - \Delta A_1 = (\Delta \varepsilon_2 - \Delta \varepsilon_1)x = \Delta \Delta \varepsilon \cdot x \quad (3.17)$$

Einsetzen für  $x$  in Gleichung (3.12) ergibt Gleichung (3.18) für die mathematische Auswertung der Auftragung von  $\Delta \Delta A$  gegen  $c(c_{552F}^{\text{red}})$

$$\Delta \Delta A = \Delta \Delta \varepsilon \cdot \frac{K(A_0 + B_0) - \sqrt{K^2(A_0 + B_0)^2 - 4(K-1)KA_0B_0}}{2(K-1)} \quad (3.18)$$

Die mathematische Anpassung und Auswertung wurde von Professor F. Malatesta sowohl für den Soret- als auch für den  $\alpha$ -Bandenbereich vorgenommen (Abbildung 3.37 und Abbildung 3.38). Für die Gleichgewichtskonstante der ET-Reaktion zwischen  $c_{1CFWT}$  und  $c_{552F}$  wurden aus mehreren Ansätzen Werte zwischen 30 und 75 erhalten.

Somit ist das Gleichgewicht der Reaktion stark zu Gunsten der  $c_{552F}$ -Reduktion verschoben.

### 3.6.6 Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen $c_{caa3}$ und $c_{bc}$ oder $c_{552}$

Für die Messung der Ionenstärkeabhängigkeit des Elektronentransfers vom löslichen  $c_{caa3}$ -Fragment aus *T. thermophilus* zu seinen potentiellen Redoxpartnern Cytochrom  $c_{bc}$  des  $bc$ -Komplexes und  $c_{552}$  wurde das etablierte Mess- und *non-PFO*-Auswertungsprotokoll (Abschnitt 3.6.3) verwendet. So wurde jeweils ein Redoxpartner vorab mit 1 mM Ascorbat reduziert und der Redoxzustand des anderen spektroskopisch bestimmt. Für die Messung wurden die für das jeweilige Redoxpaar individuell bestimmten DSC-Differenzwellenlängen verwendet (Abschnitt 3.6.1): 406/420 nm für das  $c_{caa3}/c_{bc}$ -Redoxpaar und 419 nm für das  $c_{caa3}/c_{552}$ -Paar. Es stellte sich heraus, dass der ET bei 10 °C und den für das *P. denitrificans*-System verwendeten Salzkonzentrationen für eine adäquate Auflösung zu schnell war, weshalb zur Messung der Ionenstärkeabhängigkeit KCl-Konzentrationen in einem Bereich von 150-500 mM eingesetzt wurden, um die Reaktion zu verlangsamen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gleichungen (3.2) und (3.8) unter Berücksichtigung der *non-PFO*-Bedingungen.

#### 3.6.6.1 ET zwischen Cytochrom $c_{caa3}$ und $c_{bc}$

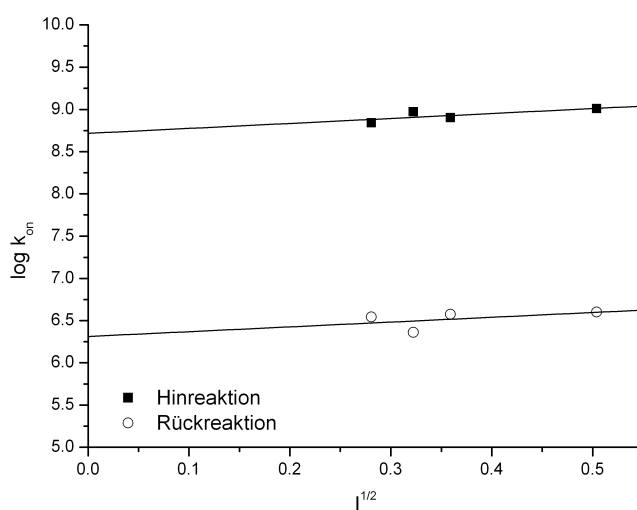
Für den ET von Cytochrom  $c_{bc}$  zum  $c_{caa3}$ -Fragment (Hinreaktion) ergeben sich sehr schnelle Geschwindigkeiten  $\eta$  von ca. 1000 bis 2000  $s^{-1}$  und daraus hohe bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  von 7 bis  $10 \cdot 10^8 M^{-1}s^{-1}$ . Der ET vom  $c_{caa3}$ -Fragment zum Cytochrom  $c_{bc}$  (Rückreaktion) konnte im Gegensatz zum *P. denitrificans*-System direkt gemessen werden und ergab Geschwindigkeiten  $\eta$  von 0,4 bis 10,5  $s^{-1}$ , die damit um den Faktor 1000 unter denen für die Hinreaktion liegen. Dementsprechend geringer sind die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}^{rev}$  (2 bis  $4 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$ ). Weder  $\eta$  noch die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}^{for}$  bzw.  $k_{on}^{rev}$  zeigen große Schwankungen mit der Ionenstärke. Ein direkter Vergleich der  $k_{on}$ -Werte für die Hin- und Rückreaktion ergibt eine um etwa 250 bis 300-fach beschleunigte Hinreaktion gegenüber der Rückreaktion. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt somit auf der Seite des reduzierten  $c_{caa3}$ -Fragmentes. Tabelle 3.14 fasst die verwendeten Cytochromkonzentrationen und kinetischen Parameter für das  $c_{caa3}/c_{bc}$ -Redoxpaar zusammen.

**Tabelle 3.14: Kinetische Parameter des ET von  $c_{caa3}$  mit  $c_{bc}$  und  $c_{552}$  aus *T. thermophilus***  
Kinetische Parameter  $\eta$ ,  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  sowie Cytochrom- und Salzkonzentrationen für die Hin- und Rückreaktion des ET zwischen  $c_{caa3}$  und  $c_{bc}$  aus *T. thermophilus*.

KCl [mM <sub>am</sub> ]	Hinreaktion $c_{bc} \rightarrow c_{caa3}$		Rückreaktion $c_{caa3} \rightarrow c_1$		KCl [mM <sub>am</sub> ]
	$\eta$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{for}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_{rev}^v$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$\eta$ [ $s^{-1}$ ]	
200	1225-1631	<b><math>6,97 \cdot 10^8</math></b>	<b><math>3,49 \cdot 10^6</math></b>	0,4- 7,5	150
300	994-1883	<b><math>9,40 \cdot 10^8</math></b>	<b><math>2,30 \cdot 10^6</math></b>	0,6- 6,9	200
400	1422-2065	<b><math>8,00 \cdot 10^8</math></b>	<b><math>3,76 \cdot 10^6</math></b>	0,6- 8,4	250
500	1560-2604	<b><math>10,2 \cdot 10^8</math></b>	<b><math>4,01 \cdot 10^6</math></b>	1,5-10,5	500

Zur Untersuchung der Ionenstärkeabhängigkeit der Hin- und Rückreaktion wurden die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten beider Reaktionen nach Brønsted

analysiert. Wie Abbildung 3.39 zeigt, ergibt die Brønsted-Analyse der Hinreaktion eine extrapolierte Geschwindigkeitskonstante  $k_0^{for}$  von  $4,31 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei  $I=0$  und einen Graph leicht positiver Steigung, was Wechselwirkungen von Ladung gleichen Vorzeichens und damit abstoßende Coulombkräfte bedeutet. Das Ionenprodukt  $z_A z_B$  errechnet sich zu 0,51, was 0,71 effektiven Ladungen pro Redoxpartner entspricht. Für die Rückreaktion zeigt die Auswertung nach Brønsted eine ähnliche Situation.  $k_0^{rev}$  ist mit  $2,05 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Rückreaktion um den Faktor 200 kleiner als  $k_0^{for}$  für die Hinreaktion. Aus der leicht positiven Steigung errechnet sich  $z_A z_B$  mit einem Wert von 0,4, was 0,63 effektiven Ladungen entspricht.



**Abbildung 3.39: Brønsted-Analyse der  $c_{caa3}/c_{cb}$ -Reaktion**  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des ET der Hin- und Rückrichtung für Cytochrom  $c_{caa3}$  und  $c_{bc}$  aus *T. thermophilus*

Die Brønsted-Analyse sowohl der Hin- als auch der Rückreaktion ergibt damit eine leicht positive Steigung und 0,6-0,7 effektiven Ladungen, die abstoßend wirken. Dies lässt auf einen Wechselwirkungsmechanismus schließen, der ladungsunabhängig ist und von hydrophoben Kontakten vermittelt wird.

Die Brønsted-Parameter für die Hin- und Rückreaktion sind in Tabelle 3.15 zusammengefasst:

**Tabelle 3.15: Brønsted-Parameter für den ET von  $c_{bc} \rightleftharpoons c_{caa3}$  aus *T. thermophilus***  
Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit für die Hin- und Rückreaktion des ET zwischen Cytochrom  $c_{bc}$  und  $c_{caa3}$

ET-Reaktion	$k_0 [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$z_A z_B$	effektive Ladungen
$c_{bc} \rightarrow c_{caa3}$ (Hinreaktion)	$4,31 \cdot 10^8$	0,51	0,71
$c_{bc} \leftarrow c_{caa3}$ (Rückreaktion)	$2,05 \cdot 10^6$	0,40	0,63

### 3.6.6.2 ET zwischen Cytochrom $c_{caa3}$ und $c_{552}$

Die ET-Reaktionen zwischen  $c_{caa3}$  und  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* waren auch bei hohen Ionenstärken noch so schnell, dass sie nur schlecht durch SF-Techniken aufgelöst und ausgewertet werden konnten, so dass an dieser Stelle nur eine Größenordnung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  angegeben werden kann. Es ergaben

sich Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , die sich damit an der Grenze eines diffusionskontrollierten Prozesses befinden.

### 3.7 Laserflash-Kinetiken im *pre-steady state*-Bereich

Da der Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  so schnell verläuft, dass ein Großteil der Reaktion in der Totzeit des Stopped-Flow-Spektrometers abläuft und somit für die Detektion verloren geht, wurden *pre-steady state* Laserflash-Kinetiken mit einem Rutheniumkomplex als photoaktiver Komponente durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Auflösung schneller Kinetiken im sub-ms-Bereich. Ein weiterer Vorteil besteht in der Regenerierbarkeit des Systems, die die Akkumulation vieler Kinetiken bei Verwendung derselben Probe ermöglicht. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass ein photoaktiver Rutheniumkomplex kovalent über eine SH-Gruppe mit einem Redoxprotein verknüpft wird und durch einen Laserpuls in einen angeregten Zustand übergeht, der als *metal to ligand charge transfer state* bezeichnet wird. Je nach Struktur und Redox Eigenschaften der Rutheniumverbindung ist diese nun in der Lage das gekoppelte Redoxprotein zu reduzieren, indem es ein Elektron aus dem angeregten Ru-Komplex auf jenes überträgt, oder zu oxidieren, indem es diesem ein Elektron entzieht, und so den Elektronentransfer mit einem Partnerprotein zu induzieren. Im Falle des  $c_{1CF}/c_{552F}$  Elektronentransfers wurde die  $c_{552F}$ -Cysteinmutante N23C verwendet (siehe 3.7.1), um die oxidierend wirkende Rutheniumkomponente  $\text{Ru}(2,2'\text{-bipyrazin})_2(4\text{-bromomethyl-4'-methyl-2,2'-bipyridin})$ , die im Folgenden mit  $\text{Ru}_z$  abgekürzt wird, kovalent mit dem  $c_{552F}$  zu verknüpfen. Alle Laserflash-Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Quan Yuan im Labor von Prof. Dr. Francis Millett an der Universität von Arkansas durchgeführt.

Im Folgenden werden die vorbereitenden Experimente, die Etablierung des Meßsystems und Auswertungsprotokolls sowie die Laserflash-Kinetiken, Messungen zur Ionenstärke- und Temperaturabhängigkeit beschrieben.

#### 3.7.1 Ruthenium-Kopplung von $c_{552F}$ N23C

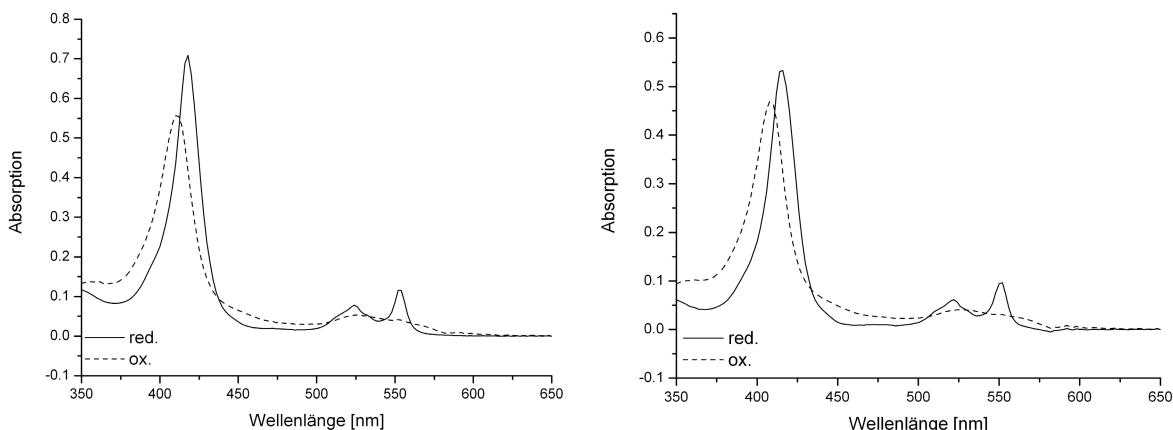
Die kovalente Verknüpfung des  $\text{Ru}_z$ -Komplexes an die Cysteinmutante N23C des  $c_{552F}$  wurde von Quan Yuan an der Universität von Arkansas durchgeführt. Das durch gerichtete Mutagenese eingeführte Cystein von N23C erfüllt am ehesten die Bedingungen der Lokalisation in der Hämperipherie (siehe Abschnitt 3.3.5) und der Oberflächenexposition, so dass die SH-Gruppe für die Kopplungsreaktion mit der  $\text{Ru}_z$ -Verbindung zugänglich ist (siehe Abschnitt 3.3.4).

1 mg N23C wurden mit einem 10-fachen Überschuss an Dithiothreitol (DTT) reduziert, anschließend in einem Konzentrador ankonzentriert und dreimal mit je 10 ml Phosphatpuffer gewaschen (5 mM Na-Phosphat, pH 8). Die Kopplungsreaktion wurde für 12-14 Stunden bei RT im Dunkeln unter anaeroben Bedingungen ( $\text{N}_2$ -Begasung) durchgeführt. Der Reaktionsmix wurde in 5 mM Na-Phosphat umgepuffert und auf eine DE53-Säule gegeben, die zuvor in 5 mM Na-Phosphat pH 7 äquilibriert worden war. Hier zeigte sich, dass nur das ungekoppelte  $c_{552F}$  N23C fest auf der Säule gebunden

wurde und das meiste gekoppelte Ru<sub>z</sub>-N23C durch Waschen mit 5 mM Phosphatpuffer eluiert werden konnte. Eine anschließende Aufreinigung mittels HPLC (DEAE-52) unter Zusatz von DTT, um das Ru<sub>z</sub> reduziert zu halten und eine Bindung auf der DEAE-Säule zu gewährleisten, resultierte in einer Kopplungsausbeute von 30 %.

### 3.7.2 Bestimmung der isosbestischen Wellenlängen

Als isosbestischer Punkt wird eine Wellenlänge bezeichnet, bei der sich zwei Spezies einer Substanz (z.B. Säure und Säureanion oder im Falle eines Redoxproteins das oxidierte und das reduzierte Protein) spektroskopisch in ihrer Absorption nicht unterscheiden, ihre Extinktionskoeffizienten also gleich sind. Die Bestimmung der isosbestischen Punkte für Cytochrom *c*<sub>1CF</sub> und *c*<sub>552F</sub> war hier notwendig, um zum einen die Gesamtkonzentration jedes Cytochroms unabhängig von seinem Redoxzustand in der Küvette spektroskopisch bestimmen zu können, und zum anderen, um Detektionswellenlängen zu finden, bei denen die Reduktion/Oxidation eines der beiden *c*-Typ Cytochrome selektiv verfolgt werden konnte. Hierfür wurden *c*<sub>1CF</sub>- und *c*<sub>552F</sub>-Stammlösungen angesetzt und jeweils in drei Ansätze identischer Konzentration aufgeteilt: Mit dem ersten Ansatz wurde ein normales Redoxdifferenzspektrum aufgenommen und über den spezifischen Extinktionskoeffizienten die Hämkonzentration in der Lösung berechnet. Ansatz 2 wurde durch Zugabe katalytischer Mengen an Cytochrom *c*-Oxidase und Inkubation für einige Minuten bei Raumtemperatur an der Luft vollständig oxidiert. Die Verwendung katalytischer Oxidase-Mengen hat den Vorteil, dass sie bei der Spektrenaufnahme spektroskopisch nicht ins Gewicht fällt. Des weiteren hat sich gezeigt, dass die Oxidase neben ihrem physiologischen Redoxpartner Cytochrom *c*<sub>552</sub> auch unspezifisch mit Cytochrom *c*<sub>1CF</sub> wechselwirkt und dieses oxidiert. Mit den so oxidierten Cytochrom-Lösungen wurden nach ausreichender Inkubationszeit Oxidationsspektren aufgenommen. Der dritte Ansatz wurde mit Ascorbat reduziert und Reduktionsspektren aufgenommen. Die Oxidations- und Reduktionsspektren wurden überlagert aufgetragen (Abbildung 3.40) und die isosbestischen Wellenlängen aus den Spektrenüberschneidungen bestimmt.



**Abbildung 3.40: Isosbestische Wellenlängen für Cytochrom  $c_{1CF}WT$  und  $c_{552F}N23C$**

Die Reduktionsspektrum (durchgezogene Linie) und Oxidationsspektrum (unterbrochene Linie) für Cytochrom  $c_{1CF}WT$  (links) und  $c_{552F}N23C$  (rechts) sind übereinandergelegt und aus den Schnittpunkten die isosbestischen Wellenlängen bestimmt worden.

Des weiteren wurden über die aus den Redoxspektren ermittelten Cytochrom-Konzentrationen die Extinktionskoeffizienten der isosbestischen Wellenlängen bestimmt (Tabelle 3.16).

**Tabelle 3.16: Isosbestische Wellenlängen und ihre Extinktionskoeffizienten**

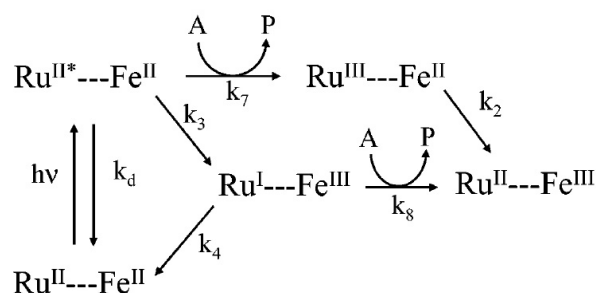
Bestimmung der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{iso}$  für die isosbestischen Wellenlängen  $\lambda_{iso}$  von Cytochrom  $c_{1CF}WT$  und Cytochrom  $c_{552F}N23C$  zur Berechnung der genauen Cytochrom-Konzentrationen.

Cytochrom $c_{1CF}WT$		Cytochrom $c_{552F}N23C$	
$\lambda_{iso}$ [nm]	$\epsilon_{iso}$ [ $mM^{-1}cm^{-1}$ ]	$\lambda_{iso}$ [nm]	$\epsilon_{iso}$ [ $mM^{-1}cm^{-1}$ ]
413	133,25	412	182,98
438	26,74	434	36,03
508	15,34	506	14,25
534	16,94	530	19,98
544	13,64	542	16,56
560	11,18	558	13,14

### 3.7.3 Mediatoren

Für die Durchführung der Laserflash-Experimente mussten zwei Bedingungen erfüllt werden: Die beiden Hämgruppen mussten während des Experiments reduziert gehalten werden und die Ruthenium-Verbindung musste nach der Anregung wieder regeneriert werden. Zu diesem Zweck wurde nach chemischen Mediatoren gesucht, die das System in einem optimalen Redoxzustand halten konnten. Zum besseren Verständnis werden im Folgenden die ET-Reaktionen und Nebenreaktionen des Laserflash-Systems kurz vorgestellt und anschließend die Suche und Auswahl der Mediatoren beschrieben.





**Abbildung 3.41: Schema der Elektronentransfer-Reaktionen und Nebenreaktionen des Ru<sub>2</sub>**

Ru<sub>2</sub> ist kovalent gekoppelt an c<sub>552F</sub>N23C (repräsentiert durch Fe für die Hämgruppe); k sind die Geschwindigkeitskonstanten und A/P Mediatoren zur Regeneration des Ru<sub>2</sub> (nach (Engstrom, Rajagukguk *et al.* 2003))

Wie in Abbildung 3.41 dargestellt, ist der Ausgangspunkt das reduzierte Fe<sup>II</sup> des c<sub>552F</sub> gekoppelt an Ru<sup>II</sup>, das bei Anregung durch einen Laserpuls in den *metal to ligand charge transfer*-Anregungszustand Ru<sup>II\*</sup> übergeht und in einer nachfolgenden Reaktion das Eisen zu Fe<sup>III</sup> oxidiert (Geschwindigkeitskonstante  $k_3$ ). Um die Rückreaktion des Ru<sup>I</sup> zu Ru<sup>II</sup> (Geschwindigkeitskonstante  $k_4$ ) zu verhindern und den Fe<sup>III</sup>-Zustand zu stabilisieren, wird dem System ein exogener Mediator beigelegt, der Ru<sup>I</sup> zu Ru<sup>II</sup> regeneriert und dadurch ebenfalls den Fe<sup>III</sup>-Zustand stabilisiert ( $k_7$ ,  $k_8$ ). Nachfolgend kann nun der ET von dem reduzierten Häm des Redoxpartners stattfinden und detektiert werden.

Es musste also nach Mediatoren gesucht werden, die die Hämgruppen zwischen den Laserpulsen in einem reduzierten Zustand halten und das Ruthenium nach der Anregung wieder regenerieren.

Als Häm-Reduktionsmittel wurde wie bei den Stopped-Flow-Experimenten Ascorbat (0,1 bis 1,1 mM;  $E_0' = 60$  mV) verwendet. Allerdings wurde als zweiter Mediator der Reaktion TMPD (2  $\mu$ M;  $E_0' = 27$  mV) zwischengeschaltet, um die Reaktion zu beschleunigen, so dass folgende Reaktionskette abläuft:

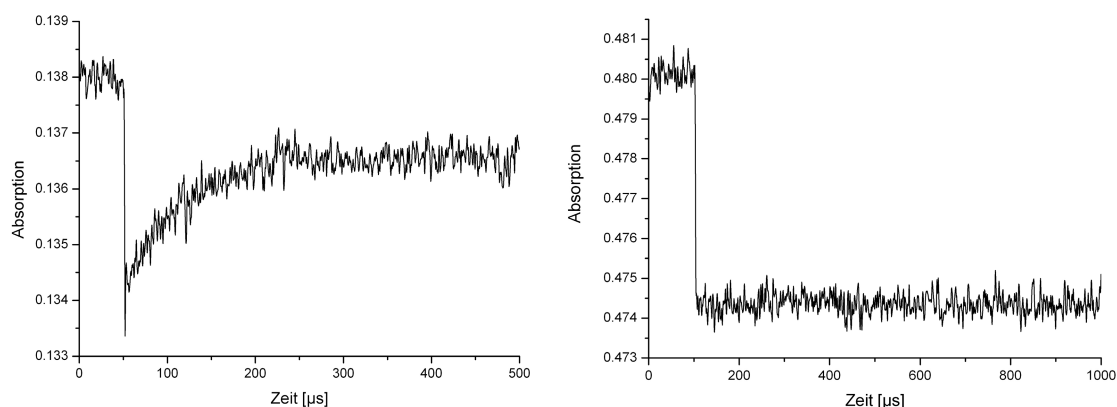


**Abbildung 3.42: Häm-Reduktion unter Verwendung von Ascorbat und TMPD als Mediatoren**

Es stellte sich als problematisch heraus, die Hämgruppen im Experiment bei niedrigen Ionenstärken vollständig reduziert zu halten, da viele c<sub>1CF</sub>-Mutanten ein gegenüber dem WT geringeres Redoxpotential aufweisen (Abschnitt 3.5). Des weiteren zeigte sich, dass das Redoxpotential stark von der Ionenstärke abhängig zu sein scheint, da sich viele der Mutanten erst bei Zugabe höherer Salzkonzentrationen vollständig reduzieren ließen.

Als erster Mediator zur Regeneration des Rutheniums wurde ein Osmium-Komplex [Os(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>(CH<sub>3</sub>CN)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) unter anaeroben Bedingungen verwendet. Die Oxidation von Ru<sup>I</sup> zu Ru<sup>II</sup> durch Osmium sollte schnell genug verlaufen, um kinetisch die

thermische Rückreaktion ( $k_4$  siehe Abbildung 3.41) zu verhindern. Zu erwarten war ein Zeitverlauf in Form einer Stufenfunktion, wobei in Abwesenheit von  $c_{1CF}$  durch Laser-Anregung ein initialer Abfall der Funktion vom Grundniveau (Anregung des  $Ru^{II}$  zu  $Ru^{II*}$  und anschließende Oxidation des  $c_{552F}$ ) beobachtet werden sollte, gefolgt von einem geraden Verlauf auf diesem neuen, niedrigen Niveau, der den neuen Endzustand nach Regeneration des Rutheniums  $Ru^{II}$ - $Fe^{III}$  widerspiegelt. Da kein  $c_{1CF}$  in der Küvette anwesend war und somit kein weiterer Elektronentransfer stattfinden konnte, sollte diese Grundlinie über die Zeit stabil verlaufen. Tatsächlich war ein initialer Abfall des Transienten vom Anfangsniveau zu beobachten. Dann allerdings erfolgte ein Ansteigen des Signals, das jedoch die Grundlinie nicht wieder erreichte (Abbildung 3.43, links).



**Abbildung 3.43: Laserflash-Transienten der Reaktion von  $c_{552F}$ -N23C- $Ru_z$  mit versch. Mediatoren**  
Laserflash-Transienten für die Reaktion von  $c_{552F}$ -N23C- $Ru_z$  mit dem Osmium-Komplex (links) und einem Cobalt-Komplex (rechts) als Mediator, aufgenommen bei 550 nm.

Der Anstieg des Signals konnte über eine partielle Reduktion des  $c_{552F}$ -Häms erklärt werden. Um herauszufinden, was diese partielle Re-Reduktion verursachte, wurde eine Titration mit dem Osmiumkomplex unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, bei der sich herausstellte, dass die Osmiumverbindung bei Konzentrationen zwischen 2-5 mM das Häm scheinbar teilweise reduziert. Zusätzlich schien diese Reaktion noch ionenstärkeabhängig zu sein (der Osmium-Komplex trägt in wässriger Lösung drei positive Ladungen), da sie mit zunehmender Salzkonzentration verlangsamt wurde. Somit kam der Osmium-Komplex als Mediator zur Regeneration des Rutheniums nicht in Frage.

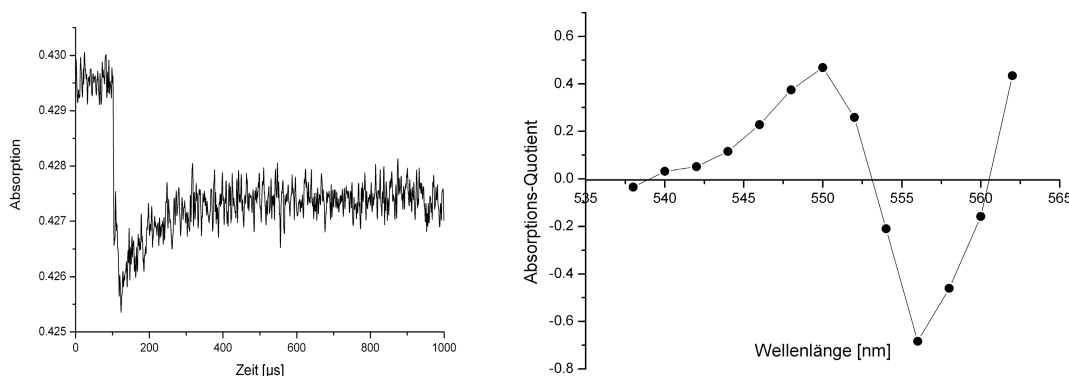
Als zweite Möglichkeit wurde unter aeroben Bedingungen ein Cobalt-Komplex  $[Co(NH_3)_5Cl]^{2+}$  getestet, der schon in früheren Laserflash-Experimenten zum Einsatz gekommen war (Sadoski, Engstrom *et al.* 2000). Die aufgenommenen Transienten bei 552 nm zeigten bei Abwesenheit des  $c_{1CF}$  die erwartete Stufenfunktion (Abbildung 3.43, rechts), so dass eine Probe einschließlich  $c_{1CF}$  als Redoxpartner hergestellt und die ET-Messungen gestartet wurden. Nach kurzer Flash-Dauer waren die aufgenommenen Transienten sehr verrauscht, mit kleiner Signalamplitude, und die Lösung in der Küvette zeigte eine Trübung, so dass auch auf die Verwendung des Cobalt-Komplexes als Mediator verzichtet werden musste, weil dieser nach längerer Inkubation bei RT und Laser-Anregung das Cytochrom  $c_{1CF}$  präzipitierte.

Als alternativer Mediator für die oxidative Regeneration des Rutheniums wurde Paraquat getestet, das mit einem Redoxpotential von  $E_0' = 0$  mV sowohl  $\text{Ru}^{\text{I}}$  zu  $\text{Ru}^{\text{II}}$  ( $E_0' = -79$  mV) als auch  $\text{Ru}^{\text{II}*}$  zu  $\text{Ru}^{\text{III}}$  ( $E_0' = -25$  mV) oxidieren kann. Unter aeroben Bedingungen wurde eine Titration mit Paraquat (1-10 mM) durchgeführt. Die aufgenommenen Transienten in Abwesenheit von  $c_{1\text{CF}}$  wiesen die erwartete Stufenfunktion auf und das System war nach Zugabe von  $c_{1\text{CF}}$  während des Flash-Experiments bei RT über einen langen Zeitraum stabil. Auf sehr langen Zeitskalen konnte eine artifizielle Nebenreaktion beobachtet werden ( $k = 100 \text{ s}^{-1}$ ), die aber aufgrund der langsamen Raten den ET zwischen  $c_{1\text{CF}}$  und  $c_{552\text{F}}$  nicht beeinflusste und damit vernachlässigbar war.

### 3.7.4 Detektionswellenlängen und kinetisches Differenzspektrum

Für die Detektion der ET-Reaktion wurden zwei Wellenlänge gesucht, mit denen man möglichst selektiv entweder die Oxidation von  $c_{1\text{CF}}$  oder die Reduktion von  $c_{552\text{F}}$  beobachten kann. Als Detektionswellenlängen wurden 550 nm und 558 nm ausgewählt. Die Detektion bei 558 nm zeigt ausschließlich die Oxidationsreaktion des Cytochrom  $c_{1\text{CF}}$ , da es sich bei dieser Wellenlänge um einen isosbestischen Punkt für  $c_{552\text{F}}$  handelt. Der Signal-Anstieg korreliert also direkt mit der  $c_{1\text{CF}}$ -Oxidation.

Die Detektion bei 550 nm (Abbildung 3.44) zeigt die  $c_{552\text{F}}$ -Oxidation (initialer Abfall des Signals) und Re-Reduktion durch den Elektronentransfer vom  $c_{1\text{CF}}$  (Ansteigen des Signals). Allerdings kehrt das Signal nicht mehr zum Ausgangsniveau zurück, da die Basislinie vor dem Flashen die Konzentrationen an vollständig reduziertem  $c_{552\text{F}}$  und  $c_{1\text{CF}}$  widerspiegelt. 550 nm ist kein isosbestischer Punkt für  $c_{1\text{CF}}$ . Die Anregung durch den Laserpuls führt zur Oxidation von  $c_{552\text{F}}$ , was den initialen Abfall des Signals bewirkt. Zur gleichen Zeit und mit der gleichen Geschwindigkeit, mit der das  $c_{552\text{F}}$  nun durch  $c_{1\text{CF}}$  reduziert wird und das Signal wieder ansteigt, wird die Menge an reduziertem  $c_{1\text{CF}}$  ebenfalls durch den ET verringert, so dass die Gesamtamplitude erniedrigt wird. Obwohl diese Wellenlänge kein isosbestischer Punkt für  $c_{1\text{CF}}$  ist, wurde sie gewählt, weil die resultierenden Transienten eine hohe Amplitude bei geringem Rauschen aufwiesen.



**Abbildung 3.44: Laserflash-Transient bei 550 nm und kinetische Differenzspektrum**

Laserflash-Transient (links) exemplarisch gezeigt für die Reaktion von  $c_{1\text{CF}}\text{WT}$  mit  $c_{552\text{F}}\text{N23C-Ru}_z$  aufgenommen bei 550 nm. Kinetisches Differenzspektrum (rechts) für das Redoxpaar  $c_{1\text{CF}}\text{WT}/c_{552\text{F}}\text{N23C}$ ; aufgetragen ist der Absorptionsquotient gegen die Wellenlänge (Erläuterungen siehe Text)

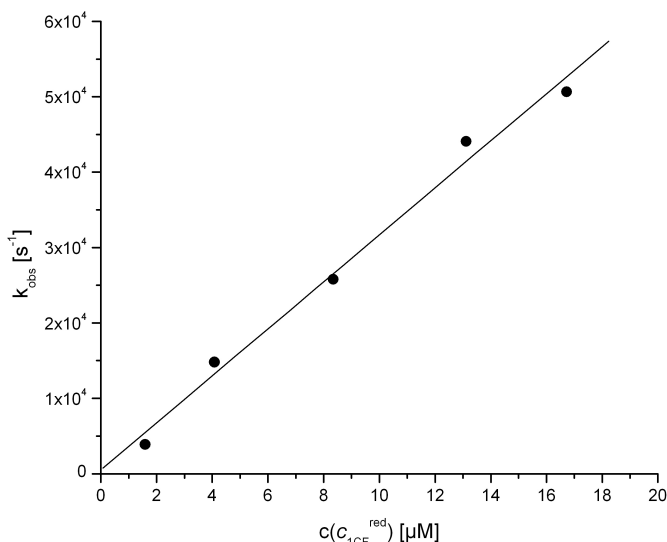
Um die Detektionswellenlängen zu verifizieren, wurde ein kinetisches Differenzspektrum aufgenommen. Hierfür wurden Transienten bei verschiedenen Wellenlängen (538-562 nm) detektiert und anschließend der Absorptionsquotient gegen die Wellenlänge aufgetragen. Unter dem Absorptionsquotienten versteht man das Verhältnis aus dem initialen Absorptionsanstieg oder -abfall bei einer gegebenen Wellenlänge zum initialen Signalabfall bei 550 nm (Referenz). Das kinetische Differenzspektrum für das Redoxpaar  $c_{1CF}WT/c_{552F}N23C$  ist auf der rechten Seite in Abbildung 3.44 dargestellt. Minimum und Maximum geben die Wellenlängen wieder, bei denen der Absorptionsquotient den größten Betrag aufweist und somit Transienten mit der größten Amplitude detektiert werden können. Als Maximum- und Minimumwellenlänge ergeben sich 550 und 556 nm. Während der Experimente wurde jedoch 558 nm statt 556 nm als Detektionswellenlänge gewählt, da diese ein isosbestischer Punkt für  $c_{552F}$  ist, sich somit selektiv nur die Oxidationsreaktion des  $c_{1CF}$  detektieren lässt und sich trotz der Abweichung vom Minimum des Differenzspektrums Transienten mit großer Amplitude und geringem Rauschen ergaben.

### 3.7.5 Standard-Flashprotokoll und Auswertung

Für die Etablierung eines Flashprotokolls war es zum einen wichtig, gleiche experimentelle Bedingungen für die Messung der Ionenstärken für alle Mutanten zu gewährleisten, um den experimentellen Fehler zu minimieren, und zum anderen ähnliche Bedingungen (Puffer, Salzkonzentrationen, pH-Wert) wie in den Stopped-Flow-Experimenten zu wählen, um die Ergebnisse beider Methoden direkt vergleichen zu können. Die Laserflash-Experimente wurden bei RT durchgeführt. Die Anregung erfolgte durch einen Laserpuls von 480 nm und 0,5  $\mu$ s Dauer. Es wurde ein Detektionssystem verwendet, das schon früher durch (Heacock, Liu *et al.* 1993) etabliert und beschrieben worden war. Die Detektion erfolgte jeweils bei 550 nm und 558 nm auf verschiedenen Zeitskalen, um sicherzugehen, dass der Elektronentransfer vollständig detektiert wurde, wobei jeweils 10 Transienten zu einem Durchschnitt gemittelt wurden. Vor jeder Erhöhung der Cytochrom- oder Salzkonzentration wurden der Probe 100  $\mu$ M Ascorbat hinzugefügt, um zu gewährleisten, dass die Hämgruppen in einem reduzierten Zustand gehalten werden. Vor und nach jeder Flash-Serie wurden Absorptionsspektren aufgenommen, aus denen sich später die akkuraten Cytochromkonzentrationen und der jeweilige Redoxzustand ermitteln ließen. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: In einer Halbmikro-Glasküvette wurden 300  $\mu$ l Puffer (10 mM Tris, pH 8) vorgelegt und auf eine Endkonzentration von ca. 5  $\mu$ M  $c_{552F}$ -Ru<sub>z</sub> gebracht. Es folgte die Zugabe von 1  $\mu$ l 30 mM Ascorbat-Stammlösung (100  $\mu$ M Endkonzentration), 0,43  $\mu$ l 1,4 mM TMPD-Stammlösung (2  $\mu$ M Endkonzentration) und 3  $\mu$ l 0,1 M Paraquat-Stammlösung (1 mM Endkonzentration). Nach jeder Zugabe einer Substanz wurden Absorptionsspektren aufgenommen. Dann wurde die Probe auf ca. 5  $\mu$ M  $c_{1CF}$  gebracht und spektroskopisch der Redoxzustand überprüft (*before flash*-Spektrum). Es folgte die erste Anregungsserie und anschließend die Aufnahme des *after flash*-Spektrums. Dann wurde die  $c_{1CF}$ -Konzentration auf 10  $\mu$ M erhöht, mit weiteren 100  $\mu$ M Ascorbat reduziert, mittels Absorptionsspektrum die Häm-Reduktion überprüft und erneut angeregt. Es stellte sich heraus, dass weder der WT noch die

Mutanten bei Bedingungen ohne Salz (also nur 10 mM Tris, pH 8) vollständig reduziert vorlagen und auch durch Titrationsversuche mit Ascorbat nicht vollständig zu reduzieren waren. Erst bei Zugabe von KCl stellte sich die vollständige Reduktion ein.

Die zweistufige Erhöhung der  $c_{1CF}$ -Konzentration diente der Kontrolle, ob es sich unter den gegebenen Bedingungen um eine bimolekulare Reaktion handelte, da Geschwindigkeiten einer bimolekulare Reaktion linear von der Konzentration der Redoxpartner abhängen. Eine Verdopplung der  $c_{1CF}$ -Konzentration sollte unter bimolekularen Bedingungen eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirken. Im Fall eines stabilen ET-Komplexes bei niedrigen Ionenstärken sollte eine weitere Erhöhung der  $c_{1CF}$ -Konzentration keine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirken. Es zeigte sich, dass bei einer Titration von 1,6  $\mu\text{M}$  bis 16,7  $\mu\text{M}$   $c_{1CF}$  bei konstanter  $c_{552F}$ -Konzentration ( $\sim 5 \mu\text{M}$ ) in Abwesenheit von KCl kein stabiler ET-Komplex zwischen  $c_{1CF}^{\text{WT}}$  und  $c_{552F}$ -Ru ausgebildet wurde und jede Erhöhung der  $c_{1CF}$ -Konzentration linear zu einer Erhöhung der ET-Geschwindigkeit führte (Abbildung 3.45):



**Abbildung 3.45: Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit**  
Lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit der ET-Reaktion von der effektiven  $c_{1CF}$ -Konzentration

Eine lineare Regression der Daten ergibt eine Geradengleichung:  $k_{\text{obs}} = 3117 \cdot c(c_{1CF}^{\text{red}}) + 518$ , wobei  $c(c_{1CF}^{\text{red}})$  die Konzentration an effektiv reduziertem  $c_{1CF}$  in der Küvette ist. Bei Bedingungen ohne Salz wird kein stabiler ET-Komplex gebildet und die ET-Reaktion ist bimolekularer Natur.

Die Transienten wurden mit einer monoexponentiellen Funktion angepasst, um  $k_{\text{obs}}$  zu erhalten. Alle Volumenänderungen während des Experiments mussten berücksichtigt werden, um sowohl die akkuraten Cytochrom- und Salzkonzentrationen als auch die Ionenstärke berechnen zu können. Des Weiteren musste für jede Anregungsbedingung der genaue Redoxzustand des  $c_{1CF}$  berechnet und daraus die Konzentration an effektiv reduziertem  $c_{1CF}$  ermittelt werden. Hierfür wurden von den Gesamtabsorptionsspektren die Spektren, die nur das  $c_{552F}$  und die Mediatoren enthielten, abgezogen, um das reine Cytochrom  $c_{1CF}$ -Spektrum zu erhalten. Dann wurde ein vollständig oxidiertes und ein

vollständig reduziertes  $c_{1CF}$ -Spektrum normiert und mit dem gemessenen  $c_{1CF}$ -Spektrum verglichen, um den genauen Redoxzustand zu ermitteln. Für alle Spektren wurde ein Nullabgleich bei 650 nm vorgenommen und sie dann über die Absorption bei 544 nm (isosbestischer Punkt für  $c_{1CF}$ ) normiert. Der Redoxzustand wurde über den  $\alpha$ -Peak bei 553 nm ermittelt. Diese Wellenlängen (650, 553, 544 nm) wurden gewählt, da sie dicht beieinander liegen und den Fehler, der bei der Normierung durch eine Basislinienverschiebung auftreten könnte, minimieren. Der Redoxzustand (in %) wurde dazu genutzt, um die effektive Konzentration an reduziertem  $c_{1CF}$  zu berechnen und mit dieser die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{on}$  über folgende Formel zu ermitteln:

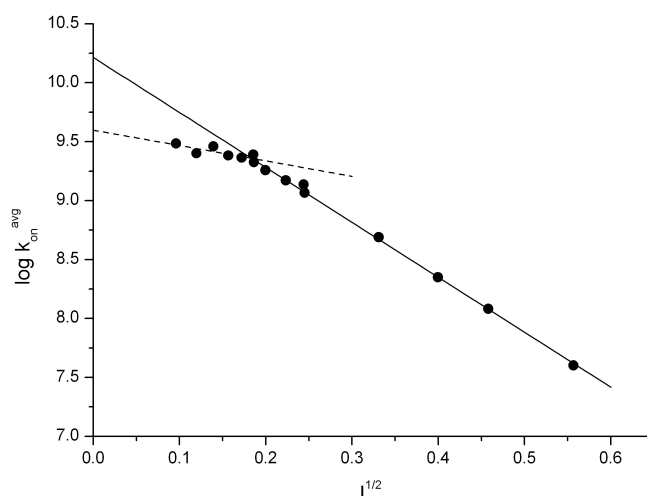
$$k_{on} = \frac{k_{obs}}{c(c_{1CF}^{red})} \quad (3.19)$$

Sowohl  $k_{obs}$  als auch  $k_{on}$  wurden anschließend separat nach Detektionswellenlängen (550 und 558 nm) nach dem Brønsted-Gesetz (Gleichung (3.9)) aufgetragen, ausgewertet und die Ergebnisse verglichen. Des Weiteren wurden jeweils für die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  und  $k_{on}$  für 550 nm und 558 nm Mittelwerte (*avg*) gebildet und  $k_{obs}^{avg}$  und  $k_{on}^{avg}$  nach dem Brønsted-Gesetz unabhängig zu den vorherigen Brønsted-Auftragungen analysiert. Für den Vergleich der Mutanten untereinander und zum WT wurden die *avg*-Auswertungen verwendet.

### 3.7.6 Ionenstärkeabhängigkeiten

#### 3.7.6.1 Ionenstärkeabhängigkeit der $c_{1CF}$ -WT-Reaktion

Auffallend bei den ersten Ionenstärkemessungen des WT und deren Auswertung war, dass die ersten beiden Geschwindigkeitskonstanten bei Bedingungen niedriger Ionenstärke (kein Salz und 25 mM KCl) nicht in die lineare Brønsted-Anpassung zu passen schienen und anfangs aus der Brønsted-Analyse ausgeschlossen wurden. Dann wurde das WT-Experiment wiederholt und im Bereich niedriger Salzkonzentrationen in kleineren Zwischenschritten gemessen (von 0 bis 50 mM KCl in 5 mM-Abständen, danach in 50 bis 100 mM-Abständen). Die Brønsted-Analyse für den WT ist in Abbildung 3.46 gezeigt:



**Abbildung 3.46: Ionenstärkeabhängigkeit des  $c_{1CFWT}/c_{552FN23C}$ - $Ru_z$  Elektronentransfers**  
Daten für die Brønsted-Analyse wurden aus den Laserflash-Experimenten erhalten

Die Brønsted-Analyse der WT-Reaktion zeigt zwei unterschiedliche Phasen. Eine schnelle Phase geringer Ionenstärkeabhängigkeit ( $I = 10$  bis  $35$  mM), mit  $k_{obs}$ -Werten von  $10200$  bis  $20200$   $s^{-1}$  und  $k_{on}$ -Werten von  $1,6$  bis  $3,7 \cdot 10^9$   $M^{-1}s^{-1}$ , und eine langsamere Phase stärkerer Ionenstärkeabhängigkeit ( $I > 35$  mM) mit  $k_{obs}$ -Werten von  $300$  bis  $31520$   $s^{-1}$  und  $k_{on}$ -Werten von  $3,6 \cdot 10^7$  bis  $3,2 \cdot 10^9$   $M^{-1}s^{-1}$ . Die Brønsted-Parameter der beiden Phasen sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 3.17: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von  $c_{1CFWT}/c_{552FN23C}$**

Die Bestimmung der Brønsted-Parameter erfolgte getrennt nach den kinetischen Phasen bei niedriger ( $< 35$  mM) und höheren Ionenstärken ( $> 35$  mM)

Parameter	Phase 1	Phase 2
Ionenstärke $I$	9-35 mM	35-360 mM
$k_0$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$3,96 \cdot 10^9$	$1,64 \cdot 10^{10}$
$z_A z_B$	-1,30	-4,85
effektive Ladungen	1,14	2,20

Für beide Phasen ergeben sich aus der Brønsted-Analyse negative Steigungen ( $z_A z_B$ ), woraus sich Wechselwirkungen von Ladungen gegensätzlichen Vorzeichens ableiten lassen. Für die erste Phase bei niedrigen Ionenstärken ergibt sich eine wesentlich schwächere Ionenstärkeabhängigkeit mit 1,14 effektiv wechselwirkenden Ladungen pro Proteinmolekül. Für die zweite Phase bei höheren Ionenstärken ergibt sich eine stärkere Ionenstärkeabhängigkeit mit 2,16 effektiven Ladungen, woraus ein Unterschied von einer Nettoladung zwischen den beiden Phasen resultiert. Auch die extrapolierte bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_0$  zeigt einen großen Unterschied im direkten Vergleich der beiden Phasen von fast einer Größenordnung. Fraglich ist jedoch, ob der  $k_0$ -Wert für den Vergleich überhaupt herangezogen werden sollte, da er offensichtlich stark von den tatsächlich gemessenen Geschwindigkeitskonstanten abzuweichen scheint. Die zwei unterschiedlichen Phasen deuten auf ein unterschiedliches Ionenstärkeverhalten bei niedrigen verglichen zu hohen Ionenstärken hin. Ein Deutungsversuch wäre ein elektrostatisch gebildeter Prä-Komplex bei niedrigen Ionenstärken, der über einen gewissen Ionenstärkebereich stabil ist und hohe ET-Raten

aufweist (siehe Diskussion). Bei höheren Ionenstärken löst sich dieser Komplex auf und die Reaktion erhält ihren bimolekularen Charakter.

### 3.7.6.2 Ionenstärkeabhängigkeit der Interaktionsmutanten

Die Brønsted-Analyse der Mutanten zeigte ein ähnliches Ionenstärkeverhalten wie der WT mit zwei unterschiedlichen Phasen bei niedriger und hoher Ionenstärke. Allerdings wurde der Bereich  $I = 0\text{--}35$  mM nicht weiter aufgelöst, da lediglich Messungen bei  $I = 10$  mM (Puffer ohne Salzzugabe) und bei  $I = 60$  mM (Puffer mit 50 mM KCl) durchgeführt worden waren. Die ersten zwei Datenpunkte wurden deswegen aus der Datenanpassung mit dem Brønsted-Gesetz (Gleichung (3.9)) ausgeschlossen. Des Weiteren wurde auf einen direkten Vergleich der  $k_0$ -Werte verzichtet, da dieser Wert, der aus der Brønsted-Analyse der zweiten, langsamen Phase bei höheren Ionenstärken gewonnen wurde, nicht dem Verlauf der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten bei niedrigen Ionenstärken entspricht. Stattdessen wurden die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten bei  $I = 10$  mM,  $I = 60$  mM und  $I = 310$  mM verglichen und direkt zum WT in Beziehung gesetzt (dessen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  bei der jeweiligen Ionenstärke gleich 100 % gesetzt wurden). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Werte bei  $I = 10$  mM vom linearen Brønsted-Verhalten abweichen. Der zweite Brønsted-Parameter, das Ionenprodukt  $z_{AZB}$ , wurde weiterhin als Vergleichsparameter beibehalten. Die Ergebnisse der Brønsted-Analyse sind in Tabelle 3.18 dargestellt und werden im Folgenden für jede Mutante im Vergleich zum WT vorgestellt.

**Tabelle 3.18: Kinetische Parameter der Ionenstärkeabhängigkeit des ET der Interaktionsmutanten**  
Vergleich des Ionenproduktes  $z_{AZB}$  und der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Ionenstärken der  $c_{1CF}$ -Mutanten mit dem WT

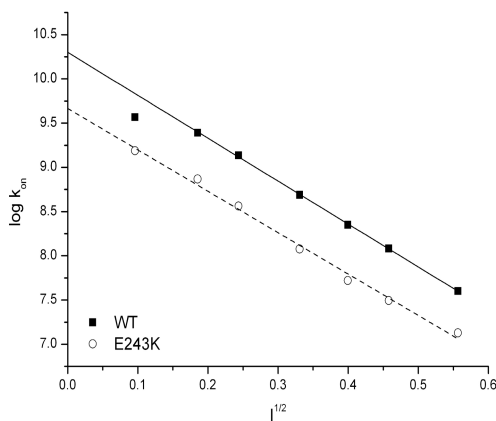
Cytochrom $c_{1CF}$	% der WT-Aktivität bei			$z_{AZB}$	effektive Ladungen
	$I = 10$ mM	$I = 60$ mM	$I = 310$ mM		
WT	100	100	100	-4,85	2,20
E243K	42	31	34	-4,95	2,22
V244Q	27	47	85	-4,03	2,00
V244T	50	62	126	-3,78	1,94
A247N	63	66	60	-4,97	2,23
A314S	84	75	78	-4,61	2,15
K315E	92	49	17	-5,54	2,35
K315T	88	90	86	-4,82	2,20
G319A	50	84	90	-4,60	2,14
S378A	81	83	78	-4,74	2,18
Q381V	66	88	93	-4,57	2,14
Q271C	61	72	56	-4,95	2,23
E304C	57	62	68	-4,83	2,20
A356A	62	91	93	-4,68	2,16
T383C	55	62	57	-4,71	2,17

#### E243K

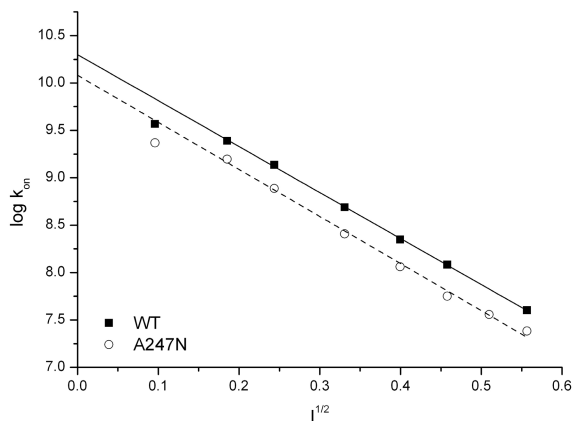
Die Brønsted-Analyse ergibt ein ähnliches Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -4.95 und damit eine ähnliche Anzahl effektiver Ladungen von 2,22 wie der WT mit 2,20. Insgesamt zeigt sich eine sehr ähnliche Ionenstärkeabhängigkeit, wobei die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante generell auf 31-34 % der WT-Aktivität reduziert ist



(Abbildung 3.47). Eine Ladungsumkehr von negativ zu positiv in dieser Position zeigt widererwartend keine Änderung der Ionenstärkeabhängigkeit. Die geringe Erhöhung des Raumbedarfes durch die Einführung eines Lysins scheint einen sterisch hindernden Einfluss bei der ET-Reaktion zu haben und so die Geschwindigkeit des ET generell zu reduzieren.



**Abbildung 3.47: Brønsted-Analyse E243K**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von E243K im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)



**Abbildung 3.48: Brønsted-Analyse A247N**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von A247N im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

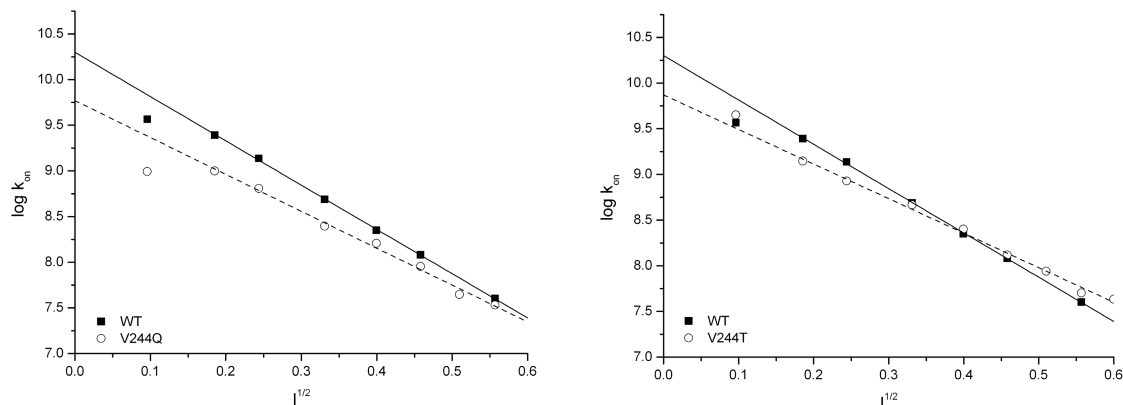
### A247N

Die A247N-Reaktion zeigt eine sehr ähnliche Ionenstärkeabhängigkeit wie der WT ( $z_{AZB} = -4,97$  und damit 2,23 effektive Ladungen), wohingegen die Geschwindigkeitskonstanten generell auf 66-64 % der WT-Aktivität verringert sind (Abbildung 3.48). Der Austausch des unpolaren Alanins gegen ein polares und etwas voluminöseres Asparagin ändert scheinbar nichts an der Ionenstärkeabhängigkeit, verlangsamt aber die Gesamtreaktion auf ca. 65 %. Position 247 scheint demnach optimiert für eine enge, unpolare Wechselwirkung zum  $c_{552F}$ , wobei die Einführung der Amidgruppe auch hier wieder das Wasserstoffbrücken-Netzwerk beeinflussen könnte.

### V244Q und V244T

Die Brønsted-Analyse der Reaktion von V244Q zeigt eine generell verlangsamte Reaktion im Vergleich zum WT. Die Geschwindigkeitskonstanten sind bei niedrigen Ionenstärken auf 27 % und bei hohen Ionenstärken auf 85 % der WT-Aktivität verringert. Dies spiegelt sich auch in der Steigung des Graphen und damit im Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -4,03 wider, wodurch sich eine Beteiligung von zwei effektiven Ladungen pro Redoxpartner ergeben. Damit ist der Anteil an effektiven Ladungen gegenüber dem WT etwas geringer. Da bei dieser Mutante keine Ladung eingeführt oder eliminiert wurde, die Geschwindigkeitskonstanten und die Ionenstärkeabhängigkeit aber verringert sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Einführung eines Glutamins mit zusätzlich potentiellen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren eine Veränderung des H-Brückennetzwerkes und damit eine Verschiebung der Interaktionsfläche zur Folge haben könnte.

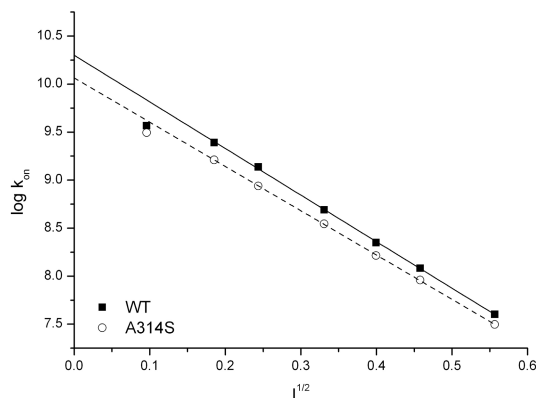
V244T weist eine flachere Steigung als der WT auf, mit einem Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -3,78 und einer sich daraus ergebenden Beteiligung von weniger als 2 effektiven Ladungen. Die Geschwindigkeitskonstanten sind gegenüber denen des WT bei niedrigen Ionenstärken um etwa 50 % verringert, wohingegen sie bei hohen Ionenstärken auf 126 % ansteigen. Die Einführung eines polaren Restes anstelle des unpolaren Valins beeinflusst auch hier die Ionenstärkeabhängigkeit, obwohl keine Ladung verändert wurde, so dass hier ebenfalls als Schlussfolgerung eine verschobenen Interaktionsfläche nahe liegt.



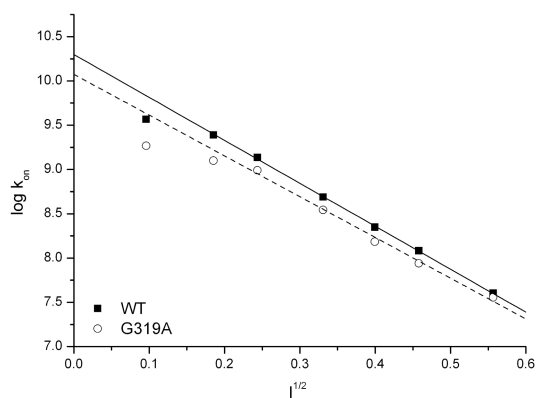
**Abbildung 3.49: Brønsted-Analyse V244Q und V244T**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von V244Q (links) und V244T (rechts) im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

### A314S

Die Brønsted-Analyse des ET von A314S zeigt ein der WT-Reaktion sehr ähnliches Ionenstärkeverhalten mit einem Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -4,61 und dementsprechend 2,15 effektiven Ladungen (Abbildung 3.50). Die Reaktion ist generell auf 74-78 % WT-Aktivität reduziert, so dass die Erhöhung der Polarität durch Einführung der OH-Gruppe in dieser Position keinen Effekt auf die Ionenstärkeabhängigkeit und nur einen geringen Effekt auf die Geschwindigkeit der Reaktion ausübt.



**Abbildung 3.50: Brønsted-Analyse A314S**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von A314S im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)



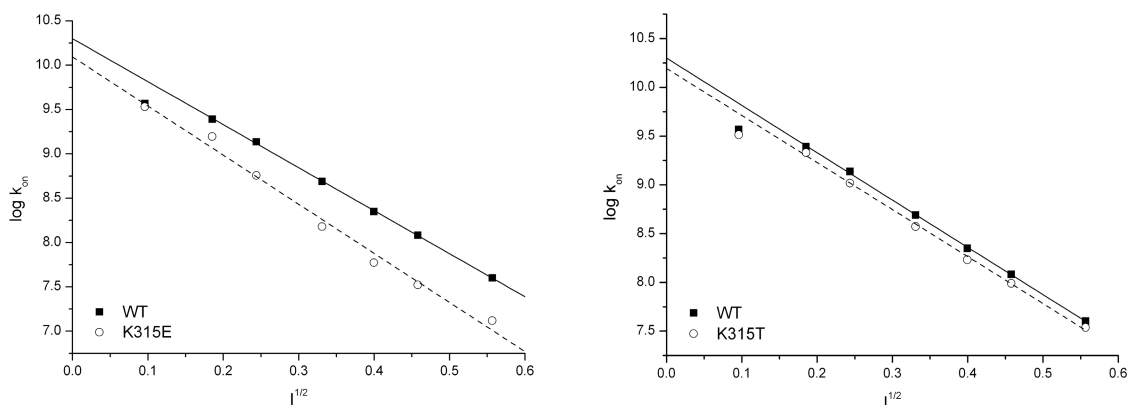
**Abbildung 3.51: Brønsted-Analyse G319A**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von G319A im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

### G319A

Die Brønsted-Analyse zeigt eine sehr ähnliche Ionenstärkeabhängigkeit mit 2,15 effektiven Ladungen pro Cytochrom, die sich aus dem Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -4,60 ergeben (Abbildung 3.51). Die Reaktion ist geringfügig auf 84-90 % der WT-Aktivität reduziert, was insgesamt unter Berücksichtigung der Ionenstärkeabhängigkeit dem WT-Verhalten entspricht.

### K315E und K315T

K315E weist in der Brønsted-Analyse eine stärkere Ionenstärkeabhängigkeit als der WT auf. Die Steigung ergibt ein Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -5,54, was rechnerisch 2,49 effektiven Ladungen entspricht. Des weiteren ist die Reaktion auf 49 % (bei 50 mM KCl) bis 17 % (bei 300 mM KCl) der WT-Aktivität reduziert. Die Analyse der K315T-Reaktion weist die gleiche Ionenstärkeabhängigkeit ( $z_A z_B = -4,85$  und 2,20 effektive Ladungen) und sehr ähnliche Geschwindigkeitskonstanten (Reduktion auf 90-86 %) wie der WT auf. Der Austausch einer positiven Ladung in Position 315 gegen einen polaren Rest bei gleichzeitiger Verringerung des Raumbedarfes zeigt hier keinen kinetischen Effekt. Sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ionenstärkeverhalten entsprechen der WT-Reaktion. Wird die positive Ladung allerdings gegen eine negative ausgetauscht, die die Reaktion zum positiv geladenen  $c_{552F}$  beschleunigen sollte, tritt eine Verlangsamung der Reaktion um 50 % bei mittleren Ionenstärken (50 mM) bis hin zu 80 % bei hohen Ionenstärken auf. Die Ionenstärkeabhängigkeit ist somit stärker ausgeprägt als bei der WT-Reaktion.

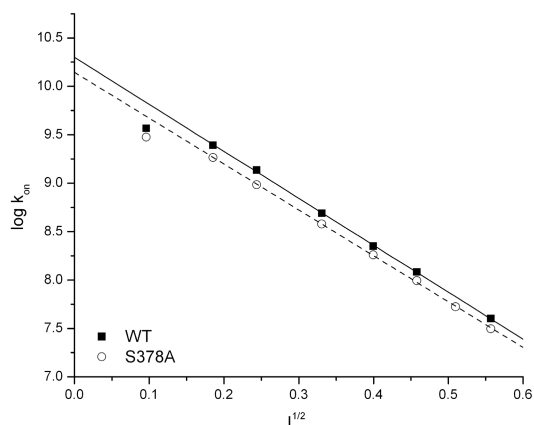


**Abbildung 3.52: Brønsted-Analyse K315E und K315T**

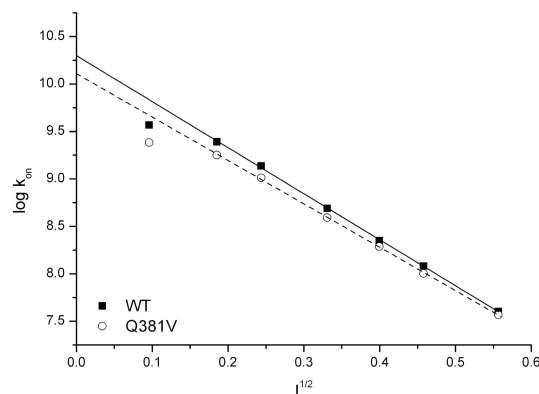
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von K315E (links) und K315T (rechts) im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

### S378A

Der Austausch des polaren Serins gegen ein unpolares Alanin bei ähnlichem Raumbedarf bewirkt eine leichte Verringerung der Gesamtreaktionsgeschwindigkeit auf 83-78 % der WT-Aktivität bei kaum veränderter Ionenstärkeabhängigkeit ( $z_A z_B = -4,74$  und dementsprechend 2,18 effektive Ladungen). S378 scheint daher keine so wichtige Rolle bei der Interaktion zum  $c_{552F}$  zu spielen wie das F230 in Hefe, das die Kation- $\pi$ -Interaktion zum CYC vermittelt.



**Abbildung 3.53: Brønsted-Analyse S378A**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von S378A im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)



**Abbildung 3.54: Brønsted-Analyse Q381V**  
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von Q381V im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

### Q381V

Die Brønsted-Analyse der Q381V-Reaktion weist insgesamt WT-Verhalten auf. Die Gesamtreaktion ist leicht auf 88-93 % der WT-Aktivität reduziert und die Ionenstärkeabhängigkeit mit  $z_{AZB} = -4,57$  und 2,14 effektiven Ladungen geringfügig schwächer ausgeprägt. Position 381 scheint keine direkte Beteiligung an der Wechselwirkung zum  $c_{552F}$  zu haben.

### 3.7.7 Ionenstärkeabhängigkeit der Cysteinmutanten

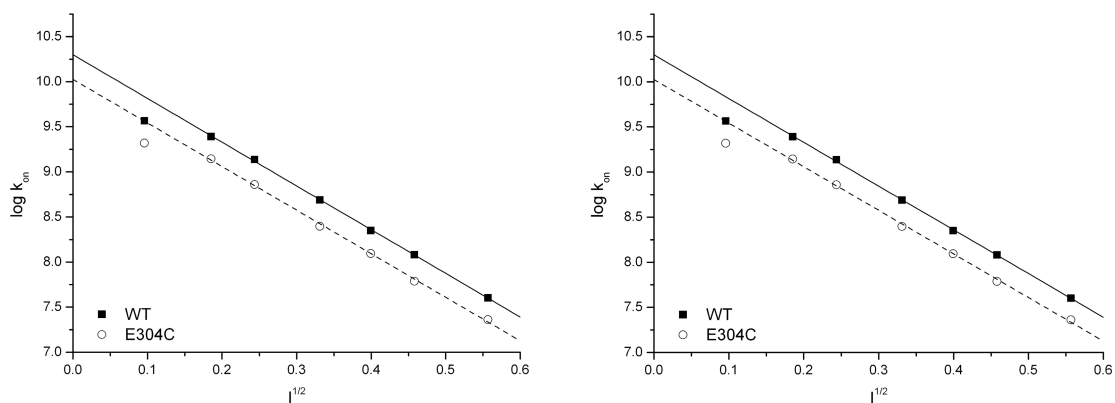
Die Cytochrom  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten Q271C, E304C, A356C und T383C (siehe Abschnitt 3.3) wurden ebenfalls per Laserflash-Spektroskopie auf ihr Ionenstärkeverhalten untersucht

#### Q271C

Die Brønsted-Analyse der Reaktion von Q271C zeigt eine allgemeine Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit auf 72-56 % der WT-Aktivität, wobei die Ionenstärkeabhängigkeit mit  $z_{AZB} = -4,95$  und resultierenden 2,23 effektiven Ladungen ähnlich der des WT ist. Eine Verringerung der Polarität und der Möglichkeit Wasserstoffbrücken ausbilden zu können scheint einen verlangsamen Effekt auf die Gesamtreaktion zu haben, obwohl der Rest in der Häm-Peripherie lokalisiert ist.

#### E304C

Ein ähnlicher Effekt ergibt sich bei der Brønsted-Analyse der Cysteinmutante E304C, die eine zur WT-Reaktion identische Ionenstärkeabhängigkeit ( $z_{AZB} = -4,85$  und 2,20 effektive Ladungen) aufweist, deren Reaktion insgesamt aber auf 62-68 % der WT-Aktivität reduziert ist. Die Eliminierung der negativen Ladung beeinflusst das Ionenstärkeverhalten nicht, da dieser Rest ebenfalls in der Häm-Peripherie lokalisiert ist. Allerdings verlangsamt sich die Gesamtreaktion um ca. 35 %.



**Abbildung 3.55: Brønsted-Analyse Q271C und E304C**

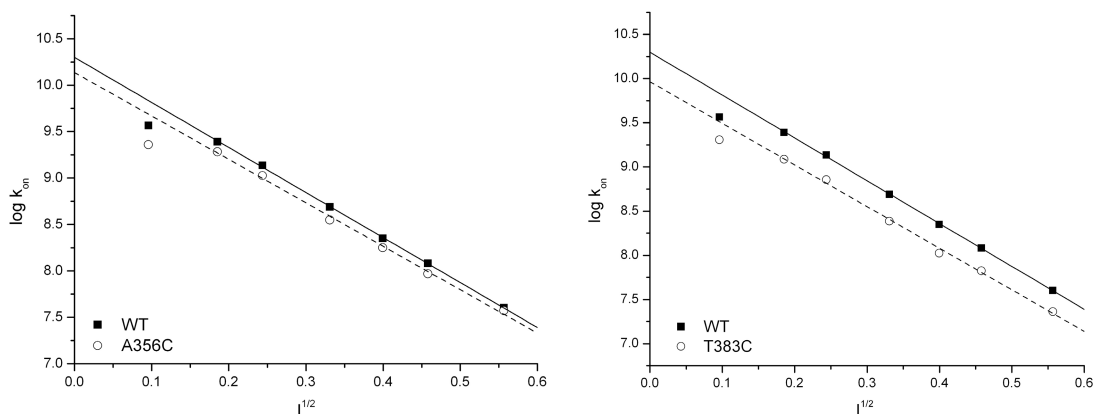
Ionenstärkeabhängigkeit des ET von Q271C (links) und E304C (rechts) im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

### A356C

A356C zeigt in der Analyse nach Brønsted WT-Verhalten. Die Gesamtreaktion weist 91-93 % der WT-Aktivität auf und die Ionenstärkeabhängigkeit ist der des WT mit  $z_{AZ_B} = -4,68$  und 2,16 effektiven Ladungen sehr ähnlich.

### T383C

Während die Gesamtreaktion der Cysteinmutante T383C auf 62-57 % der WT-Aktivität reduziert ist, ist die Ionenstärkeabhängigkeit nahezu identisch ( $z_{AZ_B} = -4,71$  und 2,17 effektive Ladungen) mit der des WT.



**Abbildung 3.56: Brønsted-Analyse A356C und T383C**

Ionenstärkeabhängigkeit des ET von A356C (links) und T383C (rechts) im Vergleich zur WT-Reaktion (Laserflash-Daten)

### 3.7.8 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit von Geschwindigkeitskonstanten lässt sich durch die Arrhenius-Gleichung (Gleichung (3.21)) beschreiben:

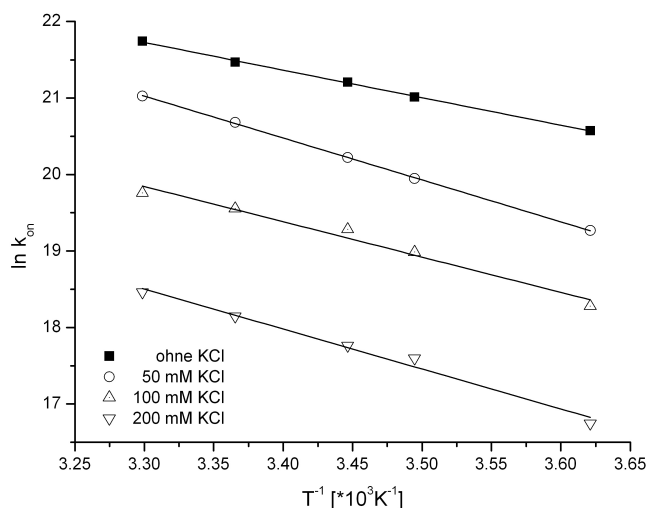
$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (3.20)$$

wobei  $k$  die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante,  $A$  der präexponentielle Faktor,  $E_A$  die Aktivierungsenergie,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die Temperatur in Kelvin ist.  $E_A$  ist die Energie, die die Reaktanten besitzen müssen, damit sie miteinander reagieren und Produkte bilden können. Der präexponentielle Faktor gibt die Anzahl der Stöße zwischen den Teilchen an, die überhaupt stattfinden, während der exponentielle Faktor  $e^{-E_A/RT}$  den Bruchteil aller Stöße angibt, die mit einer Aktivierungsenergie  $E_A$  zu einer Reaktion führen. Die Umformung in die logarithmische Schreibweise ergibt:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT} \quad (3.21)$$

und Auftragung von  $\ln k$  gegen  $T^{-1}$  im Arrhenius-Diagramm eine Gerade mit einer Steigung  $-E_A/R$ , aus der sich die Aktivierungsenergie berechnen lässt.

Die Temperaturabhängigkeit für die  $c_{1CF}WT$ -Reaktion wurde in einem Bereich von 3-30 °C und für verschiedene Ionenstärken bestimmt, um die Laserflash-Ergebnisse (Messungen bei ca. 22 °C) mit den Stopped-Flow-Ergebnissen (Messungen bei 10 °C) vergleichen zu können (siehe Diskussion 4.2.8). Die Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene Salzkonzentrationen ist in Abbildung 3.57 dargestellt.



**Abbildung 3.57: Arrhenius-Diagramm der Cytochrom  $c_{1CF}WT/c_{552F}N_{23}C-Ru_2$  ET-Reaktion**  
Bestimmung der Temperaturabhängigkeit in einem Temperaturbereich von 3 bis 30 °C und verschiedenen KCl-Konzentrationen (ohne KCl, 50 mM, 100 mM und 200 mM KCl)

In dem angegebenen Temperaturbereich und unter den gegebenen Salzbedingungen zeigen alle Reaktionen einen linearen Verlauf mit ähnlichen Steigungen. Wie erwartet

nimmt mit zunehmender Temperatur die Geschwindigkeit der Reaktion zu. Die Arrhenius-Parameter berechnen sich zu:

**Tabelle 3.19: Arrhenius-Parameter der  $c_{1CF}WT/c_{552F}N23C-Ru_z$  ET-Reaktion**

Angegeben sind der präexponentielle Faktor  $A$  und die Aktivierungsenergie  $E_A$  für die Reaktionen des Cytochrom  $c_{1CF}WT$  mit  $c_{552F}N23C-Ru_z$  in einem Temperaturbereich von 3 bis 30 °C und verschiedenen KCl-Konzentrationen

KCl-Konzentration	$A$ [ $\text{Mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$E_A$ [ $\text{kJ}\cdot\text{Mol}^{-1}$ ]
ohne KCl	$3,94\cdot 10^{14}$	29,9
50 mM	$9,86\cdot 10^{16}$	45,6
100 mM	$1,66\cdot 10^{15}$	38,3
200 mM	$3,36\cdot 10^{15}$	43,5

Mit Ausnahme der Reaktion bei 50 mM KCl kann man sehen, dass generell der präexponentielle Faktor  $A$  und damit die Anzahl der stattfindenden Stöße mit steigender Temperatur zunimmt. Die Werte für die Aktivierungsenergie schwanken zwischen 30 und 47  $\text{kJ}^{-1}\text{Mol}^{-1}$  und liegen damit in einem Bereich, der für diffusionskontrollierte Reaktionen typisch ist (Gutfreund 1998).

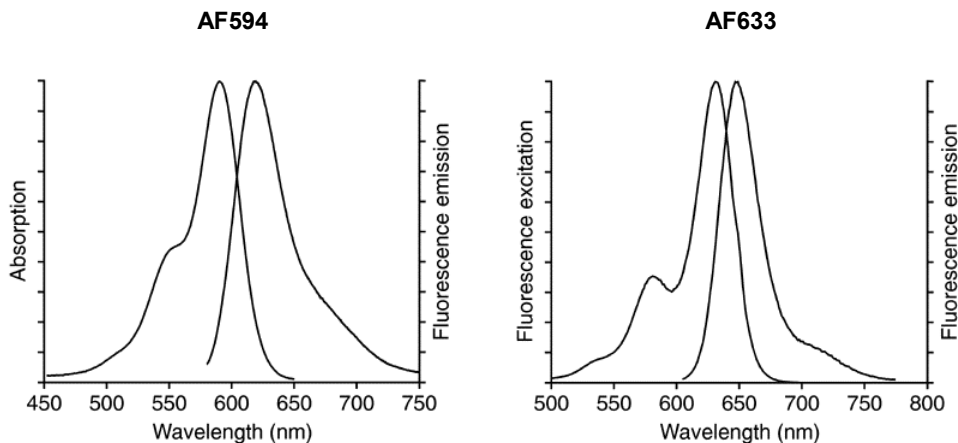
### 3.8 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer

Eine weitere Frage, die im Rahmen dieser Doktorarbeit geklärt werden sollte, war die Frage, wie der ET-Komplex von Cytochrom  $c_{1CF}$  mit  $c_{552F}$  aussieht. Da es bislang weder Röntgen- bzw. NMR-Strukturen des *P. denitrificans* Cytochrom  $c_1$  noch des ET-Komplexes mit Cytochrom  $c_{552}$  oder deren löslicher Fragmente gibt, sollte diese Fragestellung mit Hilfe des Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) untersucht werden. Die Idee hierbei war, über gerichtete Mutagenese Cysteinreste an der Oberfläche beider löslicher Fragmente einzuführen, über dessen freie SH-Gruppen dann kovalent Fluoreszenzmarker gebunden werden können. Kommen zwei Fluorophore bei der Bildung des ET-Komplexes in räumliche Nähe, kann der Energietransfer stattfinden und aus der Effizienz der Energieübertragung Abstandsinformationen gewonnen werden.

#### 3.8.1 Auswahl und Charakterisierung der Fluorophore

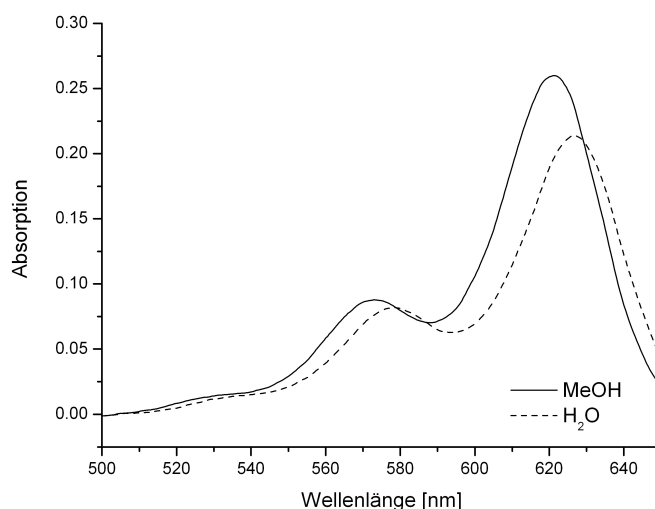
Zur Anwendung der FRET-Messungen wurden zwei Alexa Fluorophore (*Molecular Probes*) gewählt. Diese Substanzen reagieren als Maleimide selektiv mit Cystein-SH-Gruppen unter Bildung von Thioetherprodukten, wobei sie nicht mit Histidinen und Methioninen reagieren. Das pH-Optimum für die Kopplungsreaktion liegt bei pH 7, wohingegen bei Werten größer als pH 8 Zerfallsprozesse zu Maleinsäuren als Konkurrenzreaktionen zur Kopplungsreaktion auftreten können. Als FRET-Fluorophor-Pärchen wurden die Farbstoffe Alexa Fluor Dye 594 C<sub>5</sub>-maleimid (AF594) und Alexa Fluor Dye 633 C<sub>5</sub>-maleimid (AF633) ausgewählt. Diese beiden Fluorophore erfüllen zum einen das Kriterium, dass sie spektral nicht mit der Hämgruppe wechselwirken. Zum anderen interagieren beide Fluorophore spektral miteinander, indem das Anregungsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt, denn nur so kann der Energietransfer stattfinden. AF594 wurde als Donor-Fluorophor

an Cytochrom  $c_{1CF}$  gekoppelt, während AF633 als Akzeptor-Fluorophor an  $c_{552F}$  gebunden wurde. In Abbildung 3.58 sind die Absorptions- und Emissionsspektren der beiden Alexa Fluor-Farbstoffe dargestellt.



**Abbildung 3.58: Absorptions- und Emissionsspektren der Alexa Fluorophore** AF594 (in H<sub>2</sub>O, rechts) und AF633 (in MeOH, links)

Um später die Kopplungsrate der Fluorophore am Protein spektroskopisch bestimmen zu können, musste zunächst ein Extinktionskoeffizient für AF633 in wässriger Lösung ermittelt werden, da *Molecular Probes* für AF633 nur einen Extinktionskoeffizienten in Methanol angibt. Hierfür wurde etwas AF633 in wenig DMSO gelöst, jeweils 1  $\mu$ l dieser AF633-Stammlösung in 1 ml Methanol oder 1 ml H<sub>2</sub>O verdünnt und die Absorptionsspektren in einem Bereich von 500-650 nm aufgenommen. Es zeigte sich, dass der Absorptionsspektrums des H<sub>2</sub>O-Spektrums etwas zu höheren Wellenlängen verschoben und das Absorptionsmaximum gegenüber dem des Methanolspektrums verringert ist (Abbildung 3.59).



**Abbildung 3.59: AF633-Absorptionsspektren in MeOH und H<sub>2</sub>O**

Anschließend wurden über den für AF633 bekannten Extinktionskoeffizienten ( $158,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 621 nm in MeOH) die Konzentration der AF633/MeOH-Lösung



bestimmt und nachfolgend über die nun bekannte Konzentration der Extinktionskoeffizient für AF633 in H<sub>2</sub>O zu 130,4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> bei 627 nm berechnet. Die Funktion und spektralen Eigenschaften der beiden Alexa Fluorfarbstoffe sind in Tabelle 3.20 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 3.20: Funktion und spektrale Eigenschaften der Alexa Fluorophore AF594 und AF633**

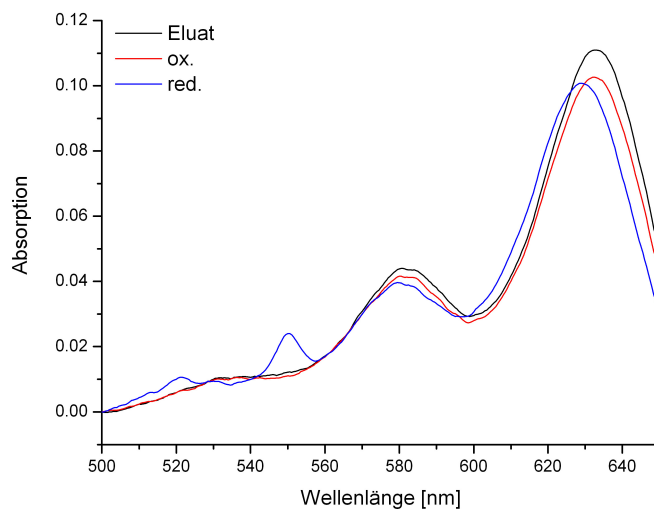
	<b>AF594</b>	<b>AF633</b>
<b>Funktion</b>	als Donor gekoppelt an c <sub>1CF</sub>	als Akzeptor gekoppelt an c <sub>552F</sub>
<b>M<sub>w</sub></b>	908,97	1300
<b>Absorptionsmaximum</b>	588 nm	621 nm (MeOH) und 627 nm (H <sub>2</sub> O)
<b>Emissionsmaximum</b>	615 nm	641 nm
<b>Extinktionskoeffizient</b>	ε <sub>588</sub> = 101,7 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O; <i>Molecular Probes</i> )	ε <sub>621</sub> = 158,6 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (MeOH) ε <sub>627</sub> = 130,4 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O)

### 3.8.2 Fluorophor-Kopplung

Für die FRET-Experimente wurden jeweils vier Cystein-Mutanten des c<sub>1CF</sub> und des c<sub>552F</sub> ausgesucht, um die Fluorophore kovalent an die Oberflächencysteine zu koppeln. Es wurden die Mutanten Q271C, E304C, A356C und T383C des c<sub>1CF</sub> und die Mutanten N23C, K51C, N68C und N91C des c<sub>552F</sub> verwendet (siehe Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14 in Abschnitt 3.3.1). Während der Kopplungsreaktion musste darauf geachtet werden, dass sämtliche Fluorophor- und Protein-Fluorophorlösungen vor Licht geschützt wurden. Des weiteren wurden die Reaktionspuffer vorher mit Stickstoff begast, um sauerstoffarme Bedingungen zu gewährleisten und dadurch eine Oxidation der SH-Gruppen zu verhindern. Die Cytochrome wurden mit Dithiothreitol vorreduziert und vom überschüssigen Reduktionsmittel durch Gelfiltration abgetrennt. Der Fluorophor wurde möglichst konzentriert in DMSO gelöst und langsam im Dunkeln zur Proteinlösung in einem Verhältnis von 1:1 zutitriert, um zum einen die Menge an zugegebenen DMSO zu minimieren und dadurch ein eventuelles Präzipitieren der Cytochrome zu verhindern, zum anderen um Mehrfach-Reaktionen zu vermeiden. Nach der Kopplungsreaktion erfolgte die Abtrennung des ungebundenen Fluorophors von dem Fluorophor-Cytochrom-Konjugat mittels Gelfiltration, bei der während des Laufs zwei Fraktionen erkennbar waren: eine schneller laufende, je nach Fluorophor violett- oder pinkfarbene Fluorophor-Cytochrom-Fraktion und eine langsamer laufende Fluorophor-Fraktion, die eine blaue (AF633) oder lila (AF594) Farbe aufwies. Es wurde eine relativ lange G-25-Säule gewählt, um eine lange Trennstrecke und damit eine eindeutige Auftrennung der beiden Fraktionen zu gewährleisten. Die aufgefangenen Eluate wurden spektroskopisch auf das Vorhandensein von Fluorophor getestet (Peaks bei 588 und 627 nm). Das Fluorophor-Cytochrom-Eluat wurde anschließend mindestens dreimal mit 20 ml Puffer in einem Konzentrator gewaschen und nachfolgend ankonzentriert. Die Bestimmung der Kopplungsrate erfolgte spektroskopisch über Redoxdifferenzspektren, aus denen die Cytochrom-Konzentration ermittelt wurde, und über Absorptionsspektren zur Bestimmung der Fluorophorkonzentration über folgende Formel:

$$\text{Kopplungsrate} = \frac{\text{Mol}_{\text{Fluorophor}}}{\text{Mol}_{\text{Häm}}} \quad (3.22)$$

Auffallend war, dass sich der Fluorophorpeak des AF633 bei Kopplung an  $c_{552F}$  im Gegensatz zur AF594-Kopplung an Cytochrom  $c_{1CF}$  sowohl zu höheren Wellenlängen verschob als auch in Lage und Amplitude abhängig vom Redoxzustand des Cytochroms zu sein schien. Exemplarisch sind die Spektren für die Kopplung von AF633 an  $c_{552F}$ K51C gezeigt (Abbildung 3.60), wobei ein Absorptionsspektrum des ankonzentrierten Eluats unbekanntes Redoxzustandes, ein Oxidations- und ein Reduktionsspektrum aufgenommen wurde. Die Peakmaxima des Absorptionsspektrums des unbekanntes Redoxzustandes und des Oxidationsspektrums liegen bei 634 nm und unterscheiden sich in der Amplitude, wobei der Peak aus dem Oxidationsspektrum gegenüber dem Eluat-Spektrum verringert ist. Das Peakmaximum des Reduktionsspektrums liegt bei 630 nm und hat eine gegenüber den anderen beiden Spektren weiter verringerte Amplitude. Zur Bestimmung der Fluorophorkonzentration wurde der Reduktionspeak herangezogen, der von der Lage dem Peak des ungekoppelten AF633 in  $H_2O$  am ähnlichsten ist.



**Abbildung 3.60: Absorptionsspektren des AF633-K51C-Konjugats abhängig vom Redoxzustand**

In schwarz ist das Spektrum des ankonzentrierten Eluats unbekanntes Redoxzustandes, in rot das Oxidations- und in blau das Reduktionsspektrum gezeigt. Die AF633-Peakmaxima befinden sich je nach Redoxzustand bei 631 und 627 nm.

Durch die Berechnung der Cytochrom- bzw. Hämkonzentration mittels Redoxdifferenzspektren und der Fluorophorkonzentration durch die Absorptionsspektren konnten mit Gleichung (3.22) die Kopplungsraten bestimmt werden (Tabelle 3.21):

**Tabelle 3.21: Kopplungsraten der Alexa-Fluorophore in der Übersicht**

Die Berechnung der Hämkonzentration erfolgte aus Redoxdifferenzspektren über die jeweiligen Extinktionskoeffizienten, die Berechnung der Fluorophorkonzentration erfolgte aus den Absorptionsspektren mit den Extinktionskoeffizienten der Fluorophore in wässriger Lösung.

Mutante	Extinktionskoeffizient [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	c(Häm) <sub>redox</sub> [μM]	Fluorophor	c(AF) [μM]	F/P [%]
<b>c<sub>1CF</sub> Q271C</b>	19,3	188,1	AF594	97,7	<b>52</b>
<b>c<sub>1CF</sub> E304C</b>	21,6	103,4	AF594	68,4	<b>66</b>
<b>c<sub>1CF</sub> A356C</b>	18,4	199,7	AF594	84,9	<b>40</b>
<b>c<sub>1CF</sub> T383C</b>	21,9	190,6	AF594	65,7	<b>34</b>
<b>c<sub>552F</sub> N23C</b>	22,5	47,9	AF633	47,8	<b>100</b>
<b>c<sub>552F</sub> K51C</b>	20,6	152,4	AF633	155,2	<b>102</b>
<b>c<sub>552F</sub> N68C</b>	20,9	13,7	AF633	12,0	<b>87</b>
<b>c<sub>552F</sub> N91C</b>	21,7	4,6	AF633	3,1	<b>66</b>

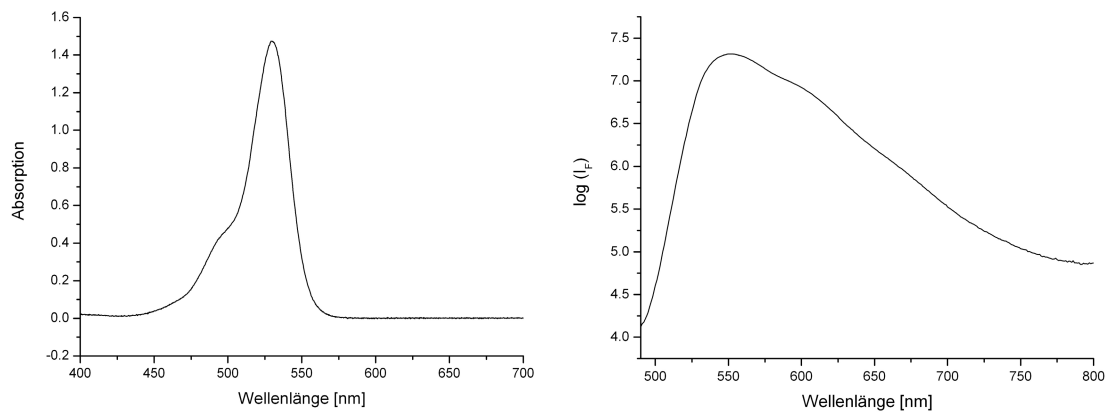
Der Alexa Fluor Farbstoff AF594 konnte als Donor mit einer Ausbeute von 34 bis 66 % kovalent an die Cytochrom c<sub>1CF</sub>-Cysteinmutanten gebunden werden. Im Allgemeinen ist es für einen FRET-Ansatz wichtig, dass keine unspezifische Bindung des Fluorophors oder Mehrfach-Reaktionen auftreten, was den Energietransfer und die daraus resultierenden Abstände stark verfälschen würde, während eine Kopplung von „nur“ 30 % vollkommen ausreichend ist, um einen Energietransfer zu detektieren (Shyamal Mazumdar; persönliche Mitteilung). Die Kopplungsraten für die Kopplung von AF633 als Akzeptor an die Cytochrom c<sub>552F</sub>-Cysteinmutanten liegen verglichen zu den AF594-Ausbeuten mit 66 bis 102 % insgesamt höher. Um sicherzustellen, dass es sich insbesondere bei den 100 und 102 %igen Kopplungen wirklich um eine spezifische, kovalente Verknüpfung des Fluorophors über die SH-Gruppen der Oberflächencysteine zum jeweiligen Cytochrom handelt und um unspezifische Fluorophorbindungen ausschließen zu können, wurde eine Kopplung des AF633 mit dem c<sub>552F</sub>WT unter identischen Bedingungen durchgeführt. Wie erwartet, konnte kein Fluorophor im ankonzentrierten Cytochrom-Eluat detektiert werden.

### 3.8.3 Bestimmung der Quantenausbeute

Unter der Quantenausbeute (*quantum yield, QY*) versteht man das Verhältnis von emittierter zu absorbierter Strahlung, sie ist damit allgemein definiert als:

$$QY = \frac{I_F}{I_A} \quad (3.23)$$

mit  $I_F$  und  $I_A$  als Intensitäten der Fluoreszenz und Absorption. Für den FRET-Ansatz mussten die Quantenausbeuten des Donor-Fluorophors gekoppelt an die jeweilige c<sub>1CF</sub>-Cysteinmutante bestimmt werden, da dieser Wert in die Abstandsberechnung einfließt und sowohl vom Lösungsmittel als auch von der direkten Fluorophorumgebung abhängt. Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgte über Vergleichsmessungen zu der gut untersuchten Standardsubstanz Rhodamin 6G (R6G) mit bekannter Quantenausbeute. Die Rhodamin-Absorptions- und Emissionsspektren sind in Abbildung 3.61 angegeben:



**Abbildung 3.61: Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum von Rhodamin 6G**

Praktisch wurden unter den R6G-Referenzbedingungen (Anregung bei 480 nm, Rhodamin gelöst in Ethanol) die Absorptions- und Emissionsspektren von Rhodamin 6G und der Cytochrom  $c_{1CF}$ -AF594-Konjugate (Anregung bei 480 nm, gelöst in FRET-Messpuffer) sowie des ungekoppelten AF594 aufgenommen. Da eine lineare Abhängigkeit von Fluoreszenz- und Absorptionsintensität nur für ausreichend verdünnte Proben gegeben ist ( $Abs. < 0,05$ ), wurden die Proben stark verdünnt. Wichtig für die Bestimmung der Quantenausbeute war, dass für die Messung des Rhodamin 6G dieselben Anregungsbedingungen und dasselbe Lösungsmittel verwendet wurden wie in der Referenzmessung von *Molecular Probes* angegeben. Für die Messung der Fluorophore musste die R6G-Anregungswellenlänge beibehalten, jedoch im FRET-Messpuffer gearbeitet werden, da  $QY$  stark von den Lösungsmiteleigenschaften abhängig ist. Die Quantenausbeute wurde dann mittels Gleichung (3.24) bestimmt.

$$QY_u = QY_s \cdot \left( \frac{a_u}{a_s} \right) \cdot \left( \frac{n_u^2}{n_s^2} \right) \quad (3.24)$$

mit

- $QY_u$  = unbekannte Quantenausbeute
- $QY_s$  = Quantenausbeute der Standardsubstanz
- $a_u, a_s$  = normierte Peakflächen (Erklärung siehe Text)
- $n_u, n_s$  = Brechungsindices der Lösungsmittel

Die Absorptionsspektren der Cytochrom  $c_{1CF}$ -Fluorophor-Konjugate wurden um die Cytochromabsorption korrigiert (siehe Abschnitt 3.3.4) und anschließend die reine AF594-Absorption bei 480 nm ermittelt. Die Fläche unter dem Fluoreszenzpeak wurde durch numerische Integration bestimmt und durch die AF594-Absorption bei 480 nm dividiert, um eine normierte Peakfläche ( $a_u$  und  $a_s$ ) und damit eine Konzentrationsunabhängigkeit zu erhalten. Die Brechungsindices der verwendeten Lösungsmittel gehen ebenfalls in die Berechnung ein ( $n_u(\text{H}_2\text{O}) = 1,333$  und  $n_s(\text{EtOH}) = 1,3614$ ). Mit einer Quantenausbeute für Rhodamin 6G von 0,95 erhält man für die Donor-Konjugate folgende Quantenausbeuten (Tabelle 3.22):

**Tabelle 3.22: Quantenausbeuten der AF594- $c_{1CF}$ -Konjugate**

Die Quantenausbeute wurde im Vergleich zur Standardsubstanz Rhodamin 6G ( $QY = 0.95$ ) gemessen

Fluorophor	Quantenausbeute QY
<b>Rhodamin 6G</b>	<b>0,95</b>
<b>AF594</b>	0,1360
AF594- $c_{1CF}$ - <b>Q271C</b>	0,0380
AF594- $c_{1CF}$ - <b>E304C</b>	0,0706
AF594- $c_{1CF}$ - <b>A356C</b>	0,0788
AF594- $c_{1CF}$ - <b>T383C</b>	0,0744

Der ungekoppelte Fluorophor AF594 hat eine Quantenausbeute von 0,136, die trotz der chemischen Verwandtschaft zum Rhodamin sehr viel geringer ist als die Quantenausbeute des R6G. Die Quantenausbeuten der AF594-Konjugate E304C, A356C und T383C sind durch die Proteinumgebung und die Nähe zur Hämgruppe noch mal um die Hälfte auf 0,0706 bis 0,0788 reduziert. Hämgruppen sind effektive Fluoreszenz-Quencher. Auf etwa ein Viertel der AF594-Quantenausbeute ist die des AF594-Q271C-Konjugats mit 0,038 verringert, was durch eine günstigere Orientierung des Fluorophors zur Hämgruppe und dadurch bedingte erhöhte Fluoreszenzlöschung oder durch Tryptophan-vermittelte Fluoreszenzlöschung zustande kommen kann. Tatsächlich befindet sich ein Tryptophanrest in Position 275 in unmittelbarer Nachbarschaft zu C271, das für diesen *Quench*-Prozeß verantwortlich sein könnte.

### 3.8.4 Bestimmung des Überlappungsintegrals

Das Überlappungsintegral  $J$  ist die Fläche, mit der sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Um  $J$  bestimmen zu können, wurden Fluoreszenzspektren aller vier AF594- $c_{1CF}$ -Konjugate (Q271C, E304C, A356C und T383C) und Absorptionsspektren aller vier AF633- $c_{552F}$ -Konjugate (N23C, K51C, N68C, N91C) aufgenommen und  $J$  mit dem Programm *jintegrl* (S. Mazumdar) über folgende Formel berechnet:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot (\lambda)^4}{\int_0^{\infty} F(\lambda) \cdot d\lambda} \left[ \text{cm}^3 \text{M}^{-1} \right] \quad (3.25)$$

$J(\lambda)$  = Überlappungsintegral  
 $F(\lambda)$  = Fluoreszenzspektrum  
 $\varepsilon(\lambda)$  = Extinktionskoeffizienten

Für die verschiedenen AF594-Donor- und AF633-Akzeptorkombinationen ergeben sich folgende  $J$ -Werte (Tabelle 3.23):

**Tabelle 3.23: Überlappungsintegrale  $J$** 

Werte für die Überlappungsintegrale aller AF594-Donor- und AF633-Akzeptorkombinationen;

Donor-/ Akzeptorkombination	Überlappungsintegrale $J$ [ $M^{-1}cm^{-3}$ ]			
	N23C	K51C	N68C	N91C
<b>Q271C</b>	$1,022 \cdot 10^{-12}$	$1,011 \cdot 10^{-12}$	$9,388 \cdot 10^{-13}$	$9,541 \cdot 10^{-13}$
<b>E304C</b>	$1,016 \cdot 10^{-12}$	$1,006 \cdot 10^{-12}$	$9,320 \cdot 10^{-13}$	$9,855 \cdot 10^{-13}$
<b>A356C</b>	$9,984 \cdot 10^{-13}$	$9,886 \cdot 10^{-13}$	$9,139 \cdot 10^{-13}$	$1,009 \cdot 10^{-12}$
<b>T383C</b>	$9,899 \cdot 10^{-13}$	$9,804 \cdot 10^{-13}$	$9,053 \cdot 10^{-13}$	$1,019 \cdot 10^{-12}$

### 3.8.5 FRET-Messungen

Die eigentlichen FRET-Messungen wurden in einem Puffer niedriger Ionenstärke (10 mM Tris/HCl, pH 8) durchgeführt, um die Komplexbildung nicht durch Abschirmung von Oberflächenladung durch zu hohe Salzkonzentrationen zu behindern. Anschließend wurde die Salzkonzentration in der Küvette auf 25 mM durch Zugabe von 5  $\mu$ l 5 M NaCl-Lösung gebracht, um zu testen, ob die Ionenstärke einen Einfluss auf den Komplex und damit auf die Fluoreszenzintensität ausübt. Aufgenommen wurden die Emissionsspektren des Donors ohne Akzeptor und die Fluoreszenzintensität bei 600 nm  $I_{D600}$  bestimmt. Diese Wellenlänge wurde gewählt, da hier nur der Donor-Fluorophor emittiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Akzeptors in 10-fachen Überschuss (bezogen auf die Fluorophorkonzentrationen), da in diesem Bereich der Energietransfer von der Konzentration unabhängig wird. Die Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors  $I_{DA600}$  wurde bestimmt. Die Fluoreszenzabnahme bei 600 nm in Anwesenheit des Akzeptors korreliert direkt mit dem Förster-Transfer, dessen Effizienz  $E$  so unmittelbar aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden kann (Gleichung.(3.26)):

$$E = \frac{1 - I_{DA}}{I_D} \quad (3.26)$$

$E$  = Effizienz des Energietransfers

$I_{DA}$  = Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

$I_D$  = Fluoreszenzintensität des Donors ohne Akzeptor

Die Fluoreszenzintensitäten  $I_D$  und  $I_{DA}$  sowie die Transfereffizienz  $E$  der 16 Donor/Akzeptor-Kombinationen für den Ansatz bei niedriger Ionenstärke sind in Tabelle 3.24 aufgeführt. Die Erhöhung der Ionenstärke auf 25 mM NaCl zeigt keine großen Abweichungen.

**Tabelle 3.24: FRET-Parameter**

Fluoreszenzintensitäten ( $I_D$ ,  $I_{DA}$ ) und Transfereffizienz ( $E$ ) für die verschiedenen Donor/Akzeptor-Paare

AF594-Donor	$I_D$	AF633-Akzeptor	$I_{DA}$	$E$
<b>Q271C</b>	7,19	<b>N23C</b>	4,94	0,313
		<b>K51C</b>	2,17	0,698
		<b>N68C</b>	5,61	0,220
		<b>N91C</b>	3,95	0,451
<b>E304C</b>	8,95	<b>N23C</b>	6,16	0,311
		<b>K51C</b>	2,22	0,752
		<b>N68C</b>	6,40	0,284
		<b>N91C</b>	4,29	0,521
<b>A356C</b>	9,10	<b>N23C</b>	7,97	0,125
		<b>K51C</b>	6,20	0,319
		<b>N68C</b>	8,79	0,034
		<b>N91C</b>	7,83	0,140
<b>T383C</b>	7,48	<b>N23C</b>	6,40	0,145
		<b>K51C</b>	5,03	0,327
		<b>N68C</b>	7,33	0,019
		<b>N91C</b>	5,92	0,208

Zusammen mit den vorher bestimmten Quantenausbeuten und Überlappungsintegralen kann nun über Gleichung (3.27) der Förster-Radius  $R_0$  bestimmt werden:

$$R_0 = \left[ 8,8 \cdot 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot n^4 \cdot QY_D \cdot J(\lambda) \right]^{1/6} [\text{Å}] \quad (3.27)$$

$R_0$  = Distanz, bei der die Effizienz des Energietransfers 50 % ist

$\kappa^2$  = Dipol-Orientierungsfaktor (= 2/3 für willkürlich orientiertes D/A-Paar)

$n$  = Brechungsindex des Lösungsmittels, hier für  $H_2O$  = 1,333

$QY_D$  = Quantenausbeute des Donors

$J(\lambda)$  = Überlappungsintegral

und dieser in Gleichung (3.28) eingesetzt werden, um die Abstandsinformationen zu erhalten.

$$R = R_0 \left( E^{-1} - 1 \right)^{1/6} \quad (3.28)$$

$E$  = Effizienz des Energietransfers

$R$  = FRET-Distanz

$R_0$  = Förster-Radius

Gleichung (3.28) zeigt, dass die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz des Radius zwischen den beiden Fluorophoren abnimmt. Die Förster-Radien  $R_0$  (Abstände, bei denen die Transfereffizienz  $E$  um die Hälfte verringert ist) und die Distanzen  $R$  zwischen den Donor/Akzeptor-Paaren sind in Tabelle 3.25 wiedergegeben. Hieraus wird ersichtlich, dass die Förster-Radien für jeweils einen Donor mit seinen vier Akzeptoren nahezu identisch sind und sich die Werte der verschiedenen Donoren ebenfalls nur wenig unterscheiden (48-49 Å für die Donoren E304C, A356C und T383C; 43 Å für Q271C, das ebenfalls eine reduzierte Quantenausbeute aufwies). Die ermittelten Abstände liegen in einem Bereich von 38 bis 93 Å und damit innerhalb des für Proteine üblichen Distanzbereiches.

**Tabelle 3.25: FRET-Distanzen**

Förster-Radien ( $R_0$ ) und Abstände ( $R$ ) der verschiedenen Donor/Akzeptor-Kombinationen

AF594-Donor	AF633-Akzeptor	$R_0$ [Å]	$R$ [Å]
<b>Q271C</b>	<b>N23C</b>	44	<b>50</b>
	<b>K51C</b>	44	<b>38</b>
	<b>N68C</b>	43	<b>54</b>
	<b>N91C</b>	43	<b>45</b>
<b>E304C</b>	<b>N23C</b>	49	<b>56</b>
	<b>K51C</b>	49	<b>40</b>
	<b>N68C</b>	48	<b>56</b>
	<b>N91C</b>	48	<b>48</b>
<b>A356C</b>	<b>N23C</b>	49	<b>68</b>
	<b>K51C</b>	49	<b>56</b>
	<b>N68C</b>	49	<b>85</b>
	<b>N91C</b>	50	<b>67</b>
<b>T383C</b>	<b>N23C</b>	49	<b>66</b>
	<b>K51C</b>	49	<b>55</b>
	<b>N68C</b>	48	<b>93</b>
	<b>N91C</b>	49	<b>61</b>

### 3.8.6 Dockingberechnungen und ET-Komplex

Um eine räumliche Vorstellung der Anordnung beider Cytochrome im ET-Komplex zu erhalten, wurden die durch die FRET-Messungen gewonnenen Abstände für Dockingberechnungen eingesetzt. Die Rechnungen wurden von Dr. Ulrich Schieborr (Institut für Organische Chemie, Universität Frankfurt) unter Verwendung des Programmes HADDOCK (Dominguez, Boelens *et al.* 2003) durchgeführt. Als *Template*-Strukturen dienten die Kristallstrukturdaten des Cytochrom  $c_{552F}$  (1QL4, *protein data bank*) und die modellierte *SwissI*-Struktur des Cytochrom  $c_{1CF}$  (siehe Abschnitt 3.2.1.2).

Bereits nach einer *rigid body*-Minimierungen wurde klar, dass das strukturelle Problem durch die aus den FRET-Messungen berechneten Distanzen nicht bestimmt wird. Docking Experimente mit den FRET-Ergebnissen als obere Abstandsbegrenzungen zeigen zwar Strukturen, in denen beide Cytochrome so angeordnet sind, dass ihre potentiellen Interaktionsflächen und Hämspalten einander zugewandt sind, allerdings weichen die Distanzen in den Strukturen stark von den FRET-Abständen ab. Außerdem existieren unterschiedliche Komplexstrukturen, die in ihrer Signifikanz gleichwertig sind, da sie sämtliche Abstandsbegrenzungen erfüllen. Des weiteren spiegeln die relativen Größen der Distanzen in den Strukturen die FRET-Daten nicht wider (siehe Tabelle 3.26). Die FRET-Abstände sind insgesamt zu groß, um Komplexstrukturen zu generieren, die intermolekulare Wechselwirkungen aufweisen. Da die durch HADDOCK berechneten Distanzen wesentlich kleiner waren als die FRET-Abstände, wurden zum Vergleich und zur Veranschaulichung die Abstände der äquivalenten Positionen im Hefe-Cokristall, die zuvor anhand von Sequenzalignments ermittelt worden waren, bestimmt. Es zeigte sich, dass die HADDOCK-Distanzen (10-46 Å) von der Größenordnung denen im Hefe-Kristall ähneln (12-42 Å), jenen in der Reihenfolge allerdings nicht entsprechen, wohingegen die FRET-Abstände mindestens um den Faktor 2 größer sind (38-93 Å).



**Tabelle 3.26: Vergleich der FRET-, HADDOCK und 1KYO-Distanzen**

Vergleich der Distanzen aus den FRET-Messungen ( $R_{FRET}$ ) mit den über HADDOCK berechneten ( $R_{HADDOCK}$ ) und denen im 1KYO-Cokristall zwischen den äquivalenten Aminosäurepositionen des CYT1 und des CYC ( $R_{1kyo}$ ) determinierten (die entsprechenden Aminosäurepositionen im Hefe-Cokristall wurden per Sequenzalignments mit Hilfe des Programmes *ClustalX* ermittelt).

<i>P. d.</i> $C_{1CF}$	<i>P. d.</i> $C_{552F}$	$R_{FRET}$ [Å]	$R_{HADDOCK}$ [Å]	<i>S. c.</i> CYT1	<i>S. c.</i> CYC	$R_{1kyo}$ [Å]
Q271C	N23C	50	39	Q127	P30	42
	K51C	38	23		K60	29
	N68C	53	31		Q75	23
	N91C	45	44		E98	37
E304C	N23C	56	28	Q161	P30	26
	K51C	40	11		K60	24
	N68C	56	23		Q75	26
	N91C	48	10		E98	36
A356C	N23C	68	29	L208	P30	22
	K51C	56	31		K60	39
	N68C	85	45		Q75	33
	N91C	67	46		E98	31
T383C	N23C	66	30	M233	P30	29
	K51C	55	24		K60	27
	N68C	93	36		Q75	12
	N91C	67	46		E98	16

Daher wurde eine weitere HADDOCK-Rechnung durchgeführt, bei der die FRET-Abstände mit einem oberen und unteren Fehlerbalken von 5 Å als Begrenzung eingesetzt wurden. Dadurch sollte erreicht werden, dass keine Energieminimierung wie beim ersten Ansatz gerechnet wird, sondern lediglich ein „Verschieben“ der Strukturkoordinaten der beiden Cytochrome anhand der gemessenen Daten im dreidimensionalen Raum stattfindet. Auch dieser Rechnungsansatz zeigte, dass es unter Verwendung der gemessenen Abstände keinen Docking-Komplex geben kann, da beide Cytochrome zu weit voneinander positioniert werden.

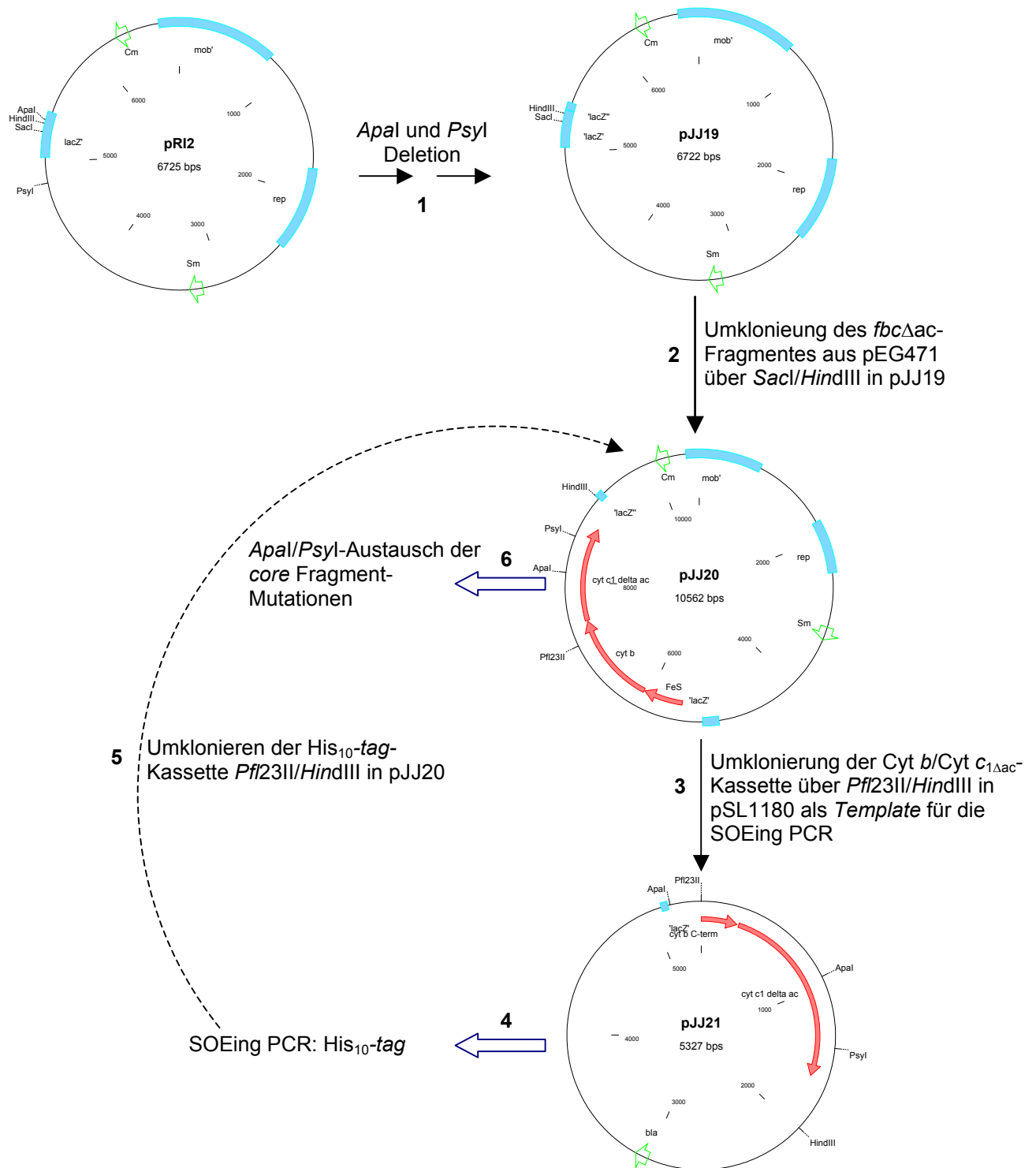
### 3.9 Der $bc_{1\Delta ac}$ - Komplex aus *P. denitrificans*

Um die an löslichen Fragmenten gewonnenen Erkenntnisse über den Elektronentransfer in einem Proteinkomplex zu überprüfen, sollten die *core*-Fragment-Mutationen aus dem  $c_{1CF}$  in einen  $bc_1$ -Komplex überführt werden, dem die saure Extensionsdomäne (siehe 1.3.3) fehlt (Gerhus, 1992 Dissertation). Durch das Fehlen dieser Domäne sollen die Auswirkungen der eingeführten Mutationen nicht durch die hohe Anzahl von negativen Ladungen überkompensiert werden, so dass sich ein Effekt in der Wechselwirkung zum Cytochrom  $c_{552}$  direkt bemerkbar macht. Der  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex wurde durch eine *in frame*-Deletion der Aminosäurereste 39-203 auf DNA-Ebene (DNA-Sequenz 2279-2766 bp) erhalten. Als Ausgangsplasmid für dieses Projekt wurde pEG471 aus dem *P. denitrificans*-Stamm G440 verwendet (Gerhus, 1992 Dissertation).

#### 3.9.1 Klonierungen

Da dem  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex die saure Extensionsdomäne fehlt, ergeben sich Probleme bei der Aufreinigung des Proteinkomplexes, da die vielen negativen Ladungen als Aufreinigungs“tag“ wegfallen. Aus diesem Grunde sollte ein His-tag eingeführt werden. Des Weiteren sollten die Interaktionsmutationen des  $c_{1CF}$  per Restriktion in den

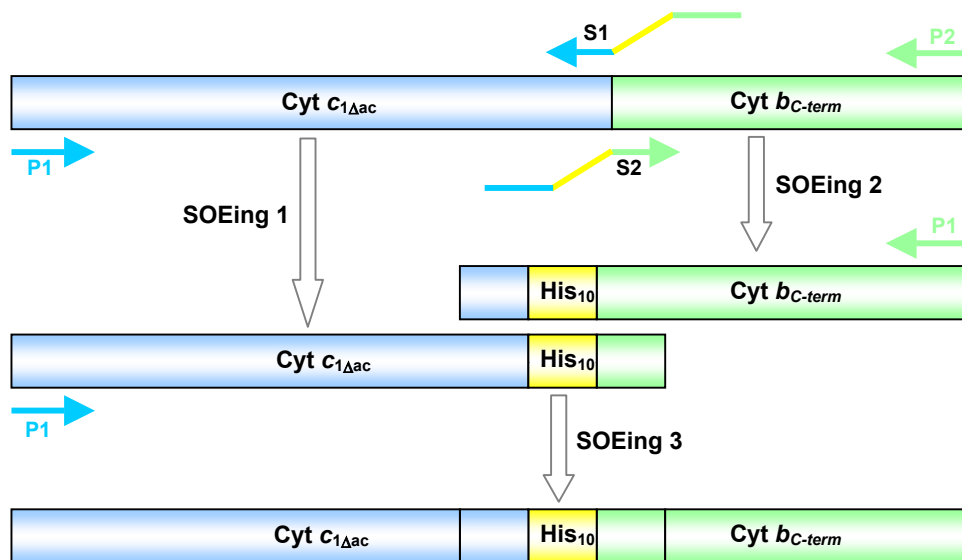
Komplex überführt werden, um die Ergebnisse der ET-Studien der Interaktionsmutanten der löslichen Fragmente mit denen in einem Proteinkomplex vergleichen zu können. Zu diesem Zweck musste eine Kombination an Restriktionsenzymen gefunden werden, mit der selektiv eine die Mutationen enthaltene DNA-Kassette aus dem  $c_{ICF}$  ausgeschnitten und mit der Kassette aus dem  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex ausgetauscht werden konnte. Als einzige Restriktionskombination bot sich *ApaI/PsyI* an, die erstens eine Kassette von 467 bp aus dem *core*-Fragment ausschneidet, welche alle Mutagenesepositionen einschließt, und zweitens ausschließlich einmal im  $c_{ICF}$  und einmal im  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex schneidet. Für die eben vorgestellten molekulargenetischen Arbeiten sollte das *fbc $\Delta$ ac*-Operon aus dem *Paracoccus*-Vektor pEG471 mittels *SacI/HindIII*-Restriktion isoliert und für eine leichtere Handhabung in den *broad host range* Vektor pRI2 umkloniert werden, um alle Klonierungsarbeiten in *E. coli* durchführen zu können. Dabei ergab sich das Problem, dass dieser Vektor selbst jeweils eine *ApaI* und eine *PsyI*-Schnittstelle aufwies. Deswegen wurden vorab die beiden Schnittstellen durch Restriktion mit dem jeweiligen Restriktionsenzym, anschließend „blunten“ (im Falle der *ApaI*-Schnittstelle durch 3'-5'-Exonuklease-Abbau und in Falle des *PsyI* durch eine Klenow-Auffüllreaktion) und Selbstligation deletiert und das entstandene pRI2-Konstrukt mit den fehlenden Schnittstellen mit pJJ19 bezeichnet. In dieses Konstrukt wurde das *fbc $\Delta$ ac*-Fragment aus pEG471 unter Bildung von pJJ20 kloniert. Die eben vorgestellte Klonierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 3.62 angegeben.



**Abbildung 3.62: Klonierungsstrategie für die Einführung eines *His*<sub>10</sub>-tags in den *bc*<sub>1</sub> $\Delta$ *ac*-Komplex**  
 Einführung des *His*<sub>10</sub>-tags und nachfolgender Austausch der *core*-Fragment-Mutationen. pJJ21 dient als *Template* für die SOEing-PCR zur Einführung des *His*<sub>10</sub>-tags, das *getagte* Fragment wird wieder über *Pfi231I/HindIII* in pJJ20 rückkloniert (pMC1) und dort über *Apal/Psyl* die *core*-Fragment-Mutationen eingebracht.

### 3.9.2 Einführen eines His<sub>10</sub>-tags

Zunächst sollte ein His<sub>10</sub>-tag in den bc<sub>1Δac</sub>-Komplex mittels SOEing-PCR (*splicing by overlap extension*) eingeführt werden. Hierfür wurde als Position der C-Terminus des Cytochrom *b* ausgewählt, da ein Einfügen eines His<sub>10</sub>-tags hier beim nativen bc<sub>1</sub>-Komplex erfolgreich war (Thomas Kleinschroth, persönliche Mitteilung). Um pJJ20 mit 10,5 kbp nicht als *Template* für die PCR einsetzen zu müssen, wurde zunächst eine DNA-Kassette, die den C-Terminus des Cytochrom *b* und das Cytochrom *c*<sub>1Δac</sub> einschließt, per Restriktion mit Pfl23II/HindIII aus pJJ20 isoliert und in den Vektor pSL1180 umklontiert (pJJ21, Abbildung 3.62), für den schon PCR-Primer konzipiert worden waren (T. Kleinschroth). Alle folgenden Arbeiten wurden von Michela Castellani im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Das pJJ21-Konstrukt diente als *Template* für die SOEing-PCR, dessen Ablauf schematisch in Abbildung 3.63 dargestellt ist. Die Primer S1 und S2 sind so konstruiert, dass sie aus zwei zu der *Templated*sequenz komplementären Bereichen bestehen (grün und blau), welche die His<sub>10</sub>-Sequenz umschließen. Die PCRs SOEing1 mit den Primern P1 und S1 und SOEing2 mit den Primern P2 und S2 amplifizieren 2 Fragmente (1287 und 587 bp), die zum einen in der eingeführten His<sub>10</sub>-Sequenz überlappen, aber zusätzlich noch Überlappungsbereich links und rechts von der His<sub>10</sub>-Sequenz aufweisen. Der größere Überlappungsbereich stabilisierte die Hybridisierung der beiden DNA-Fragmente in der SOEing3-PCR, mit der unter Verwendung der äußeren Primer (P1 und P2) ein Fragment von 1837 bp amplifiziert werden konnte.



**Abbildung 3.63: Schritte der SOEing PCRs 1-3**

Übersicht über die Schritte der SOEing-PCR mit verlängerten Primern zur Einföhrung des His<sub>10</sub>-tags in den bc<sub>1Δac</sub>-Komplex

Für Details des SOEing1- und SOEing2-PCR-Protokolle siehe 2.2.12.

So konnten aus den ersten beiden PCRs die Produkte SOEing1 mit 1287 bp und SOEing2 mit 587 bp amplifiziert werden, die mittels Gelextraktion aufgereinigt und in der dritten PCR als *Template* eingesetzt wurden. Durch die SOEing3-PCR konnte ein

1837 bp-Fragment amplifiziert werden, das ebenfalls per Gelextraktion isoliert und anschließend über seine glatte Enden in den mit *StuI* linearisierten pSL1180-Vektor subkloniert wurde. In diesem Vektor konnte das Fragment repliziert, dadurch vermehrt und wieder daraus isoliert werden. Um das Einbringen des His<sub>10</sub>-tags zu überprüfen, wurde das Fragment sequenziert. Nach dem die Einführung des His<sub>10</sub>-tags durch die Sequenzierung verifiziert worden war, wurde das *getagte* Fragment mit *Pfl23II* und *HindIII* geschnitten und in pJJ20 kloniert. Somit lag im resultierenden pMC1-Konstrukt (Castellani, Diplomarbeit 2006) das His-*getagte* *bc*<sub>1Δac</sub>-Fragment vor.

### 3.9.3 Homologe Expression und erste Charakterisierung

Das pCM1-Konstrukt konnte über ein triparentales Mating unter Verwendung des *E. coli*-Helferstammes RP4-4 in den *P. denitrificans*-Stamm MK6 (Pd1222-Derivat, *bc*<sub>1</sub>-Deletionsstamm ( $\Delta bc::Km$ )) eingebracht und in diesem homolog exprimiert werden. Durch eine Membranpräparation konnten Membranen erhalten werden, in denen sich der *bc*<sub>1Δac</sub>-Komplex nachweisen ließ. Spektroskopisch wurde der *bc*<sub>1Δac</sub>-Komplex über Redoxdifferenzspektren und immunologisch die Untereinheiten ISP, Cytochrom *b* und Cytochrom *c*<sub>1Δac</sub> über Westernblot-Analyse nachgewiesen.

### 3.9.4 Ausblick

Michela Castellani hat im Rahmen ihrer Diplomarbeit weiterhin erste Aufreinigungsversuche über die NiNTA-Säule unternommen und dabei versucht, ein Aufreinigungsprotokoll zu etablieren. Es werden eine optimierte Aufreinigung des *bc*<sub>1Δac</sub>-Komplexes sowie seine biochemische und spektroskopische Charakterisierung folgen. Des Weiteren sollen die *c*<sub>1</sub>-*core*-Fragment-Mutationen in diesen Komplex überführt und sowohl *steady state*-Kinetiken im Vergleich zum WT *bc*<sub>1</sub>-Komplex als auch *pre-steady state*-Stopped-Flow-Kinetiken im Vergleich zu den löslichen *c*<sub>1CF</sub>-Mutanten durchgeführt werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Lösliche Redoxfragmente aus *P. denitrificans* und *T. thermophilus*

#### 4.1.1 Lösliche Redoxfragmente als Modellsystem für ET-Prozesse

Die Verwendung löslicher Fragmente von ansonsten membranständigen Redoxproteinen zur Untersuchung von Elektronentransfermechanismen bringt zwei entscheidende Vorteile gegenüber dem Einsatz von Membranproteinen oder Membranproteinkomplexen: Zum einen ergibt sich eine einfachere experimentelle Handhabung, da zum Beispiel keine Zugabe von Detergenzien erforderlich ist. Zum anderen kann ausschließlich die ET-Reaktion von Interesse untersucht werden, da anders als in einem Proteinkomplex keine Beeinflussung durch nachfolgende ET-Reaktionen oder Energieumwandlungsprozesse stattfindet. Andererseits könnte das Fehlen wichtiger struktureller Bereiche den ET verfälschen und das Fragment zusätzliche Rotations- und Translationsfreiheitsgrade zum Beispiel durch das Fehlen eines Membranankers gewinnen.

Lösliche ET-Fragmente aus *P. denitrificans* und *T. thermophilus* konnten in der Vergangenheit erfolgreich zur Aufklärung und Charakterisierung von Elektronentransferreaktionen eingesetzt werden. Lappalainen *et al.* (Lappalainen, Watmough *et al.* 1995) klonierten ein lösliches Cu<sub>A</sub>-Fragment der Untereinheit II der aa<sub>3</sub>-Oxidase aus *P. denitrificans*, mit dem sie in Mutagenese- und kinetischen Studien mittels Stopped-Flow-Spektroskopie den Elektronentransfer zum löslichen Cytochrom c<sub>550</sub> aus *Paracoccus* und zum Cytochrom c aus Pferdeherz-Mitochondrien untersuchten. Britta Reincke klonierte im Rahmen ihrer Promotion zwei lösliche Fragmente des membranständigen Cytochrom c<sub>552</sub> (Reincke, Thony-Meyer *et al.* 1999), das in der Atmungskette von *P. denitrificans* als der native Elektronenmediator zwischen dem bc<sub>1</sub>-Komplex und der Cytochrom c-Oxidase angesehen wird (Turba, Jetzek *et al.* 1995). Beide Fragmente sind funktionell, kinetisch (Reincke, Thony-Meyer *et al.* 1999) und im Falle des Cytochrom c<sub>552F</sub> strukturell charakterisiert worden (Harrenga, Reincke *et al.* 2000; Pristovsek, Lucke *et al.* 2000; Pristovsek, Lucke *et al.* 2000). Der Elektronentransfer des Cytochrom c<sub>552F</sub> zur aa<sub>3</sub>-Oxidase wurde nachfolgend in Mutagenesestudien und kinetischen *pre-steady* und *steady state*-Ansätzen untersucht (Drosou, Malatesta *et al.* 2002; Drosou, Reincke *et al.* 2002). Ein System beider löslicher ET-Fragmente, des löslichen Cu<sub>A</sub>-Fragmentes und des löslichen Cytochrom c<sub>552F</sub>, wurde dann von Maneg *et al.* (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004) in *pre-steady state* Stopped-Flow-Messungen untersucht und die Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten näher bestimmt. Der Elektronentransfer zwischen dem bc<sub>1</sub>-Komplex und Cytochrom c<sub>552</sub> aus *Paracoccus* wurde durch die Klonierung zweier löslicher Fragmente des Cytochrom c<sub>1</sub> (Eichhorn,

Dissertation 2003) sowie deren biochemischer und funktioneller Charakterisierung mit Schwerpunkt auf den elektrostatischen Wechselwirkungen untersucht. Die weiterführende Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Redoxpartnern ist Gegenstand dieser Arbeit.

Auch der Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette von *T. thermophilus* ist anhand von löslichen Redoxproteinen und -fragmenten untersucht worden. So konnte der Elektronentransfer zwischen einem löslichen Fragment des *bc*-Komplexes (Cytochrom  $c_{bc}$ ), dem nativen löslichen Cytochrom  $c_{552}$  (Hon-Nami and Oshima 1977) und einem löslichen  $Cu_A$ -Fragment der  $ba_3$ -Oxidase (Maneg, Dissertation 2004) anhand von schnellen Kinetiken mittels Stopped-Flow-Spektroskopie untersucht und charakterisiert werden (Mooser, Maneg *et al.* 2005; Mooser, Maneg *et al.* 2006).

#### 4.1.2 Herstellung löslicher *c*-Typ Cytochrome

Die Klonierung, Expression und Aufreinigung der in dieser Arbeit hergestellten löslichen *c*-Typ Cytochrome und Mutanten erfolgte generell nach derselben Strategie: Das Strukturgen wurde vor die *pefB*-Leadersequenz des Expressionsvektors pET-22b kloniert, die den späteren Transport des Apoproteins ins Periplasma vermittelt. Es folgte die Cotransformation des Expressionsstammes (*E. coli* BL21(DE3)-Zellen und pET-22b-Vektor) mit dem Hämreifungsplasmid pEC-86 (Arslan, Schulz *et al.* 1998), das die Gene für den Periplasmatransport und Einbau des Häm-Cofaktors trägt. Die Expression wurde generell durch die Zugabe von IPTG induziert. Es folgten eine Periplasmapräparation (Witholt, Boekhout *et al.* 1976) sowie eine klassische Aufreinigung über Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration. Diese Strategie hatte sich schon früher bei der heterologen Expression löslicher *c*-Typ Cytochrome aus *P. denitrificans* (Reincke, Thony-Meyer *et al.* 1999); Drosou, Dissertation 2002; Eichhorn, Dissertation 2003) als erfolgreich erwiesen. Im Falle des Cytochrom  $c_{1CF}$  und seiner Mutanten wurde das etablierte Protokoll (Eichhorn, Dissertation 2003) optimiert (siehe 3.1.1), um verlässliche Expressionsraten von 4-6 mg/Liter zu erzielen. Diese sind vergleichbar mit den Expressionsausbeuten anderer löslicher *c*-Typ Cytochrome aus *P. denitrificans* (Reincke, Thony-Meyer *et al.* 1999); Eichhorn Dissertation 2003): So konnten für die heterologe Expression des Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{1AF}$  Expressionsausbeuten von 6-9 mg/Liter Kulturmedium erzielt werden, wobei allerdings die Ausbeuten von Anzucht zu Anzucht und innerhalb verschiedener Kulturkolben stark schwankten. Durch die in dieser Arbeit vorgenommene Optimierung der Expressionsbedingungen wurde die Reproduzierbarkeit der Expressionsausbeute erhöht. Die Ausbeuten für die heterologe Expression des löslichen Cytochrom  $c_{550}$  betragen 15 mg/Liter und die für das Cytochrom  $c_{552F}$  8-14 mg/Liter Kulturmedium. Im Gegensatz zur Expression des Cytochrom  $c_{1CF}$  und des  $c_{552F}$  aus *P. denitrificans* erforderte die heterologe Expression des löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes aus *T. thermophilus* keine Induktion mit IPTG. Die basale Cytochrom *c*-Expression ergab Expressionsausbeuten von 4 mg/Liter, die auch durch Induktion mit IPTG nicht wesentlich erhöht werden konnten. Dies war ebenfalls bei der Expression des löslichen Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragmentes und des Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* der Fall gewesen (Daniela Mooser, persönliche Mitteilung), wobei für das Cytochrom  $c_{552}$



Expressionsausbeuten von ungefähr 5 mg/Liter bestimmt worden waren (Maneg, Dissertation 2004).

### 4.1.3 Cytochrom $c_1$ core-Fragment und Interaktionsmutanten

Im folgenden Abschnitt werden die biochemischen und spektralen Charakteristika des Cytochrom  $c_1$  core-Fragmentes ( $c_{1CF}$ ) mit denen des nativen Cytochrom  $c_1$  aus *P. denitrificans* verglichen und diskutiert. Die Eigenschaften der  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten werden dann anschließend denen des  $c_{1CF}$  WT gegenübergestellt.

#### 4.1.3.1 Cytochrom $c_{1CF}$ WT

Das Cytochrom  $c_{1CF}$  ist biochemisch und spektroskopisch bereits von Anna Eichhorn während ihrer Promotion charakterisiert worden (Eichhorn, Dissertation 2003). In dieser Arbeit wurden ergänzende Charakterisierungsschritte unternommen, um umfassendere Informationen über die physikochemischen Eigenschaften des  $c_{1CF}$  zu erhalten.

Das aufgereinigte Cytochrom  $c_{1CF}$  zeigt im SDS-Gel ein apparentes Molekulargewicht ( $M_w$ ) von 26-28 kDa. Das aus der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht (ProtParam; ExPASy Homepage; Gasteiger E., Hoogland C, 2005) ohne Häm liegt bei 23,8 kDa, wobei durch MALDI-Massenspektrometrie ein  $M_w$  von 24,4 kDa (mit Häm) bestimmt wurde. Damit zeigt das Cytochrom  $c_1$  ein gegenüber dem wahren  $M_w$  leicht erhöhtes apparentes Molekulargewicht. Dies wurde schon für das native Cytochrom  $c_1$  beobachtet, das trotz eines aus der Sequenz errechneten Molekulargewichts von 45 kDa bei 60-68 kDa im SDS-Gel läuft (Ludwig, Suda *et al.* 1983), was sich in diesem Fall durch die saure Extensionsdomäne erklären lässt, da durch die hohe negative Ladungsdichte weniger SDS gebunden werden kann und das native  $c_1$  dadurch langsamer im Polyacrylamidgel läuft. Beide Cytochrome haben, trotz der fehlenden sauren Extensionsdomäne im  $c_{1CF}$ , einen ähnlichen isoelektrischen Punkt (pI), wobei der pI des nativen Cytochrom  $c_1$  experimentell durch isoelektrische Fokussierung (Ludwig, Suda *et al.* 1983) und in dieser Arbeit zusätzlich durch Berechnung aus der Aminosäuresequenz zu 4,2 bestimmt, während der des Cytochrom  $c_{1CF}$  aus der Sequenz zu 4,44 berechnet wurde (ProtParam, ExPASy Homepage). Die ähnlichen isoelektrischen Punkte sind unerwartet, da dem core-Fragment die große Anzahl an negativen Aminosäureresten der sauren Extensionsdomäne fehlen.

Immunologisch konnte das Cytochrom  $c_{1CF}$  im Westernblot durch anti- $c_1$ -Antikörper detektiert werden, die gegen das native Cytochrom  $c_1$  generiert worden waren. Der kovalente Häm-Einbau wurde durch eine Hämfärbung nachgewiesen und das Häm : Protein-Verhältnis zu 1:1 bestimmt, was dem Verhältnis im nativen Cytochrom  $c_1$  entspricht (Ludwig, Suda *et al.* 1983). Eine einheitliche Faltung des  $c_{1CF}$  wurde durch native Gelelektrophorese nach Maurer (Maurer and Dati 1972) bestätigt.

Die spektroskopischen Eigenschaften des Cytochrom  $c_{1CF}$  sind nahezu identisch zu denen des nativen Cytochrom  $c_1$ . Das native  $c_1$  zeigt Soretbanden im Oxidations- und Reduktionsspektrum bei 411 und 417 nm sowie einen charakteristischen  $\alpha$ -Peak im Redoxdifferenzspektrum bei 553 nm (Ludwig, Suda *et al.* 1983). Dieser konnte auch für das  $c_{1CF}$  beobachtet werden, wobei die Positionen der Soretpeaks im Oxidations-

(410 nm) und Reduktionsspektrum (418 nm) etwas abweichen. Der von Ludwig *et al.* durch Pyridinhämochromspektren bestimmte  $c_1$ -Extinktionskoeffizient (red-ox, 553-35 nm) von  $22,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für das native Cytochrom ist dem in dieser Arbeit bestimmten Extinktionskoeffizienten (red-ox, 553-535 nm) von  $22,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für den Cytochrom  $c_{1CF}$ WT sehr ähnlich, wobei die geringen Unterschiede durch die Verwendung unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten für  $c$ -Typ Pyridinhämochrome zu erklären sind ( $24,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  nach Williams (Williams 1964) und  $23,97 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  nach Berry & Trumpower (Berry and Trumpower 1987)). Durch *charge transfer*-Spektren, Sequenzanalysen und Strukturmodellierungsansätze konnte gezeigt werden, dass die Hämgruppe des Cytochrom  $c_{1CF}$  durch den distalen Methionin-Liganden (Met373) koordiniert wird.

Ein auffälliger Unterschied zwischen dem nativen Cytochrom  $c_1$  und dem löslichen Fragment ergibt sich im Vergleich der Redoxpotentiale. Für das  $c_{1CF}$  war vormals ein Redoxpotential von 163 mV (*SHE*) bestimmt worden (siehe Eichhorn, Dissertation 2003), während sich ein Redoxpotential von 268-308 mV für das native Cytochrom  $c_1$  innerhalb des  $bc_1$ -Komplexes von *P. denitrificans* ergab (Michaela Ritter, persönliche Mitteilung; Eichhorn, Dissertation 2003). Ein in dieser Arbeit für den  $c_{1CF}$ WT erneut bestimmtes Redoxpotential von 189 mV zeigt einen geringfügigen Unterschied durch die Verwendung eines leicht modifizierten Meßsystems. Die große Diskrepanz zum nativen Cytochrom  $c_1$  im  $bc_1$ -Komplex lässt sich durch die unterschiedliche Proteinumgebung im Komplex erklären, die das Redoxpotential beeinflusst. Die Strukturmodelle zeigen eine größere Zugänglichkeit zur Hämgruppe, da im  $bc_1$ -Komplex ein Teil der Hämspalte durch Cytochrom  $b$  abgeschirmt wird. Cytochrom  $c_{1CF}$  mit einem Redoxpotential von 189 mV ist auf jeden Fall in der Lage, in physiologischer ET-Richtung das Cytochrom  $c_{552F}$  zu reduzieren, das ein Redoxpotential von 263-268 mV aufweist.

Damit ist das Cytochrom  $c_{1CF}$  dem nativen Cytochrom  $c_1$  in seinen biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften ähnlich und kann als ET-Modellsystem für das native Cytochrom  $c_1$  verwendet werden, um den ET zum  $c_{552F}$  zu charakterisieren.

#### 4.1.3.2 Cytochrom $c_{1CF}$ Abbaufragment

Während der Aufreinigung des Cytochrom  $c_{1CF}$  und seiner Mutanten zeigte sich in den SDS-Gelen immer wieder eine charakteristische Doppelbande. Durch Gelfiltration wurden die beiden Proteinfractionen aufgetrennt und biochemisch und spektroskopisch untersucht. Beide Fraktionen wiesen eine rote Färbung auf, zeigten identische Absorptions- und Redoxspektren, die kovalente Hämbindung konnte durch eine Häm-färbung nachgewiesen und das Protein der unteren Bande eindeutig über Westernblot-Analyse als Fragment des Cytochrom  $c_{1CF}$  identifiziert werden. Das MALDI-Massenspektrum bestätigte einen Größenunterschied von 2-3 kDa gegenüber dem Cytochrom  $c_{1CF}$  und die N-terminale Sequenzierung (T. Soulimane) verifiziert das Fehlen der ersten 24 Aminosäuren am N-Terminus. Durch Inkubieren einer aufgereinigten Cytochrom  $c_{1CF}$ -Probe für 24 h bei RT konnte im SDS-Gel gezeigt werden, dass das Protein der unteren Bande erneut gebildet wurde. Somit handelt es

sich bei diesem um ein Abbauprodukt des Cytochrom  $c_{1CF}$ , das in hohem Maße gebildet wird, wenn bei Temperaturen  $> 4^{\circ}\text{C}$  gearbeitet und aufgereinigt wurde. Die Suche nach einer Peptidase mit Hilfe des Programmes *PeptideCutter* (*Expasy Homepage*), die spezifisch zwischen Ile und Ser schneidet, blieb erfolglos, was zu erwarten war, da es sich um ein für *E. coli* spezifisches Enzym handeln wird, das wahrscheinlich zusammen mit dem Cytochrom  $c_{1CF}$  isoliert wurde. Eine saubere chromatographische Abtrennung des Abbaufragmentes von der Hauptfraktion des Cytochrom  $c_{1CF}$  erwies sich als schwierig und war nur schrittweise durch die Verwendung verschiedener Gelfiltrationsmaterialien möglich.

#### 4.1.3.3 Cytochrom $c_{1CF}$ Interaktionsmutanten

Die Mutagenesepositionen des Cytochrom  $c_{1CF}$  sollten denjenigen Positionen im Cytochrom  $c_1$  des Hefe Co-Komplexes entsprechen, die eine direkte Wechselwirkung zum Cytochrom  $c$  zeigen (Lange and Hunte 2002). Das Auffinden dieser korrespondierenden Aminosäurepositionen im *P. denitrificans* Cytochrom  $c_{1CF}$  erwies sich als Herausforderung, da die Struktur des  $c_{1CF}$  bislang noch nicht aufgeklärt werden konnte. Frühere Ansätze, die Struktur mittels NMR-Spektroskopie zu lösen, blieben erfolglos (Eichhorn, Dissertation 2003). Es wurde lediglich deutlich, dass das Cytochrom  $c_{1CF}$  viele  $\alpha$ -helikale Bereiche, jedoch keine  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweist. Auch der Versuch der Kristallisation erbrachte bislang kein Ergebnis. Mit Hilfe von Sequenzalignments und Strukturmodellierungsansätzen, die auf der Hefe Cytochrom  $c_1$ -Sequenz bzw. auf der Co-Komplexstruktur (1KYO) als *Template* basieren, wurde versucht, die äquivalenten Aminosäurepositionen im *P. denitrificans* Protein zu identifizieren. Dabei wurden in den Sequenzalignments zunächst 14 verschiedene  $c_1$ -Sequenzen miteinander verglichen, wobei allerdings der Anteil an eukaryontischen Sequenzen erheblich höher war als der an prokaryontischen. Dies führte zu dem Problem, dass sich die Gewichtung des Alignments und damit auch das Setzen von Sequenzlücken oder -einschüben stark an der Mehrheit der eukaryontischen Sequenzen orientierte. So wurde ein zweites Alignment vorgenommen, in dem lediglich fünf  $c_1$ -Sequenzen miteinander verglichen wurden: drei prokaryontische mit zwei eukaryontischen Sequenzen, so dass die Gewichtung nahezu ausgeglichen war. Zu Aminosäurepositionen in Hefe, bei denen die Zuordnung eines *Paracoccus*-Restes durch Lücken oder Sequenzeinschübe im Alignment uneindeutig war, wurden alternative Positionen für die Mutagenese ausgewählt (z. B. Position Ala 164 in *S. c.* wurden Lys 315 und A314 in *P. d.* zugeordnet).

Um sich nicht nur auf Sequenzvergleiche verlassen zu müssen, durch die die räumliche Anordnung der Aminosäurepositionen nicht wiedergegeben wird, wurden mehrere Strukturen basierend auf der Hefe  $c_1$ -Struktur modelliert. Hier wurde ganz bewusst mit unterschiedlichen Programmen gearbeitet, um vergleichend eine Reihe von modellierten  $c_1$ -Strukturen zu erhalten, die unterschiedliche Interpretationen der 3D-Struktur zulassen. Hauptsächlich unterscheiden sich die modellierten Strukturen im Bereich des Loop1 und der Helix A (siehe Abbildung 3.9.), so dass bei der Auswertung der kinetischen Studien die Positionen A314, K315 und G319 sowie E304 besonders sorgfältig interpretiert werden müssen.

Bei der Expression, Aufreinigung und biochemischen Charakterisierung der Interaktionsmutanten zeigten sich keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Cytochrom  $c_{1CF}$  WT. Allerdings wies die spektroskopische Charakterisierung sowie die Bestimmung der Redoxpotentiale bei einigen Mutanten zum Teil erhebliche Abweichungen vom WT auf. Der Vergleich der Redoxdifferenzspektren zeigte eine leichte Verschiebung des  $\alpha$ -Peaks von 553 nm zu 552 nm bei den Mutanten V244Q und V244T, was auf eine veränderte Umgebung der Hämgruppe hindeutet. Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten ergab größere Abweichungen vom WT ( $\epsilon = 22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bei den Mutanten V244Q ( $\epsilon = 16,78 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), E243K ( $\epsilon = 24,28 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und V244T ( $\epsilon = 20,77 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), wobei E243K die einzige Erhöhung des Extinktionskoeffizienten im Vergleich zum WT aufwies. Ebenfalls größere Abweichungen zeigten die Mutanten S378A ( $\epsilon = 20,70 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und K315E ( $\epsilon = 20,55 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), wobei die zu dieser Position alternativen Mutanten K315T und das benachbarte A314S einen Koeffizienten ähnlich dem des WT besaßen. Die *charge transfer*-Spektren zur Detektion der Hämkoordination durch den distalen Met-Liganden wiesen Auffälligkeiten bei den Mutanten V244Q, V244T und E243K auf. Am stärksten wich das Spektrum der Mutante V244Q vom WT ab. Es zeigte einen ausgeprägten Peak bei 645 nm und eine kaum erkennbare Schulter bei 695 nm. Ebenfalls einen 645 nm-Peak wies E243K auf, allerdings war hier die 695 nm-Schulter im Vergleich zu V244Q etwas stärker ausgeprägt. V244T zeigte einen Peak bei 650 nm und eine gut erkennbare 695 nm-Schulter. Die Positionen E243 und V244 liegen direkt nebeneinander und in der Sequenz unmittelbar vor dem Häm-Bindemotiv. Die Einführung von Resten mit hohem Raumbedarf (Lysin und Glutamin), das Einbringen einer positiven Ladung (Lys) bzw. zusätzlicher, potentieller H-Brückendonoren bzw. -Akzeptoren (Gln) scheint in diesen Positionen Einfluss auf die Faltung und damit Umgebung der Hämgruppe zu nehmen und den distalen Met-Liganden leicht zu deplazieren. Die Bestimmung der Redoxpotentiale zeigte deutlich, wie empfindlich die Redox Eigenschaften der Hämgruppe auf Punktmutationen in ihrer Nähe auf der Proteinoberfläche reagieren. Von zehn Mutanten hatte die Hälfte (V244Q, V244T, A247N, K315E, G319A, S378A) ein verändertes Redoxpotential (siehe Tabelle 3.9), wobei in allen Fällen das Redoxpotential gegenüber dem des WT erniedrigt war. V244Q wies mit einer Differenz von 159 mV zum WT die stärkste Abweichung auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Mutanten des Cytochrom  $c_{1CF}$  mit Mutationen, die in der Sequenz dem Häm-Bindemotiv unmittelbar benachbart sind (E243K, V244Q und V244T, siehe Region I, Abbildung 4.3), spektroskopisch und redoxchemisch die größten Abweichungen zum WT aufweisen. Kleinere Unterschiede gegenüber dem WT treten im Bereich der Helix A (A314S, K315E/T, G319) auf.

#### 4.1.4 Cysteinmutanten des Cytochrom $c_{1CF}$ und des $c_{552F}$

Die Cysteinmutanten des Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  wurden hergestellt, um sie in kinetischen Studien mittels Ruthenium-Laserflash-Spektroskopie bzw. in FRET-Experimenten zur Gewinnung von Abstandsinformationen über den ET-Komplex einsetzen zu können. In beiden Ansätzen wurde jeweils ein exogenes Molekül (der photoaktive Rutheniumkomplex oder Fluoreszenzfarbstoffe) kovalent über die SH-

Gruppe des eingebrachten Cysteins an das Protein gekoppelt. Hierfür mussten folgende Bedingungen erfüllt sein: Das eingeführte Cystein musste neben den Cysteinen des Häm-Bindemotivs das einzige Cystein im Protein sein, um unspezifische und Vielfachkopplungen zu verhindern. Das Cystein musste oberflächenexponiert sein, damit es für die Kopplungsreagenzien zugänglich ist. Des weiteren sollte es sich in der Peripherie zur Hämspalte befinden, um die Komplexbildung und den ET nicht zu beeinflussen. Die Cysteinpositionen des Cytochrom  $c_{552F}$  wurden anhand der Kristallstrukturen (1QL3, 1QL4; *protein data bank*) ausgesucht, die des Cytochrom  $c_{1CF}$  mit Hilfe des Sequenzalignments und anhand der modellierten Strukturen. Die biochemische Charakterisierung zeigte wie schon bei den  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten keine Besonderheiten. Auch die Redoxdifferenzspektren der Cysteinmutanten glichen denen des jeweiligen  $c_{1CF}$  bzw.  $c_{552F}$  WT. Bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten traten jedoch größere Abweichungen zum  $c_1$ WT-Koeffizienten ( $\epsilon = 22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) für die Mutanten Q271C ( $\epsilon = 19,33 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und A356C ( $\epsilon = 18,43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) auf, die auf Veränderungen in der Umgebung der Hämgruppe schließen lassen, obwohl die Positionen Q271 und A356 in allen modellierten Strukturen klar in der Häm-Peripherie liegen. Die *charge transfer*-Spektren der  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten dagegen ähnelten alle dem des WT. Für die Cysteinmutanten des Cytochrom  $c_{552F}$  verhält es sich genau umgekehrt. Alle  $c_{552F}$ -Mutanten besaßen ähnliche Extinktionskoeffizienten wie der WT mit  $\epsilon = 21,16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Jedoch zeigten die *charge transfer*-Spektren der Mutanten K51C und N68C starke Abweichungen von dem des WT. Das Spektrum des  $c_{552F}$  WT wies anstatt der 695 nm-Bande eine zu längeren Wellenlängen verschobene Bande bei 703 nm auf. Diese war ebenfalls bei den Mutanten N23C und N91C klar erkennbar. Die beiden Mutanten K51C und N68C zeigten allenfalls eine sehr schwache Schulter, so dass man mutmaßen kann, dass die Einführung der zusätzlichen Cysteine an der Proteinoberfläche Auswirkungen auf die Hämkoordination durch das distale Met78 (Harrenga, Reincke *et al.* 2000) zu haben und dieses leicht deplaziert zu sein scheint.

Um die Zugänglichkeit und Reaktivität der eingeführten Oberflächencysteine zu testen, wurde ein SH-Assay durchgeführt, in dem der Farbstoff Fluorescein-5-maleimid kovalent an die jeweilige Cysteinmutante gekoppelt und anschließend spektroskopisch über Redoxdifferenz- und Absorptionsspektren die Kopplungsausbeute bestimmt wurde. Es zeigte sich, dass die Kopplungsraten der Cytochrom  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten insgesamt geringer ausfielen (11-38 %) als die der Cytochrom  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten (50-82 %), wobei allerdings schon der  $c_{552F}$  WT als Negativkontrolle eine unspezifische Kopplung von 11 % aufwies. Als Positivkontrolle diente iso-1 Cytochrom *c* aus Hefe, das als Isomerengemisch zu 95 % eine oberflächenexponierte Cystein-SH-Gruppe trägt (Healy, Helser *et al.* 1987). Auch die Kopplungsausbeute der Positivkontrolle betrug nur 70 %. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass entweder die Zugänglichkeit der SH-Gruppen der einzelnen Cysteinmutanten nicht ausreichend gewährleistet ist, was im Falle der Cytochrom  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten aufgrund einer fehlenden Struktur schwer zu beurteilen ist. Oder die Reaktivität und Spezifität von Fluorescein-5-maleimid mit SH-Gruppen unter den gegebenen Bedingungen ist nicht ausreichend, um eine nahezu 100 %ige, spezifische Kopplung an die SH-Gruppen zu gewährleisten. Im Falle der

kinetischen Studien mit Hilfe der photoaktiven Rutheniumverbindung wäre eine hohe Kopplungsrate wünschenswert, um Materialverlust zu vermeiden, da nur gekoppeltes Cytochrom  $c_{552F}$  für die Kinetiken eingesetzt werden kann, um die Geschwindigkeitskonstanten durch eine scheinbar höhere Konzentration an  $c_{552}$  nicht abzufälschen. Im Falle der FRET-Experimente wäre eine höhere Kopplungsausbeute ebenfalls wünschenswert, aber nicht zwingend notwendig, da nur die  $c_{1CF}/c_{552F}$ -Pärchen einen Energietransfer zeigen werden, die beide ein Fluorophor enthalten. Hierbei spielt vielmehr die Spezifität eine große Rolle, da Vielfachkopplung zu einer drastischen Verfälschung der Signale führen würde.

Die Cysteinmutanten des Cytochrom  $c_{552F}$  wurden zusätzlich noch in einem Oxidase-Aktivitätstest als Substrat eingesetzt, um zu testen, ob sich Unterschiede in der Wechselzahl beim Umsatz der Mutanten im Vergleich zum  $c_{552F}$  WT ergeben. Da angenommen wird, dass dieselbe Interaktionsfläche des Cytochrom  $c_{552F}$ , die mit der Oxidase in Wechselwirkung tritt, auch die Interaktion zum Cytochrom  $c_{1CF}$  vermittelt (Ferguson-Miller, Brautigan *et al.* 1976; Ferguson-Miller, Brautigan *et al.* 1978), diente der Oxidase-Aktivitätstest als indirektes Maß für die Reaktion zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c_{552}$ . Der Aktivitätstest ergab eine Wechselzahl von  $375\text{ s}^{-1}$  für den Umsatz vom  $c_{552F}$  WT. Der Umsatz der Mutanten N23C und N91C erbrachte Wechselzahlen von  $177\text{ s}^{-1}$  (N23C) und  $183\text{ s}^{-1}$  (N91C), was 47 % bzw. 49 % des WT-Umsatzes entspricht. Die Mutanten K51C und N68C wiesen eine so starke Autoxidation auf, dass sie während der Messung nicht redoxstabil waren und keine reproduzierbaren Umsatzraten lieferten. Dieses Verhalten könnte mit den abweichenden *charge transfer*-Spektren korrelieren, was darauf hindeutet, dass die Proteinfaltung und die Redoxigenschaften des Häms durch die Einführung der Oberflächencysteine in diesen Positionen empfindlich beeinflusst wurden.

Zusammenfassend zeigen die Cytochrom  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten keine größeren biochemischen und spektroskopischen Abweichungen vom WT, allerdings könnte die Zugänglichkeit der SH-Gruppen für die Kopplung mit thiolselektiven Reagenzien beeinträchtigt sein. Von den Cytochrom  $c_{552F}$ -Cysteinmutanten verhalten sich N23C und N91C spektroskopisch wie der  $c_{552F}$  WT, wobei sie eine zur Hälfte reduzierte Aktivität mit der Oxidase im Vergleich zum WT aufweisen. Die Mutanten K51C und N68C zeigen starke Abweichungen in der Hämkoordination und im autoxidativen Verhalten, so dass diese beiden Mutanten für das Ruthenium-Labeling in den kinetischen Studien nicht in Frage kommen.

#### 4.1.5 Cytochrom $c_{caa3}$ aus *T. thermophilus*

In Analogie zu den klonierten, löslichen Redoxfragmenten zur Untersuchung des ET zwischen Komplex III und IV der Atmungskette von *P. denitrificans*, ist im Rahmen dieser Arbeit die hydrophile C-terminale Cytochrom *c*-Domäne der Untereinheit Ilc der *caa3*-Oxidase aus *T. thermophilus* als lösliches Fragment kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert worden.

Lösliche Redoxfragmente der Atmungskette von *T. thermophilus* sind vormals erfolgreich generiert und als Modellsysteme zur Aufklärung der ET-Prozesse eingesetzt

worden. So konnte der ET zwischen dem löslichen Cytochrom  $c_{552}$  und der  $ba_3$ -Oxidase durch Stopped-Flow-Kinetiken unter Verwendung eines löslichen  $Cu_A$ -Fragmentes untersucht werden (Maneg, Ludwig *et al.* 2003). Ein lösliches Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragment (Mooser, Maneg *et al.* 2005) des kürzlich beschriebenen Cytochrom  $bc$ -Komplexes (Mooser, Maneg *et al.* 2006) wurde eingesetzt, um die ET-Reaktion zum Cytochrom  $c_{552}$  zu charakterisieren (Mooser, Maneg *et al.* 2005). In Anlehnung an diesen dynamischen Ansatz zur Klärung der ET-Prozesse innerhalb der aeroben Atmungskette von *T. thermophilus* wurde in dieser Arbeit das lösliche Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragment in kinetischen Studien eingesetzt, um die Wechselwirkung und die ET-Reaktion mit seinen potentiellen Redoxpartnern Cytochrom  $c_{bc}$  und  $c_{552}$  zu untersuchen.

Die Klonierung, Expression und Aufreinigung des löslichen Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes erfolgte nach der gleichen Strategie, die erfolgreich zur Herstellung der löslichen Redoxfragmente aus *P. denitrificans* angewendet worden war (siehe Abschnitt 4.1.2). Das Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragment besteht aus 107 Aminosäuren, hat ein errechnetes Molekulargewicht von 11,5 kDa und einen theoretischen pI von 5,04. Dieser liegt zwischen dem pI der hydrophilen Cytochrom  $c$ -Domäne innerhalb der  $caa_3$ -Oxidase mit pI = 4,7 und einem pI von 5,5 für die komplette Untereinheit IIC (Mather, Springer *et al.* 1991). Die Laufhöhe des Fragmentes im SDS-Gel spiegelt das errechnete Molekulargewicht von 11,5 kDa wider. Verifiziert wurde dieses durch MALDI-Massenspektrometrie, die eine molekulare Masse von 12,12 kDa mit und 11,57 kDa ohne Hämgruppe ergab. Das Hämbindemotiv CAACH, das sich im Fragment in Position 17-21 befindet, wurde bereits von Buse *et al.* (Buse, Hensel *et al.* 1989) durch Peptidanalyse in der Untereinheit IIC identifiziert. Als distaler Methioninligand, der die  $c$ -Hämgruppe koordiniert, wird Met73 angenommen (bezogen auf die Fragment-Nummerierung). Diese Annahme stützt sich auf Sequenzvergleiche zwischen dem C-Terminus der Untereinheit IIC der  $caa_3$ -Oxidase und Cytochrom  $c$ -Sequenzen, deren Strukturen bekannt sind (Mather, Springer *et al.* 1991). Der kovalente Hämeinbau in das Apocytochrom  $c_{caa3}$  wurde durch Hämfärbung bestätigt. Spektroskopisch lässt sich die  $c$ -Typ Hämgruppe des  $c_{caa3}$ -Fragmentes über eine  $\alpha$ -Bande bei 549 nm und einen über Pyridinhämochromspektren bestimmten Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{\text{red-ox}, 549-517 \text{ nm}} = 21,71 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  charakterisieren. Über UV/Vis-Redox titrationen konnte der  $\alpha$ -Peak des  $c$ -Typ Häms innerhalb der  $caa_3$ -Oxidase bei 548 nm bestimmt werden (Hellwig, Soulimane *et al.* 2002). Die leichte Verschiebung der Bande lässt sich durch das Herauslösen des Fragmentes aus dem Gesamtkomplex und die dadurch veränderte Umgebung des Häms erklären.

Die Redoxpotentiale des Fragmentes und der hydrophilen Domäne innerhalb der Oxidase unterscheiden sich drastisch. So wurde für das  $c_{caa3}$ -Fragment ein Redoxpotential von 78 mV ( $SHE'$ ) bestimmt, wohingegen das Mittelpunktspotential des  $c$ -Häms innerhalb der Oxidase bei 218 mV liegt (Yoshida and Fee 1985; Hellwig, Soulimane *et al.* 2002). Auch das lässt sich durch die Isolierung der Cytochrom  $c$ -Domäne aus dem Komplex erklären. Für das lösliche Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragment ist ein Mittelpunktspotential von 210 mV (Daniela Mooser, persönliche Mitteilung), für Cytochrom  $c_{552}$  sind 200 mV bzw. 230 mV (Hon-Nami and Oshima 1977; Fee, Chen *et al.* 2000) und für das  $Cu_A$ -Fragment 266 mV bzw. 240 mV (Slutter, Sanders *et al.*

1996); Maneg, Dissertation 2003) gemessen worden. Diese Potentiale sind damit alle wesentlich positiver als das des  $c_{caa3}$ -Fragmentes und reflektieren die Potentiale der hydrophilen Domänen innerhalb der jeweiligen Komplexe. Das Redoxpotential des löslichen  $c_{caa3}$ -Fragmentes spiegelt damit nicht die physiologischen Eigenschaften der hydrophilen Domäne innerhalb des Komplex wider. Für die *pre-steady state*-Untersuchungen mittels Stopped-Flow-Spektroskopie sind diese Unterschiede jedoch nicht bedeutend, da unter den gewählten Messbedingungen die ET-Reaktionen bimolekular ablaufen und die zeitlichen Unterschiede im ET innerhalb des Komplexes, die durch die Differenzen im Redoxpotential verursacht werden, mittels Stopped-Flow-Techniken nicht mehr aufgelöst werden können.

## 4.2 Kinetische Untersuchungen des ET zwischen Komplex III und IV der Atmungskette von *P. denitrificans* und *T. thermophilus* anhand löslicher Redoxfragmente

Aus den bislang gelösten Strukturen von Redoxproteinkomplexen (Pelletier and Kraut 1992; Axelrod, Abresch et al. 2002; Lange and Hunte 2002; Wienk, Maneg et al. 2003) lassen sich die folgenden generellen Aussagen über die Natur der Wechselwirkungen zwischen ET-Proteinen ableiten: Direkte Kontakte zwischen den Redoxpartnern werden hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen vermittelt, bei denen oft Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen eine zentrale, stabilisierende Rolle spielen. Die Kontaktfläche ist klein und besteht überwiegend aus unpolaren Aminosäuren. Innerhalb der Kontaktfläche sind die Aminosäureseitenketten nur locker gepackt, was eine Hydratisierung und damit die Auflösung des Komplexes erleichtert und dadurch den transienten Charakter der Wechselwirkung und schnellen Elektronenumsatz gewährleistet. Um der Diskrepanz zwischen den statischen Kristallstrukturen und der transienten Natur der ET-Komplexe gerecht zu werden, sind in der Vergangenheit dynamische Ansätze unter Verwendung löslicher ET-Fragmente gewählt worden, um die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Redoxpartnern der Atmungskette durch Mutagenesestudien, *pre-steady state*- und *turnover*-Kinetiken sowie Messung der Ionenstärkeabhängigkeit zu untersuchen (Lappalainen, Watmough et al. 1995; Drosou, Malatesta et al. 2002; Drosou, Reincke et al. 2002; Maneg, Ludwig et al. 2003; Maneg, Malatesta et al. 2004; Mooser, Maneg et al. 2005; Mooser, Maneg et al. 2006). Diese zeigten in den meisten Fällen eine starke Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten, so dass zusammen mit den Erkenntnissen aus den Kristallstrukturen folgender allgemeiner Mechanismus der transienten Komplexbildung abgeleitet werden konnte: Getrieben von weitreichenden, elektrostatischen Anziehungskräften nähern sich zwei Redoxpartner einander an und bilden ein Ensemble von verschiedenen Orientierungen zueinander, das man den sogenannten *Encounter*-Komplex nennt. Dabei spielen einzelne Ladungspärchen eine eher untergeordnete Rolle und die gerichtete Annäherung wird durch die Gesamtheit der Oberflächenladungen erreicht. Im *Encounter*-Komplex findet entlang der Kontaktflächen eine zweidimensionale Diffusion statt, die durch Ausbildung direkter, hydrophober Kontakte zum effizienten Komplex und nachfolgendem ET führt. Die lockere Packung der



Aminosäureseitenketten in der Kontaktfläche erleichtert die Rehydratisierung und schnelle Dissoziation des Komplexes, so dass ein schneller Umsatz gewährleistet ist.

Der Elektronentransfer zwischen zwei Redoxpartnern lässt sich generell in drei Phasen unterteilen: Assoziation, ET-Reaktion und Dissoziation der Redoxpartner. Durch die Aufnahme schneller Kinetiken im *pre-steady state* Bereich lassen sich die initialen ET-Prozesse zeitlich auflösen. So können die Assoziation und die ET-Reaktion detektiert und Informationen über die Art der Wechselwirkungen gewonnen werden. Im Falle eines stabil gebildeten Komplexes (z. B. bei niedriger Ionenstärke) kann der intramolekulare Elektronentransfer detektiert und so unabhängig von der Assoziation untersucht werden. Unter *pre-steady state*-Bedingungen werden keine Dissoziationsprozesse beobachtet. Der vollständige Elektronentransfer kann in *turnover*-Kinetiken untersucht werden.

#### 4.2.1 ET-Untersuchungen mittels Stopped-Flow-Spektroskopie

Zur Messung des schnellen Elektronentrfers zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und Cytochrom  $c_{552F}$  wurde das vormals etablierte Mess- und Auswertungsprotokoll (Eichhorn, Dissertation 2003) optimiert und den Besonderheiten dieses speziellen ET-Systems angepasst. Wie sich gezeigt hatte, ergaben sich sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Eichhorn, Dissertation 2003), so dass die Messtemperatur erniedrigt werden musste, um den Elektronentransfer zu verlangsamen und zeitlich auflösen zu können. Von der Möglichkeit, die Ionenstärke zur Verlangsamung der Reaktion zu erhöhen, wurde abgesehen, da weiterhin die Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten untersucht wurde und dafür anfangs niedrige Ionenstärkebedingungen notwendig waren. Um die Autoxidation der Hämgruppen zu minimieren, wurde zum einen unter sauerstoffarmen Bedingungen unter Verwendung von mit Stickstoff gespülten Puffern gearbeitet. Zum anderen wurde Cytochrom  $c_{1CF}$  mit Ascorbat vorreduziert, wie es von Maneg *et al.* (Maneg, Ludwig *et al.* 2003) für das Cytochrom  $c_{552F}/\text{Cu}_A$ -System etabliert worden war. Die Reduktion mit Ascorbat brachte den Vorteil eines definierten Redoxzustandes und damit der Kenntnis der initialen Konzentration an reduziertem Cytochrom  $c_{1CF}$ . Der Redoxzustand des Cytochrom  $c_{552F}$  wurde durch Absorptionsspektren bestimmt und in der Auswertung berücksichtigt, da sich herausgestellt hatte, dass jenes schon bis zu 30 % reduziert vorlag. Das Problem der spektralen Überlappung wurde durch die Aufnahme von Doppeldifferenzspektren umgangen, die für jedes  $c_{1CF}/c_{552F}$ -Redoxpaar Differenzwellenlängen im Soretbereich aufzeigten, mit denen sich selektiv die Oxidation oder Reduktion eines der beiden Cytochrome detektieren ließ. Die Verwendung der Differenzwellenlängen im Soretbereich führte allerdings zu dem Problem, dass geringe Signalamplituden vor dem Hintergrund einer sehr hohen Grundabsorption detektiert wurden, da die Cytochrome im Soretbereich hohe Extinktionskoeffizienten aufweisen. So musste mit niedrigen Konzentrationen im äquimolaren Bereich gearbeitet werden, die dazu führten, dass die Kinetiken nicht unter *pseudo-first order (PFO)*-Bedingungen aufgenommen werden konnten. Unter *PFO*-Bedingungen wäre die Auswertung durch eine monoexponentielle Funktion möglich gewesen. Unter den nun vorherrschenden *non-pseudo first order (non-PFO)*-

Bedingungen lassen sich die Zeitverläufe nicht mehr durch eine solche Funktion beschreiben und weichen klar vom monoexponentiellen Verhalten ab. Aus diesem Grund wurde die Auswertung mit Hilfe von Gleichungen vorgenommen, die die Abweichung des experimentellen Systems von den *PFO*-Bedingungen berücksichtigen (Malatesta 2005) und zudem noch die effektiven Konzentrationen an vollständig reduziertem und oxidiertem Cytochrom miteinbezogen. Unter Verwendung dieses Mess- und Auswertungsprotokolls wurden komplette Ionenstärkeabhängigkeiten gemessen, um den Einfluss der eingeführten Mutationen der Cytochrom  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten auf die Wechselwirkung zum Cytochrom  $c_{552F}$  untersuchen zu können.

#### 4.2.2 ET-Untersuchungen mittels Laserflash-Spektroskopie

Da der schnelle ET zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und Cytochrom  $c_{552F}$  mittels Stopped-Flow-Spektroskopie nur schwer zeitlich aufzulösen war und ein Großteil der Reaktion innerhalb der Totzeit des Spektrometers ablief, wurde der ET dieses Redoxpaares zusätzlich mit Hilfe der Ruthenium-Laserflash-Spektroskopie untersucht.

Diese Methode war schon vorher erfolgreich angewandt worden, um schnelle ET-Kinetiken innerhalb von Redoxproteinkomplexen oder zwischen zwei Redoxproteinen zu messen. So sind mit dem Cytochrom *c*-Derivat Ru<sub>2</sub>-H39C-Cc aus Hefe, an das über ein eingeführtes Oberflächencystein eine photoaktive Rutheniumverbindung kovalent gekoppelt worden war, die Wechselwirkungen zur Cytochrom *c*-Peroxidase (Wang, Mei *et al.* 1996) kinetisch untersucht worden. ET-Prozesse innerhalb von *bc*<sub>1</sub>-Komplexen aus verschiedenen Organismen sind mit Hilfe einer dimeren Rutheniumverbindung charakterisiert worden, die durch elektrostatische Anziehung an saure Oberflächenreste des Cytochrom *c*<sub>1</sub> bindet und dieses nach Laseranregung photooxidiert (Sadoski, Engstrom *et al.* 2000; Tian, Sadoski *et al.* 2000; Engstrom, Xiao *et al.* 2002; Xiao, Engstrom *et al.* 2003). Die ET-Reaktion zwischen Cytochrom *c* und *bc*<sub>1</sub>-Komplexen aus Rind und *R. sphaeroides* wurde unter Verwendung des Ru<sub>2</sub>-H39C-Cc-Derivates spezifiziert (Tian, Sadoski *et al.* 2000; Engstrom, Rajagukguk *et al.* 2003).

Die Laserflash-Methode bringt eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Stopped-Flow-Technik. Zum einen erreicht man die zeitliche Auflösung von Reaktionen im sub-ms-Bereich. Zum anderen ist das Redoxsystem regenerierbar, so dass durch mehrmalige Laseranregung Daten akkumuliert werden können und gleichzeitig der Materialverbrauch (z. B. rekombinante Proteine, die nur mit geringer Ausbeute exprimiert werden können) gering bleibt. Ein Nachteil ist sicherlich, dass im Gegensatz zur Stopped-Flow-Technik mit einem artifiziellen Redoxpartner (in diesem Fall Cytochrom  $c_{552F}N23C$ , an das kovalent die Rutheniumverbindung gekoppelt wurde) gearbeitet werden muss. Da allerdings, wie im Rahmen dieser Arbeit, sowohl der  $c_{1CF}$ WT als auch sämtliche Mutanten gegen dasselbe Ru-Cc-Derivat gemessen wurden, bleibt die Vergleichbarkeit innerhalb des Systems erhalten.

Das Mess-System mit seinen Mediatoren und Redoxkomponenten zur Untersuchung des schnellen ET zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  ist empfindlich gegenüber jeglicher Veränderung in der Zusammensetzung und die Komponenten sind sorgfältig

zusammengestellt worden. So sind in der Vergangenheit eine Reihe von Rutheniumkomponenten mit verschiedenen Redoxeigenschaften synthetisiert worden (Millett and Durham 2002), von denen für diesen Zweck das Ru<sub>z</sub> (Ru(2,2'-bipyrazin)<sub>2</sub>(4-bromomethyl-4'-methyl-2,2'-bipyridin)) ausgesucht wurde, das bei Laseranregung die Hämgruppe des Cytochrom *c*<sub>552F</sub>N23C photooxidiert und dadurch den ET in der physiologischen Richtung vom Cytochrom *c*<sub>1CF</sub> zum *c*<sub>552F</sub> induziert.

Die Mediatoren, die erstens für die Regeneration der beiden *c*-Typ Hämgruppen und zweitens der Rutheniumkomponente sorgen, wurden anhand ihrer Redoxeigenschaften ausgesucht und vorher getestet, ob sie die eigentliche ET-Reaktion nicht beeinflussen (siehe 3.7.3). Ascorbat und TMPD wurden als Mediatoren zur Regeneration der Hämgruppen ausgewählt. Diese stellen mit ihren Redoxpotentialen und in den verwendeten Konzentrationen (60 mV/100 μM bis 1,1 mM (Ascorbat) und 27 mV/2 μM (TMPD)) ein gutes Redoxsystem dar, um die Hämgruppen des Cytochrom *c*<sub>552F</sub> und des Cytochrom *c*<sub>1CF</sub>WT mit einem Redoxpotential  $E_0'$  von 268 mV bzw. 189 mV zu reduzieren. Da die Redoxpotentialen der *c*<sub>1CF</sub>-Mutanten allerdings über einen Bereich von 39-189 mV schwanken, war es in einigen Fällen nur bei hohen Salzkonzentrationen möglich, das entsprechende *c*<sub>1CF</sub>-Häm vollständig zu reduzieren. Da die Konzentration des reduzierten Cytochrom *c*<sub>1CF</sub> aber maßgeblich zur Bestimmung der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten in der Auswertung beiträgt, wurde der *c*<sub>1CF</sub>-Redoxzustand für jede Anregungsserie bestimmt und die effektive Konzentration an reduziertem Cytochrom berechnet. Zur Regeneration der Rutheniumkomponente wurde Paraquat eingesetzt. Mit einem Redoxpotential von  $E_0' = 0$  mV ist es in der Lage, sowohl Ru<sup>I</sup> zu Ru<sup>II</sup> ( $E_0'(\text{Ru}^{\text{I}}/\text{Ru}^{\text{II}}) = -79$  mV) als auch Ru<sup>II\*</sup> zu Ru<sup>III</sup> ( $E_0'(\text{Ru}^{\text{II}*}/\text{Ru}^{\text{III}}) = -25$  mV) zu oxidieren.

Die Detektionswellenlängen (550 nm und 558 nm) wurden anhand eines kinetischen Differenzspektrums und der vorher bestimmten isosbestischen Punkte für Cytochrom *c*<sub>552F</sub> und *c*<sub>1CF</sub> ausgewählt. Das kinetische Differenzspektrum zeigte Maxima und Minima bei 550 nm und 556 nm. Das Spektrum ähnelt denen der Redoxpaare *bc*<sub>1</sub>(Hefe)/Ru<sub>z</sub>-39-Cc (Hefe) und *bc*<sub>1</sub>(Rind)/Ru<sub>z</sub>-39-Cc (Pferd) mit Maxima und Minima bei 550/557 nm bzw. 548/556 nm (Engstrom, Rajagukguk *et al.* 2003). Für die Redoxpaare der *bc*<sub>1</sub>-Komplexe aus Rind und *R. sphaeroides* mit Ru<sub>z</sub>-72-Cc aus Hefe zeigten sich Maxima und Minima bei 546 nm und 556 nm (Tian, Sadoski *et al.* 2000).

Für die Laserflashmessungen wurde das von Heacock *et al.* (Heacock, Liu *et al.* 1993) etablierte Detektionssystem verwendet und in der Auswertung jegliche Änderungen des Messvolumens, der Konzentrationen und der Ionenstärke (durch Zugabe von Salz und/oder Verdünnungsschritten) sowie der Redoxzustand des Cytochrom *c*<sub>1CF</sub> und damit die effektive Konzentration an reduziertem *c*<sub>1</sub>-Häm berücksichtigt, um eine genaue mathematische Beschreibung und Auswertung der ET-Prozesse gewährleisten zu können.

### 4.2.3 ET zwischen Cytochrom $c_{1CF}$ WT und $c_{552F}$

#### Stopped-Flow

Zunächst wurde die Kinetik der Cytochrom  $c_{1CF}$ -Reduktion durch Ascorbat aufgenommen und ausgewertet, um sicherzugehen, dass die eigentliche ET-Reaktion zum  $c_{552F}$  nicht durch die Ascorbatreduktion beeinflusst wird. Hierbei handelte es sich um eine Reaktion unter wahren *PFO*-Bedingungen, da Ascorbat in einem 1000-fachen Überschuss zum Cytochrom  $c_{1CF}$  eingesetzt wurde. Die Zeitverläufe konnten durch eine monoexponentielle Funktion ausgewertet werden und ergaben Geschwindigkeiten  $k_{obs}$  von  $0,0045 \text{ s}^{-1}$  bis  $0,0093 \text{ s}^{-1}$  und eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante  $k_{asc}$  von  $2,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , diese ist somit langsam genug, um den ET zum  $c_{552F}$  nicht zu beeinflussen. Die Reduktion des Cytochrom  $c_{1CF}$  ist etwa 60 mal langsamer als die Reduktion des Cytochrom  $c_{552F}$  mit einer bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten von  $k_{asc} = 150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und etwa 25 mal langsamer als die Reduktion des  $\text{Cu}_A$ -Fragmentes aus *P. denitrificans* mit  $62 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Maneg, Ludwig *et al.* 2003). Die Reduktion der homologen Redoxfragmente aus *T. thermophilus* mit Ascorbat ergibt Geschwindigkeitskonstanten von  $77 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für das  $\text{Cu}_A$ -Fragment,  $326 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für Cytochrom  $c_{552}$  (Maneg, Ludwig *et al.* 2003) und  $2830 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für das Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragment (Mooser, Maneg *et al.* 2005), die damit alle wesentlich schneller sind als die Reduktion des Cytochrom  $c_{1CF}$ . Der Vergleich der Redoxpotentiale zeigt, dass Cytochrom  $c_{1CF}$ WT das niedrigste Redoxpotential in der Reihe der löslichen Redoxfragmente aufweist und ebenso die geringste Geschwindigkeitskonstante der Ascorbat-Reduktion (siehe Tabelle 4.1). Allerdings ist keine direkte Korrelation zwischen der absoluten Potentialdifferenz (Ascorbat/Redoxfragment) und der Größe der Geschwindigkeitskonstante  $k_{asc}$  festzustellen. Die verschiedenen Ascorbat-Reduktionsraten können auch durch eine unterschiedliche Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppen für Ascorbat zustande kommen. Es zeigt sich aber, dass Ascorbat mit einem Redoxpotential von 60 mV alle sechs Redoxfragmente reduzieren kann und alle Geschwindigkeitskonstanten in einem Bereich liegen, in dem die ET-Reaktionen der Fragmente miteinander auf der ms-Zeitskala nicht beeinflusst wird.

**Tabelle 4.1: Vergleich der Redoxpotentiale löslicher Redoxfragmente**

Redoxpotentiale und Geschwindigkeitskonstanten der Reduktion löslicher Redoxfragmente aus *P. denitrificans* und homologer Fragmente aus *T. thermophilus* mit Ascorbat

	Ascorbat	<i>P. denitrificans</i>			<i>T. thermophilus</i>		
		$c_{1CF}$	$c_{552F}$	$\text{Cu}_A$	$c_{bc}$	$c_{552}$	$\text{Cu}_A$
$k_{asc} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$		2,4	150	62	2830	326	77
$E_0' [\text{mV}]$	60	189	266	240	210	230	266

Die ET-Reaktion des Cytochrom  $c_{1CF}$  WT mit  $c_{552F}$  wurde mittels Stopped-Flow-Spektroskopie in einem Ionenstärkebereich von 68-318 mM nach dem oben beschriebenen optimierten *non-PFO*-Protokoll untersucht und ausgewertet (siehe 3.6.4). Es ließen sich Geschwindigkeiten  $\eta$  von  $14 \text{ s}^{-1}$  (300 mM KCl) bis etwa  $1000 \text{ s}^{-1}$  (50 mM KCl) bestimmen, was bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  von  $2,25 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (300 mM KCl) bis  $2,25 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (50 mM KCl) ergab und die Geschwindigkeitskonstanten damit erstens im Bereich einer diffusionskontrollierten Reaktion liegen und

zweitens eindeutig eine Abhängigkeit von der Ionenstärke zeigen. Durch die Brønsted-Analyse wurde ein Ionenprodukt  $z_A z_B$  von etwa -4 ermittelt, was einer Beteiligung von zwei effektiven Ladungen gegensätzlichen Vorzeichens pro Redoxpartner an der ET-Reaktion entspricht. Aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  zu  $k_{rev}$  konnte aus den kinetischen Daten je nach Salzbedingungen eine Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 28-38 ermittelt werden. Dieser Wert wurde durch die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten aus Doppeldifferenzspektren ( $K_{eq} = 30-70$ ) bestätigt (siehe 3.6.5). Das Gleichgewicht der Reaktion liegt damit weit auf der Seite des reduzierten Cytochrom  $c_{552F}$ . Aus diesem Grund war es nicht möglich, die Rückreaktion (ET vom reduzierten Cytochrom  $c_{552F}$  auf Cytochrom  $c_{1CF}$ ) zu messen, da die ohnehin schwachen ET-Signale durch die ungünstige Gleichgewichtslage nicht mehr detektierbar waren.

Generell konnten die zuvor nach dem alten Protokoll erhaltenen Werte für die ET-Reaktion zwischen  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  bestätigt werden (Eichhorn, Dissertation 2003). So war bereits für den Elektronentransfer zwischen  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  bei einer konstanten Ionenstärke von 46 mM eine Geschwindigkeitskonstante von  $3,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ermittelt worden. Die Brønsted-Analyse in einem Ionenstärkebereich von 25-200 mM bei konstanter  $c_{552F}$ -Konzentration hatte ein Ionenprodukt  $z_A z_B$  von -5,4 und daraus resultierend 2,3 effektive Ladung pro Redoxpartner ergeben, die an der Wechselwirkung beteiligt sind. Die Brønsted-Auftragung hatte ebenfalls andeutungsweise zwei unterschiedliche kinetische Phasen gezeigt, die aber damals nicht als solche erkannt und interpretiert worden waren: Eine schnelle Phase mäßiger Ionenstärkeabhängigkeit bei sehr niedrigen Ionenstärken im Bereich von 25 bis etwa 50 mM und eine langsamere Phase stärkerer Ionenstärkeabhängigkeit bei Ionenstärken oberhalb von 50 mM. Dieses Verhalten könnte auf einen *Encounter*-Komplex bei niedrigen Ionenstärken hindeuten, der über einen gewissen Ionenstärkebereich stabil ist und schnellen ET gewährleistet. Die zweite langsamere Phase entspricht der bimolekularen ET-Reaktion.

Da in dieser Arbeit die Ionenstärkeabhängigkeit in einem Bereich unterhalb von 50 mM nicht gemessen wurde, kann nur die zweite, bimolekulare Phase zum Vergleich herangezogen werden. Die Biphasizität der Brønsted-Analyse führt auch dazu, dass der Vergleich der extrapolierten  $k_0$ -Werte der bimolekularen Reaktion hinfällig wird, da sie nicht der Situation bei niedrigen Ionenstärken entsprechen.

**Tabelle 4.2: Vergleich von PFO- und non-PFO-Auswertung**

Vergleich der durch PFO- und non-PFO-Auswertung erhaltenen kinetischen Parameter für die ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$

Analyse	Geschwindigkeitskonstante	$k_0$	$z_A z_B$	Effektive Ladungen
PFO*	$k_{obs} [\text{s}^{-1}]$	$5,87 \cdot 10^3$	-5.4	2.3
non-PFO	$\eta [\text{s}^{-1}]$	$5,76 \cdot 10^3$	-4.8	2.2
non-PFO	$k_{on} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$1,65 \cdot 10^9$	-4.0	2.0

\* Stopped-Flow-Messungen und Auswertung Eichhorn, Dissertation 2003

Für die ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{552F}$  und dem löslichen  $\text{Cu}_A$ -Fragment aus *P. denitrificans* (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004) wurden ähnliche kinetische Daten erhalten wie für das  $c_{1CF}/c_{552F}$ -System. Der ET läuft bei

Ionenstärken zwischen 10 und 200 mM mit Geschwindigkeitskonstanten zwischen  $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die physiologische Richtung und  $1,8 \cdot 10^7$  und  $6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Rückrichtung ab und ist damit etwas langsamer als die Reaktion des  $c_{1CF}/c_{552F}$ -Paares. Die daraus resultierende Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 0,2 zeigt eine Gleichgewichtslage zugunsten des reduzierten Cytochrom  $c_{552F}$  auf. Die Brønsted-Analyse ergibt auch hier ein Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -4,6, was einer Beteiligung von etwa 2,2 effektiven Ladungen pro Redoxpartner an der ET-Reaktion entspricht. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass dieselbe Interaktionsfläche des  $c_{552F}$ , die mit dem  $\text{Cu}_A$ -Fragment wechselwirkt, auch mit dem Cytochrom  $c_{1CF}$  in Wechselwirkung tritt (Margoliash, Ferguson-Miller *et al.* 1976).

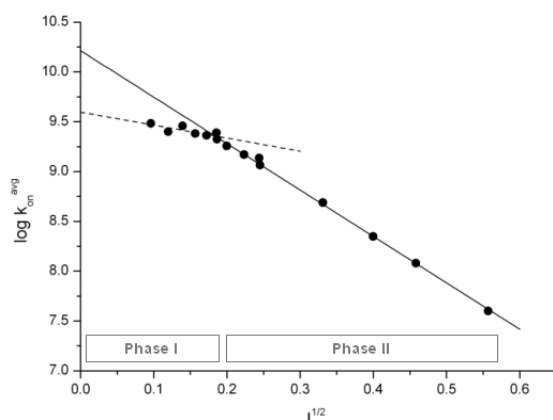
**Tabelle 4.3: Kinetische Parameter der ET-Reaktionen zwischen  $c_{1CF}$ ,  $c_{552F}$  und  $\text{Cu}_A$**

Vergleich der durch Stopped-Flow-Messungen erhaltenen kinetischen Parameter der ET-Reaktionen der löslichen Fragmente  $c_{1CF}$ ,  $c_{552F}$  und  $\text{Cu}_A$  aus *P. denitrificans*

Redoxpaar	$c_{1CF} \rightleftharpoons c_{552F}$	$c_{552F} \rightleftharpoons \text{Cu}_A$
$k_{\text{for}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$2,3 \cdot 10^8$ bis $2,3 \cdot 10^6$ ( $I = 50\text{-}300 \text{ mM}$ )	$4 \cdot 10^6$ bis $9 \cdot 10^4$ ( $I = 10\text{-}200 \text{ mM}$ )
$k_{\text{rev}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$6,4 \cdot 10^6$ bis $4,3 \cdot 10^5$ ( $I = 50\text{-}300 \text{ mM}$ )	$1,8 \cdot 10^7$ bis $6 \cdot 10^5$ ( $I = 15\text{-}200 \text{ mM}$ )
$K_{eq}$	30-70	0,2
$z_{AZB}$	-4,0	-4,6
effektive Ladungen	2	2,2

### Ru-Laserflash-Kinetiken

Die Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit der WT-Reaktion ergibt ein biphasisches Brønsted-Diagramm mit einer schnellen Phase geringer Ionenstärkeabhängigkeit bei niedrigen Ionenstärken (Phase I) und einer langsameren Phase stärkerer Ionenstärkeabhängigkeit bei mäßigen bis hohen Ionenstärken (Phase II) (siehe Abbildung 4.1).



WT-Parameter	Phase I	Phase II
$I [\text{mM}]$	$< 35$	$> 35$
$k_{obs} [\text{s}^{-1}]$	$1\text{-}2 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^2\text{-}3 \cdot 10^4$
$k_{on} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$1,6\text{-}3,7 \cdot 10^9$	$3,6 \cdot 10^7\text{-}3,2 \cdot 10^9$
$k_0 [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$4 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^{10}$
$z_{AZB}$	-1,3	-4,7
eff. Ladungen	1,1	2,2

**Abbildung 4.1: Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$ -WT und  $c_{552F}$**

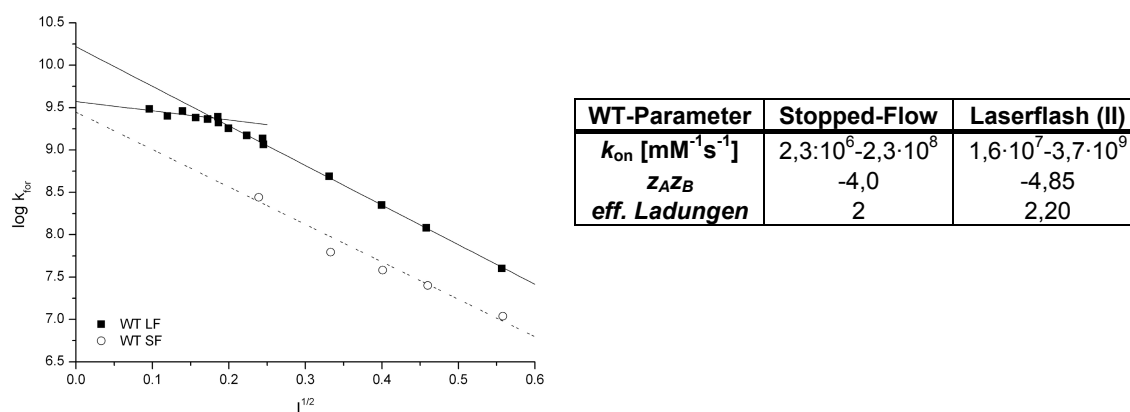
Brønsted-Analyse der Laserflash-Daten für die ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$ -WT und  $c_{552F}$

Phase I bei Ionenstärken  $< 35 \text{ mM}$  weist Geschwindigkeiten  $k_{obs}$  von  $1\text{-}2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  auf, was sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  von  $1,6$  bis  $3,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ergibt. Der  $k_0$ -Wert liegt bei etwa  $4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und die Ionenstärkeabhängigkeit weist eine Beteiligung von etwa einer effektiven Ladung pro Redoxpartner auf. Die Geschwindigkeiten von

Phase II erstrecken sich in einem Ionenstärkebereich von 35 bis 350 mM von  $3 \cdot 10^2$  bis  $3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ , ebenso die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  von  $3,6 \cdot 10^7$  bis  $3,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Ionenstärkeabhängigkeit ist stärker ausgeprägt und ergibt etwa 2 effektive Ladungen pro Redoxpartner und einem  $k_0$ -Wert von  $1,6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Beide Phasen unterscheiden sich um eine effektive Ladung und zeigen somit ein unterschiedliches Ionenstärkeverhalten. Die hohen ET-Raten und die geringer ausgeprägte Ionenstärkeabhängigkeit von Phase I legen einen *Encounter*-Komplex nahe, der innerhalb eines Bereichs niedriger Ionenstärke beständig ist und schnellen ET gewährleistet, während bei Erhöhung der Ionenstärke der *Encounter*-Komplex zerfällt und die Reaktion bimolekular wird, was sich an den geringeren Geschwindigkeitskonstanten und der stärkeren Ionenstärkeabhängigkeit zeigt. Interessanterweise konnte ein solcher *Encounter*-Komplex in Messungen zum Nachweis der Bimolekularität der ET-Reaktion nicht beobachtet werden. Hier war bei Bedingungen niedriger Ionenstärke ( $I = 10 \text{ mM}$ ) schrittweise die Konzentration an Cytochrom  $c_{1CF}$  in der Küvette erhöht worden und es hatte sich eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der  $c_{1CF}$ -Konzentration ergeben. Dies lässt vermuten, dass der *Encounter*-Komplex zwischen den beiden löslichen Fragmenten auf *P. denitrificans* nicht sehr stabil ist. Ein stabiler Komplex zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$ WT und  $c_{552F}$  konnte vormals durch analytische Gelfiltration und Ultrazentrifugation ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Eichhorn, Dissertation 2003). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Cytochrom  $c_{1CF}$  mit einem Ruthenium-markierten Cytochrom  $c$ -Derivat aus Hefe ( $\text{Ru}_z\text{-H39C-Cc}$ ) über einen weiten Ionenstärkebereich einen stabilen Komplex bildet und schneller intrakomplexer ET stattfindet (Quan Yuan & Francis Millett, persönliche Mitteilung, siehe Abschnitt 4.2.5).

Die Biphazizität der ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  war schon zuvor in SF-Experimenten beobachtet, bei der Auswertung aber vernachlässigt worden (Eichhorn, Dissertation 2003). Während der in dieser Arbeit durchgeführten SF-Experimente ist das biphasische Verhalten nicht aufgetreten, da zugunsten der zeitlichen Auflösung der Reaktion hohe Ionenstärken gewählt worden waren (50-500 mM). Die zwei Phasen legen jedoch nahe, in der Brønsted-Auswertung die gemessenen Geschwindigkeiten und die aus ihnen berechneten Geschwindigkeitskonstanten der bimolekularen Phase miteinander zu vergleichen und nicht die  $k_0$ -Werte dafür heranzuziehen, da dies extrapolierte hypothetische Werte sind, die sich für die beiden Phasen stark unterscheiden. So wäre der  $k_0$ -Wert der zweiten Phase viel höher als der der ersten Phase, die jedoch das Verhalten der beiden Redoxpartner bei niedrigen Ionenstärken widerspiegelt.

Phase II der LF-Experimente entspricht der bimolekularen Reaktion der SF-Ergebnisse (siehe Abbildung 4.2). Die Geschwindigkeitskonstanten der LF-Experimente liegen höher als die der SF-Experimente, da die SF-Messungen bei  $<10 \text{ }^\circ\text{C}$  und die LF-Experimente bei RT durchgeführt wurden. Aus beiden Methoden ergeben sich übereinstimmend etwa 2 effektive Ladungen pro Redoxpartner, die an der intermolekularen Wechselwirkung beteiligt sind.



**Abbildung 4.2: Vergleich der Brønsted-Daten aus Stopped-Flow- und Laserflash-Experimenten**  
Vergleich von Stopped-Flow- (offene Kreise) und Laserflash-Ergebnissen (Quadrate) für die ET-Reaktion von Cytochrom  $c_{1CF}WT$  mit  $c_{552F}$

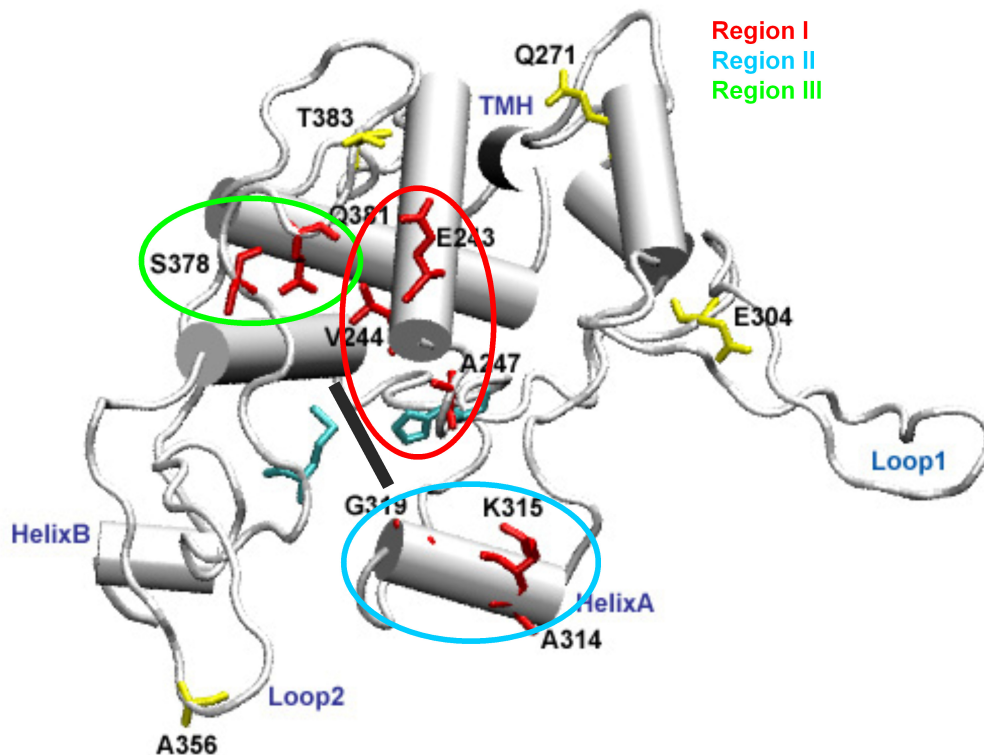
Da die Kinetiken der beiden Methoden aus experimentellen Gründen bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen und bei der Laserflash-Methode mit einem modifizierten Cytochrom  $c_{552F}$  gearbeitet wurde, können die absoluten Geschwindigkeitskonstanten nicht direkt miteinander verglichen werden. Für die Gesamtinterpretation der kinetischen Mutanten-Effekte wurde deshalb die Aktivität prozentual zur WT-Aktivität (gemessen mit der jeweiligen Methode) in Beziehung gesetzt. Das Ionenprodukt und die sich daraus ergebenden effektiven Ladungen sind durch die Temperatur nicht beeinflusst und können daher in beiden Methoden direkt miteinander verglichen werden.

#### 4.2.4 Charakterisierung des ET durch $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten

Die Aminosäurereste des Cytochrom  $c_{1CF}$ , die potentiell an der Wechselwirkung zu Cytochrom  $c_{552F}$  beteiligt sind und in dieser Arbeit mutiert wurden, lassen sich in drei Regionen zusammenfassen (siehe Abbildung 4.3): Region I liegt oberhalb und leicht rechts von der Hämspalte und umfasst die Mutationen E243K, V244Q/T und A247N. Region II entspricht in den modellierten Strukturen Helix A und beinhaltet die Mutationen A314S, K315E/T und G319A. Region III befindet sich links oberhalb der Hämspalte und schließt die Mutationen S378A und Q381V ein.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Stopped-Flow- und Ruthenium-Laserflash-Kinetiken miteinander verglichen und die Mutationen der drei verschiedenen Regionen auf ihren kinetischen Effekt hin diskutiert. Dabei wurde den LF-Daten mehr Gewicht verliehen, da für die Brønsted-Analyse der SF-Daten oftmals nur wenige Datenpunkte verwendet werden konnten oder die Streuung dieser sehr groß war, so dass die Interpretation sich als schwierig erwies.





**Abbildung 4.3: Zusammenfassung der mutierten Aminosäurereste im  $c_{1CF}$  in drei Hauptregionen**

Markiert sind die Regionen I bis III; Interaktionsmutationen in rot, Hämliganden in cyan und Cysteinmutationen in gelb (die *P. denitrificans*  $c_1$ -Sequenz wurde auf die Hefe 1KYO-Struktur mit Hilfe des Programmes Swissmodel (Expasy) modelliert, wobei das Häm nachträglich als Balken in die Struktur modelliert wurde).

#### 4.2.4.1 Region I: E243K, V244Q/T und A247N

Aus Vergleichen der Strukturmodelle (siehe Abschnitt 3.2.1.2) kann man erkennen, dass sich die Orientierungen dieser drei Aminosäurepositionen in allen Strukturen gleichen. E243 ist auf der potentiellen Interaktionsfläche exponiert, während V244 zwischen zwei Helices begraben wird und sich eher im Proteininneren befindet. A247 weist in die Hämspalte senkrecht zur Hämebene hinein. Das Sequenzalignment zeigt, dass Glutamat 243 (Ausnahme *bos taurus*: Q) und Valin 244 konserviert sind. Beide Reste befinden sich unmittelbar vor dem Hämbindemotiv, während Alanin 247 sich innerhalb dieses Motivs vor dem zweiten Cystein befindet und nicht konserviert ist:

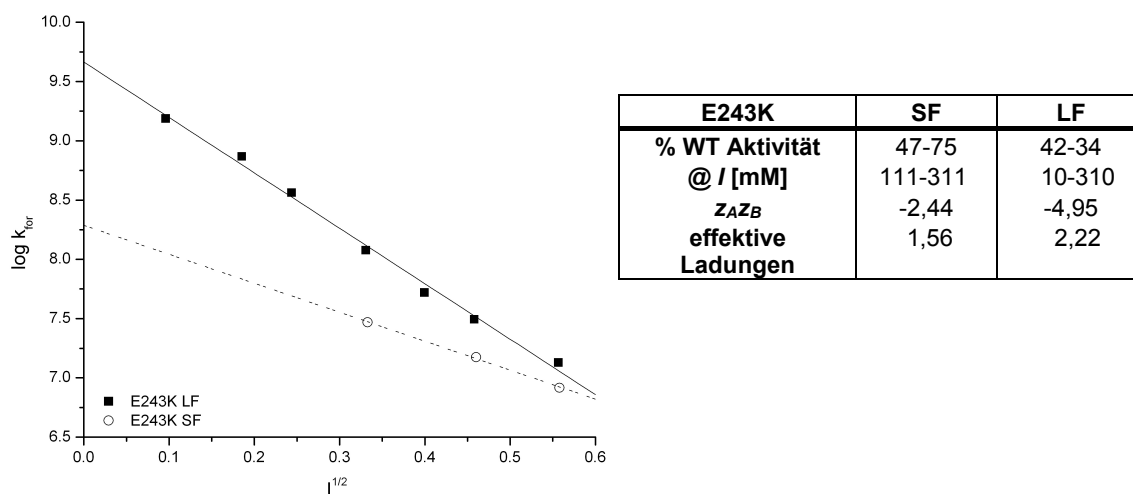


#### E243K

Spektroskopisch fällt die Mutante E243K lediglich durch einen leicht erhöhten Extinktionskoeffizienten im Vergleich zum WT (24,3 statt 22,8  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und einen ausgeprägten Peak bei 650 nm bei gleichzeitiger Anwesenheit der 695 nm-Bande im *charge transfer*-Spektrum auf. Das Redoxpotential entspricht dagegen dem des WT mit 189 mV. Dies deutet darauf hin, dass durch die Einführung eines Lysins anstelle des Glutamats und der damit verbundenen Ladungsumkehr sowie dem erhöhten

Raumbedarf keine größere Beeinflussung der Faltung oder der Redoxeigenschaften der Hämgruppe aufgetreten sind.

Die SF-Ergebnisse zeigen eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten gegenüber dem WT von 47-75 % bei steigender Ionenstärke. Die Brønsted-Analyse ergibt eine Beteiligung von 1,6 effektiven Ladungen pro Redoxpartner an der ET-Reaktion. Allerdings konnten aufgrund der schlechten Auflösung nur drei Datenpunkte in der Brønsted-Analyse verwendet werden, so dass die Auswertung schwierig ist und mit einem Fehler behaftet sein kann, obwohl die Datenpunkte auf einer Geraden liegen und die Streuung nicht allzu groß zu sein scheint.



**Abbildung 4.4: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von E243K mit C<sub>552F</sub>**

Vergleich der kinetischen Parameter von E243K aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Die generelle Verringerung der Raten werden durch die LF-Ergebnisse bestätigt. Hier zeigt sich in der Brønsted-Analyse eine konstante Erniedrigung der Geschwindigkeitskonstanten auf 34-42 % mit steigender Ionenstärke im Vergleich zum WT. Das Ionenprodukt ergibt 2,2 effektive Ladungen, womit die Ionenstärkeabhängigkeit der des WT gleicht. Die SF- und LF-Ergebnisse sind vergleichend in Abbildung 4.4 dargestellt.

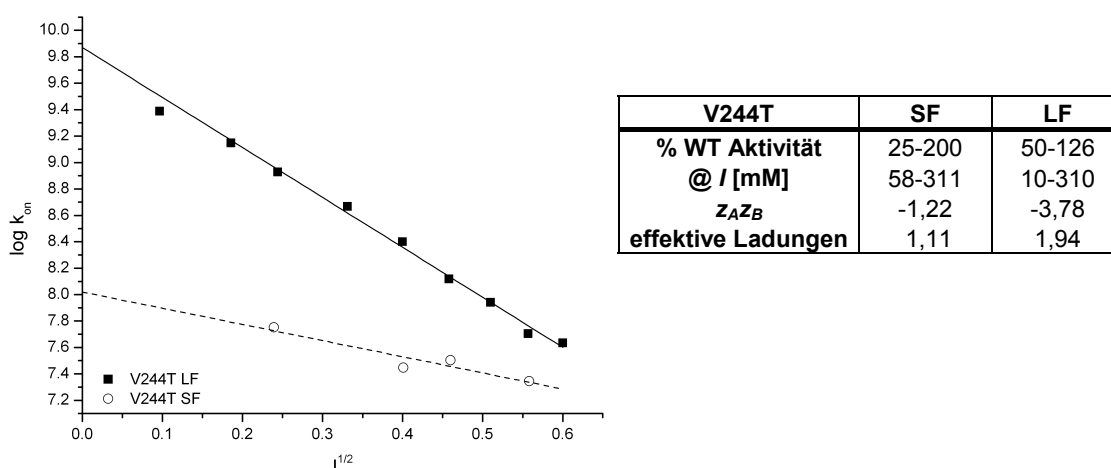
Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Ladungsumkehr in Position 243 keinen Einfluss auf die Ionenstärkeabhängigkeit hat und die Ladung in dieser Position für die Wechselwirkung zwischen C<sub>1CF</sub> und C<sub>552F</sub> keine Rolle spielt. Die Einführung eines voluminösen Lysins in dieser Position scheint jedoch durch sterische Hinderung die Gesamtreaktion auf 40 % der WT-Reaktion zu verlangsamen.

#### V244Q und V244T

Beide Mutanten verhalten sich spektroskopisch und redoxchemisch auffallend. So ist der  $\alpha$ -Peak beider Mutanten im Redoxdifferenzspektrum zu 552 nm verschoben. V244Q hat einen stark erniedrigten Extinktionskoeffizienten ( $16,78 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) im Vergleich zum WT ( $22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), wohingegen der Koeffizient von V244T mit  $20,77 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  nicht ganz so stark von dem des WT abweicht. Auch die *charge transfer*-Spektren sind auffällig. Beide Mutanten zeigen einen Peak bei 645 nm.

Während V244T zusätzlich die 695 nm-Schulter aufweist, ist diese bei V244Q nur andeutungsweise zu erkennen, was für eine Deplazierung des distalen Methionins spricht. Das Redoxpotential der Mutanten V244T ist im Vergleich zum WT um etwa 60 mV auf 139 mV erniedrigt, wogegen V244Q die stärkste Abweichung vom WT-Redoxpotential mit einer Differenz von fast 160 mV zeigt ( $E_0' = 30$  mV). Durch den Austausch des unpolaren Valins in Position 244 gegen die polaren Reste Threonin und Glutamin, die beide potentiell Wasserstoffbrücken ausbilden können, wurden die spektralen und redoxchemischen Eigenschaften des HämS beeinflusst. Im Falle des V244Q scheint die Mutation sogar zu einer Deplazierung des distalen Hämliganden geführt zu haben.

Bei der kinetischen Interpretation der Mutante V244Q kann nur auf die Laserflash-Daten zurückgegriffen werden, da sie nur mit dieser Methode untersucht worden ist. Die Daten zeigen eine generelle Verlangsamung der Reaktion gegenüber der WT-Reaktion auf 27 % ( $I = 10$  mM) bis 85 % ( $I = 310$  mM). Die Ionenstärkeabhängigkeit ist etwas weniger stark ausgeprägt, so dass statt 2,2 nur 2 effektive Ladungen an der Wechselwirkung beteiligt sind. Ähnlich verhält es sich für die Mutante V244T. Sowohl die SF- als auch die LF-Ergebnisse zeigen eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zum WT bei niedrigen Ionenstärken (25 % im SF-Experiment und 50 % im LF-Experiment) und eine Erhöhung auf 200 % (SF) bzw. 126 % (LF) bei hohen Ionenstärken. Auch hier ist die Ionenstärkeabhängigkeit schwächer ausgeprägt als beim WT (1,1 statt 2 (SF) und 1,9 statt 2,2 (LF) effektiven Ladungen). Die Werte für das Ionenprodukt und die effektiven Ladungen weichen zwar in beiden Methoden voneinander ab, aber der Trend einer verringerten Ionenstärkeabhängigkeit ist bei beiden gegeben.



**Abbildung 4.5: Brønsted-Parameter der ET-REaktion von V244T mit  $c_{552F}$**

Vergleich der kinetischen Parameter von V244T aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

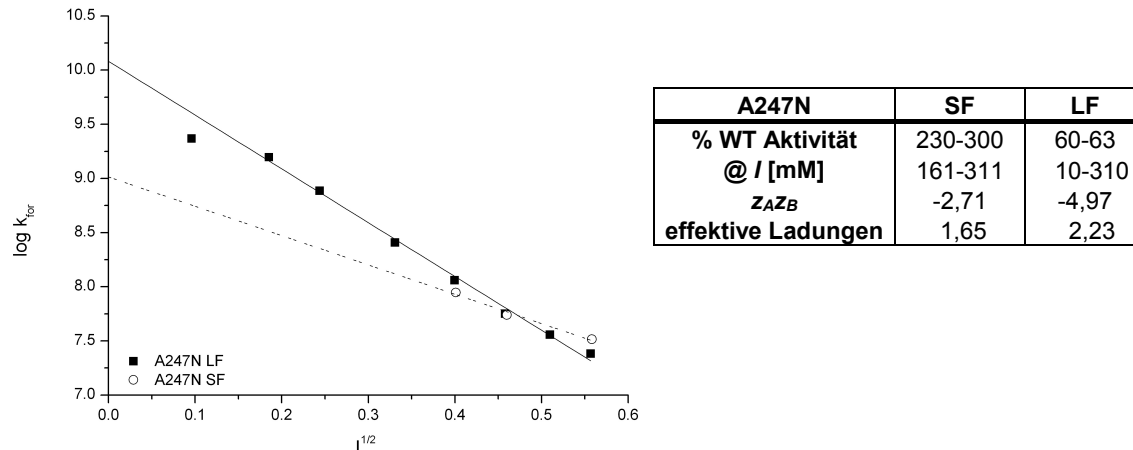
Zusammenfassend zeigen sich also bei Einführung eines polaren Restes, der potentiell Wasserstoffbrücken ausbilden kann, und bei zusätzlicher Erhöhung des Raumvolumens (Gln) ähnliche Effekte: eine Verlangsamung der Reaktion bei niedrigen Ionenstärken und ein verändertes Ionenstärkeverhalten, obwohl keine Ladung verändert wurde.

Zudem sind die spektralen und redoxchemischen Eigenschaften dieser Mutanten verändert. Durch die modellierten Strukturen wird ersichtlich, dass sich diese Aminosäureposition nicht exponiert innerhalb der Interaktionsfläche, sondern zwischen zwei oder drei Helices befindet und in Richtung der Hämspalte ausgerichtet ist. Daher könnte die Mutagenese eine veränderte Faltung und eine Verschiebung der Interaktionsfläche zur Folge haben.

### A247N

A247N mit A103 als äquivalenten Rest im Hefe-Komplex verhält sich spektroskopisch wie der WT, weist aber ein um 50 mV erniedrigtes Redoxpotential von 133 mV auf. Der Austausch von Alanin nach Asparagin bewirkt eine erhöhte Hydrophilie und eine leichte Erhöhung des Raumbedarfes sowie die Bereitstellung von potentiellen Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren durch die Säureamidgruppe des Asparagins. Die SF-Messungen ergeben einen dem WT gegenüber um den Faktor 2,3 bis 3 erhöhten ET und eine Beteiligung von 1,7 effektiven Ladungen pro Redoxpartner an der Interaktion. Allerdings fließen auch hier wieder nur drei Datenpunkte in die Brønsted-Auswertung ein, so dass diese weniger verlässlich ist.

Die LF-Experimente ergeben eine konstante Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten auf 60-63 % der WT-Aktivität bei steigenden Ionenstärken und eine Beteiligung von 2,2 effektiven Ladungen an der Wechselwirkung (Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von A247N mit C<sub>552F</sub>**

Vergleich der kinetischen Parameter von A247N aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Mit Schwerpunkt bei der Interpretation auf den LF-Daten lässt sich für die Mutante A247N erwartungsgemäß keine Veränderung der Ionenstärkeabhängigkeit feststellen, da keine Ladung eingeführt oder eliminiert wurde. Die Orientierung der Seitengruppe in die Hämspalte in unmittelbarer Nähe zur Hämgruppe und der Austausch einer kleinen, unpolaren gegen eine polare Aminosäure, die durch die Amidgruppe in der Lage ist, Wasserstoffbrücken auszubilden und ein etwas größeres Raumvolumen einnimmt, könnte das Redoxpotential der Hämgruppe beeinflussen. Die generelle Erniedrigung der ET-Raten auf etwa 60 % der WT-Aktivität könnte auf die Erhöhung des Raumbedarfes

zurückzuführen sein. So könnte die generelle Verlangsamung der Reaktion auf sterischer Hinderung beruhen, wenn beide Redoxpartner sich für die Ausbildung eines effizienten ET an dieser Stelle sehr nahe kommen, was nur durch einen kleinen, unpolaren Rest gewährleistet wird.

### **Zusammenfassung zu Region I**

Diese Region ist von allen drei Regionen am empfindlichsten gegenüber Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung. Alle vier Mutanten zeigen einen kinetischen Effekt, wobei die benachbarten Positionen E243 und V244 durch die Mutationen auch in ihren spektralen und redoxchemischen Eigenschaften beeinflusst worden sind. In allen vier Fällen tritt eine Verlangsamung der Reaktion verglichen zum WT ein. Die Mutanten E243K und A247N zeigen eine Verlangsamung der Reaktion bei unveränderter Ionenstärkeabhängigkeit. Beide Aminosäureseitengruppen ragen exponiert in die Interaktionsfläche, so dass die Erhöhung des Raumbedarfes hier sterisch die Gesamtreaktion hindert. Die Mutanten V244Q und V244T zeigen zusätzlich eine leicht abgeschwächte Ionenstärkeabhängigkeit verglichen mit der WT-Reaktion, obwohl durch die Mutagenese keine Ladung verändert wurde. Dies zusammen mit den veränderten Hämeigenschaften und der Ausrichtung zwischen den Helices lässt die Schlussfolgerung zu, dass hier durch die Faltung die Umgebung des Häms beeinflusst wurde und sich die Interaktionsfläche insgesamt etwas verschoben hat.

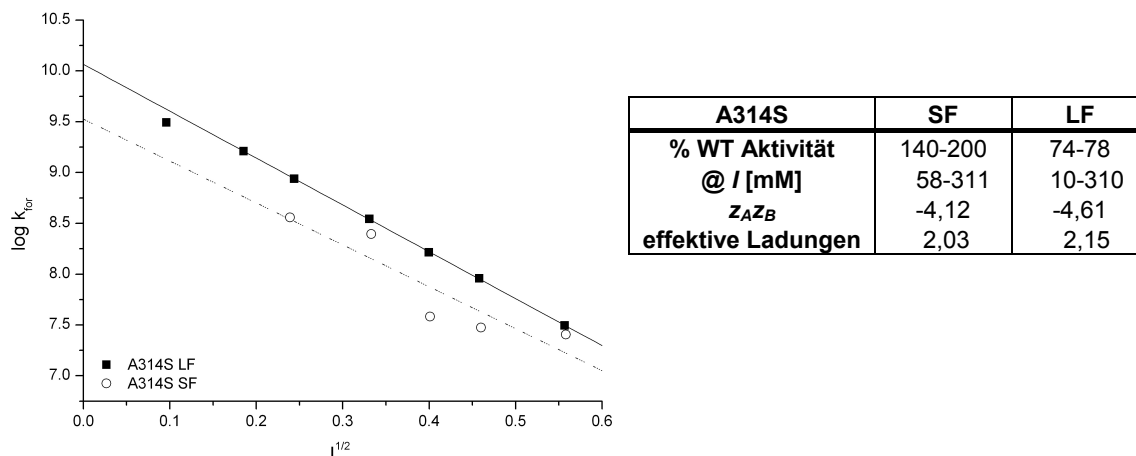
#### **4.2.4.2 Region II: A314S, K315E/T und G319A**

Je nach Strukturmodell liegen die Reste der Region II (Helix A) (siehe Abbildung 4.3) leicht rechts unterhalb der Hämspalte (Swissmodell, Jigsaw 3D; Abbildung 3.9) und sind alle entweder zur Interaktionsfläche orientiert und exponiert, oder direkt hinter der Hämspalte im Proteininneren (Esyspred3D; Abbildung 3.9), womit die Reste unzugänglich für eine Interaktion zum  $c_{552F}$  wären. Die Positionen A314, K315 und G319 liegen in der Sequenz in einer für Prokaryonten hochkonservierten Region. Das Sequenzmotiv findet sich auch konserviert bei Eukaryonten wieder, allerdings geht hier im Vergleich zu den Prokaryontensequenzen eine Deletion in der Sequenz voraus (siehe Abbildung 3.8).

#### **A314S**

In den modellierten Strukturen weist die Aminosäure A314 nach vorn unten von der potentiellen Interaktionsfläche weg, ist zwar exponiert aber durch die Orientierung nach unten vielleicht nicht unmittelbar an der Wechselwirkung zum  $c_{522F}$  beteiligt (siehe Abbildung 4.3). Spektroskopisch verhält diese Mutante sich wie der WT und das Redoxpotential entspricht ebenfalls dem des WT mit 189 mV. Durch die Mutation wird bei gleichbleibendem Raumbedarf die Hydrophilie in Position 314 erhöht. Die SF-Experimente ergeben eine gegenüber dem WT erhöhte Aktivität von etwa 140 bis 200 % bei steigender Ionenstärke und aus der Brønsted-Auswertung eine Beteiligung von 2 effektiven Ladungen an der Wechselwirkung zum  $c_{552F}$ . Hier konnten zur Auswertung fünf Datenpunkte herangezogen werden, allerdings weisen diese eine sehr hohe Streuung auf, so dass sich die Interpretation der Brønsted-Auswertung als

schwierig erweist (Abbildung 4.7). Die LF-Experimente dagegen ergeben eine generelle Reduktion der ET-Raten auf 74-78 % der WT-Aktivität, aber ein den SF-Ergebnissen sehr ähnliches Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -4,16, was 2,15 effektiven Ladungen entspricht.



**Abbildung 4.7: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von A314S mit  $C_{552F}$**

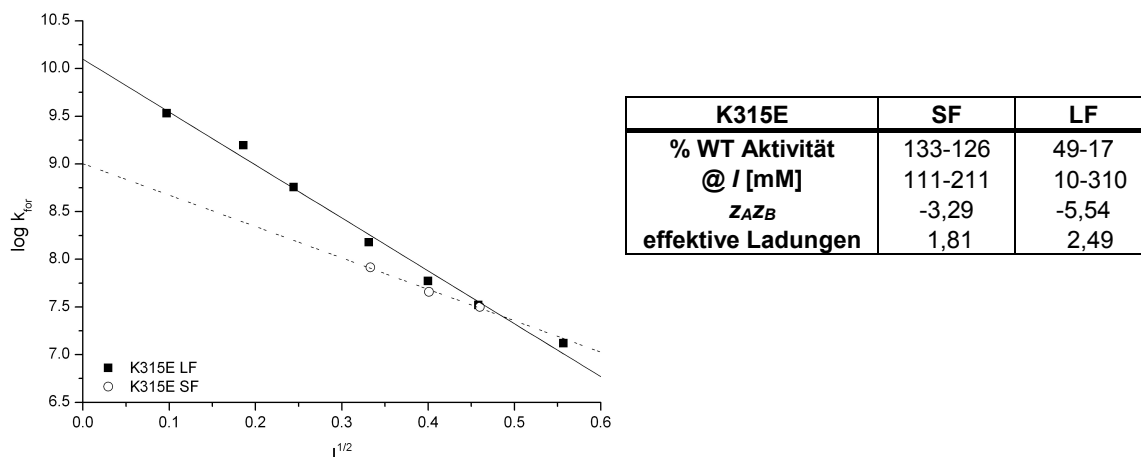
Vergleich der kinetischen Parameter von A314S aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Allgemein lässt sich erwartungsgemäß keine Änderung der Ionenstärkeabhängigkeit verglichen mit dem WT feststellen. Der Faktor 1,4 bis 2 je nach Ionenstärke in den Raten aus den SF-Experimenten verglichen mit dem WT könnte aus der großen Streuung der Datenpunkte resultieren, wohingegen die LF-Experimente eine klare Reduktion der Aktivität auf etwa 76 % ergeben. Zusammengefasst lässt sich daraus ein Verhalten ableiten, das zwischen einer leichten Verringerung der Aktivität und WT-Verhalten liegt, womit diese Position insgesamt kaum an der Interaktion zum  $C_{552F}$  beteiligt zu sein scheint.

### K315E und K315T

Die Position K315 ist exponiert und die Aminosäureseitenkette weist direkt von der Interaktionsfläche weg, so dass diese Aminosäure zumindest einen steuernden, sterischen Effekt bei der Orientierung des  $C_{552F}$  haben könnte. Beide Mutanten verhalten sich spektroskopisch wie der WT. Während K315E ein um 50 mV verringertes Redoxpotential von 139 mV aufweist, ist das der Mutante K315T identisch mit dem des WT (189 mV). Dies lässt darauf schließen, dass die Ladungsinversion in Position 315 von positiv nach negativ die Umgebung der Hämgruppe und dadurch ihr Potential beeinflusst. Die SF- und LF-Daten sind sehr widersprüchlich (siehe Abbildung 4.8). Während aus den SF-Messungen hervorgeht, dass die ET-Reaktion um den Faktor 1,3 gegenüber der WT-Reaktion beschleunigt ist und die Ionenstärkeabhängigkeit etwas weniger stark als beim WT ausgeprägt zu sein scheint (1,8 effektive Ladungen statt 2 wie beim WT), zeigen die LF-Messungen das Gegenteil. Die Gesamtreaktion ist bei steigenden Ionenstärken auf 49 % bis 17 % der WT-Reaktion verlangsamt und die Ionenstärkeabhängigkeit ist stärker ausgeprägt als beim WT (2,5 effektive Ladungen statt 2,2 wie beim WT). Da für die Brønsted-Analyse nach der SF-Messung lediglich drei Datenpunkte verwendet werden konnten, ist die Auswertung schwierig. Obwohl

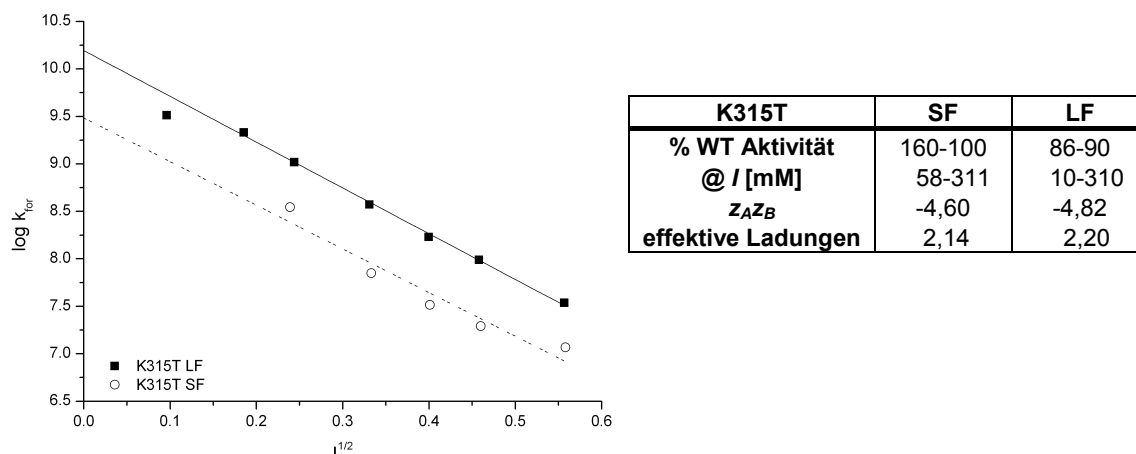
eine beschleunigte Reaktion erwartet worden wäre, da eine für die Interaktion zum  $c_{552F}$  potentiell repulsive positive Ladung in eine negative, potentiell anziehende überführt wurde, scheint der gegensätzliche Effekt nach der Brønsted-Analyse der LF-Daten der Fall zu sein. Die Ladungsinversion scheint eine stärkere Ionenstärkeabhängigkeit und eine Verlangsamung der Gesamtreaktion zur Folge zu haben, was auf eine Verschiebung der Interaktionsfläche hindeuten kann.



**Abbildung 4.8: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von K315E mit  $c_{552F}$**

Vergleich der kinetischen Parameter von K315E aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Durch den Austausch des Lysins gegen Threonin bei K315T wird eine positive Ladung eliminiert und das Raumvolumen in dieser Position verringert. Die SF-Daten ergeben eine dem WT gegenüber beschleunigte ET-Reaktion zwischen 100 bis 160 %, wobei die Streuung der Datenpunkte auch hier Interpretationsspielraum lässt (siehe Abbildung 4.9). Die Brønsted-Auswertung ergibt eine Beteiligung von 2,1 effektiven Ladungen an der Wechselwirkung zum  $c_{552F}$ . Dieser Wert wird durch die Anzahl von 2,2 effektiven Ladungen aus der LF-Auswertung bestätigt, womit sich diese Mutante wie der WT verhält. Es konnte eine leichte generelle Reduktion der Geschwindigkeitskonstanten auf 86-90 % beobachtet werden, die noch als WT-Verhalten angesehen werden kann.



**Abbildung 4.9: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von K315T mit C<sub>552F</sub>**

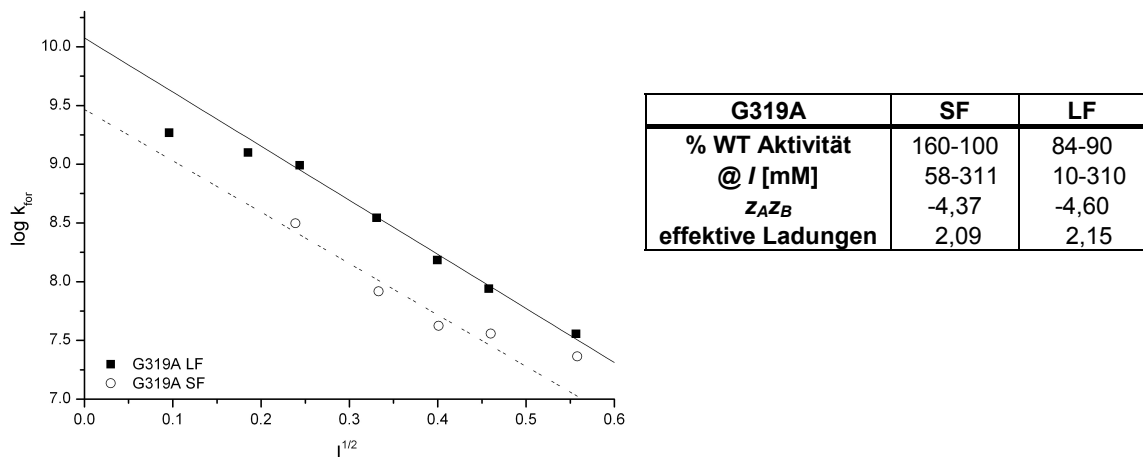
Vergleich der kinetischen Parameter von K315T aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Zusammenfassend bewirkt die Ladungsumkehr in Position 315 von positiv nach negativ (K315E, LF-Daten) erwartungsgemäß eine Veränderung der Ionenstärkeabhängigkeit, aber eine Verlangsamung der Reaktion, die bei Einführung einer negativen Ladung nicht erwartet worden wäre. Die Eliminierung der positiven Ladung und Austausch gegen einen polaren Rest (K315T, Laserflash-Daten) scheint dagegen keinen Effekt zu zeigen und diese Mutante verhält sich wie der WT. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Ladungsinversion eine Verschiebung der Interaktionsfläche zur Folge hat, die sowohl das Ionenprodukt beeinflusst als auch die ET-Raten verlangsamt.

### G319A

G319 ist der äquivalente Rest zu A168 in Hefe. Glycin als „Helix Brecher“ ist in den modellierten  $c_1$ -Strukturen am Ende von Helix A lokalisiert. Der Austausch zu Alanin erhöht den Raumbedarf in dieser Position bei unveränderter Polarität. Spektroskopisch verhält sich die Mutante wie der WT, jedoch ist das Redoxpotential um 50 mV gegenüber dem WT auf 139 mV verringert, was durch die räumliche Nähe der Aminosäureseitenkette zu einem der Hämpropionate verursacht werden könnte. Die SF-Messungen ergeben leicht erhöhte ET-Raten (160 %) bei niedrigen und WT-Verhalten bei mäßigen Ionenstärken. Durch die Brønsted-Analyse läßt sich eine Beteiligung von 2,1 effektiven Ladungen pro Redoxpartner an der Wechselwirkung zum C<sub>552F</sub> ermitteln. Dieser Wert deckt sich sehr gut mit der aus den LF-Experimenten erhaltenen Anzahl von 2,2 effektiven Ladungen. Damit weist G319A eine Ionenstärkeabhängigkeit wie der WT auf. Die ET-Raten sind im LF-Experiment generell geringfügig erniedrigt (84-90 %), wobei diese Erniedrigung auch hier noch als WT-Verhalten betrachtet werden kann.





**Abbildung 4.10: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von G319A mit  $c_{552F}$**

Vergleich der kinetischen Parameter von G319A aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Im Rahmen der Streuung der Datenpunkte in der SF-Auswertung und zusammen mit den Erkenntnissen aus den LF-Messungen weist G319A WT-Verhalten auf, so dass die Erhöhung des Raumbedarfes in dieser Position keinen kinetischen Effekt zeigt.

### Zusammenfassung zu Region II

Auch hier wurden die Laserflash-Daten mehr berücksichtigt als die Stopped-Flow-Ergebnisse, da sich die Interpretation der SF-Daten oftmals schwierig erwies. Die Interaktionsmutanten der Region II zeigen keine großen kinetischen Unterschiede. A314S und G319A verhalten sich ähnlich wie der WT und scheinen damit nicht an der direkten Wechselwirkung zum  $c_{552F}$  beteiligt zu sein. Die Eliminierung der positiven Ladung des Lysins in Position 315 und Austausch gegen ein polares und kleineres Threonin zeigt ebenfalls nahezu keinen Effekt, so dass man daraus schließen kann, dass auch diese Position nicht an der Interaktion beteiligt ist. Die Ladungsumkehr jedoch verändert das Ionenstärkeverhalten und verlangsamt die ET-Reaktion auf etwa 50-20 % je nach Ionenstärke, so dass bei dieser radikalen Mutation von einer Verschiebung der Interaktionsfläche ausgegangen werden kann, die zu einer negativen Beeinflussung der ET-Reaktion führt.

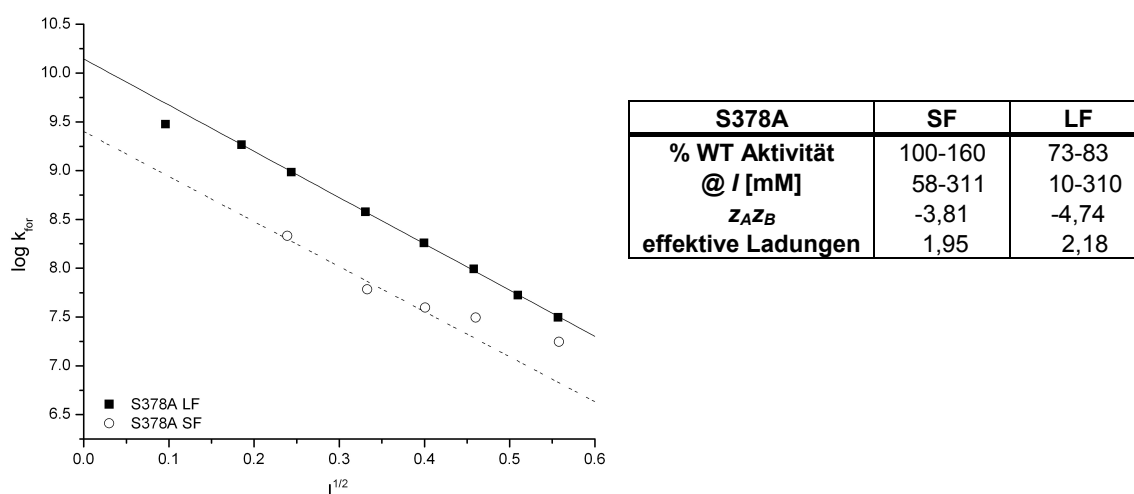
#### 4.2.4.3 Region III: S378A und Q381V

Die Reste der Region III befinden sich links oberhalb der Hämospalte und sind in allen modellierten Strukturen in einer fast identischen, exponierten Orientierung (siehe Abbildung 4.3). S378A entspricht im Sequenzalignment F230 in Hefe, das die Kation- $\pi$ -Interaktion zum Cytochrom *c* eingeht (Lange and Hunte 2002). In *P. denitrificans* läßt sich in nächster Sequenznähe kein aromatischer Rest finden, der diese Funktion übernehmen könnte. Diese Position ist im Sequenzalignment nicht konserviert, es finden sich aber aromatische Reste in den Sequenzen von *R. sphaeroides* (F), *S. cerevisiae* (F) und *Bos taurus* (Y). *P. denitrificans* und *R. capsulatus* weisen Serin und Valin, aber keinen aromatischen Rest in der Nähe auf. Q381 ist der entsprechende Rest zu M233 in Hefe. Auch diese Position ist im Sequenzalignment nicht konserviert.

### S378A

S378A zeigt spektroskopisch dasselbe Verhalten wie der WT und das Redoxpotential ist nur leicht gegenüber dem des WT erniedrigt (159 mV).

Die Auswertung der SF-Messungen ergeben WT-Verhalten. Zwar zeigt der direkte Vergleich der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten eine leichte Beschleunigung von 100-160 %. Die lineare Regression in der Brønsted-Analyse ergibt jedoch WT-Aktivität. Aus dem Ionenprodukt errechnet sich eine Beteiligung von etwa 2 effektiven Ladungen pro Redoxpartner, was dem Ionenstärkeverhalten des WT entspricht. Dieser Wert wird durch die LF-Experimente bestätigt. Hier ergibt das Ionenprodukt 2,2 effektive Ladungen und damit die gleiche Anzahl wie sie für den WT bestimmt worden ist. Die ET-Raten sind generell leicht auf 73-83 % erniedrigt (siehe Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von S378A mit  $c_{552F}$**

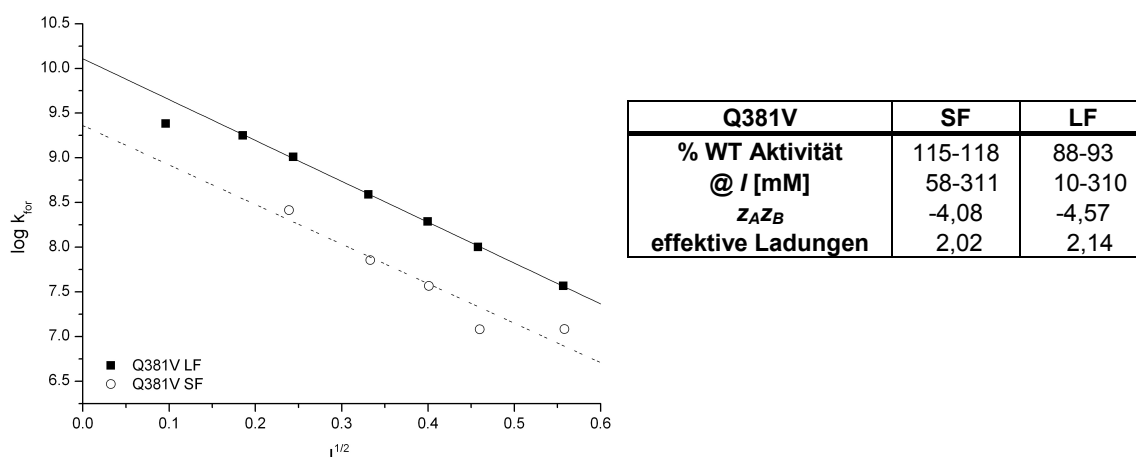
Vergleich der kinetischen Parameter von S378A aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

Insgesamt kann der kinetische Effekt der Mutante S378A als WT-Verhalten eingestuft werden, so dass die Position S378 nicht an der direkten Interaktion zum  $c_{552F}$  beteiligt zu sein scheint. Es konnte kein aromatischer Rest in unmittelbarer Nähe im Sequenzalignment gefunden werden, der eine ähnliche stabilisierende Aufgabe in der Wechselwirkung einnimmt wie F230 aus Hefe, das die Kation- $\pi$ -Interaktion zu R13 im Cyt *c* eingeht.

### Q381V

Q381V zeigt spektroskopisch und kinetisch WT-Verhalten. Das Redoxpotential ist ebenfalls identisch mit dem des WT (189 mV).

Die SF-Messungen ergeben leicht erhöhte ET-Raten von 115-118 % der WT-Aktivität und etwa 2 effektive Ladungen pro Redoxpartner, die an der Interaktion beteiligt sind. Aus den LF-Experimenten lassen sich geringfügig verringerte ET-Raten (88-93 %) und 2,1 effektive Ladungen ableiten (siehe Abbildung 4.12 )



**Abbildung 4.12: Brønsted-Parameter der ET-Reaktion von Q381V mit  $c_{552F}$**

Vergleich der kinetischen Parameter von Q381V aus Stopped-Flow- (gestrichelte Linie) und Laserflash-Experimenten (durchgezogene Linie)

### Zusammenfassung zu Region III

Die Mutanten der Region III zeigen ein dem WT sehr ähnliches Verhalten und scheinen nicht an der direkten Interaktion zu Cytochrom  $c_{552F}$  beteiligt zu sein. Es konnte kein aromatischer Rest in unmittelbarer Nähe zu S378 gefunden werden, dem die Aufgabe der Stabilisierung des ET-Komplexes durch Ausbildung einer Kation- $\pi$ -Wechselwirkung zum  $c_{552F}$  zukommen könnte.

#### 4.2.4.4 ET-Interaktionen zwischen Cytochrom $c_{1CF}$ und $c_{552F}$

Abschließend können die Ergebnisse der Interaktionsmutanten der drei verschiedenen Regionen folgendermaßen bewertet werden:

Lediglich die Mutanten aus Region I zeigen alle einen kinetischen Effekt. Die mutierten Aminosäurepositionen liegen links oberhalb der Hämspalte (Abbildung 4.3) und befinden sich in der Sequenz unmittelbar vor oder innerhalb des Hämbindemotivs (Abbildung 3.8). Die Mutante E243K entstammt der Doktorarbeit von Anna Eichhorn (Eichhorn, Dissertation 2003) und der äquivalente Rest in der Hefesequenz ist E99, das allerdings im Cokristall keine direkte Wechselwirkung zeigt. Durch Austausch des Glutamats gegen Lysin wird die ET-Gesamtreaktion sterisch beeinflusst, wohingegen die Ladung in dieser Position keine direkte Rolle zu spielen scheint. Die Mutanten V244Q und V244T zeigen beide ein verändertes Ionenstärkeverhalten, das sich aus einer leicht verschobenen Interaktionsfläche erklären lässt. Diese Position weist ebenfalls im Hefe-Cokristall keine direkte Wechselwirkung auf, war aber aufgrund ihrer exponierten Lage für die Mutagenese ausgewählt worden. Nur die Position A247 entspricht einem Rest in der Hefesequenz (A103), der einen direkten Kontakt zum Cytochrom  $c$  ausbildet. Die Mutante A247N zeigt eine generelle Verringerung der ET-Raten bei unverändertem Ionenstärkeverhalten, die durch eine sterische Beeinflussung erklärt werden kann.

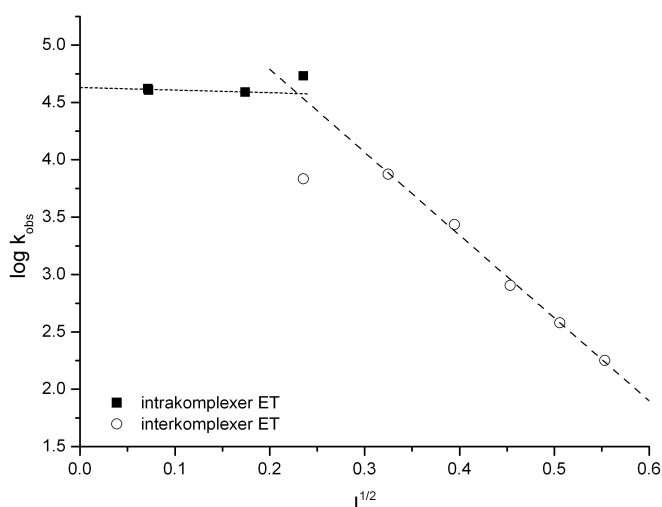
Aus Region II zeigt nur die Mutante K315E einen kinetischen Effekt, der aufgrund der Ladungsinversion auf eine verschobene Interaktionsfläche zurückgeführt werden kann.

Die alternativen Mutanten K315T und A314S verhalten sich mehr oder weniger wie der WT. Ebenso verhält es sich mit der Mutante G319A.

Keine der beiden Mutanten aus Region III zeigen einen kinetische Effekt und ihr Verhalten entspricht dem des WT. Die Position S378 ist der äquivalente Rest zu F230 in Hefe, das die stabilisierende Kation- $\pi$ -Interaktion zu R13 des Cytochrom *c* ausbildet. Es konnte kein aromatischer Rest durch Sequenz- und Strukturalignments in der Nähe von Position S378 identifiziert werden, der diese Funktion übernehmen könnte. Die Mutante S378A verhält sich wie der WT.

#### 4.2.5 ET zwischen $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten und $Ru_z$ -H39C-Cc

Das Cytochrom  $c_{1CF}$ -Fragment und seine Interaktionsmutanten wurden weiterhin in kinetischen Laserflash-Messungen eingesetzt und der ET zum  $Ru_z$ -H39C-Cc aus Hefe untersucht (Quan Yuan und Francis Millett, University of Arkansas). Dieses Rutheniumderivat (siehe Abschnitt 4.2.2) war zuvor erfolgreich zur Charakterisierung des ET zwischen unterschiedlichsten Redoxproteinen aus verschiedenen Organismen eingesetzt worden (Wang, Mei *et al.* 1996; Tian, Sadoski *et al.* 2000; Engstrom, Rajagukguk *et al.* 2003).



**Abbildung 4.13: Elektronentransfer zwischen  $c_{1CF}$ WT und H39C-Cc**

ET innerhalb eines stabilen Komplexes bei niedrigen Ionenstärken (gepunktete Linie) und bimolekulare ET-Reaktion (gestrichelte Linie) bei höheren Ionenstärken zwischen  $c_{1CF}$ WT und  $Ru_z$ -H39C-Cc aus Hefe

$Ru_z$ -H39C-Cc bildet aufgrund des basischeren Oberflächenpotentials (verglichen mit Cytochrom  $c_{552F}$ ) bei niedrigen Ionenstärken ( $I < 50$  mM) einen stabilen Komplex mit Cytochrom  $c_{1CF}$ WT aus und zeigt eine schnelle ET-Reaktion innerhalb dieses Komplexes mit Geschwindigkeiten  $k_{obs}$  von etwa  $4,3 \cdot 10^4$  s<sup>-1</sup>. Bei Ionenstärken oberhalb von 50 mM wird die Reaktion bimolekular mit  $k_{obs}$ -Werten von 7500 bis 200 s<sup>-1</sup> ( $I = 50$  mM bis 300 mM) und bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten von  $8 \cdot 10^8$  bis  $2 \cdot 10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Die Ionenstärkebedingungen und kinetischen Parameter des ET zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$ WT und den beiden Ruthenium-Derivaten  $Ru_z$ - $c_{552F}$ N23C und  $Ru_z$ -H39C-Cc sind in Tabelle 4.4 vergleichend dargestellt.

**Tabelle 4.4: Kinetische Parameter des ET zwischen  $c_{1CF}$ WT und  $c_{552F}$ N23C oder H39C-Cc**

Vergleich der kinetischen Parameter der ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$ WT mit den Ruthenium-Derivaten  $Ru_z$ - $c_{552F}$ N23C aus *P. denitrificans* und  $Ru_z$ -H39C-Cc aus Hefe.

ET-Reaktion	Parameter	$c_{1CF}$ WT/ $Ru_z$ - $c_{552F}$ N23C	$c_{1CF}$ WT/ $Ru_z$ -H39C-Cc
im Komplex	Ionenstärke /	10-35 mM	5-50 mM
	$k_{obs}$	20200-10200 s <sup>-1</sup>	43000 s <sup>-1</sup>
bimolekular	Ionenstärke /	35-360 mM	50-300 mM
	$k_{obs}$	31500-300 s <sup>-1</sup>	7500-200 s <sup>-1</sup>
	$k_{on}$	$3,2 \cdot 10^9$ - $3,6 \cdot 10^7$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$8,2 \cdot 10^8$ - $2,1 \cdot 10^7$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>

Im Vergleich der beiden Systeme fällt auf, dass der ET-Komplex mit dem nicht-physiologischen Redoxpartner H39C-Cc aus Hefe eine höhere Stabilität über einen größeren Ionenstärkebereich aufweist. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen pI-Werte der beiden Cytochrome erklären: Cytochrom  $c_{1CF}$  ist mit einem pI von 4,5 bei neutralem pH-Wert negativ geladen. Cytochrom  $c_{552F}$  weist einen pI von 6,3 und Cytochrom  $c$  aus Hefe einen pI von 9,5 auf (alle pI-Werte wurden aus der Aminosäuresequenz mit dem Programm *ProtParam* der ExPASy-Website berechnet). Aufgrund der unterschiedlichen Ladungsverhältnisse ist der elektrostatisch ausgebildete Komplex zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und H39C-Cc stabiler als der zwischen  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$ N23C. Der ET innerhalb des Komplexes zeigt zusätzlich eine geringere Schwankungsbreite der apparenten Geschwindigkeit  $k_{obs}$  und ist generell schneller.

Im Gegensatz dazu ist die bimolekulare Reaktion der physiologischen Redoxpartner ( $c_{1CF}/c_{552F}$ ) gegenüber dem heterologen *Paracoccus*/Hefe-System bei Ionenstärken oberhalb von 35 mM beschleunigt, was auf einen optimierten und effizienten ET des physiologischen Systems deutet. Des Weiteren bildet sich hier kein wirklich stabiler ET-Komplex bei niedrigen Ionenstärken aus, wodurch *Paracoccus* flexibel auf die vorherrschenden Umweltbedingungen reagieren und einen schnellen ET-Umsatz gewährleisten kann. Bei Ausbildung eines stabilen Komplexes bei niedrigen Ionenstärkebedingungen könnte der Elektronenfluss und damit verbundene Energietransduktionsprozesse durch eine langsame Dissoziationsrate der beiden Redoxpartner nicht sichergestellt werden.

Die  $c_{1CF}$ -Interaktionsmutanten weisen ein ähnliches Verhalten wie der WT bei niedrigen Salzkonzentrationen auf. Auch sie bilden einen stabilen ET-Komplex zum H39C-Cc aus, der über einen Ionenstärkebereich von etwa 5 bis 60 mM stabil ist und hohe apparente Geschwindigkeiten  $k_{obs}$  von  $5 \cdot 10^4$  s<sup>-1</sup> aufweist. Da es sich bei dem H39C-Cc um einen nicht-physiologischen Redoxpartner des Cytochrom  $c_{1CF}$  handelt, wird hier nicht weiter auf die Ionenstärkeabhängigkeit des bimolekularen Elektronentransfers eingegangen.

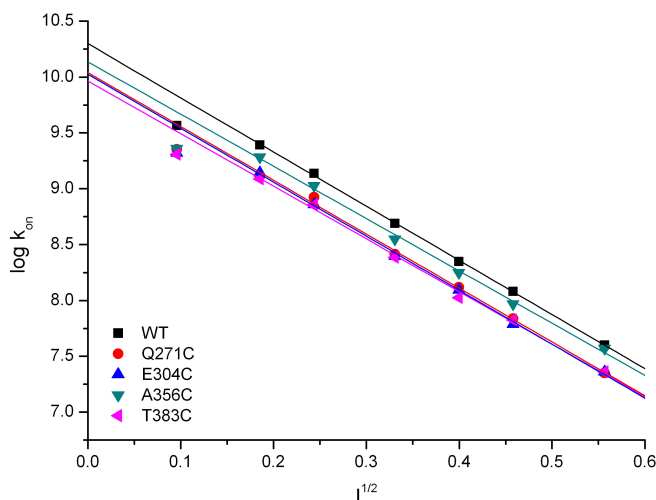
#### 4.2.6 ET zwischen $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten und $c_{552F}$

Die vier Cysteinmutanten des Cytochrom  $c_{1CF}$  sind konzipiert worden, um Fluoreszenzfarbstoffe für FRET-Experimente kovalent mit dem Cytochrom verknüpfen zu können. Die vier Positionen befinden sich (mit Blick auf die Hämspalte) in allen vier „Himmelsrichtungen“ und sollten oberflächenexponiert sein und sich in der Hämperipherie befinden, damit die Komplexbildung durch den Aminosäureaustausch nicht beeinflusst wird. Die modellierten  $c_{1CF}$ -Strukturen zeigen, dass die Aminosäuren

Q271, A356 und T383 in allen Modellen sehr ähnliche Positionen und Orientierungen einnehmen, wobei alle drei Aminosäurereste sich in der Peripherie befinden, eine exponierte Orientierung aufweisen und in Richtung Interaktionsfläche ragen. Die Position E304 dagegen ist in den Strukturmodellen nicht klar definiert. Sie befindet sich entweder im Loop1 (Swiss1- und Jigsaw-Modell), wobei die Orientierung innerhalb des Loops sich auch unterscheidet, oder in der Nähe von Helix A (Swiss2- und Esypred-Modell), ebenfalls mit verschiedenen Orientierungen.

Spektroskopisch zeigen alle  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten ein dem WT sehr ähnliches Verhalten. Die Redoxdifferenzspektren unterscheiden sich nicht von dem des WT, lediglich die Extinktionskoeffizienten der Mutanten Q271C ( $19,33 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und A356C ( $18,43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) weichen von dem des WT stärker ab ( $22,83 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die *charge transfer*-Spektren gleichen ebenfalls dem des WT, wobei in allen Fällen die 695 nm-Bande klar erkennbar ist, so dass die Einführung eines zusätzlichen Cysteins keinen Einfluss auf die kovalente Verknüpfung des Häms mit den Cysteinen des Hämbindemotivs und eine dadurch veränderte Orientierung des distalen Methionin-Liganden hatte.

Kinetisch wurden die vier Cysteinmutanten lediglich mit der Laserflash-Methode untersucht (siehe Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14: Ionenstärkeabhängigkeit des ET zwischen den  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten und  $c_{552F}N23C$**   
Vergleich der Brønsted-Analysen (LF-Daten) des ET der  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten zu Cytochrom  $c_{552F}N23C$ ; als Referenz ist die WT-Reaktion aufgeführt

Die Ionenstärkeabhängigkeit ist in allen Fällen unverändert und die Zahl effektiver Ladungen an der Wechselwirkung zum  $c_{552F}$  schwankt um den Wert für den WT (2,16 bis 2,23). Dies zeigt deutlich, dass durch die Eliminierung der negativen Ladung der Mutante E304C kein Einfluss auf das Ionenstärkeverhalten ausgeübt wurde und diese Ladung in der Peripherie keine Rolle für die elektrostatische Anziehung der beiden Redoxpartner spielt. Allerdings sind die Geschwindigkeitskonstanten der Mutanten Q271C, E304C und T383C generell auf 60 bis 70 % der WT-Aktivität verringert, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sterische Einflüsse im ET-Prozess eine Rolle spielen. Lediglich die Mutante A356C zeigt WT-Verhalten. Insgesamt verhalten

sich die Cysteinmutanten allerdings kinetisch unauffällig. Obwohl die Position T383 im Sequenzalignment der Position E235 im Hefe Cytochrom  $c_1$  entspricht, die eine potentiell polare Interaktion zu K86 im Cytochrom  $c$  eingeht (Lange and Hunte 2002); Solmaz, Dissertation 2006), zeigt die Mutante T383C kein im Vergleich zu den anderen Mutanten abweichendes Verhalten.

#### 4.2.7 ET zwischen Cytochrom $c_{caa3}$ und potentiellen Redoxpartnern

Der Elektronentransfer zwischen dem  $bc$ -Komplex und den terminalen Oxidasen in *T. thermophilus* ist Gegenstand kinetischer und struktureller Untersuchungen der Vergangenheit und Gegenwart (Hon-Nami and Oshima 1977; Yoshida and Fee 1984; Soulimane, von Walter *et al.* 1997; Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Mooser, Maneg *et al.* 2005; Muresanu, Pristovsek *et al.* 2006). Die ET-Reaktion zwischen dem  $bc$ -Komplex und dem löslichen Cytochrom  $c_{552}$  wurde unter Verwendung des löslichen Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragmentes durch kinetische Studien mittels Stopped-Flow-Spektroskopie untersucht (Maneg, Dissertation 2003; (Mooser, Maneg *et al.* 2006). Für die ET-Reaktion in physiologischer als auch in der Rückrichtung ergeben sich Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , die nur mäßig von der Ionenstärke abhängen. So erhält man aus der Brønsted-Analyse 1,2 effektive Ladungen pro Cytochrom, die miteinander wechselwirken ( $z_{AZB} = -1,39$ ). Aus dem Verhältnis der bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion lässt sich eine Gleichgewichtskonstante von  $K_{eq} = 1,13$  bestimmen.

Der Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und der  $ba_3$ -Oxidase wurde durch kinetische Studien im *pre-steady state*-Bereich (Maneg, Ludwig *et al.* 2003) und unter *turnover*-Bedingungen (Soulimane, von Walter *et al.* 1997) sowie strukturell durch *chemical shift perturbation mapping*-NMR-Experimente und Dockingberechnungen (Muresanu, Pristovsek *et al.* 2006) untersucht.

Stopped-Flow-Messungen zur Charakterisierung der ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und der  $ba_3$ -Oxidase unter Verwendung eines löslichen  $\text{Cu}_A$ -Fragmentes (Maneg, Ludwig *et al.* 2003) ergaben Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die physiologische und  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Rückrichtung, woraus sich eine Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 4,8 berechnen ließ, so dass die ET-Reaktion in physiologischer Richtung thermodynamisch begünstigt ist. Die Geschwindigkeitskonstanten zeigten nur eine geringfügige Ionenstärkeabhängigkeit, die in einem Ionenprodukt  $z_{AZB}$  von -0,57 resultierte, was einer Beteiligung von weniger als einer Ladung pro Redoxpartner an der Wechselwirkung entspricht. Dies konnte auch durch NMR-Messungen und Dockingberechnungen bestätigt werden, die in der ansonsten apolaren Kontaktfläche lediglich die Beteiligung von insgesamt zwei geladenen Resten detektieren konnten (Muresanu, Pristovsek *et al.* 2006).

*Pre-steady state*- und *turnover*-Messungen belegen, dass Cytochrom  $c_{552}$  der physiologische Redoxpartner der  $ba_3$ -Oxidase ist (Soulimane, von Walter *et al.* 1997; Maneg, Ludwig *et al.* 2003). Über den ET zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und der  $caa_3$ -Oxidase existieren andererseits widersprüchliche Daten. Es konnte gezeigt werden, dass die  $caa_3$ -Oxidase mit TMPD als einzigem Substrat einen Elektronenumsatz von  $170 \text{ s}^{-1}$

erreicht, aber durch Zugabe von Cytochrom  $c_{552}$  die Aktivität nicht weiter erhöht wird, so dass vermutet wurde, dass Cytochrom  $c_{552}$  kein Substrat der  $caa_3$ -Oxidase ist (Soulimane, von Walter *et al.* 1997). Zuvor jedoch war von Hon-nami und Oshima (Hon-Nami and Oshima 1977) berichtet worden, dass die in Phospholipidvesikeln rekonstituierte  $caa_3$ -Oxidase bei Zugabe von Cytochrom  $c_{552}$  hohe Aktivitäten aufweist.

Durch die Klonierung und heterologe Expression der hydrophilen, C-terminalen Cytochrom  $c$ -Domäne der  $caa_3$ -Oxidase wurde in dieser Arbeit ein lösliches Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragment hergestellt, das in kinetischen Untersuchungen mittels Stopped-Flow-Spektroskopie eingesetzt wurde, um den ET zwischen der  $caa_3$ -Oxidase und seinen potentiellen Redoxpartnern Cytochrom  $c_{bc}$  und Cytochrom  $c_{552}$  zu charakterisieren. Es wurden *pre-steady state*-Kinetiken aufgenommen und die Ionenstärkeabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten untersucht.

Für die Reaktion des  $c_{caa3}$ -Fragmentes mit dem löslichen Cytochrom  $c_{bc}$ -Fragment ergeben sich bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten von 7 bis  $10 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in einem Ionenstärkebereich von 150 bis 500 mM. Für die Rückreaktion wurden Werte von 2 bis  $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  erhalten. Diese Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion in physiologischer Richtung sind um zwei bis drei Größenordnungen schneller als die der  $c_{bc}/c_{552}$ - und der  $c_{552}/\text{Cu}_A$ -Reaktion (siehe Tabelle 4.5), während die Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktionen nicht soweit auseinander liegen. Daraus ergibt sich eine sehr hohe Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  von 250-300, so dass das Gleichgewicht vollständig auf der Seite des reduzierten Cytochrom  $c_{caa3}$ -Fragmentes liegt. Die Steigung des Graphen in der Brønsted-Auftragung ist leicht positiv, was auf eine Stabilisierung von hydrophoben Wechselwirkungen bei steigenden Ionenstärken hindeutet und sich mit der Hypothese im Einklang befindet, dass die Interaktionen zwischen ET-Proteinen in der Atmungskette von *T. thermophilus* hauptsächlich hydrophober Natur sind. Das Ionenprodukt  $z_{AZB}$  mit einem Wert von 0,5 ergibt 0,7 effektive Ladungen, die aufgrund des positiven Vorzeichens repulsiv wirken. Die hohen ET-Raten belegen allerdings, dass die Komplexbildung und der ET sehr effizient verlaufen, so dass man davon ausgehen kann, dass der leicht repulsive Effekt vollständig durch apolare Wechselwirkungen kompensiert wird. Die Reaktion des Cytochrom  $c_{552}$  mit dem  $c_{caa3}$ -Fragment verläuft so schnell, dass sie nicht mehr adäquat durch SF-Techniken aufgelöst werden konnte und lediglich eine Größenordnung für die ET-Geschwindigkeitskonstante von  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  angegeben werden kann. Die in Tabelle 4.5 angegebenen Redoxpotentiale spielen hier, wie schon bei den *pre-steady state*-Messungen der löslichen *Paracoccus* Cytochrome, keine Rolle, da in der bimolekularen Reaktion die Assoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und der ET innerhalb des Komplexes auf einer Zeitskala abläuft, die nicht mehr durch Stopped-Flow-Techniken aufgelöst werden kann.

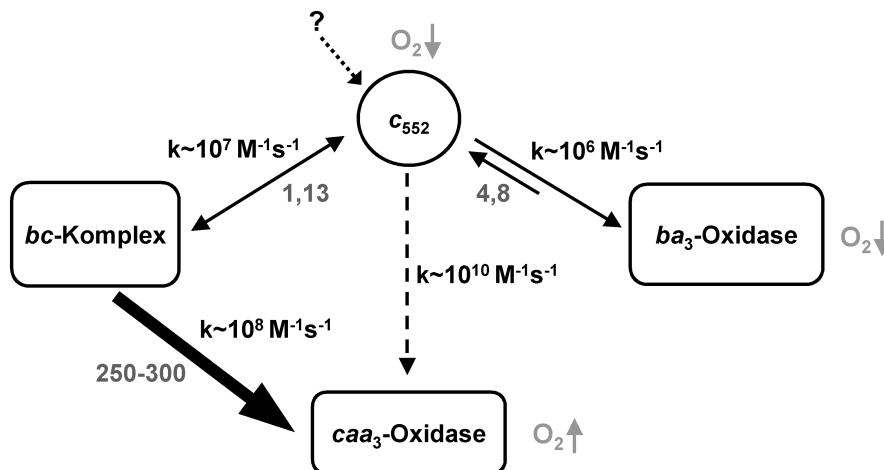


**Tabelle 4.5: Kinetische Parameter des ET löslicher Redoxfragmente aus *T. thermophilus***

Vergleich der kinetischen Parameter der ET-Reaktionen löslicher Redoxfragmente aus *T. thermophilus* ( $c_{bc} \rightleftharpoons c_{552}$ : (Mooser, Maneg *et al.* 2005);  $c_{bc} \rightleftharpoons c_{caa3}$  diese Arbeit;  $c_{552} \rightleftharpoons Cu_A$ : (Maneg, Ludwig *et al.* 2003);  $c_{552} \rightleftharpoons c_{caa3}$ : diese Arbeit)

	$c_{bc} \rightleftharpoons c_{552}$	$c_{bc} \rightleftharpoons c_{caa3}$	$c_{552} \rightleftharpoons Cu_A$	$c_{552} \rightleftharpoons c_{caa3}$
<b>Ionenstärke</b>	10-200 mM	150-500 mM	15-100 mM	150
<b><math>k_{for}</math> [<math>M^{-1}s^{-1}</math>]</b>	2 bis $0,7 \cdot 10^7$	7 bis $10 \cdot 10^8$	3,5 bis $2,3 \cdot 10^6$	$10^{10}$
<b><math>k_{rev}</math> [<math>M^{-1}s^{-1}</math>]</b>	$1,75 \cdot 10^7$	2 bis $4 \cdot 10^6$	$0,7 \cdot 10^6$	-
<b><math>K_{eq}</math></b>	1,13	250-300	4,8	-
<b><math>Z_A Z_B</math></b>	-1,4	+0,5	-0,6	-
<b>effektive Ladungen</b>	1,2 (anziehend)	0,7 (repulsiv)	0,75 (anziehend)	-
<b><math>E_0'</math> [mV]</b>	210/215 mV	210/78 mV	215/266 mV	215/78 mV

Aus den vorhandenen Daten zeichnet sich folgendes Schema für den ET zwischen Komplex III und den terminalen Oxidasen in *T. thermophilus* ab (siehe Abbildung 4.15): Unter aeroben Bedingungen wird die *caa3*-Oxidase exprimiert und die Elektronen vom Cytochrom *c* des *bc*-Komplexes mit einer Rate von  $10^8 M^{-1}s^{-1}$  auf die *caa3*-Oxidase transferiert. Dabei liegt das Gleichgewicht vollständig auf der Seite der reduzierten *caa3*-Oxidase. Unter semianaeroben Bedingungen werden zusätzlich Cytochrom *c*<sub>552</sub> und die *ba3*-Oxidase exprimiert (Yoshida and Fee 1984; Soulimane, von Walter *et al.* 1997). Elektronen werden vom *bc*-Komplex mit einer Rate von  $10^7 M^{-1}s^{-1}$  auf Cytochrom *c*<sub>552</sub> und dann mit einer Rate von  $10^6 M^{-1}s^{-1}$  weiter zur *ba3*-Oxidase transferiert, die eine hohe Sauerstoffaffinität besitzt. Während die ET-Reaktion zwischen Cytochrom *c*<sub>bc</sub> und Cytochrom *c*<sub>552</sub> isoenergetisch ist und das Gesamtgleichgewicht des ET vom Cytochrom *c*<sub>552</sub> zur *ba3* zur Seite des reduzierten Cu<sub>A</sub> verschoben ist, wird das Gesamtgleichgewicht dieses ET-Zweiges zur reduzierten *ba3*-Oxidase verlagert sein. Aus der hohen Gleichgewichtskonstante für die Reaktion zwischen Cytochrom *c*<sub>bc</sub> und dem *c*<sub>caa3</sub>-Fragment, den hohen ET-Raten dieser Reaktion und der Tatsache, dass die *caa3*-Oxidase effizienter arbeitet als die *ba3*-Oxidase ( $1H^+/e^-$  anstelle von 0,4 bis 0,5  $H^+/e^-$  (Kannt, Soulimane *et al.* 1998)), kann man mutmaßen, dass alle Elektronen, die unter diesen Sauerstoff-armen Bedingungen von der *caa3*-Oxidase noch umgesetzt werden können, auch diesem Zweig der Atmungskette zugeführt werden. Auch Elektronen, die dem Cytochrom *c*<sub>552</sub> über den *bc*-Komplex oder noch unbekannte Elektronendonoren zugeführt werden, werden zur *caa3*-Oxidase transferiert, was die hohen Elektronentransferraten zwischen Cytochrom *c*<sub>552</sub> und dem *c*<sub>caa3</sub>-Fragment belegen. Ändern sich die Sauerstoffbedingungen zu höherem O<sub>2</sub>-Anteil, so ist damit gewährleistet, dass sofort alle Elektronen wieder sehr schnell über den *bc*-Komplex zur *caa3*-Oxidase geleitet werden. Die hohen Elektronentransferraten zwischen dem Cytochrom *c*<sub>bc</sub>- und dem *c*<sub>caa3</sub>-Fragment sind ein erster wichtiger Hinweis darauf, dass hier zwei Proteinkomplexe direkt Elektronen miteinander austauschen, ohne sich eines Elektronencarriers wie Cytochrom *c*<sub>552</sub> bedienen zu müssen.



**Abbildung 4.15: ET zwischen Komplex III und terminalen Oxidasen in *T. thermophilus***

dunkelgrau: Gleichgewichtskonstanten für die ET-Reaktionen der löslichen Fragmente, hellgrau: für die Expression relevante Sauerstoffbedingungen; durchgezogene Pfeile: kinetisch durch Stopped-Flow-Experimente charakterisierte ET-Reaktionen; durchbrochener Pfeil: ET-Raten abgeschätzt anhand von Stopped-Flow-Messungen; ?: unbekannte Elektronendonoren für Cytochrom  $c_{552}$

#### 4.2.8 Temperaturabhängigkeit und Vergleichbarkeit der beiden Methoden

Die mittels der LF-Methode gemessene Temperaturabhängigkeit der ET-Reaktion des Cytochrom  $c_{1CF}$  mit Cytochrom  $c_{552F}N_{23}C-Ru_z$  und Auswertung nach Arrhenius ergibt je nach Ionenstärkebedingung Werte für die Aktivierungsenergie  $E_A$  von 30 bis 46  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , die damit in einem Bereich liegen, der typisch für diffusionskontrollierte Reaktionen ist (Gutfreund, „Kinetics for life science“). Die Auftragung nach Arrhenius ( $\ln k$  gegen  $T^{-1}$ ) ergibt einen linearen Verlauf, so dass man davon ausgehen kann, dass während der Reaktion keine konformationellen Änderungen auftreten. Für die ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{552F}$  und dem  $Cu_A$ -Fragment aus *P. denitrificans* ist eine Aktivierungsenergie von 44,4  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  berechnet worden (Maneg, Ludwig *et al.* 2003). Die Werte für die beiden Reaktionen stimmen somit gut überein, wie es für beide Reaktionen, die Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung eines diffusionskontrollierten Prozesses aufweisen, zu erwarten ist.

Mit der Arrhenius-Gleichung und den aus der Temperaturabhängigkeit erhaltenen Arrhenius-Parametern  $A$  und  $E_A$  kann nun theoretisch die Geschwindigkeitskonstante  $k$  für verschiedene Temperaturen berechnet werden. Da die Laserflash-Experimente bei RT (ca. 22 °C) und die Stopped-Flow-Messungen bei 10 °C durchgeführt worden sind, ist es interessant zu untersuchen, ob die theoretisch ermittelten Werte für  $k$  mit den tatsächlich bestimmten übereinstimmen. Dies lässt ebenfalls Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit der absoluten Werte der Geschwindigkeitskonstanten beider Methoden zu.

**Tabelle 4.6: Vergleich von gemessenen und berechneten Geschwindigkeitskonstanten**

Vergleich der über die Arrhenius-Gleichung berechneten Geschwindigkeitskonstanten bei 10 °C und 22 °C mit denen aus den LF- und SF-Experimenten und Berechnung des  $Q_{10}$ -Wertes für die ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{1CFWT}$  und  $c_{552F}$

	$k$ bei $T = 10\text{ °C}$ (SF)	$k$ bei $T = 22\text{ °C}$ (LF)	$Q_{10}$ -Wert
theoretisch (100 mM KCl)	$1,43 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2,77 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	1,94
gemessen (100 mM KCl)	$6,23 \cdot 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4,89 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	7,85
theoretisch (200 mM KCl)	$3,17 \cdot 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$6,73 \cdot 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	2,12
gemessen (200 mM KCl)	$2,52 \cdot 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$1,21 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	4,80

Setzt man die berechneten Werte  $A$  und  $E_A$  für 10 °C bzw. 22 °C in die Arrhenius-Gleichung ein, so erhält man Geschwindigkeitskonstanten von  $2,77 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (für 100 mM KCl) bzw.  $6,73 \cdot 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (200 mM KCl) für die Reaktion bei 22 °C und  $1,43 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (100 mM KCl) bzw.  $3,17 \cdot 10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (200 mM KCl) für die Reaktion bei 10 °C (Tabelle 4.6). Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten bei der jeweiligen Ionenstärke zueinander ist ungefähr 2 und wird  $Q_{10}$ -Wert genannt, wenn die Temperaturdifferenz 10 °C bzw. 10 K beträgt. Der Faktor 2 ist ein typischer Wert für biologische Systeme (Gutfreund 1998). Der Vergleich der berechneten Geschwindigkeitskonstanten mit den aus den Laserflash- und Stopped-Flow-Experimenten erhaltenen zeigt, dass die SF-Geschwindigkeitskonstanten um den Faktor 2,3 (für 100 mM KCl) und 1,3 (für 200 mM KCl) kleiner sind als die theoretisch ermittelten Werte. Die LF-Geschwindigkeitskonstanten dagegen sind jeweils um den Faktor 1,8 größer als die theoretisch bestimmten. Damit weichen auch die  $Q_{10}$ -Werte stark von den für die theoretisch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten ab. Die direkte Vergleichbarkeit der mit beiden kinetischen Methoden absolut bestimmten Geschwindigkeitskonstanten ist somit nicht gegeben, obwohl sich ähnliche Größenordnungen ergeben.

Aus diesem Grund wurden bei der kinetischen Auswertung die zum WT prozentualen Aktivitäten innerhalb derselben Methode bestimmt und die Prozentwerte der beiden Methoden miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass sobald genug Datenpunkte für eine verlässliche Brønsted-Analyse zur Verfügung standen (mehr als drei), die Brønsted-Parameter der SF-Ergebnisse mit denen der LF-Ergebnissen gut übereinstimmten. Bei weniger als drei Datenpunkten wichen die SF-Ergebnisse zum Teil stark von denen der LF-Methode ab. Auch die große Streuung der SF-Datenpunkte im Brønsted-Diagramm erschwerte die Interpretation teilweise erheblich. Allerdings konnte durch Vergleich und Kombination der Ergebnisse beider Methoden eine kinetische Gesamtinterpretation vorgenommen werden.

### 4.3 Charakterisierung der ET-Komplexbildung von $c_{1CF}$ und $c_{552F}$

Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) ist ein Prozess, bei dem ein Fluorophor (Donor) im angeregten Zustand seine Energie strahlungslos über Dipol-Dipol-Kopplung an einen Akzeptor überträgt. Dieser Energietransfer findet immer dann statt, wenn das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt und beide Fluorophore sich innerhalb eines Abstandes von 10-100 Å zueinander befinden. Die Effizienz  $E$ , mit der dieser Energietransfer stattfindet, hängt mit der

sechsten Potenz vom Abstand  $R$  der beiden Fluorophor zueinander ab (Gleichung (4.29)):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (4.29)$$

Der Radius  $R_0$  wird als Förster-Radius bezeichnet und beschreibt den Abstand, bei dem die Transfereffizienz 50 % beträgt. Durch Messen der Transfereffizienz  $E$  und Kenntnis oder Berechnung von  $R_0$  kann also der Abstand zwischen zwei Fluorophoren bestimmt werden, weswegen FRET als „*spectroscopic ruler*“ bezeichnet wird (Stryer and Haugland 1967). Da die typischen  $R_0$ -Werte zwischen 20 und 90 Å liegen und diese Distanzen mit der Größe von Proteinen und dem Durchmesser von Membranen vergleichbar sind, eignet sich diese Methode sehr gut zur Messung von Distanzen zwischen Proteinen (zum Beispiel bei der Komplexbildung) oder zwischen Proteindomänen sowie zur Detektion von konformationellen Änderungen und Bewegungen. Generell ist FRET besser dafür geeignet, Distanz- oder Konformationsänderungen zu detektieren als absolute Distanzen zu bestimmen, da die Transfereffizienz von einer Reihe von Parametern abhängt: dem Ausmaß der spektralen Überlappung der Emissions- und Absorptionsspektren von Donor und Akzeptor, dem Extinktionskoeffizienten des Akzeptors, der Quantenausbeute des Donors, der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor und dem Abstand zwischen beiden. (Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*). Die Transfereffizienz kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten gemessen werden. Zum einen über Emissionsmessungen, bei denen der Donorfluorophor angeregt wird und Energie auf den Akzeptorfluorophor überträgt. Aus Messung der Fluoreszenzintensität des Donors und/oder Akzeptors in An- und Abwesenheit des Partners erhält man die Transfereffizienz. In dieser Arbeit wurde die Emissionsabnahme der Donorfluoreszenz bei 600 nm in Anwesenheit des Akzeptors detektiert und mit der Fluoreszenz ohne Akzeptor verglichen. Diese Wellenlänge war gewählt worden, da der Akzeptorfluorophor in diesem Bereich nicht fluoresziert. Eine weitere Möglichkeit, die Transfereffizienz zu bestimmen, ist das *photobleaching*. Beim Akzeptor-*photobleaching* wird durch Bestrahlung der Akzeptor zerstört und die Fluoreszenzzunahme des Donors gemessen, die direkt aus der Abnahme des Förstertransfers resultiert. Beim Donor-*photobleaching* wird die Lebensdauer des Donorfluorophors in An- und Abwesenheit des Akzeptors verglichen und daraus die Transfereffizienz berechnet. In Anwesenheit eines Akzeptors wird Energie vom angeregten Donor auf den Akzeptor übertragen und der Donor ist stabiler gegen den Ausbleich-Prozess.

### 4.3.1 Cysteinmutanten

In dieser Arbeit wurde der ET-Komplex aus Cytochrom  $c_{1CF}$  und Cytochrom  $c_{552F}$  mit Hilfe von FRET-Messungen untersucht. Hierfür wurden Cysteinmutanten hergestellt, über deren SH-Gruppen selektiv und kovalent Fluorophore gekoppelt werden konnten. Hierfür mussten drei Bedingungen erfüllt sein: Das zusätzlich eingeführte Cystein

musste neben den beiden Cysteinen des Hämbindemotivs das einzige Cystein in der Sequenz der Cytochrome sein, um eine selektive Fluorophorkopplung erreichen zu können. Zudem durfte durch die Einbringung des zusätzlichen Cysteins der kovalente Hämehinbau nicht gestört werden. Des Weiteren musste die Lokalisation in der Peripherie zur Hämspalte gewährleistet sein, um die Komplexbildung nicht zu behindern. Zusätzlich mussten die Cystein-SH-Gruppen oberflächenexponiert sein, um die Zugänglichkeit der Fluorophore für die Kopplungsreaktion sicherzustellen. Diese Kriterien wurden überprüft und sind in Abschnitt 4.1.4 bereits diskutiert worden.

Insbesondere für die FRET-Experimente war es wichtig, dass die Komplexbildung durch die eingeführten Cysteine und gekoppelten Fluorophore nicht behindert wird. Die spektroskopischen Eigenschaften und das redoxchemische Verhalten der Hämgruppen dagegen sind eher nebensächlich, da bei den FRET-Messungen keine ET-Reaktion beobachtet, sondern lediglich die Annäherung und Komplexbildung der beiden Redoxpartner über den Förstertransfer detektiert wird. Kinetisch konnten die Cytochrom  $c_{1CF}$ -Cysteinmutanten in den Laserflash-Experimenten untersucht werden (siehe Ergebnisse 3.7.10 und Abschnitt 4.2.6). Sie zeigten insgesamt kinetisch ein dem WT sehr ähnliches Verhalten, so dass durch die Einbringung der Cysteine keine drastischen Veränderungen der Komplexbildung zu erwarten sind. Die Cysteinmutanten des  $c_{552F}$  wurden nur indirekt durch *steady state*-Aktivitätstest mit der Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase kinetisch charakterisiert (siehe Ergebnisse 3.9.3 und Abschnitt 4.1.4). Dabei zeigten die Mutanten N23C und N91C eine um etwa 50 % reduzierte Aktivität verglichen mit dem WT. Die Mutanten K51C und N68C hatten eine so hohe Autoxidationsrate, dass sie in diesem Ansatz nicht gemessen werden konnten. Es ist unklar, ob die Halbierung der Aktivität im Falle der Mutanten N23C und N91C auf sterischen Einflüssen beruht oder durch redoxchemische Veränderungen bewirkt wird. Spektroskopisch verhalten sich N23C und N91C unauffällig, wobei für N23C das Redoxpotential bestimmt wurde und dem des  $c_{552F}$  WT gleicht. Die Mutanten K51C und N68C zeigen starke Abweichungen in ihren *charge transfer*-Spektren, so dass die starke Autoxidation an veränderten Hämeeigenschaften liegen kann und die Komplexbildung zum  $c_{1CF}$  nicht beeinflusst wird.

### 4.3.2 Fluorophore

Für die Messung des Förstertransfers zwischen den beiden Cytochromen mussten geeignete Fluorophore gefunden werden, die sich selektiv kovalent an die eingeführten Oberflächencysteine koppeln lassen und die spektralen Anforderungen erfüllen. Es wurden zwei Vertreter der Alexa Fluor-Farbstoffe (siehe 3.8.1) ausgewählt, die als Rhodamin-Derivate eine Reihe von spektralen und chemischen Vorteilen bieten (Panchuk-Voloshina, Haugland *et al.* 1999; Berlier, Rothe *et al.* 2003). Sie weisen im Allgemeinen bei geeigneter Anregung eine hohe Quantenausbeute auf und sind photostabil. Durch ihre gute Wasserlöslichkeit kann auf die Verwendung von organischen Lösungsmitteln verzichtet werden, so dass ein eventuelles Präzipitieren der Proteine vermieden wird. Als C<sub>5</sub>-Maleimide reagieren sie selektiv mit Thiolen unter Bildung von Thioetherprodukten, so dass eine selektive Kopplung an die Oberflächencysteine gewährleistet wird. Die Kopplungsraten von 34-66 % für die

Cytochrom  $c_{1CF}$ -Konjugate und 66-100 % für die Cytochrom  $c_{552F}$ -Konjugate liegen wesentlich höher als die Ausbeuten der Kopplung mit Fluorescein-5-maleimid (siehe Ergebnisse 3.3.4 und Abschnitt 4.1.4) und sind vollkommen ausreichend für FRET-Messungen, da nur diejenigen ET-Komplexe ein FRET-Signal geben können, deren Komponenten einen Donor und einen Akzeptor tragen. Die Selektivität der Fluorophorkopplung wurde durch eine Negativprobe (Kopplungsversuch des Cytochrom  $c_{552F}$ WT ohne zusätzliches Cystein) gezeigt.

Durch die hohe Bandbreite an verschiedenen Alexa Fluor-Farbstoffen mit unterschiedlichsten spektralen Eigenschaften finden diese generell Anwendung in FRET-Experimenten zur Bestimmung von Distanzen oder Konformationsänderungen in Proteinen und Proteinkomplexen (Molecular Probes, *Alexa Fluor Dyes*, Produkthandbuch; (Panchuk-Voloshina, Haugland et al. 1999; Harikumar, Pinon et al. 2002; Berlier, Rothe et al. 2003; Harikumar and Miller 2005). Insbesondere der Alexa Fluor-Farbstoff 488 wurde an Cytochrom  $c$  aus Hefe gekoppelt, um mit Hilfe des Förstertransfers zwischen dem Farbstoff als Donor und der Hämgruppe als Akzeptor die Proteindenaturierung mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie darzustellen (Rischel et al. 2003).

Im Unterschied hierzu wurden für diesen FRET-Ansatz zwei Alexa-Fluorophore ausgewählt, die keine spektrale Wechselwirkung mit der Hämgruppe der Cytochrome zeigen. Alexa Fluor 594 (AF594) wurde als Donor-Fluorophor und Alexa Fluor 633 (AF633) als Akzeptorfluorophor gewählt, da deren Emissionsspektren außerhalb der Hämabsorption liegen und somit keine Gefahr des Fluoreszenz-*quenching* durch diese auftreten sollte. Des Weiteren weist das Emissionsspektrum des Donors einen großen Überlappungsbereich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors auf, was unmittelbare Voraussetzung für die FRET-Methode ist.

### 4.3.3 FRET-Parameter

Wie aus Formel (4.29) ersichtlich wird, kann bei Kenntnis des Förster-Radius  $R_0$  und Messen der Transfereffizienz  $E$  die Distanz  $R$  zwischen zwei Fluorophoren bestimmt werden. Es sind zwar einige Förster-Radien für Alexa Fluor-Kombinationen bekannt (Harikumar and Miller 2005); Molecular Probes, *Alexa Fluor Dyes* Produkthandbuch) nicht allerdings der Förster-Radius für die AF594/AF633-Paarung. Dieser wurde über Gleichung 3.27 (siehe Ergebnisse 3.8.5) bestimmt und hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab: dem Dipol-Orientierungsfaktor  $\kappa$ , dem Brechungsindex des verwendeten Lösungsmittels  $n$ , der Quantenausbeute des Donors  $QY$  und dem Überlappungsintegral  $J(\lambda)$ .

$\kappa$  ist ein geometrischer Faktor, der die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente der Donor- und Akzeptorfluorophore beschreibt. Für willkürlich orientierte und bewegliche Fluorophore wird ein Wert für  $\kappa^2$  von 2/3 angenommen (Dale, Eisinger et al. 1979). Der Brechungsindex von Wasser beträgt 1,33 (Wu and Stryer 1972). Die Quantenausbeute  $QY$  des Donorfluorophors in Abwesenheit des Akzeptors wurde für alle vier  $c_{1CF}$ -Konjugate durch Vergleichsmessungen zu Rhodamin 6G (R6G) bestimmt (siehe Ergebnisse 3.8.3). Schon die Quantenausbeute

des ungekoppelten AF594 in wässriger Lösung angeregt mit 480 nm beträgt lediglich 0,14 und ist damit sehr viel geringer als die Quantenausbeute der Vergleichssubstanz Rhodamin 6G mit 0.95.

Für die AF594-Cytochrom  $c_{1CF}$ -Konjugate wurde Quantenausbeuten von 0,04 (für Q271C) und 0,07-0,08 bestimmt, die damit durch die Kopplung an das Cytochrom noch weiter verringert sind. Bei Kopplung an Proteine können Fluorophore bis zu 50 % ihrer Quantenausbeute verlieren, da diese stark von der Umgebung abhängt (Molecular Probes, persönliche Mitteilung). Ein solches *Quenchen* kann durch Reaktionen im angeregten Zustand, molekulare Umlagerungen, Energietransfer, Komplexbildungen des Fluorophors im Grundzustand sowie durch Kollisionen verursacht werden. Sauerstoff löscht Fluoreszenz sehr effizient, ebenso besitzen die Hämgruppe und Tryptophane Fluoreszenz-löschende Eigenschaften.

Das Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  beschreibt die Fläche des Donoremmissionsspektrums, der mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum überlappt (Gleichung 3.25 (Ergebnisse 3.8.4)). Diese Überlappung ist unmittelbare Voraussetzung, damit FRET stattfinden kann und der Grad der Überlappung geht in die Berechnung des Förstertransfers mit ein (siehe Gleichung 3.27 (Ergebnisse 3.8.5)). Die Werte für die 16 unterschiedlichen Donor/Akzeptor-Paare liegen zwischen  $1 \cdot 10^{-12}$  und  $1 \cdot 10^{-14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$  und damit in der richtigen Größenordnung (Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy).

Der Förster-Radius hängt linear von den oben genannten Parametern ab (siehe Gleichung 3.27 (Ergebnisse 3.8.5)), allerdings gehen die Quantenausbeute und das Überlappungsintegral mit der sechsten Wurzel in die Gleichung ein, so dass Fehler bei der Berechnung von  $J$  und  $QY$  nicht so stark zum Tragen kommen.

Die  $R_0$ -Werte für die 16 verschiedenen Donor/Akzeptor-Paare befinden sich zwischen 43 und 50 Å, wobei die für die Cysteinmutante Q271C bei 43-44 Å und die aller anderen bei 48-49 Å liegen. Der geringere  $R_0$ -Wert für die Q271C-Kombinationen lässt sich durch die im Vergleich zu den anderen Donor-Konjugaten halbierte Quantenausbeute erklären. Förster-Radien zwischen 17 und 82 Å sind für Alexa Fluor-Paarungen bestimmt worden (Molecular Probes; *Alexa Fluor Dyes*, Produkthandbuch; (Harikumar and Miller 2005)). Somit liegen die  $R_0$ -Werte für die verwendeten Cytochrom-Konjugate im mittleren Bereich und die Effizienz des Förstertransfers ist in einem Bereich von etwa 50 Å auf 50 % reduziert.

#### 4.3.4 FRET-Distanzen und Docking

Die aus den FRET-Messungen erhaltenen Distanzen ( $R = 38-93 \text{ Å}$ ) wurden in Dockingberechnungen mit dem Programm HADDOCK eingesetzt, um die dreidimensionale Anordnung und Orientierung der beiden Cytochrome zueinander im ET-Komplex aufzuzeigen. Als Ausgangsdaten dienten die Röntgenstrukturdaten des Cytochrom  $c_{552F}$  (1QL4, *protein data bank*) und die modellierte Swissmodel-Struktur (*SwissI*) des Cytochrom  $c_{1CF}$ . Die Dockingrechnung anhand der 16 ermittelten FRET-Distanzen sollte weniger eine Energieminimierung sein, sondern eine Zuordnung der beiden Proteinstrukturen im dreidimensionalen Raum anhand der gemessenen Abstände

ermöglichen. Dabei sind die einzelnen Fluorophorpositionen und resultierenden Distanzen 4-fach überbestimmt, weil jeder Donor zu allen vier Akzeptoren gemessen wurde. In einem ersten Ansatz wurden die erhaltenen FRET-Distanzen als obere Begrenzung vorgegeben und 2000 potentielle Dockingmodelle berechnet. Die besten 10 Strukturen wurden übereinandergelegt und verglichen. Es zeigte sich, dass beide Cytochrome so angeordnet sind, dass sich die potentiellen Interaktionsflächen in räumlicher Nähe befinden und sich die Hämspalten relativ gegenüberliegen, die Hämspalte des  $c_{552F}$  aber leicht zu Seite hin geöffnet ist. Die durch die Minimierung berechneten Distanzen der FRET-Paarungen wichen allerdings stark von den gemessenen Ausgangswerten ab.

In einem zweiten Ansatz wurden die FRET-Distanzen mit einem Fehlerbalken von  $\pm 5 \text{ \AA}$  als obere und untere Begrenzung vorgegeben, um zu verhindern, dass das Programm diese Werte durch die Energieminimierung verringert. Die zehn besten Strukturen wichen stark voneinander ab, so dass eine übereinandergelegte Darstellung nicht sinnvoll erschien. Diejenigen, die eine ähnliche Orientierung wie die Modelle des ersten Rechnungsansatz aufwiesen, zeigten eindeutig, dass die FRET-Abstände viel zu groß sind, als dass ein Docking stattfinden könnte.

Durch die Laserflash-Experimente konnte gezeigt werden, dass bei sehr niedrigen Ionenstärken zwar ein *Encounter*-Komplex zwischen den beiden Redoxpartnern entsteht, dieser jedoch nicht sehr stabil ist. Dieser Komplex stellt eher ein Strukturensemble dar, bei dem sich beide Cytochrome stark annähern und dann entlang der Interaktionsflächen zweidimensional diffundieren bis sie einen effizienten ET-Komplex bilden und der ET stattfindet. Durch SF- und LF-Kinetiken konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess der Annäherung und des ET sehr schnell abläuft ( $k_{on} \sim 10^8$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Wenn es demnach nicht zu einer stabilen Komplexbildung unter den gegebenen Ionenstärkebedingungen kommt, können mittels Förstertransfer auch keine diskreten Abstände bestimmt werden. Vielmehr scheinen die gemessenen Distanzen einen Mittelwert der Abstände widerzuspiegeln, die bei der Annäherung und dem ET-Prozess eingenommen werden. Dies wird auch durch die Beobachtung während der FRET-Messungen bestärkt, dass sich durch Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe eines kleinen Volumens konzentrierter Salzlösung die Fluoreszenzintensitäten ( $I_{DA}$ ) und damit der Abstand zwischen den FRET-Paaren nicht änderten. Dies bedeutet, dass während der Fluoreszenzmessungen in der Küvette kein stabiler Komplex ausgebildet wurde. Wäre dies der Fall gewesen, hätte die Donorfluoreszenz in Anwesenheit des Akzeptors ( $I_{DA}$ ) wieder zunehmen müssen, da sich durch Auflösen des Komplexes die Abstände zwischen Donor und Akzeptor vergrößern und ein Energietransfer nicht oder nur weniger effizient stattfinden kann. Somit lassen sich mittels FRET-Methoden keine diskreten Abstände im ET-Komplex zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und Cytochrom  $c_{552F}$  bestimmen. Die Schlussfolgerung, dass Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  keinen stabilen, sondern lediglich einen *Encounter*-Komplex bei niedrigen Ionenstärken ausbilden, wird zusätzlich durch Beobachtungen von N. Schreglmann gestützt, die während ihrer Diplomarbeit (Schreglmann, Diplomarbeit 2003) keine stabile Komplexbildung zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und einer mittels SH-Gruppe kovalent an eine Thiolsepharose gebundenen Cysteinmutante des Cytochrom  $c_{552F}$  (N23C) detektieren konnte. Auch



durch analytische Gelfiltration und Ultrazentrifugation konnte kein solcher Komplex nachgewiesen werden (Eichhorn, Dissertation 2003). Des Weiteren wurden für das aus Cytochrom  $c_{552F}$  und dem löslichen  $Cu_A$ -Fragment der Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase bestehende Redoxpaar in EPR-Messungen ebenfalls eine Vielzahl von Distanzen und relativen Orientierungen der beiden Redoxpartner zueinander gefunden, aber kein stabiler, definierter Komplex nachgewiesen (Lyubenova, Siddiqui *et al.*, 2006).

#### 4.4 Der $bc_{1\Delta ac}$ - Komplex und funktionelle ET-Untersuchungen

Der  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex zeichnet sich durch eine *in frame*-Deletion der Aminosäuren 39 bis 202 des Cytochrom  $c_1$  aus, die die in *P. denitrificans* einzigartige saure N-terminale Domäne bilden (Gerhus, Dissertation 1992). Dieser Komplex soll in zukünftigen ET-Studien eingesetzt werden, um die folgenden Aspekte zu klären:

1. Welche Rolle spielt die saure Domäne des Cytochrom  $c_1$  im Gesamtkomplex bei der ET-Reaktion zu den physiologischen Redoxpartnern Cytochrom  $c_{552}$  und  $c_{550}$ ?
2. Wie wirken sich die Mutationen des Cytochrom  $c_{1CF}$  in einem Gesamtkomplex aus, in dem die Effekte nicht durch die hohe negative Ladungsdichte der sauren Domäne überlagert werden können?
3. Sind die an den löslichen Fragmenten gewonnenen Ergebnisse übertragbar auf den ET mit einem Proteinkomplex?

Ernst Gerhus (Gerhus, Dissertation 1992) konnte zeigen, dass im  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex alle drei katalytischen Untereinheiten vorhanden sind und der Hämeinbau ins Cytochrom  $c_{1\Delta ac}$  kovalent verläuft. Der Komplex ist im Vergleich zum WT- $bc_1$ -Komplex wesentlich instabiler bei der Aufreinigung, so dass der sauren Domäne eine Rolle der Komplex-Stabilisierung zuzukommen scheint. Die homologe Überexpression ergibt lediglich 10 % der WT-Ausbeute unter gleichen Bedingungen. Zwar zeigen  $bc_{1\Delta ac}$ -Membranen eine fast gleiche Wechselzahl wie  $bc_{1WT}$ -Membranen, doch wurde bei *steady state*-Messungen der Cytochrom  $c$ -Reduktaseaktivität mit Cytochrom  $c$  aus Pferdeherz als Substrat ein gegenüber dem WT dreifach erhöhter  $K_M$ -Wert und eine um die Hälfte verringerte maximale Geschwindigkeit  $v_{max}$  festgestellt. Diese Ergebnisse legen eine spezifische Funktion der sauren Domäne beim Andocken des basischen Cytochrom  $c$  in Analogie zum *hinge*-Protein bzw. Untereinheit 8 (Kim and King 1981; Kim and King 1983; Kim, Balny *et al.* 1987; Kim and King 1987; Iwata, Lee *et al.* 1998) des  $bc_1$ -Komplexes aus Rind und der Untereinheit 6 im  $bc_1$ -Komplex aus Hefe (Hunte, Koepke *et al.* 2000) nahe.

Allerdings konnte durch einen kinetischen Ansatz mit löslichen Fragmenten des Cytochrom  $c_1$  keine Präferenz des löslichen Cytochrom  $c_1$ -Fragmentes mit saurer Domäne (Cytochrom  $c_{1AF}$ ) gegenüber dem löslichen Cytochrom  $c_1$ -Fragment ohne saure Domäne (Cytochrom  $c_{1CF}$ ) in der ET-Reaktion zu physiologischen und nicht-physiologischen Redoxpartnern aufgezeigt werden (Eichhorn, Dissertation 2003).

Für eine erleichterte Aufreinigung wurde der  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex in dieser Arbeit erfolgreich mit einem *His-tag* versehen, der Komplex homolog in *P. denitrificans* exprimiert und die Membranen charakterisiert. Der mit dem *His-tag* versehene Proteinkomplex zeigte in den Membranen spektroskopisch und immunologisch keinen Unterschied zum WT- $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex. Erste Aufreinigungsversuche über eine Ni-NTA-Säule sind unternommen worden. Das Protokoll wird zukünftig optimiert werden. Des Weiteren soll die kinetische Charakterisierung des  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplexes im Vergleich zum  $bc_{1WT}$ -Komplex mit seinen physiologischen Substraten Cytochrom  $c_{550}$  und Cytochrom  $c_{552}$  in *steady state*- und *pre-steady state*-Messungen erfolgen. Zusätzlich sollen ausgewählte Mutationen des Cytochrom  $c_{1CF}$  per Restriktion und Ligation in das  $fbc_{1\Delta ac}$ -Operon überführt werden, gefolgt von der homologen Expression, Aufreinigung und der kinetischen Untersuchung der mutierten  $\Delta ac$ -Komplexe im Vergleich zu den WT $\Delta ac$ -Komplex.

## 4.5 Generelle Aspekte des ET von *P. denitrificans* und *T. thermophilus*

In diesem letzten Abschnitt sollen die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse über den Elektronentransfer in *Paracoccus* und *Thermus* zusammenfassend innerhalb der Atmungskette des jeweiligen Organismus diskutiert sowie in Beziehung zueinander gesetzt und verglichen werden. Neben der kritischen Betrachtung der hier verwendeten Methoden soll außerdem ein Ausblick auf zukünftige Projekte gegeben werden.

### 4.5.1 Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV in *P. denitrificans*

Um den ET zwischen Cytochrom  $c_1$  des  $bc_1$ -Komplexes und Cytochrom  $c_{552}$  in *P. denitrificans* zu untersuchen, ist größtenteils mit löslichen Fragmenten beider ansonsten membranständigen Cytochrome gearbeitet worden. So sind verschiedene lösliche Fragmente des Cytochrom  $c_{552}$  (Reincke, Thony-Meyer et al. 1999) und des Cytochrom  $c_1$  (Eichhorn, Dissertation 2003) konstruiert und heterolog in *E. coli* überexprimiert worden. Aus kinetischen *pre-steady state*-Studien mit den löslichen Cytochrom  $c_1$ -Fragmenten (siehe 1.3.3) konnte keine Präferenz des aziden Fragmentes ( $c_{1AF}$ ) gegenüber dem Minimalfragment ( $c_{1CF}$ ) festgestellt werden (Eichhorn, Dissertation 2003). Die Frage, ob die in *P. denitrificans* einzigartige saure N-terminale Domäne des Cytochrom  $c_1$  die Funktion des *hinge*-Proteins (Kim and King 1983; Stonehuerner, O'Brien et al. 1985; Kim, Balny et al. 1987; Kim and Zitomer 1990; Hunte, Koepke et al. 2000) übernehmen und durch die hohe negative Ladungsdichte als Docking-Plattform für das Cytochrom  $c_{552}$  fungieren könnte, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Dies könnte weiterführend durch den  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex (Gerhus, Dissertation 1992) untersucht werden, der durch die Einführung eines *His-tags* in dieser Arbeit aufgrund der erleichterten Aufreinigung in kinetischen Studien unter *pre-steady state*- und *turnover*-Bedingungen vergleichend zum  $bc_{1WT}$ -Komplex eingesetzt werden kann. Weiterhin ergaben Stopped-Flow-Kinetiken eine höhere Affinität des löslichen Cytochrom  $c_{550}$  gegenüber dem Cytochrom  $c_{552}$  zum Cytochrom  $c_{1CF}$  (Eichhorn, Dissertation 2003). Beide Cytochrome sind physiologische Redoxpartner des

Cytochrom  $c_1$ , die innerhalb der Atmungskette unterschiedliche Aufgaben erfüllen und unter verschiedenen Bedingungen exprimiert werden (Otten, Stork *et al.* 2001), so dass eine ausreichend hohe Elektronentransferrate und Energietransduktion gewährleistet wird. Die Beteiligung von 2 bis 3 effektiven Ladungen des Cytochrom  $c_{1CF}$  an der ET-Reaktionen zum Cytochrom  $c_{552}$  aus früheren kinetischen Studien (Eichhorn, Dissertation 2003) konnte durch die Stopped-Flow- und Laserflashmessungen in dieser Arbeit bestätigt werden. Dies entspricht auch der Anzahl effektiver Ladungen, die an der ET-Reaktion zwischen Cytochrom  $c_{552F}$  und dem löslichen  $Cu_A$ -Fragment beteiligt sind (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004), was die Hypothese unterstützt, dass die gleiche Interaktionsfläche des Cytochrom  $c_{552}$  sowohl mit dem  $c_1$  als auch der Untereinheit II der  $aa_3$ -Oxidase wechselwirkt (Margoliash, Ferguson-Miller *et al.* 1976).

Des Weiteren zeigt das Brønsted-Diagramm einen biphasischen Verlauf mit einer Phase sehr schnellen Elektronentransfers und geringer Ionenstärkeabhängigkeit bei niedrigen Ionenstärken, die der Bildung eines *Encounter*-Komplex zugeordnet wurde. Die zweite Phase abnehmender ET-Raten bei zunehmender Ionenstärke spiegelt die bimolekulare Reaktion wider. Der *Encounter*-Komplex ist allerdings auch bei sehr niedrigen Ionenstärken nicht sehr stabil ( $I = 10\text{-}35\text{ mM}$ ) und konnte durch analytische Gelfiltration und Ultrazentrifugation nicht nachgewiesen werden (Eichhorn, Dissertation 2003). Ein stabiler ET-Komplex konnte ebenfalls nicht zwischen dem Cytochrom  $c_{552F}$  und dem löslichen  $Cu_A$ -Fragment durch analytische Gelfiltration und Mikrocalorimetrie sowie durch EPR-Studien nachgewiesen werden (Wienk, Maneg *et al.* 2003); Lyubenova, Siddiqui *et al.*, 2006), so dass die Vermutung nahe liegt, dass das Oberflächenpotential des Cytochrom  $c_{552F}$  für die Komplexbildung mit den beiden negativ geladenen Redoxpartnern nicht basisch genug ist. Eine stabilere ET-Komplexbildung konnte zwischen Cytochrom  $c_{1CF}$  und H39C-Cc aus Hefe beobachtet werden, wo der ET-Komplex über einen Ionenstärkebereich von 5-60 mM stabil war.

Eine Untersuchung des ET-Komplexes aus Cytochrom  $c_{1CF}$  und  $c_{552F}$  mittels Fluoreszenzresonanz-Energietransfers zeigte zwar, dass beide Cytochrome sich annähern und der Energietransfer stattfinden kann. Allerdings konnten aufgrund der Tatsache, dass auch bei niedrigen Ionenstärken kein stabiler Komplex ausgebildet wurde, lediglich Abstandsdaten erhalten werden, die einen Mittelwert der Abstände widerspiegeln, die bei der Assoziation, der Ausbildung eines *Encounter*- und nachfolgend des effizienten ET-Komplexes eingenommen werden, und damit viel zu große Werte für einen stabilen Komplex ausweisen.

Die Beteiligung von 2-3 effektiven Ladungen und damit einer klaren elektrostatischen Komponente an der ET-Reaktion der beiden Cytochrome aus Mutagenesestudien und kinetischen Untersuchungen steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen, die man durch Kristallstrukturen von ET-Proteinkomplexen (Pelletier and Kraut 1992; Axelrod, Abresch *et al.* 2002; Lange and Hunte 2002) gewonnen hat. Diese zeigen, dass die direkten Kontakte durch hydrophobe Wechselwirkungen einer kleinen, apolaren Interaktionsfläche mit nur lockerer Seitenkettenpackung vermittelt werden, wobei eine Kation- $\pi$ -Wechselwirkung in einigen Fällen eine zentrale Rolle spielt (Crowley and

Ubbink 2003). Direkte elektrostatische Wechselwirkungen konnten nicht detektiert werden. Aus diesem Grunde wurden unter Orientierung am QCR/CYC-Co-Komplex (Hunte, Solmaz et al. 2002; Lange and Hunte 2002) die Aminosäurepositionen im *P. denitrificans* Cytochrom  $c_1$  gesucht, die denjenigen Resten im CYT1 aus Hefe entsprechen, die einen direkten Kontakt zum CYC aufweisen. Diese Aminosäurereste sind in dieser Arbeit durch zielgerichtete Mutagenese in ihrem Raumvolumen und/oder ihrer Polarität bzw. Ladung verändert und die Mutanten durch schnelle *pre-steady state*-Kinetiken im Vergleich zum WT charakterisiert worden. Die Mutationen lassen sich in drei Regionen auf der potentiellen Interaktionsfläche des Cytochrom  $c_{1CF}$  zusammenfassen (siehe Abschnitt 4.2.4 und Abbildung 4.3), wobei nur die Mutationen der Region I, die sich direkt oberhalb der Hämspalte befinden, einen kinetischen Effekt zeigen. Es wurde kein aromatischer Aminosäurerest in direkter Nähe zur entsprechenden Hefeposition im Sequenzalignment gefunden, der die stabilisierende Kation- $\pi$ -Interaktion zum Cytochrom  $c_{552F}$  ausbilden kann. Bei der Hälfte der Mutanten wurde durch die Mutation das Redoxpotential verändert (siehe Ergebnisse 3.5), wobei jeweils eine Verringerung des Potentials auftrat. Dies verdeutlicht die Empfindlichkeit der Hämeigenschaften gegenüber Veränderungen in der Proteinumgebung. Das veränderte Redoxpotential spielt allerdings bei den hier durchgeführten *pre-steady state*-Messungen keine Rolle, da alle Kinetiken in einem Ionenstärkebereich gemessen wurden, in dem die Reaktion eindeutig bimolekularer Natur und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Assoziation der beiden Redoxpartner ist, gefolgt von sehr schnellem ET innerhalb des Komplexes, der hier nicht weiter zeitlich aufgelöst wurde.

#### 4.5.2 Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV in *T. thermophilus*

Der Elektronentransfer zwischen Komplex III und Komplex IV der Atmungskette von *T. thermophilus* ist unter anderem durch *pre-steady state*- und *turnover*-Kinetiken sowie NMR-Techniken und Dockingberechnungen unter Verwendung der Proteinkomplexe und löslicher Redoxfragmente charakterisiert worden (Hon-nami and Oshima 1980; Soulimane, von Walter et al. 1997; Giuffre, Forte et al. 1999; Maneg, Ludwig et al. 2003; Mooser, Maneg et al. 2005; Muresanu, Pristovsek et al. 2006). Generell ergeben sich hohe ET-Raten im Bereich von  $10^6$  bis  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und eine Beteiligung von weniger als einer effektiven Ladung pro Redoxpartner, so dass die Interaktion hauptsächlich hydrophober Natur ist. Dies ist für einen thermophilen Organismus sinnvoll, da hydrophoben Wechselwirkungen mit steigenden Temperaturen ein größerer Einfluss zukommt, elektrostatische hingegen abgeschwächt werden.

Uneinigkeit herrschte über den Aspekt, ob Cytochrom  $c_{552}$  ein Substrat der *caa*<sub>3</sub>-Oxidase ist (Hon-nami and Oshima 1980; Soulimane, von Walter et al. 1997) und wie die Elektronen vom *bc*-Komplex zur *caa*<sub>3</sub>-Oxidase transferiert werde.

Die Expression der hydrophilen Cytochrom *c*-Domäne der *caa*<sub>3</sub>-Oxidase und ihre kinetische Charakterisierung in *pre-steady state*-Kinetiken mit beiden potentiellen physiologischen Redoxpartnern, Cytochrom  $c_{bc}$  und Cytochrom  $c_{552}$ , bestätigte den schnellen ET mit beiden Redoxpartnern. Eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante

von  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  für die Reaktion mit Cytochrom  $c_{552}$  konnte nur abgeschätzt werden, da die Reaktion so schnell verläuft, dass die durch konventionelle Stopped-Flow-Techniken nicht mehr aufzulösen war. Cytochrom  $c_{552}$  scheint demnach ein effizientes Substrat für die Cytochrom  $caa_3$ -Oxidase zu sein und die Ergebnisse von Hon-nami und Oshima (Hon-nami and Oshima 1980) zu bestätigen. Generell wurden sehr hohe Geschwindigkeitskonstanten erhalten ( $10^8$  bis  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und eine Beteiligung von weniger als einer effektiven Ladung pro Redoxpartner an der Interaktion aus vorherigen Ergebnissen bestätigt. Unter aeroben Bedingungen können die Elektronen von Cytochrom  $c_{bc}$  des  $bc$ -Komplexes direkt auf die Cytochrom  $c$ -Domäne der  $caa_3$ -Oxidase übertragen werden (siehe Abbildung 4.15 und Abschnitt 4.2.7), die unter diesen Bedingungen exprimiert wird (Fee, Choc et al. 1980; Hon-nami and Oshima 1980) und deuten so auf einen direkten Elektronentransfer zwischen den beiden Redoxkomplexen hin, ohne dass ein Elektronenmediator benutzt wird. Ein „Umweg“ über Cytochrom  $c_{552}$  scheint ebenfalls möglich. Dieses wird allerdings zusammen mit der  $ba_3$ -Oxidase unter semianaeroben Bedingungen exprimiert (Zimmermann, Nitsche *et al.* 1988; Soulimane, von Walter *et al.* 1997) und gewährleistet so unter diesen Bedingungen durch eine hohe Sauerstoffaffinität den Elektronentransfer vom  $bc$ -Komplex über Cytochrom  $c_{552}$  auf Sauerstoff.

#### 4.5.3 Methodische Aspekte und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesestudien, kinetischen Untersuchungen und fluoreszenzspektroskopischen Techniken stellen etablierte Methoden dar, die bereits erfolgreich zur Aufklärung von Elektronentransferprozessen eingesetzt worden sind. Dieser dynamisch ausgerichtete Ansatz begegnet außerdem der Kritik an „statischen“ röntgenkristallographischen Methoden zur Klärung der Eigenschaften von Interaktionen zwischen Redoxproteinen, da sie der transienten Natur dieser ET-Komplexe nicht gerecht werden.

Die Arbeiten mit löslichen Redoxfragmenten als Modellsystem von ansonsten membranständigen Proteinen, die in Proteinkomplexe und Superkomplexe eingebunden sind, birgt generell das Risiko, dass die intrinsischen Eigenschaften der Proteine durch eine Erhöhung der Rotations- und Translationsfreiheitsgrade und eine bessere Zugänglichkeit der prosthetischen Gruppe verändert werden können. Die hier verwendeten löslichen Fragmente sind teilweise im nativen Zustand nicht nur membranständig, was eine Orientierung des ET vorgibt, sondern auch Teil eines Proteinkomplexes, wodurch Teile der im löslichen Fragment in erhöhtem Maße zugänglichen Hämspalte durch andere Untereinheiten abgeschirmt werden. Die Einbindung in einen Superkomplex (Berry and Trumpower 1985; Stroh, Anderka et al. 2004) bringt außerdem nicht nur den Vorteil des *substrate channeling*, sondern auch den einer Stabilisierung von ansonsten instabilen Komplexen und Untereinheiten.

Die volle Redoxfunktionalität der hier verwendeten Fragmente und ihre Spezifität gegenüber ihren physiologischen Substraten kann als Kriterium für die Tauglichkeit als ET-Modellsystem angesehen werden. Durch zahlreiche vorangegangene Studien unter Verwendung löslicher Redoxfragmente konnte gezeigt werden (Lappalainen,

Watmough et al. 1995; Reincke, Thony-Meyer et al. 1999; Maneg, Ludwig et al. 2003; Maneg, Malatesta et al. 2004; Mooser, Maneg et al. 2005; Mooser, Maneg et al. 2006), dass diese als Modellsystem für den ET bestehen. Enorme Vorteile bieten unter anderem die leichte experimentelle Handhabung (z. B. durch den Verzicht auf Detergenzien) und die Fokussierung auf die zu interessierende ET-Reaktion, die nicht durch nachfolgende ET-Prozesse innerhalb eines Proteinkomplexes beeinflusst wird.

Um die Übertragbarkeit der erhaltenen Erkenntnisse über den ET zwischen den löslichen Cytochrom  $c_1$ - und  $c_{552}$ -Fragmente aus *P. denitrificans* auf die Situation im Proteinkomplex überprüfen zu können, wurde der  $bc_{1\Delta ac}$ -Komplex (Gerhus, Dissertation 1992) für eine leichtere Aufreinigung mit einem *His-tag* versehen. In zukünftigen Arbeiten sollen die Mutationen des Cytochrom  $c_{1CF}$  in diesen Komplex übertragen werden. Dieser bietet durch die Deletion der sauren Domäne im Cytochrom  $c_1$  den Vorteil, dass die durch die Mutation von unpolaren Resten hervorgerufenen Effekte nicht durch die hohe negative Ladungsdichte der sauren Extensionsdomäne überlagert werden können. Der  $bc_{1\Delta ac}$ WT-Komplex und seine Mutanten sollen dann vergleichend mit dem nativen  $bc_1$ -Komplex in kinetischen *pre-steady state* und *turnover*-Studien untersucht werden. Durch die Charakterisierung mittels *turnover*-Kinetiken wird zusätzlich der Kritik begegnet, dass für einen hohen Elektronendurchsatz nicht nur die Assoziation, Bildung des effizienten ET-Komplexes und die eigentlich ET-Reaktion (die in den *pre-steady state*-Kinetiken detektiert werden können) eine Rolle spielen, sondern ebenfalls der Dissoziation eine große Bedeutung zukommt, da für transiente ET-Komplexe eine schnelle Dissoziation gewährleistet sein muss, um einen hohen Elektronenumsatz sicherstellen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Adenosintriphosphat (ATP) als universelles Energieäquivalent der Zelle wird durch die oxidative Phosphorylierung synthetisiert, bei der Elektronen entlang des elektrochemischen Gefälles der Atmungskette über verschiedene Redoxkomplexe transferiert und durch die chemiosmotische Kopplung Protonen über die Membran gepumpt werden. Der Protonengradient wird dann von der ATP-Synthase genutzt, um ADP zu ATP zu phosphorylieren. Zentraler Redoxkomplex der Atmungskette vieler Pro- und Eukaryonten ist der  $bc_1$ -Komplex, der Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom *c* überträgt, von wo sie nachfolgend auf die Cytochrom *c*-Oxidase transferiert werden. Das mesophile Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* wird als Modellsystem für den mitochondrialen Elektronentransfer (ET) verwendet, da es eine aerobe Atmungskette exprimiert, die der mitochondrialen homolog ist, allerdings einen wesentlich einfacheren Aufbau der einzelnen Redoxkomplexe aufweist. Auch *Thermus thermophilus* als extrem thermophiles Bakterium bildet eine vergleichbare aerobe Atmungskette aus, wobei deren Proteine allerdings eine hohe Thermostabilität aufweisen, wodurch sie in das Interesse der Forschung gerückt sind.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des ET zwischen Komplex III und IV der Atmungsketten von *P. denitrificans* und *T. thermophilus*, die aufgrund ihrer mesophilen und thermophilen Eigenschaften unterschiedliche Mechanismen in der Wechselwirkung ihrer Redoxproteine aufweisen. Es wurden lösliche Redoxfragmente verwendet, um anhand von Mutagenesestudien, Stopped-Flow (SF)- und Laserflash-Kinetiken (LF) unter *pre-steady state*-Bedingungen sowie FRET-Experimenten den ET zu untersuchen. Für die LF-Experimente wurde eine photoaktive Rutheniumverbindung kovalent an Cyt  $c_{552}$  gekoppelt, durch die bei Laseranregung das Häm photooxidiert und dadurch der ET von einem reduzierten Redoxpartner induziert werden kann.

Die Strukturdaten des  $bc_1$ /Cyt *c*-Cokomplexes aus Hefe zeigen, dass direkte Kontakte zwischen Cyt  $c_1$  und Cyt *c* durch unpolare Wechselwirkungen und eine zentrale Kation- $\pi$ -Interaktion vermittelt werden. Daher wurden anhand von Sequenz- und Strukturalignments äquivalente Aminosäurepositionen im *Paracoccus* Cyt  $c_1$  identifiziert, die an der Wechselwirkung zu Cyt  $c_{552}$  beteiligt sein könnten. Diese wurden durch gerichtete Mutagenese in ihrem Raumvolumen, ihrer Polarität oder Ladung variiert und in kinetischen Studien untersucht. Für die LF-Kinetiken sowie für die FRET-Experimente wurden Oberflächen-Cysteinmutanten des Cyt  $c_1$  bzw.  $c_{552}$  generiert, über deren SH-Gruppen kovalent der Rutheniumkomplex bzw. Fluorophore gekoppelt werden konnten.

Die ET-Reaktion zeigt zwei Phasen in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Bei niedrigen Ionenstärken ergeben sich Geschwindigkeitskonstanten von  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und eine geringe Ionenstärkeabhängigkeit (etwa eine effektive Ladung), wohingegen bei Ionenstärken ab 35 mM 2-3 effektive Ladungen pro Redoxpartner beteiligt sind und bimolekulare Geschwindigkeitskonstanten von  $10^7$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  erhalten werden. Diese Ergebnisse deuten auf die Bildung eines Encounter-Komplexes bei niedrigen Ionenstärken hin, der

ein Ensemble verschiedener Distanzen und relativer Orientierungen der Redoxpartner zueinander darstellt. Diese Annahme wurde ebenfalls durch FRET-Experimente bestätigt, durch die selbst bei niedrigen Ionenstärken keine definierten Abstände erhalten werden konnten. Die Geschwindigkeitskonstanten der bimolekularen Reaktion weisen auf einen diffusionskontrollierten Prozess hin, an dem 2 bis 3 effektive Ladungen an der elektrostatischen Annäherung der beiden Redoxpartner beteiligt sind. Diese Ergebnisse werden durch vorherige kinetische Untersuchungen und EPR-Studien des ET von Cyt  $c_{552}$  zum  $Cu_A$ -Fragment der  $aa_3$ -Oxidase bekräftigt, für den die gleiche Anzahl effektiver Ladungen und die Bildung eines Encounter-Komplex gefunden wurden. Lediglich  $c_1$ -Mutanten, deren variierte Aminosäuren sich direkt oberhalb der Hämspalte und in der Sequenz um bzw. innerhalb des Hämbindemotivs befinden, bewirken eine Verlangsamung der Gesamtreaktion und ein leicht verändertes Ionenstärkeverhalten, das auf eine leicht verschobene Interaktionsfläche hindeutet. Es wurde durch Sequenz- und Strukturalignments kein aromatischer Rest in direkter Nähe der entsprechenden Position im *Paracoccus* Cyt  $c_1$  gefunden, der wie im Hefekomplex eine stabilisierende Kation- $\pi$ -Interaktion zwischen den Redoxpartnern vermittelt.

Zur Untersuchung des ET zwischen Komplex III und Komplex IV aus *T. thermophilus* wurde die hydrophile Cytochrom  $c$ -Domäne der  $caa_3$ -Oxidase in Analogie zum *Paracoccus*-System als lösliches Redoxfragment kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Dieses Fragment wurde in SF-Studien eingesetzt, um den ET zu seinen potentiellen Redoxpartnern Cyt  $c_{bc}$  des  $bc$ -Komplexes und Cyt  $c_{552}$  zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass das  $c_{caa_3}$ -Fragment Elektronen von beiden Redoxpartnern empfängt, wobei die ET-Reaktion mit Cyt  $c_{552}$  so schnell verläuft, dass sie durch SF-Techniken nur schlecht aufgelöst und lediglich eine Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten abgeschätzt werden kann ( $k_{on} \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Die Reaktion mit Cyt  $c_{bc}$  verläuft auch noch schnell ( $k_{on} = 10^8\text{-}10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und ist nahezu unabhängig von der Ionenstärke, was eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen beiden Redoxpartnern bestätigt. Die Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass ein ET direkt zwischen zwei Redoxproteinkomplexen ( $bc$ -Komplex und  $caa_3$ -Oxidase) stattfindet, ohne dass ein Elektronenüberträger (wie z. B. Cyt  $c_{552}$ ) zwischengeschaltet ist.

Um die Übertragbarkeit der Erkenntnisse, die hier über den ET an löslichen Redoxfragmenten gewonnen wurden, in einem Proteinkomplex zu verifizieren, wurde ein  $bc_1$ -Komplex verwendet, in dem die für *P. denitrificans* einzigartige saure Cyt  $c_1$ -Domäne deletiert ist. Der Komplex wurde für eine erleichterte Aufreinigung mit einem His-tag versehen, homolog exprimiert und erste Aufreinigungs- und Charakterisierungsschritte unternommen. Er soll zukünftig eingesetzt werden, um die Mutationen des löslichen  $c_1$ -Fragmentes in den Komplex zu überführen und die Mutanten kinetisch mittels *pre-steady state*- und *steady state*-Techniken im Vergleich zum  $bc_1$ WT-Komplex zu untersuchen, ohne dass die Effekte der Punktmutationen durch die hohe negative Ladungsdichte der sauren Domäne überlagert werden.



## 6 Summary

Adenosine triphosphate as the universal energy source of cells is produced by oxidative phosphorylation, where electrons are passed through different transmembrane redox complexes along the electrochemical gradient of the respiratory chain. This electron transfer (ET) is coupled to proton pumping across the membrane to generate a gradient which is then used by the ATP-synthase to drive phosphorylation of ADP to ATP. The cytochrome  $bc_1$ -complex represents the central part of this aerobic respiratory chain of many pro- and eukaryotic organisms and transfers electrons from ubiquinol to cytochrome  $c$ , from where they are passed subsequently to cytochrome  $c$ -oxidase. The mesophilic soil bacterium *Paracoccus denitrificans* is used as a model system for mitochondrial electron transfer processes because it has an aerobic respiratory chain which is homologous to the mitochondrial one, but with a much simpler subunit composition of its redox complexes; this bacterium is a member of the  $\alpha$ -subdivision of the proteobacteria, presumably harbouring the mitochondrial precursor. Also the extremely thermophilic genus *Thermus thermophilus* provides a similar aerobic respiratory chain. Proteins of *T. thermophilus* have gained interest because of their thermostability and their decreased sensitivity against extreme pH-values and proteolytic degradation.

The aim of this work was the characterization of the electron transfer between complex III and complex IV of the aerobic respiratory chains of *P. denitrificans* and *T. thermophilus*. Because of their mesophilic or thermophilic properties both organisms show different mechanisms of interaction between their redox components.

Soluble redox fragments have been successfully used before to study the electron transfer reactions of *P. denitrificans* and *T. thermophilus* (Lappalainen, Watmough et al. 1995; Reincke, Thony-Meyer et al. 1999; Maneg, Ludwig et al. 2003; Maneg, Malatesta et al. 2004; Mooser, Maneg et al. 2005). In this work soluble fragments of cytochrome  $c_1$  ( $c_{1CF}$ ) (Eichhorn, Dissertation 2003) and cytochrome  $c_{552}$  ( $c_{552F}$ ) (Reincke, Thony-Meyer et al. 1999) were used to determine the interaction of both redox partners in a dynamic and functional approach by mutagenesis studies, *pre-steady state* kinetics and fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments.

From the yeast  $bc_1$ /cytochrome  $c$  co-complex structure, information about the cytochrome  $c_1$ /cytochrome  $c$  interaction could be obtained (Lange and Hunte 2002); Solmaz, Dissertation 2006), showing that direct interactions are mediated by hydrophobic contacts and a central cation- $\pi$ -interaction. Based on this knowledge amino acid positions of the *Paracoccus* cytochrome  $c_1$  were identified by sequence alignments and structural modelling approaches that might contribute to the interaction to cytochrome  $c_{552}$ . These positions were exchanged by site-directed mutagenesis for residues differing in volume, polarity or charge, and these mutants were analyzed by stopped-flow (SF) *pre-steady state* studies under *non-pseudo first order conditions* to determine the ET-reactions on a millisecond timescale. Furthermore surface cysteine

mutants of both cytochromes were generated, and a cytochrome  $c_{552F}$  cysteine mutant (N23C) was then used for covalently labeling with a photoactive ruthenium compound. The attached ruthenium can be excited by laser flash (LF) and photooxidizes the heme group of the cytochrome, thus inducing electron transfer from a reduced redox partner. With the same set of  $c_{1CF}$  interaction mutants used for the stopped-flow approach ruthenium LF-kinetics were performed, providing a better resolution at faster timescales (sub-ms) and the regenerability of the ET-system.

The ET-reaction between cytochrome  $c_{1CF}WT$  and  $c_{552F}$  yields bimolecular rate constants of  $10^7$  to  $10^9 M^{-1}s^{-1}$  depending on the ionic strength conditions and therefore reaches the limit of a diffusion controlled process. Two to three effective charges on each redox partner contribute to the interaction, so that the ET-reaction reveals a clear electrostatic component. The same number of effective charges had been found earlier for the interaction of cytochrome  $c_{552F}$  with the soluble  $Cu_A$ -fragment of the  $aa_3$ -oxidase (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Maneg, Malatesta *et al.* 2004), which confirms the assumption that cytochrome  $c_{552}$  uses the same interaction interface reacting with cytochrome  $c_1$  and the  $aa_3$ - $Cu_A$ -domain (Margoliash, Ferguson-Miller *et al.* 1976). The laser flash experiments elucidated two different kinetic phases: a very fast phase at low ionic strength with high rates ( $10^9 M^{-1}s^{-1}$ ) and a low ionic strength dependency (around one effective charge), which represents the formation of an encounter complex, followed by the bimolecular phase of stronger ionic strength dependency (2-3 effective charges) and bimolecular rate constants of  $10^7$  to  $10^9 M^{-1}s^{-1}$ . These results confirm earlier findings of a multistep ET reaction mechanism for transient ET interactions (Ubbink, Ejdeback *et al.* 1998; Witt, Malatesta *et al.* 1998; Drosou, Reincke *et al.* 2002; Maneg, Ludwig *et al.* 2003), where the two redox partners approach each other via long range electrostatic interactions and form an encounter complex, which is an ensemble of distances and relative orientations of the two redox partners. Hydrophobic contacts then mediate the fine tuning yielding an efficient ET-complex where electron transfer can take place.

Mutations which are located within and around the heme binding motif (region I: E243K, V244Q, V244T, A247N) and are positioned directly above the heme crevice in the structural modelling approaches (picture) all show decreased rate constants. A slightly altered ionic strength dependency can just be detected in two cases (V244Q, V244T), which could be due to a shifted interaction interface, because no charges were introduced or eliminated in these positions. Although at position 243 a negative charge was replaced by a positive one, the ionic strength dependency is identical to wild type. So the conclusion is that introduction of a bulkier residue in this position may sterically interfere with the ET, whereas the charge does not contribute to the interaction directly. Only K315E of the mutants of regions II shows a slightly stronger ionic strength behaviour and decreased rate constants. These results were unexpected, because the exchange of a positive charge by a negative one should rather accelerate the ET-reaction, for the  $c_{552}$ -heme cleft is surrounded by a ring of positively charged lysines. The same position mutated to threonine (K315T) shows WT behaviour. Taken together the effect of K315E can simply be explained by a shift in the interaction interface, which slows down the ET-reaction.

In a sequence alignment no aromatic residue in the *Paracoccus* cytochrome  $c_1$  could be identified in close vicinity to the equivalent position, which may take over the function of F230 in yeast to mediate the central cation- $\pi$ -interaction. The direct counterpart of F230 is S378, showing WT behaviour when mutated to S378A.

To gain information about the ET-complex of the *Paracoccus* cytochrome  $c_1$  and cytochrome  $c_{552}$  of which no structural NMR or X-ray data are available so far, FRET experiments were initiated, which can be used as a “spectroscopic ruler” (Stryer and Haugland 1967) to obtain distance informations in a range of 10-100 Å. For this purpose a set of surface cysteine mutants of both redox partners were constructed for covalent fluorophor attachment to the protein. When viewed onto the heme crevices the cytochromes were divided into four quadrants and positions for cysteine introduction were chosen following two criteria: the amino acid position should be located at the heme periphery to avoid interference with ET-complex formation, and the position must be surface-exposed for solvent accessibility for the fluorophor attachment. Two different fluorophores were used for covalent modification, to allow suitable spectral overlap. By detecting the fluorescence intensity of the donor with and without acceptor the FRET efficiency  $E$  could be calculated and distance information obtained. Four different  $c_1$  cysteine mutants were measured each against four  $c_{552}$  cysteine mutants under low ionic strength conditions in an attempt to achieve a stable ET-complex, followed by an increase in ionic strength to abolish complex formation and modify FRET. The 16 distances were taken as parameters for a HADDOCK docking modelling calculation by rigid body refinement: all FRET-derived distances turned out to be too long to match a single ET-complex. As has been known yet from the LF-kinetics no stable complex between cytochrom  $c_{1CF}$  and  $c_{552F}$  is formed even at low ionic strength conditions, so that the obtained FRET distances reflect the situation of the encounter complex and represent an ensemble of distances and relative orientations of the two redox partners. These results are in line with an EPR study of Lyubenova, S., Siddiqui, K., et. al. (2006, submitted) who could not find a single well-defined structure of the complex of the cytochrome  $c$ -oxidase  $Cu_A$ -fragment with  $c_{552F}$ , but rather a broad distribution of distances and orientations between the two redox partners in a presumed encounter complex.

Electrons in the *T. thermophilus* aerobic respiratory chain are passed from a recently discovered and characterized  $bc$ -complex (Mooser, Maneg *et al.* 2005; Mooser, Maneg *et al.* 2006) via a soluble cytochrome  $c_{552}$  to the  $ba_3$ -oxidase, which is expressed under low oxygen conditions. These ET reactions have been well characterized by SF-kinetics using cloned soluble fragments of cytochrome  $c$  of the  $bc$ -complex ( $c_{bc}$ ) and the  $ba_3$ -oxidase ( $Cu_A$ -fragment) together with the native soluble cytochrome  $c_{552}$  (Maneg, Ludwig *et al.* 2003; Mooser, Maneg *et al.* 2005). Those investigations revealed fast ET with bimolecular rates of  $10^6$  to  $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$  and a very weak ionic strength dependence of more or less one effective charge involved.

Under aerobic conditions the alternative  $caa_3$ -oxidase is expressed, which contains a hydrophilic C-terminal cytochrome  $c$ -domain fused onto a generic oxidase subunit II. In this work the hydrophilic cytochrome  $c$ -domain was cloned as a soluble fragment in

analogy to the former work on the *Paracoccus* and *Thermus* ET-processes, heterologously expressed in *E. coli* and characterized to address the question of the physiological redox partners of the *caa3*-oxidase. *Pre-steady state* stopped-flow kinetics were performed of the *c<sub>caa3</sub>*-fragment with cytochrome *c<sub>552</sub>* and the soluble *c<sub>bc</sub>*-fragment, revealing fast ET reactions with both redox partners. The ET between cytochrome *c<sub>552</sub>* and the *c<sub>caa3</sub>*-fragment yields bimolecular rate constants of  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  which could only be roughly estimated, because the reaction could barely be resolved by stopped-flow techniques. The ET between cytochrome *c<sub>bc</sub>* and *c<sub>caa3</sub>* turned out to be still very fast yielding rate constants of  $10^8$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and a weak ionic strength dependence of 0.5 effective charges. The Brønsted plot shows a slightly positive slope, pointing at weak repulsive electrostatic forces. Nevertheless the fast rate constants indicate a directed and specific ET reaction, which is mediated by hydrophobic interactions that overcome the repulsion. The ET reaction between the cytochrome *c<sub>bc</sub>*- and the *c<sub>caa3</sub>*-fragment for the first time gives the hint of direct ET between two redox complexes without using an electron shuttle, indicating direct ET reaction between complex III and the *caa3*-oxidase in *T. thermophilus*.

To verify the results about electron transfer obtained with the *P. denitrificans* soluble redox fragments, the cytochrome *c<sub>1CF</sub>* mutations will be transferred into a *bc<sub>1</sub>*-complex (*bc<sub>1Δac</sub>*) lacking the unique acidic *c<sub>1</sub>*-domain, and characterized by *steady state* and *pre-steady state* kinetics. This complex was originally constructed to determine the function of the acidic domain (Gerhus, Dissertation 1992) and was used in this work to avoid masking the effects of single point-mutations in front of an excessive negative charge background. For the loss of the “purification tag” consisting of the negative charged acidic domain, a histidine tag was introduced by SOEing (splicing by overlap extension) PCR at the C-terminus of cytochrome *b* to facilitate purification via affinity chromatography. The his-tagged *bc<sub>1Δac</sub>*-complex was expressed in *P. denitrificans* and membranes were prepared, in which the presence of the complex was confirmed by redox spectra and Western blot analysis using antibodies directed against individual subunits and the histidine tag. First attempts were made to establish a purification NiNTA-protocol for optimized purification. Future work will be the transfer of the *c<sub>1CF</sub>* mutations, the homologous expression in *P. denitrificans* and purification via NiNTA-column. The functional characterization will be performed by *pre-steady state* and *steady state* kinetics of the *bc<sub>1Δac</sub>*-complex, comparing the *bc<sub>1Δac</sub>*-complex and its point-mutated versions with the wild type *bc<sub>1</sub>*-complex.

## 7 Literatur

- Ahn, T., S. K. Yim, et al. (2001), *Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes* Anal Biochem **291**(2): 300-3.
- Armstrong, G. A. (1997), *Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale* Annu Rev Microbiol **51**: 629-59.
- Arslan, E., H. Schulz, et al. (1998), *Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in Escherichia coli* Biochem Biophys Res Commun **251**(3): 744-7.
- Axelrod, H. L., E. C. Abresch, et al. (2002), *X-ray structure determination of the cytochrome c2: reaction center electron transfer complex from Rhodospirillum rubrum* J Mol Biol **319**(2): 501-15.
- Baker, S. C., S. J. Ferguson, et al. (1998), *Molecular genetics of the genus Paracoccus: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility* Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1046-78.
- Bartoschek, S., M. Johansson, et al. (2001), *Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome bc1 complex* J Biol Chem **276**(38): 35231-4.
- Bates, P. A., L. A. Kelley, et al. (2001), *Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM* Proteins Suppl **5**: 39-46.
- Bates, P. A. and M. J. Sternberg (1999), *Model building by comparison at CASP3: using expert knowledge and computer automation* Proteins Suppl **3**: 47-54.
- Berks, B. C., M. D. Page, et al. (1995), *Sequence analysis of subunits of the membrane-bound nitrate reductase from a denitrifying bacterium: the integral membrane subunit provides a prototype for the dihaem electron-carrying arm of a redox loop* Mol Microbiol **15**(2): 319-31.
- Berlier, J. E., A. Rothe, et al. (2003), *Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates* J Histochem Cytochem **51**(12): 1699-712.
- Berry, E. A., M. Guergova-Kuras, et al. (2000), *Structure and function of cytochrome bc complexes* Annu Rev Biochem **69**: 1005-75.
- Berry, E. A., L. S. Huang, et al. (1999), *Structure of the avian mitochondrial cytochrome bc1 complex* J Bioenerg Biomembr **31**(3): 177-90.
- Berry, E. A. and B. L. Trumpower (1985), *Isolation of ubiquinol oxidase from Paracoccus denitrificans and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes* J Biol Chem **260**(4): 2458-67.
- Berry, E. A. and B. L. Trumpower (1987), *Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine heme spectra* Anal Biochem **161**(1): 1-15.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979), *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA* Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bosma, G., M. Braster, et al. (1987), *Isolation and characterization of ubiquinol oxidase complexes from Paracoccus denitrificans cells cultured under various limiting growth conditions in the chemostat* Eur J Biochem **165**(3): 657-63.

- Brandt, U. (1998), *The chemistry and mechanics of ubihydroquinone oxidation at center P (Qo) of the cytochrome bc1 complex* Biochim Biophys Acta **1365**(1-2): 261-8.
- Brandt, U. and B. Trumpower (1994), *The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria* Crit Rev Biochem Mol Biol **29**(3): 165-97.
- Breyton, C. (2000), *The cytochrome b(6)f complex: structural studies and comparison with the bc(1) complex* Biochim Biophys Acta **1459**(2-3): 467-74.
- Brock, T. D. and H. Freeze (1969), *Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile* J Bacteriol **98**(1): 289-97.
- Broger, C., S. Salardi, et al. (1983), *Interaction between isolated cytochrome c1 and cytochrome c* Eur J Biochem **131**(2): 349-52.
- Buse, G., S. Hensel, et al. (1989), *Evidence for cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome c--subunit II fused protein in the cytochrome 'c1aa3' of Thermus thermophilus. How old is cytochrome oxidase?* Eur J Biochem **181**(1): 261-8.
- Camacho, C. J., D. W. Gatchell, et al. (2000), *Scoring docked conformations generated by rigid-body protein-protein docking* Proteins **40**(3): 525-37.
- Camacho, C. J., Z. Weng, et al. (1999), *Free energy landscapes of encounter complexes in protein-protein association* Biophys J **76**(3): 1166-78.
- Chance, B. and R. Sager (1957), *Oxygen and Light Induced Oxidations of Cytochrome, Flavoprotein, and Pyridine Nucleotide in a Chlamydomonas Mutant* Plant Physiol **32**(6): 548-61.
- Chothia, C. and J. Janin (1975), *Principles of protein-protein recognition* Nature **256**(5520): 705-8.
- Chung, Y. R., C. H. Kim, et al. (2000), *Paenibacillus koreensis sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound* Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 4**: 1495-500.
- Clemons, W. M., Jr., D. E. Brodersen, et al. (2001), *Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from Thermus thermophilus: purification, crystallization and structure determination* J Mol Biol **310**(4): 827-43.
- Contreras-Moreira, B., P. W. Fitzjohn, et al. (2002), *Comparative modelling: an essential methodology for protein structure prediction in the post-genomic era* Appl Bioinformatics **1**(4): 177-90.
- Crofts, A. R. and E. A. Berry (1998), *Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria* Curr Opin Struct Biol **8**(4): 501-9.
- Crofts, A. R., S. Hong, et al. (1999), *Physicochemical aspects of the movement of the rieske iron sulfur protein during quinol oxidation by the bc(1) complex from mitochondria and photosynthetic bacteria* Biochemistry **38**(48): 15827-39.
- Crofts, A. R. and S. W. Meinhardt (1982), *A Q-cycle mechanism for the cyclic electron-transfer chain of Rhodospseudomonas sphaeroides* Biochem Soc Trans **10**(4): 201-3.
- Crowley, P. B. and M. Ubbink (2003), *Close encounters of the transient kind: protein interactions in the photosynthetic redox chain investigated by NMR spectroscopy* Acc Chem Res **36**(10): 723-30.
- Dale, R. E., J. Eisinger, et al. (1979), *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer* Biophys J **26**(2): 161-93.

- Daniel, R. M., D. A. Cowan, et al. (1982), *A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis* Biochem J **207**(3): 641-4.
- Darrrouzet, E., M. Valkova-Valchanova, et al. (2000), *Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion* Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4567-72.
- de Gier, J. W., M. Lubben, et al. (1994), *The terminal oxidases of Paracoccus denitrificans* Mol Microbiol **13**(2): 183-96.
- de Gier, J. W., M. Schepper, et al. (1996), *Structural and functional analysis of aa3-type and cbb3-type cytochrome c oxidases of Paracoccus denitrificans reveals significant differences in proton-pump design* Mol Microbiol **20**(6): 1247-60.
- de Vries, S., J. A. Berden, et al. (1980), *Properties of a semiquinone anion located in the QH2:cytochrome c oxidoreductase segment of the mitochondrial respiratory chain* FEBS Lett **122**(1): 143-8.
- Ding, H., D. E. Robertson, et al. (1992), *Cytochrome bc1 complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Qo site: a double-occupancy Qo site model* Biochemistry **31**(12): 3144-58.
- Dominguez, C., R. Boelens, et al. (2003), *HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information* J Am Chem Soc **125**(7): 1731-7.
- Drosou, V., F. Malatesta, et al. (2002), *Mutations in the docking site for cytochrome c on the Paracoccus heme aa3 oxidase. Electron entry and kinetic phases of the reaction* Eur J Biochem **269**(12): 2980-8.
- Drosou, V., B. Reincke, et al. (2002), *Specificity of the interaction between the Paracoccus denitrificans oxidase and its substrate cytochrome c: comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome c(552), and its truncated and site-directed mutants* Biochemistry **41**(34): 10629-34.
- Engstrom, G., R. Rajagukguk, et al. (2003), *Design of a ruthenium-labeled cytochrome c derivative to study electron transfer with the cytochrome bc1 complex* Biochemistry **42**(10): 2816-24.
- Engstrom, G., K. Xiao, et al. (2002), *Photoinduced electron transfer between the Rieske iron-sulfur protein and cytochrome c(1) in the Rhodobacter sphaeroides cytochrome bc(1) complex. Effects of pH, temperature, and driving force* J Biol Chem **277**(34): 31072-8.
- Fee, J. A., Y. Chen, et al. (2000), *Integrity of thermus thermophilus cytochrome c552 synthesized by Escherichia coli cells expressing the host-specific cytochrome c maturation genes, ccmABCDEFGH: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein* Protein Sci **9**(11): 2074-84.
- Fee, J. A., M. G. Choc, et al. (1980), *Properties of a copper-containing cytochrome claa3 complex: a terminal oxidase of the extreme thermophile Thermus thermophilus HB8* Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 147-51.
- Fee, J. A., K. L. Findling, et al. (1984), *Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from Thermus thermophilus. Evidence for a [2Fe-2S] cluster having non-cysteine ligands* J Biol Chem **259**(1): 124-33.
- Fee, J. A., D. Kuila, et al. (1986), *Respiratory proteins from extremely thermophilic, aerobic bacteria* Biochim Biophys Acta **853**(2): 153-85.

- Ferguson-Miller, S., D. L. Brautigan, et al. (1976), *Correlation of the kinetics of electron transfer activity of various eukaryotic cytochromes c with binding to mitochondrial cytochrome c oxidase* J Biol Chem **251**(4): 1104-15.
- Ferguson-Miller, S., D. L. Brautigan, et al. (1978), *Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochromes c with cytochrome c oxidase* J Biol Chem **253**(1): 149-59.
- Ferguson, S. J. (1994), *Denitrification and its control* Antonie Van Leeuwenhoek **66**(1-3): 89-110.
- Gabellini, N., J. R. Bowyer, et al. (1982), *A cytochrome b/c1 complex with ubiquinol-cytochrome c2 oxidoreductase activity from Rhodopseudomonas sphaeroides GA* Eur J Biochem **126**(1): 105-11.
- Gabellini, N. and W. Sebald (1986), *Nucleotide sequence and transcription of the fbc operon from Rhodopseudomonas sphaeroides. Evaluation of the deduced amino acid sequences of the FeS protein, cytochrome b and cytochrome c1* Eur J Biochem **154**(3): 569-79.
- Gatti, D. L., G. Tarr, et al. (1998), *Cloning and sequence analysis of the structural gene for the bc1-type Rieske iron-sulfur protein from Thermus thermophilus HB8* J Bioenerg Biomembr **30**(3): 223-33.
- Giuffrè, A., E. Forte, et al. (1999), *Kinetic properties of ba3 oxidase from Thermus thermophilus: effect of temperature* Biochemistry **38**(3): 1057-65.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997), *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling* Electrophoresis **18**(15): 2714-23.
- Gutierrez-Cirlos, E. B. and B. L. Trumpower (2002), *Inhibitory analogs of ubiquinol act anti-cooperatively on the Yeast cytochrome bc1 complex. Evidence for an alternating, half-of-the-sites mechanism of ubiquinol oxidation* J Biol Chem **277**(2): 1195-202.
- Hall, J., X. H. Zha, et al. (1987), *The binding domain on horse cytochrome c and Rhodobacter sphaeroides cytochrome c2 for the Rhodobacter sphaeroides cytochrome bc1 complex* Biochemistry **26**(14): 4501-4.
- Hall, J., X. H. Zha, et al. (1989), *Role of specific lysine residues in the reaction of Rhodobacter sphaeroides cytochrome c2 with the cytochrome bc1 complex* Biochemistry **28**(6): 2568-71.
- Haltia, T., A. Puustinen, et al. (1988), *The Paracoccus denitrificans cytochrome aa3 has a third subunit* Eur J Biochem **172**(3): 543-6.
- Hanahan, D. (1983), *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids* J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Harikumar, K. G. and L. J. Miller (2005), *Fluorescence resonance energy transfer analysis of the antagonist- and partial agonist-occupied states of the cholecystokinin receptor* J Biol Chem **280**(19): 18631-5.
- Harikumar, K. G., D. I. Pinon, et al. (2002), *Environment and mobility of a series of fluorescent reporters at the amino terminus of structurally related peptide agonists and antagonists bound to the cholecystokinin receptor* J Biol Chem **277**(21): 18552-60.
- Harms, N. and R. J. van Spanning (1991), *C1 metabolism in Paracoccus denitrificans: genetics of Paracoccus denitrificans* J Bioenerg Biomembr **23**(2): 187-210.



- Harrenga, A., B. Reincke, et al. (2000), *Structure of the soluble domain of cytochrome c(552) from Paracoccus denitrificans in the oxidized and reduced states* J Mol Biol **295**(3): 667-78.
- Heacock, D. H., 2nd, R. Q. Liu, et al. (1993), *Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome c derivatives and cytochrome c1* J Biol Chem **268**(36): 27171-5.
- Healy, A. M., T. L. Helser, et al. (1987), *Sequences required for transcriptional initiation of the Saccharomyces cerevisiae CYC7 genes* Mol Cell Biol **7**(10): 3785-91.
- Hedges, R. W. and A. E. Jacob (1974), *Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons* Mol Gen Genet **132**(1): 31-40.
- Hellwig, P., T. Soulimane, et al. (2002), *Electrochemical, FT-IR and UV/VIS spectroscopic properties of the caa3 oxidase from T. thermophilus* Eur J Biochem **269**(19): 4830-8.
- Hinchliffe, P. and L. A. Sazanov (2005), *Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I* Science **309**(5735): 771-4.
- Hon-Nami, K. and T. Oshima (1977), *Purification and some properties of cytochrome c-552 from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8* J Biochem (Tokyo) **82**(3): 769-76.
- Hon-nami, K. and T. Oshima (1980), *Cytochrome oxidase from an extreme thermophile. Thermus thermophilus HB8* Biochem Biophys Res Commun **92**(3): 1023-9.
- Hong, S., N. Ugulava, et al. (1999), *The energy landscape for ubihydroquinone oxidation at the Q(o) site of the bc(1) complex in Rhodobacter sphaeroides* J Biol Chem **274**(48): 33931-44.
- Hoseki, J., T. Yano, et al. (1999), *Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for Thermus thermophilus* J Biochem (Tokyo) **126**(5): 951-6.
- Hunsicker-Wang, L. M., A. Heine, et al. (2003), *High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from Thermus thermophilus: analysis and comparison* Biochemistry **42**(24): 7303-17.
- Hunte, C., J. Koepke, et al. (2000), *Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast Saccharomyces cerevisiae co-crystallized with an antibody Fv fragment* Structure **8**(6): 669-84.
- Hunte, C., S. Solmaz, et al. (2002), *Electron transfer between yeast cytochrome bc(1) complex and cytochrome c: a structural analysis* Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 21-8.
- Iwata, S., J. W. Lee, et al. (1998), *Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex* Science **281**(5373): 64-71.
- John, P. and F. R. Whatley (1975), *Paracoccus denitrificans and the evolutionary origin of the mitochondrion* Nature **254**(5500): 495-8.
- John, P. and F. R. Whatley (1975), *Paracoccus denitrificans: a present-day bacterium resembling the hypothetical free-living ancestor of the mitochondrion* Symp Soc Exp Biol(29): 39-40.
- Jones, S. and J. M. Thornton (1996), *Principles of protein-protein interactions* Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 13-20.

- Kaledin, A. S., A. G. Sliusarenko, et al. (1980), *[Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1]* Biokhimiia **45**(4): 644-51.
- Kannt, A., T. Soulimane, et al. (1998), *Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba3*-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus** FEBS Lett **434**(1-2): 17-22.
- Kim, C. H., C. Balny, et al. (1987), *Role of the hinge protein in the electron transfer between cardiac cytochrome *c1* and *c*. Equilibrium constants and kinetic probes* J Biol Chem **262**(17): 8103-8.
- Kim, C. H. and T. E. King (1981), *The indispensibility of a mitochondrial 15K protein for the formation of the cytochrome *C1*-cytochrome *c* complex* Biochem Biophys Res Commun **101**(2): 607-14.
- Kim, C. H. and T. E. King (1983), *A mitochondrial protein essential for the formation of the cytochrome *c1*-*c* complex. Isolation, purification, and properties* J Biol Chem **258**(22): 13543-51.
- Kim, C. H. and T. E. King (1987), *Preparation and properties of cardiac cytochrome *c1** Biochemistry **26**(7): 1955-61.
- Kim, C. H. and R. S. Zitomer (1990), *Disruption of the gene encoding subunit VI of yeast cytochrome *bc1* complex causes respiratory deficiency of cells with reduced cytochrome *c* levels* FEBS Lett **266**(1-2): 78-82.
- Knaff, D. B. (1990), *The cytochrome *bc1* complex of photosynthetic bacteria* Trends Biochem Sci **15**(8): 289-91.
- Knoll, A. H. (1992), *The early evolution of eukaryotes: a geological perspective* Science **256**(5057): 622-7.
- Koppenol, W. H. and E. Margoliash (1982), *The asymmetric distribution of charges on the surface of horse cytochrome *c*. Functional implications* J Biol Chem **257**(8): 4426-37.
- Kramer, B., W. Kramer, et al. (1984), *Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli** Cell **38**(3): 879-87.
- Kurowski, B. and B. Ludwig (1987), *The genes of the *Paracoccus denitrificans* *bc1* complex. Nucleotide sequence and homologies between bacterial and mitochondrial subunits* J Biol Chem **262**(28): 13805-11.
- Laemmli, U. K. (1970), *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4* Nature **227**(5259): 680-5.
- Lambert, C., N. Leonard, et al. (2002), *ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures* Bioinformatics **18**(9): 1250-6.
- Lange, C. and C. Hunte (2002), *Crystal structure of the yeast cytochrome *bc1* complex with its bound substrate cytochrome *c** Proc Natl Acad Sci U S A **99**(5): 2800-5.
- Lappalainen, P., N. J. Watmough, et al. (1995), *Electron transfer between cytochrome *c* and the isolated *CuA* domain: identification of substrate-binding residues in cytochrome *c* oxidase* Biochemistry **34**(17): 5824-30.
- Link, T. A. (1997), *The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (*Q(P)*) site of the cytochrome *bc1* complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism* FEBS Lett **412**(2): 257-64.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951), *Protein measurement with the Folin phenol reagent* J Biol Chem **193**(1): 265-75.

- Lucke, C., B. Reincke, et al. (2000), *Complete 1H, 15N and 13C assignment of the functional domain of Paracoccus denitrificans cytochrome c552 in the oxidized state* J Biomol NMR **18**(4): 365-6.
- Ludwig, B. (1992), *Terminal oxidases in Paracoccus denitrificans* Biochim Biophys Acta **1101**(2): 195-7.
- Ludwig, B. and G. Schatz (1980), *A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa3) from Paracoccus denitrificans* Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 196-200.
- Ludwig, B., K. Suda, et al. (1983), *Cytochrome c1 from Paracoccus denitrificans* Eur J Biochem **137**(3): 597-602.
- Malatesta, F. (2005), *The study of bimolecular reactions under non-pseudo-first order conditions* Biophys Chem **116**(3): 251-6.
- Maneg, O., B. Ludwig, et al. (2003), *Different interaction modes of two cytochrome-c oxidase soluble CuA fragments with their substrates* J Biol Chem **278**(47): 46734-40.
- Maneg, O., F. Malatesta, et al. (2004), *Interaction of cytochrome c with cytochrome oxidase: two different docking scenarios* Biochim Biophys Acta **1655**(1-3): 274-81.
- Margoliash, E., S. Ferguson-Miller, et al. (1976), *Do evolutionary changes in cytochrome c structure reflect functional adaptations?* Fed Proc **35**(10): 2124-30.
- Margulis, L. (1970), *Recombination of non-chromosomal genes in Chlamydomonas: assortment of mitochondria and chloroplasts?* J Theor Biol **26**(2): 337-42.
- Mather, M. W., P. Springer, et al. (1991), *Cytochrome oxidase genes from Thermus thermophilus. Nucleotide sequence and analysis of the deduced primary structure of subunit IIc of cytochrome caa3* J Biol Chem **266**(8): 5025-35.
- Mather, M. W., P. Springer, et al. (1993), *Cytochrome oxidase genes from Thermus thermophilus. Nucleotide sequence of the fused gene and analysis of the deduced primary structures for subunits I and III of cytochrome caa3* J Biol Chem **268**(8): 5395-408.
- Maurer, H. R. and F. A. Dati (1972), *Polyacrylamide gel electrophoresis on micro slabs* Anal Biochem **46**(1): 19-32.
- Millett, F. and B. Durham (2002), *Design of photoactive ruthenium complexes to study interprotein electron transfer* Biochemistry **41**(38): 11315-24.
- Mitchell, P. (1961), *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism* Nature **191**: 144-8.
- Mitchell, P. (1975), *The protonmotive Q cycle: a general formulation* FEBS Lett **59**(2): 137-9.
- Mitchell, P. (1976), *Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems* J Theor Biol **62**(2): 327-67.
- Mooser, D., O. Maneg, et al. (2005), *A four-subunit cytochrome bc(1) complex complements the respiratory chain of Thermus thermophilus* Biochim Biophys Acta **1708**(2): 262-74.
- Mooser, D., O. Maneg, et al. (2006), *The menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex from Thermus thermophilus: Protein domains and subunits* Biochim Biophys Acta.

- Mulkidjanian, A. Y. (2005), *Ubiquinol oxidation in the cytochrome *bcl* complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting* Biochim Biophys Acta **1709**(1): 5-34.
- Muresanu, L., P. Pristovsek, et al. (2006), *The electron transfer complex between cytochrome *c552* and the *CuA* domain of the *Thermus thermophilus ba3* oxidase. A combined NMR and computational approach* J Biol Chem **281**(20): 14503-13.
- Nakai, M., T. Endo, et al. (1993), *Acidic regions of cytochrome *c1* are essential for ubiquinol-cytochrome *c* reductase activity in yeast cells lacking the acidic *QCR6* protein* J Biochem (Tokyo) **114**(6): 919-25.
- Nett, J. H., C. Hunte, et al. (2000), *Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome *bcl* complex* Eur J Biochem **267**(18): 5777-82.
- Ohta, S., K. Goto, et al. (1987), *An extremely acidic amino-terminal presequence of the precursor for the human mitochondrial hinge protein* FEBS Lett **226**(1): 171-5.
- Oshima, T. and K. Imahori (1974), *Physicochemical properties of deoxyribonucleic acid from an extreme thermophile* J Biochem (Tokyo) **75**(1): 179-83.
- Osyczka, A., C. C. Moser, et al. (2005), *Fixing the *Q* cycle* Trends Biochem Sci **30**(4): 176-82.
- Otten, M. F., W. N. Reijnders, et al. (1999), *The reduction state of the *Q*-pool regulates the electron flux through the branched respiratory network of *Paracoccus denitrificans** Eur J Biochem **261**(3): 767-74.
- Otten, M. F., D. M. Stork, et al. (2001), *Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans** Eur J Biochem **268**(8): 2486-97.
- Otten, M. F., J. van der Oost, et al. (2001), *Cytochromes *c*(550), *c*(552), and *c*(1) in the electron transport network of *Paracoccus denitrificans*: redundant or subtly different in function?* J Bacteriol **183**(24): 7017-26.
- Page, C. C., C. C. Moser, et al. (1999), *Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction* Nature **402**(6757): 47-52.
- Palsdottir, H., C. G. Lojero, et al. (2003), *Structure of the yeast cytochrome *bcl* complex with a hydroxyquinone anion *Qo* site inhibitor bound* J Biol Chem **278**(33): 31303-11.
- Panchuk-Voloshina, N., R. P. Haugland, et al. (1999), *Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates* J Histochem Cytochem **47**(9): 1179-88.
- Peitsch, M. C., T. N. Wells, et al. (1995), *The Swiss-3DImage collection and PDB-Browser on the World-Wide Web* Trends Biochem Sci **20**(2): 82-4.
- Pelletier, H. and J. Kraut (1992), *Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c** Science **258**(5089): 1748-55.
- Pereira, M. M., M. Santana, et al. (2001), *A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases* Biochim Biophys Acta **1505**(2-3): 185-208.
- Preisig, O., R. Zufferey, et al. (1996), *A high-affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum** J Bacteriol **178**(6): 1532-8.

- Pristovsek, P., C. Lucke, et al. (2000), *Complete 1H, 15N and 13C assignment of the functional domain of paracoccus denitrificans cytochrome c552 in the reduced state* J Biomol NMR **16**(4): 353-4.
- Pristovsek, P., C. Lucke, et al. (2000), *Solution structure of the functional domain of Paracoccus denitrificans cytochrome c552 in the reduced state* Eur J Biochem **267**(13): 4205-12.
- Raitio, M., T. Jalli, et al. (1987), *Isolation and analysis of the genes for cytochrome c oxidase in Paracoccus denitrificans* Embo J **6**(9): 2825-2833.
- Raitio, M., J. M. Pispas, et al. (1990), *Are there isoenzymes of cytochrome c oxidase in Paracoccus denitrificans?* FEBS Lett **261**(2): 431-5.
- Reincke, B., L. Thony-Meyer, et al. (1999), *Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome c552 acting as electron donor to the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase* Biochim Biophys Acta **1411**(1): 114-20.
- Richter, O. M., J. S. Tao, et al. (1994), *A cytochrome ba3 functions as a quinol oxidase in Paracoccus denitrificans. Purification, cloning, and sequence comparison* J Biol Chem **269**(37): 23079-86.
- Rieder, R. and H. R. Bosshard (1980), *Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc1, and cytochrome c1. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c* J Biol Chem **255**(10): 4732-9.
- Riistama, S., A. Puustinen, et al. (2000), *Binding of O(2) and its reduction are both retarded by replacement of valine 279 by isoleucine in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans* Biochemistry **39**(21): 6365-72.
- Ross, E. and G. Schatz (1976), *Cytochrome c1 of bakers' yeast. I. Isolation and properties* J Biol Chem **251**(7): 1991-6.
- Ross, E. and G. Schatz (1976), *Cytochrome c1 of bakers' yeast. II. Synthesis on cytoplasmic ribosomes and influence of oxygen and heme on accumulation of the apoprotein* J Biol Chem **251**(7): 1997-2004.
- Sadoski, R. C., G. Engstrom, et al. (2000), *Use of a photoactivated ruthenium dimer complex to measure electron transfer between the Rieske iron-sulfur protein and cytochrome c(1) in the cytochrome bc(1) complex* Biochemistry **39**(15): 4231-6.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988), *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase* Science **239**(4839): 487-91.
- Sazanov, L. A. and P. Hinchliffe (2006), *Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from Thermus thermophilus* Science **311**(5766): 1430-6.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987), *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa* Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schmitt, M. E. and B. L. Trumpower (1990), *Subunit 6 regulates half-of-the-sites reactivity of the dimeric cytochrome bc1 complex in Saccharomyces cerevisiae* J Biol Chem **265**(28): 17005-11.
- Schwede, T., J. Kopp, et al. (2003), *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server* Nucleic Acids Res **31**(13): 3381-5.
- Slutter, C. E., D. Sanders, et al. (1996), *Water-soluble, recombinant CuA-domain of the cytochrome ba3 subunit II from Thermus thermophilus* Biochemistry **35**(11): 3387-95.

- Smith, H. T., A. J. Ahmed, et al. (1981), *Electrostatic interaction of cytochrome c with cytochrome c1 and cytochrome oxidase* J Biol Chem **256**(10): 4984-90.
- Sone, N., F. Yokoi, et al. (1988), *Nucleotide sequence of the gene coding for cytochrome oxidase subunit I from the thermophilic bacterium PS3* J Biochem (Tokyo) **103**(4): 606-10.
- Soulimane, T., G. Buse, et al. (2000), *Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from thermus thermophilus* Embo J **19**(8): 1766-76.
- Soulimane, T., M. von Walter, et al. (1997), *Cytochrome-c552 from Thermus thermophilus: a functional and crystallographic investigation* Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 572-6.
- Speck, S. H., S. Ferguson-Miller, et al. (1979), *Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification: kinetics of reaction with beef mitochondrial reductase and functional organization of the respiratory chain* Proc Natl Acad Sci U S A **76**(1): 155-9.
- Stonehuerner, J., P. O'Brien, et al. (1985), *Identification of the binding site on cytochrome c1 for cytochrome c* J Biol Chem **260**(9): 5392-8.
- Stouthamer, A. H. (1992), *Metabolic pathways in Paracoccus denitrificans and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes* Antonie Van Leeuwenhoek **61**(1): 1-33.
- Stroh, A., O. Anderka, et al. (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.
- Stryer, L. and R. P. Haugland (1967), *Energy transfer: a spectroscopic ruler* Proc Natl Acad Sci U S A **58**(2): 719-26.
- Tervoort, M. J., L. T. Schilder, et al. (1981), *The absorbance coefficient of beef heart cytochrome c1* Biochim Biophys Acta **637**(2): 245-51.
- Than, M. E., P. Hof, et al. (1997), *Thermus thermophilus cytochrome-c552: A new highly thermostable cytochrome-c structure obtained by MAD phasing* J Mol Biol **271**(4): 629-44.
- Thomas, P. E., D. Ryan, et al. (1976), *An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels* Anal Biochem **75**(1): 168-76.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (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.
- Thony-Meyer, L. (1997), *Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria* Microbiol Mol Biol Rev **61**(3): 337-76.
- Tian, H., R. Sadoski, et al. (2000), *Definition of the interaction domain for cytochrome c on the cytochrome bc(1) complex. Steady-state and rapid kinetic analysis of electron transfer between cytochrome c and Rhodobacter sphaeroides cytochrome bc(1) surface mutants* J Biol Chem **275**(13): 9587-95.
- Tian, H., S. White, et al. (1999), *Evidence for the head domain movement of the rieske iron-sulfur protein in electron transfer reaction of the cytochrome bc1 complex* J Biol Chem **274**(11): 7146-52.
- Trumpower, B. L. (1990), *Cytochrome bc1 complexes of microorganisms* Microbiol Rev **54**(2): 101-29.

- Turba, A., M. Jetzek, et al. (1995), *Purification of Paracoccus denitrificans cytochrome c552 and sequence analysis of the gene* Eur J Biochem **231**(1): 259-65.
- Ubbink, M., M. Ejdeback, et al. (1998), *The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics* Structure **6**(3): 323-35.
- van Dijk, A. D., R. Boelens, et al. (2005), *Data-driven docking for the study of biomolecular complexes* Febs J **272**(2): 293-312.
- Van Spanning, R. J., A. P. de Boer, et al. (1995), *Regulation of oxidative phosphorylation: the flexible respiratory network of Paracoccus denitrificans* J Bioenerg Biomembr **27**(5): 499-512.
- Waldburger, C. D., J. F. Schildbach, et al. (1995), *Are buried salt bridges important for protein stability and conformational specificity?* Nat Struct Biol **2**(2): 122-8.
- Wang, K., H. Mei, et al. (1996), *Design of a ruthenium-cytochrome c derivative to measure electron transfer to the radical cation and oxyferryl heme in cytochrome c peroxidase* Biochemistry **35**(47): 15107-19.
- Wayne, J. and S. Y. Xu (1997), *Identification of a thermophilic plasmid origin and its cloning within a new Thermus-E. coli shuttle vector* Gene **195**(2): 321-8.
- Wienk, H., O. Maneg, et al. (2003), *Interaction of cytochrome c with cytochrome c oxidase: an NMR study on two soluble fragments derived from Paracoccus denitrificans* Biochemistry **42**(20): 6005-12.
- Williams, J. N., Jr. (1964), *A Method for the Simultaneous Quantitative Estimation of Cytochromes a, B, C1, and C in Mitochondria* Arch Biochem Biophys **107**: 537-43.
- Williams, P. A., N. J. Blackburn, et al. (1999), *The CuA domain of Thermus thermophilus ba3-type cytochrome c oxidase at 1.6 Å resolution* Nat Struct Biol **6**(6): 509-16.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, et al. (2000), *Structure of the 30S ribosomal subunit* Nature **407**(6802): 327-39.
- Witholt, B., M. Boekhout, et al. (1976), *An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown Escherichia coli* Anal Biochem **74**(1): 160-70.
- Witt, H., F. Malatesta, et al. (1998), *Cytochrome-c-binding site on cytochrome oxidase in Paracoccus denitrificans* Eur J Biochem **251**(1-2): 367-73.
- Witt, H., F. Malatesta, et al. (1998), *Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-c oxidase in Paracoccus denitrificans. Involvement of a hydrophobic patch in the docking reaction* J Biol Chem **273**(9): 5132-6.
- Witt, H., V. Zickermann, et al. (1995), *Site-directed mutagenesis of cytochrome c oxidase reveals two acidic residues involved in the binding of cytochrome c* Biochim Biophys Acta **1230**(1-2): 74-6.
- Woese, C. R. (1987), *Bacterial evolution* Microbiol Rev **51**(2): 221-71.
- Wu, C. W. and L. Stryer (1972), *Proximity relationships in rhodopsin* Proc Natl Acad Sci U S A **69**(5): 1104-8.
- Xia, D., C. A. Yu, et al. (1997), *Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria* Science **277**(5322): 60-6.

- Xiao, K., G. Engstrom, et al. (2003), *Effect of famoxadone on photoinduced electron transfer between the iron-sulfur center and cytochrome c1 in the cytochrome bc1 complex* J Biol Chem **278**(13): 11419-26.
- Xiao, K., L. Yu, et al. (2000), *Confirmation of the involvement of protein domain movement during the catalytic cycle of the cytochrome bc1 complex by the formation of an intersubunit disulfide bond between cytochrome b and the iron-sulfur protein* J Biol Chem **275**(49): 38597-604.
- Yagi, T., K. Hon-nami, et al. (1988), *Purification and characterization of two types of NADH-quinone reductase from Thermus thermophilus HB-8* Biochemistry **27**(6): 2008-13.
- Yang, D., Y. Oyaizu, et al. (1985), *Mitochondrial origins* Proc Natl Acad Sci U S A **82**(13): 4443-7.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al. (1985), *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors* Gene **33**(1): 103-19.
- Yano, T., S. S. Chu, et al. (1997), *The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of thermophilic bacterium Thermus thermophilus HB-8. Complete DNA sequence of the gene cluster and thermostable properties of the expressed NQO2 subunit* J Biol Chem **272**(7): 4201-11.
- Yoshida, T. and J. A. Fee (1984), *Studies on cytochrome c oxidase activity of the cytochrome c1aa3 complex from Thermus thermophilus* J Biol Chem **259**(2): 1031-6.
- Yoshida, T. and J. A. Fee (1985), *Potentiometric study of cytochrome c1aa3 from Thermus thermophilus* J Inorg Biochem **23**(3-4): 279-88.
- Yu, C. A., J. R. Steidl, et al. (1983), *Microcalorimetric studies of the interactions between cytochromes c and c1 and of their interactions with phospholipids* Biochim Biophys Acta **736**(2): 226-34.
- Yu, C. A., J. Z. Xia, et al. (1996), *Crystallization and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome-bc1 complex* Biochim Biophys Acta **1275**(1-2): 47-53.
- Zhang, Z., L. Huang, et al. (1998), *Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1* Nature **392**(6677): 677-84.
- Zimmermann, B. H., C. I. Nitsche, et al. (1988), *Properties of a copper-containing cytochrome ba3: a second terminal oxidase from the extreme thermophile Thermus thermophilus* Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5779-83.
- Zu, Y., M. M. Couture, et al. (2003), *Reduction potentials of Rieske clusters: importance of the coupling between oxidation state and histidine protonation state* Biochemistry **42**(42): 12400-8.
- Zu, Y., J. A. Fee, et al. (2001), *Complete thermodynamic characterization of reduction and protonation of the bc(1)-type Rieske [2Fe-2S] center of Thermus thermophilus* J Am Chem Soc **123**(40): 9906-7.



## 8 Abkürzungen

### A

A-AP	Protein A-Alkalische Phosphatase
abs.	absolut
AF594	Alexa Fluorfarbstoff 594
AF633	Alexa Fluorfarbstoff 633
am	<i>after mixing</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASC	Ascorbat
ATP/ADP	Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat
avg	<i>average</i>

### B

BA	Antikörper BA gegen Cytochrom $c_{552}$ aus <i>P. denitrificans</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BE	Antikörper BE gegen Cytochrom $c_{552}$ aus <i>P. denitrificans</i>
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
bm	<i>before mixing</i>
bp	<i>base pairs</i>
BSA	bovines Serum Albumin

### C

$C_{1CF}$	lösliches Cytochrom $c_1$ core-Fragment aus <i>P. denitrificans</i>
$C_{1AF}$	lösliches Cytochrom $c_1$ azides Fragment aus <i>P. denitrificans</i>
$C_{552}$	Cytochrom $c_{552}$ aus <i>P. denitrificans</i>
$C_{552F}$	lösliches Cytochrom $c_{552}$ -Fragment aus <i>P. denitrificans</i>
$C_{caa3}$	lösliches Fragment der Cytochrom c-Domäne der $caa_3$ -Oxidase aus <i>T. thermophilus</i>
$C_{bc}$	lösliches Cytochrom c-Fragment des bc-Komplexes aus <i>T. thermophilus</i>
<i>c<sub>cm</sub></i>	<i>cytochrome c maturation</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
Cm	Chloramphenicol
$Cu_A$	lösliche $Cu_A$ -Domäne der $aa_3$ -Oxidase aus <i>P. denitrificans</i> oder der $ba_3$ -Oxidase aus <i>T. Thermophilus</i>
Cyt	Cytochrom

### D

DDM	$\beta$ -D-Dodecylmaltosid
dest.	destilliert
$\Delta\epsilon$	Extinktionskoeffizient
DIT	Dithionit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DSC	<i>double sector cuvette</i>
DTT	Dithiothreitol

**E**

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Elektronentransfer
EtOH	Ethanol

**F**

F5m	Fluorescein-5-maleimid
FAD	Flavinadenindinukleotid
FeS	Eisen-Schwefel-Zentrum
FMN	Flavinmononukleotid
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer

**H**

His	Histidin(-tag)
-----	----------------

**I**

$I$	Ionenstärke
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
ISD	<i>ionic strength dependency</i>
ISP	Eisen-Schwefel-Protein/Rieske-Protein

**J**

$J$	Überlappungsintegral
-----	----------------------

**K**

KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
$k_{\text{bm}}$	apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante
kDa	Kilodalton
$K_{\text{eq}}$	Gleichgewichtskonstante
$k_{\text{for}}$	Geschwindigkeitskonstante der ET-Reaktion in physiologischer Richtung
Km	Kanamycin
$k_{\text{obs}}$	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
$k_{\text{on}}$	Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung und der ET-Reaktion
$k_{\text{rev}}$	Geschwindigkeitskonstante der ET-Reaktion in nicht-physiologischer Richtung

**L**

LB	Luria Bertani-Medium/Luria Broth
LF	Laserflash

**M**

MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
MK-8	Menachinon-8

**N**

NAD/NADH	Nikotinadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazolium
NCS	<i>newborn calf serum</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure

**O**

OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>

**P**

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
------	--------------------------------

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>P.d.</i>	<i>P. denitrificans</i>
pdb	<i>protein data bank</i>
PFO/non-PFO	<i>pseudo first order / non-pseudo first order</i>

**Q**

Q-Pool	Chinon-Pool
QY	<i>quantum yield</i> , Quantenausbeute

**R**

<i>R</i>	Antikörper <i>R</i> gegen Cytochrom $c_1$ aus <i>P. denitrificans</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Ru/Ru <sub>z</sub>	Rutheniumverbindung

**S**

SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Stopped-Flow
Sm	Streptomycin
ss	<i>single strand</i>

**T**

TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TMH	Transmembranhelix
TMPD	N, N, N', N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin
<i>T.th.</i>	<i>Thermus thermophilus</i>

**U**

<i>U</i>	Units
UE	Untereinheit
UQ/UQH <sub>2</sub>	Ubichinon/Ubichinol
ÜNK	Übernachtkultur
UZ	Ultrazentrifuge

**V**

VdW	Van-der-Waals(-Kräfte)
Vol	Volumen/Volumina

**W**

WT	Wildtyp
----	---------

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

**Julia Janzon**  
Ginnheimer Landstraße 80  
60487 Frankfurt/Main

Diplom-Biochemikerin  
geboren am 22.07.1975 in Hamburg  
ledig

### Studium, Promotion und wissenschaftlicher Werdegang

---

- 05.2001 bis 2006**     **Promotion**  
an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
Abteilung für Molekulare Genetik, Prof. Dr. Bernd Ludwig  
Titel der Arbeit: *Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV der Atmungskette von Paracoccus denitrificans und Thermus thermophilus - Funktionelle und kinetische Charakterisierung der Interaktionen anhand von löslichen Fragmenten*
- 10.2001 bis 04.2006**     **Wissenschaftliche Angestellte** der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Institut für Molekulare Genetik, Prof. Dr. Bernd Ludwig  
Sonderforschungsbereich (SFB) 472, Teilprojekt P8
- 05.2001 bis 09.2001**     **Stipendiatin des Graduiertenkollegs** „Proteinstrukturen, Dynamik und Funktion“ der Johann Wolfgang Goethe-Universität
- 04.2001**     **Studienabschluss Diplom** – „sehr gut – mit Auszeichnung“
- 08.2000 bis 04.2001**     **Diplomarbeit**  
an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
Abteilung für Molekulare Genetik, Prof. Dr. Bernd Ludwig  
Titel der Arbeit: *Gezielte Mutagenese an ausgewählten Aminosäureresten des Cytochrom c<sub>1</sub> aus Paracoccus denitrificans und funktionelle Charakterisierung der Mutanten*
- 05. bis 06.2000**     **Diplomprüfung**  
Hauptfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie  
Nebenfach: Zellbiologie
- 05./06.1998**     **Vordiplomprüfung** – „sehr gut“  
Hauptfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie  
Nebenfach: Tierphysiologie; Zusatzfach: Organische Chemie
- 1995 bis 2001**     **Studium der Biochemie** Johann Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt

### Forschungsaufenthalte

---

- 01.-02.2006**     **University of Arkansas, Fayetteville, USA**  
Labor und Kooperation mit Prof. Dr. Francis Millett  
*Messung schneller Elektronentransferkinetiken mittels Ruthenium-Laserflash-Spektroskopie*
- 05.2005**     **Universität "La Sapienza", Rom**
- 09.-10.2004**     Labor Prof. Dr. M. Brunori, Kooperation mit Prof. Dr. Francesco Malatesta
- 09.-10.2003**     *Messung schneller Elektronentransferkinetiken mittels Stopped-Flow-Spektroskopie*
- 03.2003**

## Weiterbildung, Praktika & Seminare

---

- 04.2006** Fortbildungskurs "Sicherheit in der Gentechnik"  
*gentechnisches Arbeiten gemäß § 15 (4) GenTSV*  
Johannes Gutenberg Universität, Mainz
- 10.-11.1998** **Praktikum am Georg-Speyer-Haus** (Frankfurt am Main)  
Arbeitsgruppe Dr. Wolfgang Vogel  
*Rolle der extrazellulären Matrix in der Organentwicklung und Tumorinvasion*
- 09.-10.1998** **Betreuung des organisch-chemischen Praktikums für Biologen**  
Institut für organische Chemie; Universität Frankfurt, Leitung: Prof. Dr. Engels
- 06.1998** **Praktikum der Kernresonanz-Spektroskopie und Strukturaufklärung**  
Arbeitskreis Prof. Dr. Christian Griesinger/Prof. Egert  
Chemische Institute, Universität Frankfurt

## Wissenschaftliche Publikationen

---

Janzon J., Eichhorn A., Ludwig B., Malatesta F. (2006, in Vorbereitung)  
*Fast stopped-flow electron transfer kinetics of cytochrome  $c_1$  of Paracoccus denitrificans with its physiological redox partners using soluble fragments*

Janzon J., Yuan Q., Ludwig B., Millett F. (2006, in Vorbereitung)  
*Functional characterization of the electron transfer between cytochrome  $c_1$  und  $c_{552}$  of Paracoccus denitrificans by ruthenium laser flash spectroscopy*

Janzon J., Malatesta F., Ludwig B. (2006, in Vorbereitung)  
*Pre-steady state stopped-flow kinetics using soluble fragments of complex III und the  $caa_3$ -oxidase of Thermus thermophilus indicate a direct intercomplex electron transfer*

## Konferenzen & Vorträge

---

- 10.2006** **Symposium: „Membrane Proteins 2006“**  
Naurod, Deutschland  
J. Janzon, F. Malatesta, F. Millett, B. Ludwig (Poster & Abstract)  
*Characterization of the electron transfer between complex III und IV of the respiratory chains of Paracoccus denitrificans und Thermus thermophilus*
- 12.2004** **Seminarvortrag im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 472 „Bioenergetik“ (Teilprojekt P8):**  
J. Janzon, F. Malatesta, B. Ludwig  
*Electron transfer interactions between cytochrome  $c_1$  und  $c_{552}$  soluble fragments of Paracoccus denitrificans – a functional approach*
- 03.2004** **Kolloquium: „Bioenergetics of microorganisms“**  
**02.2003** Naurod & Oberreifenberg / Taunus, Deutschland
- 09.2002** **12<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference (EBEC)**  
Arcachon, Frankreich  
A. Eichhorn, J. Janzon, F. Malatesta, B. Ludwig (Abstract & Poster)  
*Complex formation und electron transfer between cytochrom  $bc_1$  und cytochrom  $c_{552}$  of Paracoccus denitrificans*

## Schulbildung

---

- 07.1982 - 06.1986** **Grundschule** Bekassinenu, Hamburg
- 07.1986 - 06.1995** **Gymnasium Oldenfelde**, Hamburg  
Allgemeine Hochschulreife - Abiturnote 1,5

## 10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und diese Dissertation bereichert haben:

Mein besonderer dank gilt **Prof. Bernd Ludwig** für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft, weiterhin für seine unnachahmlichen Motivationstechniken („Die Worte wirken weiter“) und seinen unendlichen Optimismus in scheinbar auswegslosen Situationen („Wir sind doch optimistisch, Jule“), die unzähligen Mandelhörnchen, flambierten Bananen und Rumtöpfe sowie die Urwaldpflanzen, die in meiner Wohnung wachsen und gedeihen.

**Prof. E. Bamberg** danke ich für das Schreiben meines Zweitgutachtens.

**Frau Bahl** danke ich für ihre immer freundliche und schnelle Hilfe in allen SFB-Reise-Angelegenheiten.

**Prof. Maurizio Brunori** danke ich für die Möglichkeit, die Stopped-Flow-Messungen in seinem Institut an der Universität „La Sapienza“ in Rom durchführen zu können.

I sincerely thank **Prof. Francesco Malatesta** for the great time I had in Rome, for his patience and care. I deeply appreciate his endurance spending weeks (years?) in front of the stopped-flow machine measuring hundreds of “bloody fast” mutants with me und working on this “really tough project”, for his famous  $\eta$ -equation, coming to Frankfurt und explaining it to us und helping me with the data fitting.

I also thank **Prof. Francis Millett** for giving me the possibility performing the fast ruthenium laser flash measurements at his laboratory at the University of Arkansas in Fayetteville, und his wife **Eunice**, who both hosted me at their house und made me feel home while being abroad.

**Werner Müller**, unserem Chief-TA und meinem „Dealer“ in Sachen  $c_1$  und  $c_{552}$ , danke ich ganz besonders für die Herstellung der Cytochrome im Kilogramm-Maßstab und seine Geduld mit den nicht immer einfachen Expressionsbedingungen, für sein „Verstehste das jetzt?!“, den Lachbären in Labor 121 und das allmorgendliche Bildzeitungshoroskop, ohne dessen Kenntnis der Tag nicht begonnen werden konnte.

**Dr. Oliver Richter** gilt mein ganz besonderer Dank für seine großartige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sein unglaubliches Wissen, das kritische Lesen und Korrigieren meiner Arbeit sowie die fruchtbaren Diskussionen nach meinen Seminarvorträgen sowie ebenso für seine Gesellschaft bei meinen seltenen Mensabesuchen.

**Quan Yuan** was helping me with all ruthenium laser flash experiments und spent long days with me in front of the laser, only interrupted having double cheese pizza! Thank you so much!

**Dr. Petra Hellwig** danke ich für die Messungen der Redoxpotentiale meiner vielen Mutanten.

**Dr. Ulrich Schieborr** danke ich für die HADDOCK-Rechnungen und die geduldigen Diskussionen über deren Ergebnisse.

Bei **Prof. Shyamal Mazumdar** bedanke ich mich für die Hilfe bei der Konzeption und Planung der FRET-Experimente.

**Björn Meyer** danke ich für die MALDI-Messungen des *Paracoccus* Cytochrom  $c_{1CF}$  und des *Thermus*  $c_{caa3}$ -Fragmentes.

**Prof. Tewfik Soulimane** danke ich für die N-terminale Sequenzierung des Cytochrom  $c_{1CF}$  und dessen Abbaufragment.

**Dr. Robert Dempski** danke ich für seine geduldige Diskussionsbereitschaft meiner FRET-Probleme.

**Dr. Viktoria Drosou** möchte ich für ihre Freundschaft und ihren Zuspruch in allen Lebenslagen sowie ihre offene und sehr ehrliche, geradlinige Art, ihren Sarkasmus und Realismus danken, der mich oft auf den Boden zurückholte und mir dadurch sehr geholfen hat. Danke für die schönen Tage, die wir zusammen in Rom verbracht haben.

Bei **Dr. Anna Carina Eichhorn** möchte ich für ihre Freundschaft und Wärme bedanken. Trotz ihres stressigen Alltags hat sie immer Zeit und ein offenes Ohr für mich gehabt, mich in vielen schwierigen, auch privaten Situationen unterstützt. Danke für die Betreuung während meiner Diplomarbeit und das „Erbe“ des nicht ganz trivialen Cytochrom  $c_1$ -Themas, die vielen, vielen Wochenenden im Labor und die langen Rotweinabende!

**Dr. Oliver Maneg** danke ich für unsere gemeinsame Zeit in Rom und die Einführung in den chaotischen Laboralltag dort, ohne die ich nicht überlebt hätte, für unser Labor 122 und seinen Gute-Laune-Spaßpunk, sein unermüdliches „Hättest Du mal die Anlaaach zum Säulen genommen“ und die unvergesslichen Rödelheimfeten!

**Daniela Maneg** danke ich dafür, dass sie die Mädelsstradition in Labor 121 fortgesetzt hat sowie für ihre hilfsbereite und ruhige Art, auch ausgelagerte, „anspruchsvolle“ Praktikantinnen zu ertragen!

Bei **Dr. Oliver „die Pocke“ Anderka** möchte ich mich für seine Endlos-Seminare und Zweikampfdiskussionen mit ORi bedanken, die mich zwar oft ungeduldig mit den Füßen scharen ließen, die aber immer fruchtbare Ideen aufgeworfen haben.

**Peter Greiner** danke ich für die würdige Oli-Maneg-Nachfolge in Labor 122, für sein unverwechselbares „Juuule!“, die Frühstücks-Sessions mit Honeynut-Loops und Erdnussbutter im Kaffeeraum und dafür, dass er mir ein Freund und jetzt auch Kletterpartner geworden ist!

**Carolin Werner** danke ich für die extrem positive Überraschung, dass hinter der rosa Glitzer- und Plüschfassade eine „tiefschwarze“ Seele steckt, die sich Labor 122 mehr als würdig erwiesen hat, sowie für die unzähligen Unterhaltungen über sehr weltliche und unwissenschaftliche Dinge.

**Thomas Kleinschroth** möchte ich ganz herzlich für die super Betreuung unserer (und fast mehr seiner) Diplomandin Michela danken, ohne die ich oft aufgeschmissen gewesen wäre, und seine Geduld mit Michelas oft ungewöhnlichen italienischen Arbeitszeiten. Außerdem für seine breiten Schultern zum Anlehnen...

Meinen drei Diplomandinnen **Julia Metzner**, **Nina Schreglmann** und **Michela Castellani** möchte ich für ihre engagierte und motivierte Arbeit danken, für die schöne und „pflegeleichte“ Laborzeit.

**Alena Bundschuh** danke ich für das allmorgendliche Vorlesen des Bildzeitungshoroskops, ihre Umarmungsattacken und den Halbnackte-Männerkalender im Kaffeeraum!

I thank **Khalid Siddiqui** for his enduring good mood und smiling face und for already citing my unfinished  $c_1$ -paper in his submitted one.

**Klaus (Klauusch) Hoffmeier** danke ich für seine unglaubliche Hilfsbereitschaft trotz seiner manchmal chaotischen Art, und dafür, dass er mich in Riezlern immer tapfer aus dem Schnee aufgesammelt hat.

**Andrea Hermann** danke ich für ihre ansteckende gute Laune und den Optimismus, den sie immer verbreitet hat.

Bei **Bettina Pobisch**, **Christian Groß** und **Maria Bracinha Rodriguez** bedanke ich mich für das angenehme und unkomplizierte Arbeitsklima.

**Ilias Koutris** danke ich für die Überlassung der  $c_{552F}$ -Mutanten N68C und N91C und sein unverwechselbares „To be honest“, auf das nur drei Fortsetzungen folgten: 1) „I am depressed“ 2) „I am tired“ oder 3) „I am hungry“

**Elke Stirnal**, **Peter Gröschke**, **Julia Wirmer-Bartoschek** und **Stefan Bartoschek** danke ich ganz besonders herzlich für ihre aufrichtige Freundschaft, Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit. Ich bin froh, Freunde wie Euch zu haben! Gro, tausend Dank für das Rhetorik-Coaching vor Vorträgen und das Lesen und Korrigieren meiner Arbeit!

**Georg Gertner** danke ich für seinen Optimismus und seine unbeschwerte Art, das Leben nicht zu ernst zu nehmen, sein geduldiges Ohr für mein „Rumgeheule“, seine geschickten Ablenkungsmanöver und das Ausbremsen meiner Hyperaktivität.

**Meinem Bruder Jörn** danke ich dafür, dass er zu Hause in kritischen Situationen die Stellung gehalten hat, so dass ich in diesen schwierigen Zeiten trotzdem meine Arbeit beenden konnte.

**Meinen Eltern** danke ich ganz besonders für die jahrelange Unterstützung jeglicher Art während meines wissenschaftlichen Werdeganges, dafür, dass sie mir das Studium in Frankfurt überhaupt ermöglicht und tapfer mein Gejammer über den Laboralltag ertragen haben.



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Julia Janzon, geboren am 22.07.1975 in Hamburg, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* und *Thermus thermophilus*: Funktionelle und kinetische Charakterisierung der Interaktionen anhand von löslichen Fragmenten“ selbständig angefertigt und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Ich habe an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 06.Oktober 2006