

**Untersuchung der Protonenbewegung während des O→E
Schrittes im katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c*-Oxidase von
*Paracoccus denitrificans***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Kristina Kirchberg
aus Zemmer

Frankfurt am Main
2006
(D 30)

Vom Fachbereich 14 (Biochemie, Chemie und Pharmazie) der Johann Wolfgang Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Michel

Datum der Disputation: 23.02.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die mitochondriale Atmungskette	1
1.2	Die Atmungskette von <i>Paracoccus denitrificans</i>	3
1.3	Die aa ₃ -Cytochrom-c-Oxidase von <i>Paracoccus denitrificans</i>	4
1.3.1	Die Struktur der aa ₃ Cytochrom-c-Oxidase	4
1.3.2	Die genetische Organisation und Assemblierung der aa ₃ -Cytochrom-c-Oxidase.....	5
1.3.3	Reaktionsmechanismen	7
1.4	Fragestellung dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Mikro- und Molekularbiologische Methoden	17
2.1.1	Medien.....	17
2.1.2	Anzucht von <i>Paracoccus denitrificans</i>	17
2.1.3	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	18
2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNS.....	19
2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
2.1.6	Restriktionsverdau von DNS	19
2.1.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten im Agarosegel	19
2.1.8	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.1.9	Ligation	20
2.1.10	Transformation von Bakterienzellen	20
2.1.11	Ortsspezifische Mutagenese	21
2.1.12	Triparentale Konjugation.....	23
2.2	Proteinbiochemische Methoden	24
2.2.1	Membranpräparation von <i>P. denitrificans</i> Zellen	24
2.2.2	Proteinbestimmung.....	25
2.2.3	Anzucht und Aufreinigung von Fv-Fragment	25
2.2.4	Solubilisierung der Membranen	25
2.2.5	Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cytochrom-c-Oxidase	26
2.2.6	Core-Untereinheiten Präparation	26
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.2.8	Präparation von in Liposomen inkorporierter Cytochrom-c-Oxidase.....	27
2.2.9	Modifikation von Cysteinvarianten mit Fluorescein.....	28
2.3	Spektroskopische Methoden.....	28

2.3.1	<i>VIS-Redoxspektren unter nativen Bedingungen</i>	28
2.3.2	<i>Bestimmung der Elektronentransferaktivität der Cytochrom-c-Oxidase</i>	29
2.3.3	<i>Bestimmung der Pufferkapazität an der Proteinoberfläche</i>	29
2.3.4	<i>Bestimmung der Oberflächenladungsdichte</i>	30
2.3.5	<i>Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie</i>	31
3	Ergebnisse und Zusammenfassung - Teil I	37
	Herstellung, Präparation und Charakterisierung von Einzelcystein-Cytochrom-c- Oxidase-Varianten zur ortsspezifischen Einführung von pH-sensitiven Reportergruppen	37
3.1	Etablierung eines Mutagenesesystems für Untereinheit I und II	37
3.2	Herstellung und Charakterisierung einer cysteinfreien Untereinheit I+ II- Variante von Cytochrom-c-Oxidase	39
3.3	Einführung von einzelnen Cysteinen an geeignet erscheinenden Positionen im Bereich der putativen Protoneneingangs- und -ausgangsstellen	41
3.4	Selektive Markierung von Cysteinvarianten mit Fluorescein.....	44
3.5	Pufferkapazität an der Proteinoberfläche von Cytochrom-c-Oxidase.....	47
3.6	Zusammenfassung – Teil I.....	49
4	Ergebnisse und Zusammenfassung - Teil II	51
	Elektronen- und Protonentransfer der Cytochrom-c-Oxidase.....	51
4.1	Elektronentransfer auf Häm <i>a</i>	51
4.1.1	<i>Charakterisierung des Meßsystems Rubpy-Cytochrom-c-Oxidase</i>	51
4.1.2	<i>Charakterisierung des Meßsystems RuCytc-Cytochrom-c-Oxidase</i>	52
4.1.3	<i>Charakterisierung des Meßsystems Ru₂D-Cytochrom-c-Oxidase</i>	54
4.1.4	<i>Optimierung des Meßsystems</i>	56
4.2	Protonenaufnahme und Abgabe ins Medium.....	60
4.2.1	<i>Charakterisierung von Cytochrom-c-Oxidase und freiem Farbstoff Phenolrot</i>	60
4.2.2	<i>Lichtinduzierte Protonenkonzentrationsänderungen der Wildtyp Cytochrom-c- Oxidase</i>	60
4.2.3	<i>Protonenaufnahme und -abgabe der Varianten D124N, K354M und D124N-K354M</i>	62
4.2.4	<i>Lichtinduzierte Änderung der Protonenkonzentration von Cytochrom-c-Oxidase in Liposomen</i>	66
4.3	Protonenaufnahme und -abgabe an der Oberfläche	67
4.3.1	<i>Lichtinduzierte Änderung der Protonenkonzentration an der Proteinoberfläche</i>	67

4.3.2	<i>Die Oberflächenladungsdichte auf der N-Seite der Cytochrom-c-Oxidase</i>	68
4.4	Zusammenfassung – Teil II	73
5	Diskussion	77
6	Zusammenfassung	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Abkürzungen	96
9	Lebenslauf	97
10	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Die mitochondriale Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung (ATP-Synthese, deren Triebkraft die Elektronenübertragung auf Sauerstoff ist) und die Photophosphorylierung (ATP-Synthese mit Licht als Triebkraft) sind die zwei wichtigsten Reaktionen zur Energieumwandlung in der Biosphäre. Beide Prozesse liefern den größten Teil des von aeroben Organismen synthetisierten Adenosintriphosphat (ATP). Die oxidative Phosphorylierung ist der Höhepunkt der Entwicklung aller energieliefernden Prozesse bei aeroben Organismen. Alle enzymatischen Schritte des oxidativen Abbaus von Kohlenhydraten, Fetten und Aminosäuren in aeroben Zellen münden schließlich in diese letzte Stufe der Zellatmung, bei der Elektronen von Stoffwechselzwischenprodukten auf Sauerstoff übergehen, wobei Energie für die Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat gewonnen wird. Mehr als 90% des Zellbedarfs an ATP wird dadurch erzeugt (Lodish *et al.*, 2000). Dabei werden Elektronen von NADH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert) und FADH₂ (Flavin-Adenin-Dinucleotid, reduziert) durch eine Kette aus drei großen Proteinkomplexen in der inneren Mitochondrienmembran auf molekularen Sauerstoff übertragen, welcher mit zwei Protonen zu Wasser reduziert wird. Die dabei freigesetzte freie Energie ΔG^0 von -220 kJ pro Mol O₂ wird in Form eines elektrochemischen Protonengradienten über die Membran gespeichert, der von der ATP-Synthase zur Generierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphor genutzt wird (Mitchell, P., 1961; Trumppower und Gennis, 1994).

Diese Kette von elektronenübertragenden Proteinen besteht aus drei Komplexen von integralen Membranproteinen und zwei frei beweglichen Molekülen, welche die Elektronen von einem Komplex zum nächsten transportieren (siehe Abb. 1.1).

Komplex I, die NADH-Dehydrogenase, oxidiert NADH, wobei zwei Elektronen zusammen mit zwei Protonen auf ein Flavinmononucleotid übertragen werden, das dabei in den reduzierten Zustand übergeht. Danach durchlaufen die Elektronen mehrere Redoxreaktionen und werden schließlich auf das Coenzym Q (Ubichinon) übertragen. Dieser Schritt ist auf bisher ungeklärte Weise mit der Translokation von zwei Protonen je Elektron gekoppelt (Trumppower und Gennis, 1994; Brandt, 1997; Brandt *et al.*, 2003). Komplex II hingegen, die Succinat-Dehydrogenase, welche Elektronen von Succinat auf das Ubichinon überträgt, pumpt keine Protonen. Das reduzierte Ubichinon (Ubichinol) diffundiert in der Membran von Komplex I zu Komplex III (Ubichinol-Cytochrom-*c*-Reduktase) und gibt dort seine Elektronen ab, welcher über mehrerer Redoxkomponenten die Elektronen weiter an das im Intermembranbereich befindliche Cytochrom *c* gibt (Hatefi und Stempel, 1967; Hatefi, 1976; Trumppower und Gennis, 1994).

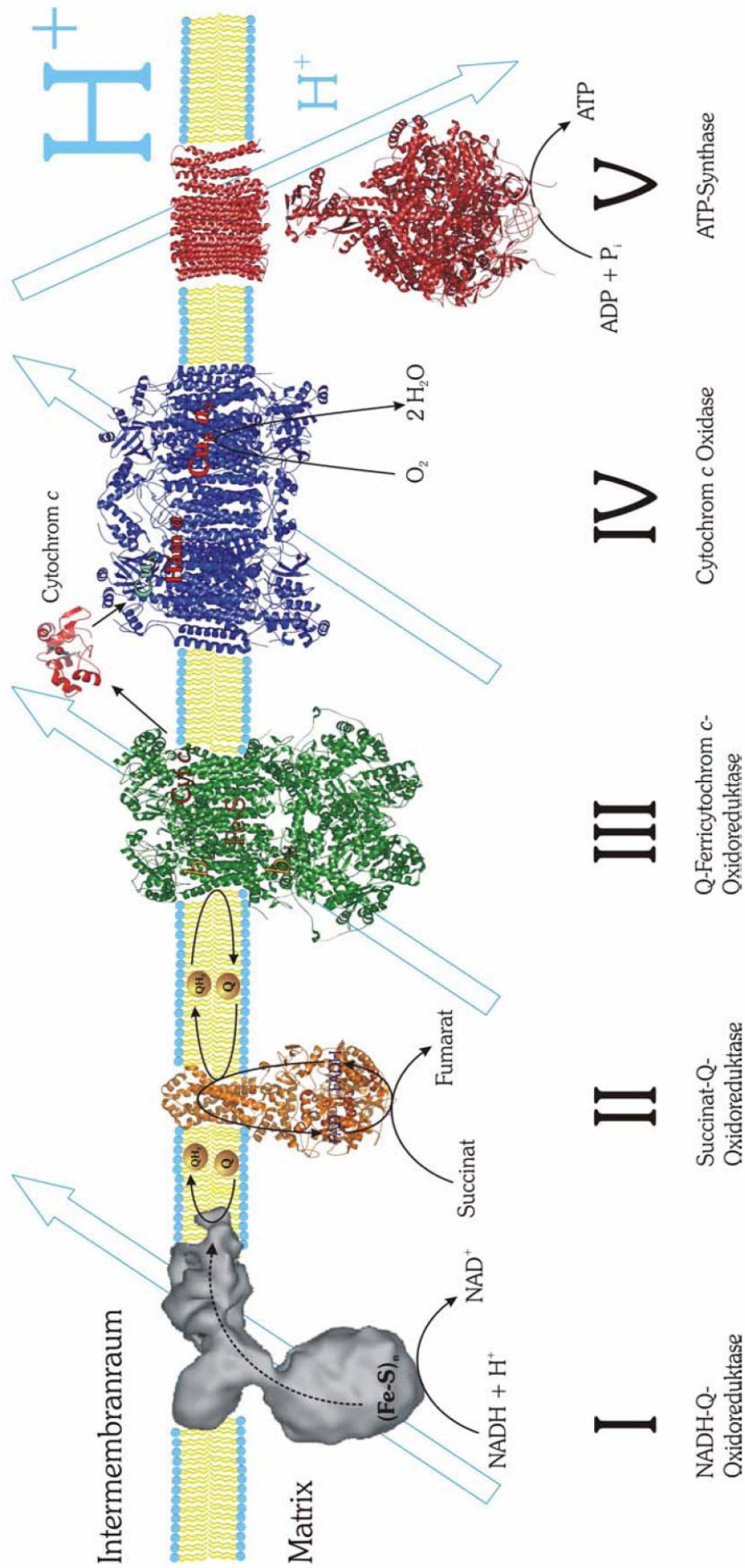


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Multienzymkomplexes der mitochondrialen Atmungskette (Dürr, 2003).

Die blauen Pfeile geben die Richtung des Protonenflusses über die Membran an.

Diese Übertragung ist mit einer weiteren Protonentranslokation von $1 \text{ H}^+/\text{e}^-$ durch den sogenannten Chinonzyklus oder Q-Zyklus gekoppelt (Trumpower, 1976; Trumpower, 1990; Brandt und Trumpower, 1994; Schultz und Chan, 2001).

Vom reduzierten Cytochrom *c* werden die Elektronen mit Hilfe des Komplex IV (Cytochrom-*c*-Oxidase) auf molekularen Sauerstoff übertragen, aus dem mit aufgenommenen Protonen Wasser gebildet wird. Zudem werden auch hier redoxgetrieben Protonen mit einer Effizienz von $1 \text{ H}^+/\text{e}^-$ gepumpt. Die Energie dieses elektrochemischen Gradienten wird von der ATP-Synthase dazu benutzt, durch den kontrollierten Rückfluß von Protonen in die Matrix ATP zu synthetisieren.

1.2 Die Atmungskette von *Paracoccus denitrificans*

Das gram-negative Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans*, welches zur a_3 -Untergruppe der Purpurbakterien zählt, besitzt eine weit verzweigte Atmungskette, die ihm eine gute Anpassung an die unterschiedlichsten Lebensbedingungen ermöglicht. Heterotrophes Wachstum tritt in der Gegenwart von verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen auf. Unter aeroben Bedingungen wird Sauerstoff als terminaler Elektronenrezeptor (Stouthamer, 1991), unter anaeroben Bedingungen diverse Stickstoffverbindungen wie zum Beispiel Nitrat oder Nitrit genutzt (Stouthamer *et al.*, 1982). Dies wird als Denitrifikation oder auch „anaerobe Atmung“ bezeichnet und gibt dem Bakterium seinen Namen. Des weiteren ist autotrophes Wachstum mit Wasserstoff, Thiosulfat, Methanolamin oder Methanol als alleinige Energiequelle möglich. Konsequenz aus dieser Anpassungsfähigkeit ist eine große Anzahl an Enzymen zum Energiegewinn. So besitzt es Homologe zu allen fünf Komplexen der mitochondrialen Atmungskette (Van Spanning *et al.*, 1995), zusätzlich zur aa_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase (Ludwig und Schatz, 1980; Haltia *et al.*, 1988) jedoch noch zwei weitere terminale Oxidasen, die ebenfalls strukturelle Ähnlichkeit zur mitochondrialen Cytochrom-*c*-Oxidase zeigen, nämlich die sogenannte ba_3 -Ubichinol-Oxidase (Ludwig, 1992; Richter *et al.*, 1994) und die cbb_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase (De Gier *et al.*, 1992).

Für die anaerobe Atmung werden z. B. Reduktasen eingesetzt, die Nitrat zu Stickstoff reduzieren (Van Verseveld *et al.*, 1983). Damit ist das Bakterium in der Lage, durch unterschiedliche Expression der verschiedenen Oxidasen / Reduktasen auf den Sauerstoffgehalt seiner Umgebung zu reagieren und damit entweder der aeroben oder der denitrifizierenden Atmungskette den Vorzug zu geben. Der dritte Schritt der anaeroben Atmung wird von der NO-Reduktase katalysiert (Van Spanning *et al.*, 1995), ein Enzym, welches ebenfalls entfernt zur Superfamilie der terminalen Oxidasen gehört.

Alle drei terminalen Oxidasen gehören zur Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Saraste, 1990; Saraste *et al.*, 1991) und besitzen als gemeinsames Merkmal das binukleare Häm-Kupfer-Zentrum, welches die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser katalysiert, sowie ein *low-spin* Häm, das die Elektronen vom Cytochrom *c* zum binuklearen Zentrum weiterleitet. Das binukleare Cu_A -Zentrum

in der Untereinheit II der aa_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase ist hingegen nicht bei allen Mitgliedern der Superfamilie vorhanden, es fehlt beispielsweise bei der cbb_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase und den Ubichinol-Oxidasen (Baker *et al.*, 1998).

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zur mitochondrialen Atmungskette wird *P. denitrificans* als Modellorganismus zur Erforschung mitochondrialer Respirationsenzymkomplexe eingesetzt. Im Rahmen der Endosymbiontentheorie wird aus der Homologie auch eine mögliche Rolle von *P. denitrificans* als Vorläufer der Mitochondrien diskutiert (Margulis, 1970; John und Whatley, 1975).

1.3 Die aa_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*

1.3.1 Die Struktur der aa_3 Cytochrom-*c*-Oxidase

Die aa_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase von *P. denitrificans* besteht aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 126 kDa, im Gegensatz dazu liegt die mitochondriale Cytochrom-*c*-Oxidase als Dimer von je 13 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von über 400 kDa in der Membran vor (siehe Abb. 1.2). Die Untereinheiten I, II und III weisen in Sequenz und Aufbau signifikante Homologien zu den „Core-Untereinheiten“ der mitochondrial kodierten Untereinheiten von Rinderherz Cytochrom-*c*-Oxidase auf, was durch die Aufklärung der Kristallstrukturen beider Enzyme belegt werden konnte (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996; Ostermeier *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1998b).

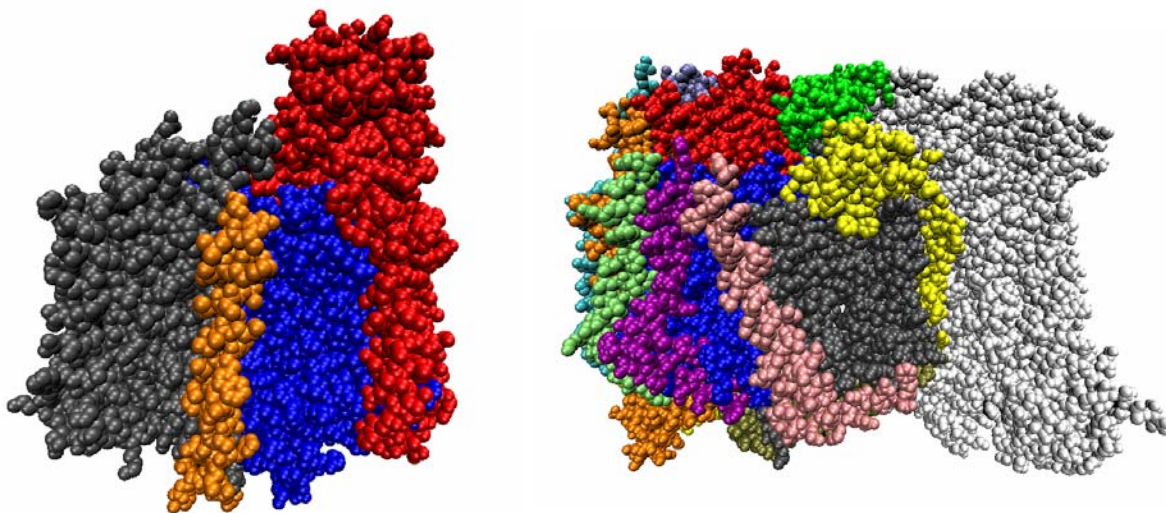


Abb. 1.2: Links: Die aa_3 -Cytochrom-*c*-Oxidase von *P. denitrificans*. Sie ist ein Monomer und besteht aus vier Untereinheiten. Rechts: Die mitochondriale Cytochrom-*c*-Oxidase aus Rinderherz. Sie liegt als Homodimer vor, jedes Monomer besteht aus 13 Untereinheiten. Die Core-Untereinheiten sind blau (Untereinheit I) und rot (Untereinheit II) dargestellt.

Die minimale Funktionseinheit der *P. denitrificans* Cytochrom-*c*-Oxidase besteht aus Untereinheit I und II und ist auch als solche erstmals isoliert worden (Ludwig und Schatz, 1980). In ihr sind alle am Elektronentransfer beteiligten Redoxzentren enthalten und eine Protonenpumpaktivität konnte nachgewiesen werden (Solioz *et al.*, 1982).

Je nach untersuchter Oxidase zeigt es sich aber, daß geringfügige Unterschiede bezüglich der Funktion der einzelnen Untereinheiten in den unterschiedlichen Organismen trotz starker Homologie auftreten. So hat man bei Untersuchungen der *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrom-*c*-Oxidase herausgefunden, daß bei fehlender III. Untereinheit die volle Pumpaktivität nicht erreicht wird. Zurückgeführt wurde dies auf den weitreichenden Einfluß, den Untereinheit III auf Konformation und pK-Wert funktionell wichtiger Aminosäuren ausübt (Thompson *et al.*, 1985; Bratton *et al.*, 1999; Gilderson *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003; Hosler, 2004). Bei Säugerzellen-Cytochrom-*c*-Oxidase zum Beispiel aus Rattenleber oder Rinderherz wurde kontrovers diskutiert, ob Untereinheit III Mitwirkung im Protonenpumpprozeß aufweist, oder vielleicht für die Assemblierung der Oxidase zuständig ist (Saraste *et al.*, 1981; Puettner *et al.*, 1985; Thelen *et al.*, 1985; Thompson *et al.*, 1985). Im Gegensatz dazu wurde eine Beteiligung an der Protonenpumpaktivität von Untereinheit III bei *P. denitrificans* nicht gefunden, jedoch auch hier wurden Einflüsse auf die Konformation auf Untereinheit I und II beschrieben, die auch zum Eintritt einer sogenannten Suizid-Inaktivierung des Enzyms führen können, ein spontaner durch Sauerstoffumsatz ausgelöster Aktivitätsverlust (Haltia *et al.*, 1991; Steverding *et al.*, 1993; Echabe *et al.*, 1995; Nicoletti *et al.*, 1998). Dies konnte auch bei *R. sphaeroides* beobachtet und auf einen Verlust von Cu_B zurückgeführt werden.

1.3.2 Die genetische Organisation und Assemblierung der *aa₃*-Cytochrom-*c*-Oxidase

Die Gene der Cytochrom-*c*-Oxidase sind auf vier verschiedenen Loci innerhalb des Genoms von *P. denitrificans* verteilt (siehe Abb. 1.3).

Das *cta*-Operon beinhaltet die Gene für Untereinheit II (*ctaC*) und Untereinheit III (*ctaE*) (Saraste *et al.*, 1986; Raitio *et al.*, 1987; van der Oost *et al.*, 1991). Dazwischen befinden sich das *ctaB*-Gen, welches die Farnesyltransferase kodiert, der Katalysator für die Synthese von Häm *O* aus Häm *B* (Zickermann *et al.*, 1997), ein offener Leserahmen und das *ctaG*-Gen. Die Translation des ORF ist noch nicht nachgewiesen worden, das *ctaG*-Gen jedoch translatiert ein 21 kDa großes Protein mit einer möglicherweise für den Transport ins Periplasma zuständigen Signalsequenz. Hypothesen, daß dieses Protein entweder für die Assemblierung der Untereinheiten I und II dient oder für den Einbau der Häme zumindest mitverantwortlich ist, wie von Steinrucke *et al.*, (1991) nach Widerlegung des ersteren Falls angenommen, konnten anhand von Deletionen im *ctaG*-Gen von *P. denitrificans* bzw. dem homologen *cox11*-Gen von *R. sphaeroides* (Hiser *et al.*, 2000) widerlegt werden. Eine mögliche Funktion könnte im Einbau von Cu_B in das binukleare Zentrum bestehen. Sequenz-

vergleiche von *ctaG*- Orthologen zeigen, daß einige ein sogenanntes CFCF-Motiv aufweisen, das auch in zahlreichen Kupferchaperonen vorkommt und dort für die Bindung des Metalls zuständig ist (Pufahl *et al.*, 1997).

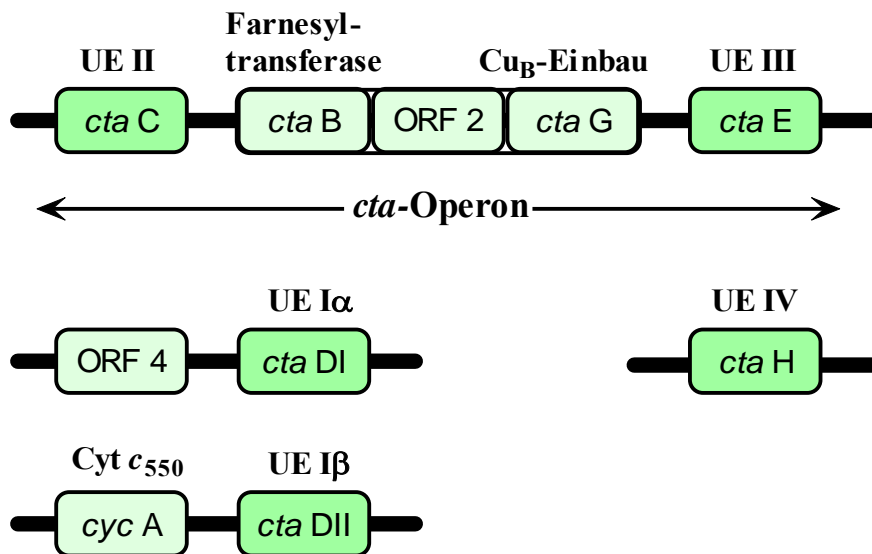


Abb. 1.3: Genetische Organisation der Untereinheiten der *aa₃*-Cytochrom-*c*-Oxidase aus *P. denitrificans*. (Die Größe der Genloci ist nicht maßstabsgetreu abgebildet).

Für die Untereinheit I der Cytochrom-*c*-Oxidase liegen im Genom von *P. denitrificans* zwei Kopien vor, *ctaDI* und *ctaDII*, welche eine 89% Homologie zueinander aufweisen. Da jedoch nur die Deletion des *ctaDII*-Gens zu einem Verlust der Expression einer intakten Oxidase führt (Raitio *et al.*, 1990), ist die genaue Verwendung und Expression der Untereinheit Iα (*ctaDI*) fraglich. Auch in den Kristallstrukturen wurde nur Untereinheit Iβ (*ctaDII*) gefunden (Iwata *et al.*, 1995; Ostermeier *et al.*, 1997). Unmittelbar vor *ctaDII* liegt das Cytochrom *c*₅₅₀ kodierende Gen *cycA*, das Substrat der Cytochrom-*c*-Oxidase. Die Untereinheit IV wird durch das *ctaH*-Gen kodiert, welches an einem dritten Genort lokalisiert ist. Eine Deletion dieses Gens ist weder für die Assemblierung noch für die enzymatische Reaktion der Cytochrom-*c*-Oxidase von Bedeutung (Witt und Ludwig, 1997).

1.3.3 Reaktionsmechanismen

Die Funktionsweise der Cytochrom-*c*-Oxidase ist sehr komplex und bis jetzt noch nicht im Detail geklärt. Wesentliche katalytische Zentren wie die beiden Häme, die Kupferatome oder die Protoneneintrittsstellen sind in den *Core*-Untereinheiten I und II lokalisiert (siehe Abb. 1.4; genauere Erläuterungen im Text weiter unten).

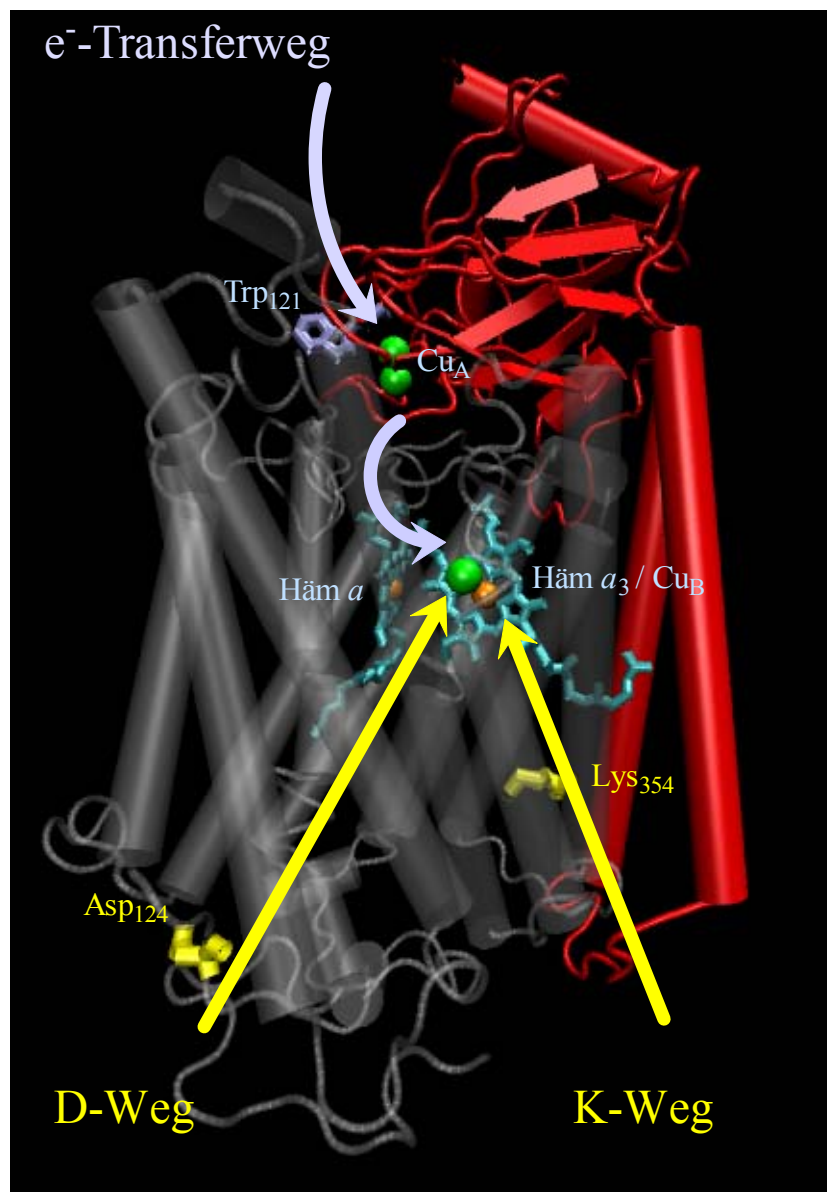


Abb. 1.4: *Core*-Einheiten der Cytochrom-*c*-Oxidase von *P. denitrificans* mit wichtigen katalytischen Zentren sowie dem Elektronentransferweg (blau) und den beiden Protonenaufnahmewegen (gelb). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Elektronentransfer und Protonentransport

Die Bindungsstelle für Cytochrom *c* ist zum periplasmatischen Raum orientiert und besteht aus überwiegend negativ geladenen Aminosäuren. Die Interaktion zwischen Cytochrom *c* und Cytochrom-*c*-Oxidase wird dabei durch elektrostatische Effekte gesteuert, die in Abhängigkeit von der Ionenstärke groß genug sind, um das Cytochrom *c* mit seiner um die Hämeinbuchtung positiv geladenen Oberfläche in die richtige Orientierung zur Cytochrom-*c*-Oxidase zu bringen (Witt *et al.*, 1998a; Flock und Helms, 2002). Als Eintrittsstelle für die Elektronen dient Trp^{II} 121 (Witt *et al.*, 1998b), welches die Elektronen in einer schnellen Reaktion, verglichen mit der Cytochrom *c* – Bindung (Hill, 1994), an das Cu_A (Untereinheit II) weiterleitet, von wo aus die Elektronen auf das *low spin* Häm *a* in Untereinheit I übertragen werden. Von hier aus werden nacheinander zwei Elektronen an das binukleare Reaktionszentrum Häm *a*₃ und Cu_B weitergegeben. Erst das vollständig reduzierte reaktive Zentrum ist in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden (Lindsay *et al.*, 1975; Malatesta *et al.*, 1990) und diesen in weiteren Reaktionsschritten zu reduzieren.

Der Protonentransport in und durch das Protein erfolgt durch zwei distinkte Protonenaufnahmewege (siehe Abb. 1.5), deren beteiligten Aminosäuren durch Mutationsstudien und Röntgenstruktur-

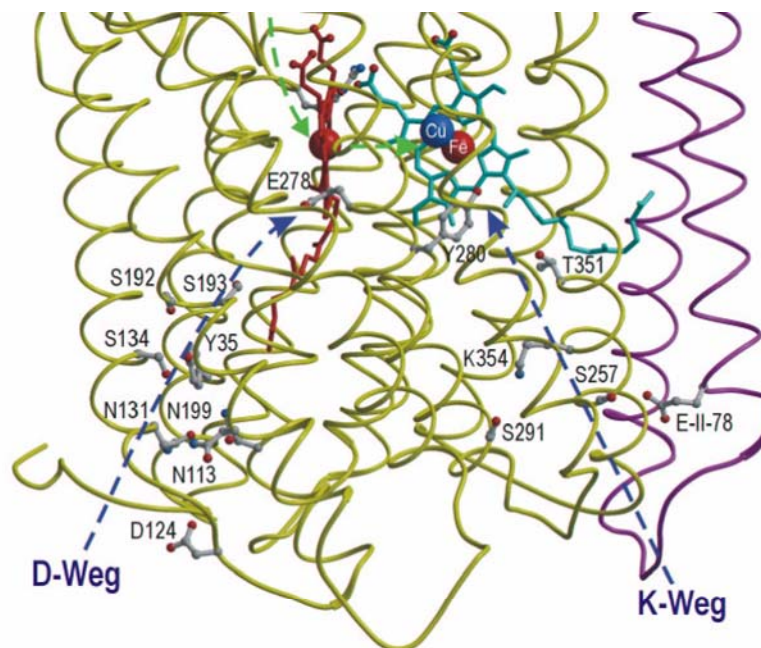


Abb. 1.5: Darstellung des K- und des D-Weges in den Core-Untereinheiten von *P. denitrificans*. Die Protonenaufnahme erfolgt über zwei verschiedene Wege: Dem kürzeren K-Weg über die Aminosäuren Lys 354, Thr 351 und Tyr 280 zum katalytischen Zentrum, und dem D-Weg, beginnend bei Asp 124, der über eine Anzahl polarer Reste zum Glu 278 führt (aus Ruitenbergh, 2001).

analysen relativ genau ermittelt werden konnten. Die Aminosäuren Asp 124 und Lys 354 dienen hierbei als Namensgeber für den D-Weg und den K-Weg. Beide Wege sind sehr wahrscheinlich durch Wasserstoffbrücken mit dem katalytischen Zentrum verbunden.

Der kürzere Transferweg, der K-Weg, führt vom bakteriellen Cytoplasma zum binuklearen Zentrum und schließt die Aminosäuren Lys 354, Thr 351 und Tyr 280 ein. Elektrostatischen Berechnungen zufolge könnte die Protonenaufnahme des K-Wegs durch das Glu^{II} 78 kontrolliert werden (Kannt *et al.*, 1998), einer Aminosäure, die in allen bekannten Cytochrom und Quinol Oxidasen konserviert ist. Dies wurde für *P. denitrificans* jedoch durch Mutagenesestudien widerlegt (Richter *et al.*, 2005).

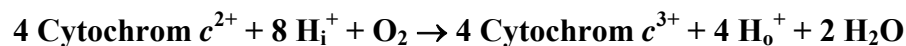
Der etwas längere D-Weg bezieht Asp 124 mit ein und führt dann weiter über eine Anzahl polarer Reste (Asn 199, Asn 113, Asn 131, Tyr 35, Ser 134, Ser 192, Ser 193) zum Glu 278. Eine Mutation der Anfangsaminosäure Asp 124 zu Asn führt zu einer inaktiven Oxidase, wobei jedoch eine Mutation von Asn 131 zu Asp interessanterweise einem entkoppelten Phänotyp zur Folge hat, bei dem katalytische Aktivität nicht mit Protonenpumpen verbunden ist (Pfitzner *et al.*, 2000).

Durch elektrostatische Berechnungen (Kannt *et al.*, 1998), welche auf der Kristallstruktur von der Cytochrom-*c*-Oxidase von *P. denitrificans* basieren, konnte ein Cluster ionisierbarer Gruppen identifiziert werden, die elektrostatisch mit redoxaktiven Cofaktoren interagieren und eine Rolle als Protonenakzeptoren für die beiden Protonenaufnahmewege spielen könnten.

Der katalytische Zyklus

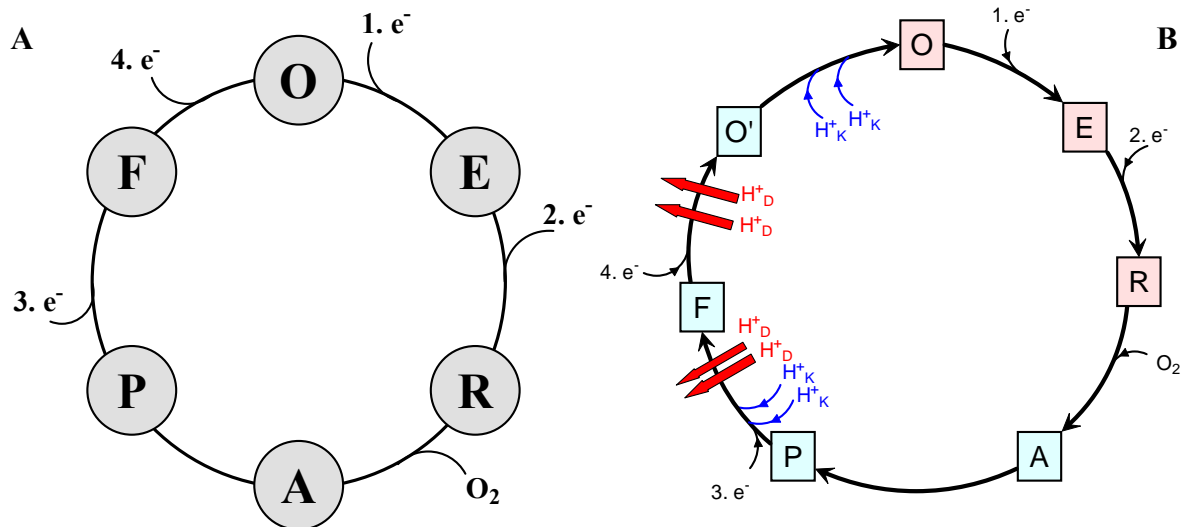
Während eines Übergangs reduziert die Cytochrom-*c*-Oxidase molekularen Sauerstoff durch die vom Cytochrom *c* aufgenommenen Elektronen zu Wasser. Dabei werden Protonen von der N-Seite der Membran aufgenommen und teilweise über die Membran gepumpt.

Die Nettoreaktionsgleichung eines Übergangs ist:



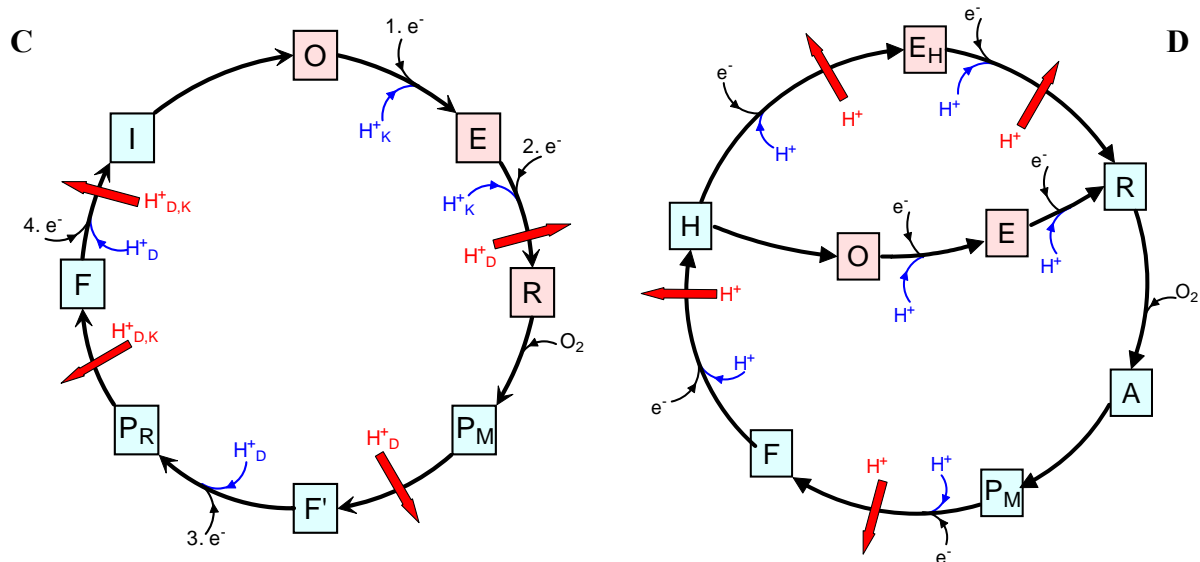
mit H_i^+ = aus dem Cytoplasma bzw. der Matrix aufgenommene Protonen und H_o^+ = in das Periplasma bzw. in den Intermembranraum abgegebene Protonen.

Diese katalytische Sauerstoffreduktion findet nach dem in Abbildung 1.6A schematisch aufgezeigtem Reaktionsschema statt. Vom vollständig oxidiertem Zustand **O** (*oxidized*) wird durch Aufnahme eines einzelnen Elektrons der Einelektronen-reduzierte Zustand **E** (*electronated*) erreicht (Moody, 1991). Wird ein weiteres Elektron aufgenommen, so kommt man zum Zweielektronen-reduzierten Zustand **R** (*reduced*). Dadurch wird die Bindung von molekularem Sauerstoff an das reduzierte Häm a_3 ermöglicht und das Zwischenprodukt **A** bildet sich (Chance *et al.*, 1975). Eine



Schematische Darstellung des katalytischen Zyklus ohne Berücksichtigung von Protonenaufnahme und -abgabe.

Der katalytische Zyklus nach Wikström (1989). Substratprotonen sind durch blaue Pfeile angedeutet, gepumpte Protonen durch rote. Rote Intermediate kennzeichnen den reduktiven Teil des Zyklus, blaue den oxidativen. Die Idee, daß gepumpte Protonen durch den D-Weg translozieren und chemische Protonen durch den K-Weg, stammt von Iwata *et al.* (1995).



Der katalytische Zyklus nach Michel (1999). Substratprotonen sind durch blaue Pfeile angedeutet, gepumpte Protonen durch rote. Die Angabe _{D, K} bedeutet, daß entweder der D- oder der K-Weg genommen wird. Rote Intermediate kennzeichnen den reduktiven Teil des Zyklus, blaue den oxidativen.

Der katalytische Zyklus nach Wikström (2004). In der Abwesenheit eines Elektronendonors relaxiert der metastabile Zustand **H** zu Zustand **O**. Während des kontinuierlichen Turnovers, wird **H** zu **R** via **E_H** reduziert. Rote Pfeile bezeichnen gepumpte Protonen, blaue Substratprotonen. Rote Intermediate kennzeichnen den reduktiven Teil des Zyklus, blaue den oxidativen.

Abb. 1.6: Verschiedene Modelle des katalytischen Zyklus.

spontane elektronische Umordnung im binuklearen Zentrum führt zur Bildung des **P_M**-Zustandes (*peroxy*, in der Abbildung 1.6 als P bezeichnet), dessen Name von der ursprünglichen Annahme herrührt, daß das Enzym in diesem Schritt ein Peroxid oder Hydroperoxid am aktiven Zentrum gebunden hat (Wikström, 1987). Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, daß das ursprüngliche Sauerstoffmolekül in diesem Zustand bereits gespalten ist und eine Oxoferryl-Struktur vorliegt (Proshlyakov *et al.*, 1996; Fabian *et al.*, 1999). Dabei konnte jedoch nicht die Frage beantwortet werden, wo das für die Sauerstoffspaltung zusätzlich benötigte Elektron herkommt. Denkbar wäre die Oxidation eines benachbarten Aminosäurerestes.

Durch Analyse der Kristallstrukturen der Cytochrom-*c*-Oxidase von *P. denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997) und Rinderherz (Yoshikawa *et al.*, 1998b) vermutete man, daß Tyr 280 kovalent an einen Histidinliganden an Cu_B gebunden ist. Diese Bindung konnte massenspektrometrisch (Buse *et al.*, 1999) und durch Redox-Fouriertransformationsspektroskopie bestätigt werden (Hellwig *et al.*, 2002). Durch EPR-Messungen konnte nach Behandlung von *P. denitrificans* Cytochrom-*c*-Oxidase mit H₂O₂ ein Tyrosinradikal nachgewiesen werden (MacMillan *et al.*, 1999). Bei weiterer Forschung stellte sich jedoch heraus, daß dieses Radikalsignal von Tyr 167 herrührt (Budiman *et al.*, 2004). Es wird jedoch von der Annahme ausgegangen, daß das Elektron für die Sauerstoffspaltung von Trp 272 geliefert wird, welches sein Elektron entweder von Tyr 167 oder von dem querverbundenen Tyr 280 – His 276 nachgeliefert bekommt (MacMillan *et al.*, 2006). Die Aufnahme des dritten Elektrons führt zur Überführung des Tyrosinradikals zu einem Tyrosinat, und durch dessen Protonierung entsteht das **F**-Intermediat (*oxoferryl*). Der Transfer des vierten Elektrons schließlich führt über den Zwischenzustand **H** (*hydroxy*, nicht dargestellt in Abbildung 1.6) (Han *et al.*, 1990) wieder zum vollständig oxidiertem Zustand **O**, und ein neuer Zyklus kann durchlaufen werden.

Heute existieren mehrere Modellvorstellungen über den Ablauf des katalytischen Zyklus.

Das klassische Modell nach Wikström (1989)

Das klassische Modell (siehe Abb. 1.6B) wurde 1989 von Wikström aufgestellt (Wikstrom, 1989). Er konnte zeigen, daß bei Anwesenheit eines elektrochemischen Protonengradienten über der Mitochondrienmembran die Oxidasereaktion teilweise umgedreht werden kann. Generiert man den Gradienten durch ATP-Hydrolyse, so kann in Gegenwart von Cytochrom *c* und Ferri-/Ferrocyano- id die Cytochrom-*c*-Oxidase quasi rückwärtslaufen, indem sie vom **O**-Zustand zurück in den **F**- und weiter in den **P**-Zustand überführt werden kann (Wikstrom, 1981; Wikström, 1987). Damit konnte postuliert werden, daß sowohl der **P**→**F** als auch der **F**→**O** Übergang am Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt sind. Aus diesen Experimenten schloß Wikström weiterhin, daß während dieser Übergänge je zwei Protonen gepumpt, zwei Substratprotonen aufgenommen werden und ein Elektron zum katalytischen Zentrum transferiert wird.

Dieses Modell basiert auf folgenden Annahmen:

- 1.) Alle Intermediate des katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c*-Oxidase stehen in einem thermodynamischen Gleichgewicht.
- 2.) Die Mitochondrienmembran ist für Protonen impermeabel und der elektrochemische Protonengradient kann somit aus der ADP- und der ATP-Konzentration berechnet werden.
- 3.) Die pH-Werte sind auf beiden Seiten der Membran gleich.
- 4.) Das katalytische Zentrum der Cytochrom-*c*-Oxidase liegt in der Mitte des Dielektrikums.

Das Modell nach Michel (1998)

1998 wurden die bis dahin veröffentlichten Daten von Michel analysiert (Michel, 1998) und in einen neuen Zusammenhang gebracht. Danach waren einige dieser Ergebnisse nicht vereinbar mit dem klassischen Modell (Michel, 1999). So ist zum Beispiel fraglich, ob das System wirklich im Gleichgewicht steht (Ferguson und Sorgato, 1982). Außerdem konnte von Mitchell und Rich (1994) gezeigt werden, daß schon während der reduktiven Phase zwei Protonen aufgenommen werden.

Durch die Analyse kam Michel zu dem Schluß, daß während des **F**→**O** Überganges nur ein Proton transloziert wird. Da jedoch sicher zu sein scheint, daß vier Protonen je Reaktionszyklus gepumpt werden, muß das fehlende Proton bei einem anderen Übergang durch das Protein gebracht werden. Michels Vorschlag (1999) war der **E**→**R** Übergang.

In Abbildung 1.6C ist das neue Modell dargestellt. Es beruht auf den verfügbaren strukturellen, spektroskopischen und durch Mutagenese erhaltenen Daten und hält strikt das Neutralitätsprinzip (Mitchell, R. und Rich, 1994) ein. Die über den D-Weg aufgenommenen Protonen werden in den Bereichen um die Hämpropionate zwischengespeichert und durch elektrostatische Abstoßung bei der Aufnahme von Substratprotonen nach außen gedrängt.

Das Modell nach Wikström (2004)

Das verbesserte Modell von Wikström beruht auf der Beobachtung, daß nach Verkhovskiy *et al.* (2001) die schnelle Reduktion des Häm *a* nicht mit einer meßbaren Protonenaufnahme gekoppelt ist, sondern nur im Falle eines erneuten Transfers eines Elektrons zum binuklearen Zentrum auftritt (siehe Abb. 1.6D).

Danach werden sieben der acht Protonen durch den D-Weg aufgenommen und in der Nähe des binuklearen Zentrums gespeichert, gleichgültig, ob sie als Substratproton dienen oder transloziert werden (Wikstrom und Verkhovskiy, 2002). Befindet sich ein Elektron an Häm *a*, so wird das Proton weiter zu einer hydrophilen Domäne über die Hämgruppen transportiert. Dieser Protonentrans-

fer erlaubt den Elektronentransfer vom Häm *a* zum binuklearen Zentrum, woraufhin nun ein Protonentransfer in die Nähe des binuklearen Zentrums möglich wird. Die Aufnahme eines zweiten Protons zur Wasserbildung bewirkt nun den Ausstoß eines Protons durch elektrostatische Abstoßung. Dieser Mechanismus erfordert die Translokation eines Protons für jedes Elektron, welches von Häm *a* zum binuklearen Zentrum transferiert wird.

Da der Elektronentransfer auf das oxidierte Enzym keinerlei meßbare Protonenaufnahme zeigte (Verkhovsky *et al.*, 2001), jedoch, wenn die Reduktion des binuklearen Zentrums unmittelbar der Oxidierung durch molekularen Sauerstoff folgte, in der reduktiven Phase zwei Protonen gepumpt werden sollen (Verkhovsky *et al.*, 1999), wurde darauf geschlossen, daß es zwei verschiedene oxidierte Zustände geben muß, die sich je nach Vorhandensein des Reduktanten einstellen. Die reduktive Phase des katalytischen Zyklus umfaßt die Reduzierung von **H** oder **O** zu **R**. Sowohl die oxidative Phase als auch die reduktive Hauptphase sind an die Translokation von zwei Protonen gekoppelt, je Elektron eines. Tritt jedoch die Relaxation von **H**→**O** ein, so ist der reduzierende Part des Zyklus nicht länger an das Protonenpumpen gekoppelt.

1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Seit der Entdeckung vor mehr als 25 Jahren, daß die Cytochrom-*c*-Oxidase die Funktion einer redox-getriebenen Protonenpumpe besitzt (Wikstrom, 1977), ist ihre Funktionsweise trotz zahlreicher aufgeklärter Details bis heute Gegenstand von Debatten.

So ist die Funktion der Protonenpumpe an sich unbestritten, und auch die Tatsache, daß pro Reaktionszyklus vier Protonen über die Membran gepumpt werden (Antonini *et al.*, 1993). Die Kristallstrukturen von mitochondrialer Cytochrom-*c*-Oxidase aus Rinderherz (Tsukihara *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998a; Yoshikawa *et al.*, 1998b) sowie aus bakterieller Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata *et al.*, 1995; Ostermeier *et al.*, 1997) konnten gelöst werden. Auch die unterschiedlichen Zwischenzustände konnten mit Hilfe verschiedener spektroskopischer und biochemischer Methoden mehr oder weniger gut charakterisiert werden.

Trotzdem gibt es bis heute noch Kontroversen und Diskussionen darüber, an welcher Stelle des Reaktionszyklus wie viele Protonen gepumpt werden, und wann und wo Substratprotonen aufgenommen werden.

Nach Ruitenberg *et al.* (2000) wird nach der Reduktion des Häm *a* durch einen Elektronentransfer in das oxidierte Enzym (**O**→**E** Schritt) eine schnelle Protonenaufnahme von der anderen Membranseite durch potentiometrische Messungen beobachtet. Dieses Ergebnis wurde von Verkhovsky *et al.* (2001) kritisiert. Mit zeitaufgelösten elektrischen Messungen konnten sie nach Elektroneninjektion keine weitere elektrogene Phase detektieren und schlossen, daß kein Ladungstransfer verbunden mit einer Protonenaufnahme stattfindet. Sie stellten fest, daß erst, wenn das binukleare Zentrum bereits reduziert ist, ein Elektronentransfer auf das Enzym eine Protonenaufnahme bewirkt und schließen daraus, daß die Reduktion von Häm *a* im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ruitenberg *et al.* (2000) nicht von einer Protonenaufnahme begleitet ist, weder im oxidierten noch im Einelektronen-reduzierten Zustand.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit einer unabhängigen und direkten Methode die Frage zu beantworten, ob und wann Protonen im ersten Schritt des katalytischen Zyklus aufgenommen werden. Dazu wird mit Hilfe der zeitaufgelösten Blitzlichtabsorptionsspektroskopie und pH-sensitiver Farbstoffe der **O**→**E** Übergang untersucht und Protonenkonzentrationsänderungen während der Elektronenaufnahme verfolgt. Diese Farbstoffe sollen sowohl löslich im Medium eingesetzt als auch kovalent an die Proteinoberfläche gebunden werden.

Dazu wird ein Mutagenesesystem benötigt, welches die zielgerichtete Mutagenese von sowohl Untereinheit I als auch Untereinheit II erlaubt. Des weiteren muß eine Mutante hergestellt werden, die keine oberflächenexponierten Cysteine enthält, um daraufhin gezielt Cysteine an ausgewählten Stellen in das Protein einführen zu können. Diese Cysteine sollen als Kopplungspartner für thiol-

reaktive pH-Indikatoren dienen. Nach einer sorgfältigen Optimierung des Meßsystems sollen dann die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen während der Funktion der Cytochrom-*c*-Oxidase gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

Allgemeingebräuchliche molekularbiologische Methoden, Puffer und Medien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.1.1 Medien

Succinat-Medium (Ludwig, 1986)

K ₂ HPO ₄	50 mM
NH ₄ Cl	10 mM
MgSO ₄ ·x 7 H ₂ O	1 mM
Zitronensäure	1 mM
Succinat	40 mM
Spurenelement-Lösung	1 ml/l
ad pH 6,2 mit KOH	

Spurenelement-Lösung

CaCl ₂	100 mM
CoCl ₂	10 mM
CuCl ₂	5 mM
FeCl ₃	90 mM
H ₃ BO ₃	5 mM
MnCl ₂	50 mM
Na ₂ MoO ₄	10 mM
ZnCl ₂	25 mM

in halbkonzentrierter HCl

Zur Herstellung von Agarplatten wird den Medien 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

2.1.2 Anzucht von *Paracoccus denitrificans*

Für die Anzucht von *P. denitrificans* in größerem Umfang (24 l) wurden zunächst 5 ml LB-Medium von einer frisch ausgestrichenen Plattenkultur angeimpft und 8-10 h bei 32°C und 225 rpm im Luftbadschüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden jeweils 100 ml Succinat-Medium angeimpft und über Nacht bei 32°C im Inkubator geschüttelt. Über eine weitere Zwischenkultur (500 ml) wurden dann 12 x 2 l – Succinat-Medium mit je 100 ml Zwischenkultur angeimpft. Die Ernte der Zellen erfolgte nach ca. 14-16 h (alle Kulturen enthielten ein geeignetes Antibiotikum).

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden die Zellen einer 2,5 ml-Übernachtskultur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert (6000 rpm, 3 min, RT), die gesammelten Zellen in 1 ml Gefriermedium (LB-Medium mit 15% Glycerin) resuspendiert und die Kulturen bei -80°C gelagert.

2.1.3 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Escherichia coli:

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ endA1 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi-1 λ - recA1 gyrA96 relA1 ϕ 80dlacZ Δ M15	Hanahan (1983) Bethesda (1986)
JM110	rpsL (Str ^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lacproAB) [F ['] traD36 proAB lacIqZ Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
MM294	F ⁻ endA1 hsdR17 [r _k ⁻ m _k ⁺] glnV 44 supE44 thi-1 relA1? rfbD1? spoT1?	Meselson und Yuan (1968)

Paracoccus denitrificans:

Stamm	Genotyp	Referenz
PD1222	Wildtypstamm, Rif ^r Spc ^r erhöhte Konjugationsfrequenz	Devries <i>et al.</i> (1989)
AO1	PD1222-Derivat, Δ ctaDI::Kmr, Δ ctaDII::Tetr, Δ ccoN::Gmr	Pfützner <i>et al.</i> (1998)
ORI4	MR31-Derivat, Δ ctaDI::Kmr Δ ctaDII::Tetr Δ cta-operon::Gmr	Oliver Richter, Frankfurt am Main

Plasmide:

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pUC18	Amp ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pKH160	XhoI-ctaDII-his-HindIII aus pKH163/1 und XhoI-ctaCBGEsurF1-HindIII aus pKH167/1 in pRI2 (HindIII)	Klaus Hoffmeier, Frankfurt am Main
pKK1	XbaI/NdeI-Fragment aus pKH160 in pUC18	diese Arbeit

2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS wurde mit dem „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen GmbH (Hilden) durchgeführt. Aus einer Präparation konnten so bis zu 20 µg Plasmid-DNS gewonnen werden.

2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 5 µl DNS-Lösung mit 995 µl H₂O_{bidest.} gemischt, in eine Quarzküvette gegeben und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gegen H₂O gemessen.

$$A_{260} \times 10 = \mu\text{g Nukleinsäure}/\mu\text{l}$$

Zur Bestimmung der Reinheit der Lösung wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Bei geringer Verunreinigung der DNS mit Proteinen sollte der Quotient aus A_{260} und A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.6 Restriktionsverdau von DNS

Restriktionsendonukleasen wurden von New England BioLabs GmbH (Schwalbach) oder MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen. Gemäß den Herstellerangaben wurden adäquate Reaktionsbedingungen für die einzelnen Enzyme gewählt. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 100-200 ng Plasmid-DNS verdaut, für präparative Ansätze wurden bis zu 400 ng DNS eingesetzt.

2.1.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten im Agarosegel

Die Auftrennung der DNS-Fragmente erfolgte nach Zugabe eines geeigneten Volumens an DNS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Xylol Cyanol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 5 mM EDTA) üblicherweise in 0,7-1,5 % Agarosegelen mit einem Zusatz

von 0,5 µg/µl Ethidiumbromid in TBE-Puffer (8,9 mM Tris, 8,9 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Zusätzlich wurde je nach erwarteten Fragmentgrößen ein Längenstandard („1 kb DNA Ladder“ oder „100 bp DNA Ladder“ von New England BioLabs GmbH (Schwalbach)) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 Volt/cm.

Durch Vergleich mit den Markerbanden des Längenstandards können die DNS-Mengen und -Größen grob abgeschätzt werden.

2.1.8 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen GmbH (Hilden) (Qiaquick Gel Extraction Kit).

2.1.9 Ligation

Für die Ligation wurden 40-50 ng Vektor sowie eine ungefähr äquimolare Menge an *Insert* eingesetzt (Legerski und Robberson, 1985).

Es wurden Enzyme und die entsprechenden Reaktionspuffer von Epicentre (Madison) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Bei *sticky end*-Ligationen wurden 2 U T4- DNS-Ligase verwendet, bei *blunt end*-Ligationen wurden 4 U Ligase und PEG6000 bis zu einer Endkonzentration von 5 % (w/v) zugesetzt, um das Lösungsmittelvolumen zu verringern. Die dadurch erreichte Konzentrationserhöhung erleichterte eine Ligation der stumpfen Enden (Pheiffer und Zimmerman, 1983).

Ligiert wurde bei 16°C zwischen einer Stunde und über Nacht.

Eine Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 min erhöhte die Effizienz der nachfolgenden Transformation in *E. coli* erheblich (Michelsen, 1995).

2.1.10 Transformation von Bakterienzellen

Herstellung RbCl-kompetenter DH5α Zellen nach Hanahan, (1985)

Da *E. coli* keine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmiden besitzt, muß eine künstliche Kompetenz herbeigeführt werden.

50 ml LB-Medium + 20 mM MgCl₂ wurden 0,5 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Luftbadschüttler inkubiert.

Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ~ 0,5) wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt. Dann erfolgte die Zellernte bei 2000 g (10 min, 4°C).

Die Zellen wurde in 7,5 ml eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 30 mM KAc, 15% (v/v) Glycerin, ad pH 5,8 mit Essigsäure) resuspendiert und eine Stunde lang auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 2000 g (10 min, 4°C).

Die Zellen wurde in 2 ml eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, ad pH 6,8 mit KOH) aufgenommen und vorsichtig resuspendiert, die entstandene Zellsuspension wurde zu 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Hitzeschock-Transformation in E. coli nach Cohen et al. (1972)

Ein 100 µl - Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von einer geeigneten Menge DNS wurde sehr vorsichtig gemischt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 0,9 ml LB-Medium zugegeben und die Zellsuspension wurde nach einer Erholzeit von 1 h im Schüttler bei 37°C auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet und die Klone am nächsten Tag auf Erhaltungsplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum umgestrichen.

2.1.11 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte in Anlehnung an die *Ligase Chain Reaction – Mutagenesis* nach Michael (1994).

Dieses System ermöglicht die gezielte Einführung von Mutationen in ein beliebiges Plasmid (< 8 kBp) durch Verwendung mutagener *Primer* in einer Cycling-Reaktion. Da mutagene *Primer* verwendet werden, die nur zu einem DNS-Strang des Plasmids komplementär sind, kann auch nur einer der beiden DNS-Stränge durch die thermostabile *Pfu*-Polymerase synthetisiert werden. Es erfolgt daher eine lineare Amplifikation des die Mutation tragenden Plasmid-Stranges.

Der anschließende Verdau des Ansatzes mit der Endonuklease DpnI, die spezifisch eine methylierte bzw. hemimethylierte Erkennungssequenz spaltet, kann der *in vitro* erzeugte, mutagene Strang nicht verdaut werden. Der Reaktionsansatz ist deswegen stark an mutagener, einzelsträngiger Plasmid-DNS angereichert und sollte daher bei der Transformation in *E. coli* Kolonien liefern, die das Plasmid mit der gewünschten Mutation aufweisen.

Konstruktion mutagener Primer

Die Sequenzen der mutagenen *Primer* wurden unter Verwendung des Programms „Primer Generator“ (Turchin und Lawler, 1999) so entworfen, daß durch die jeweilige Mutation eine neue Schnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym entsteht.

Auf diese Weise können erfolgreich eingeführte Mutationen zunächst durch Restriktionsanalyse identifiziert werden, bevor eine genaue Überprüfung der Sequenz durch Sequenzierung erfolgt.

Beim Design der *Primer* wurde außerdem darauf geachtet, daß die erzeugten Fehlpaarungen von mindestens 10 komplementären Basen flankiert werden und am 3'-Ende der *Primer* einige GC-Basen liegen.

Die *Primer* sollten eine Primerlänge von 25-45 Bp und eine Schmelztemperatur bei Ausbildung eines Doppelstranges von $\sim 75^\circ\text{C}$ besitzen.

Phosphorylierung mutagener Oligonukleotide (Primern)

Für die Phosphorylierung von Oligonukleotiden wurden 100 pmol *Primer* mit 5 U Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas, St. Leon-Roth), dem dazugehörigen Reaktionspuffer und 1 mM ATP versetzt und für 30 min bei 37°C (Phosphorylierung) und anschließend für 10 min bei 70°C (Inaktivierung) inkubiert.

Mutagene Cycling-Reaktion

Als Polymerase wurde der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ von MBI Fermentas (St. Leon-Roth) mit dem dazugehörigen Reaktionspuffer benutzt. Die Ampligase stammte von Epicentre Technologies (Madison).

Mutagenese-Ansatz:

DNS- <i>Template</i> -Plasmid	1 μl (ca. 200 ng)
„High Fidelity PCR“-Puffer mit MgCl_2 (10x)	5 μl
mutagene <i>Primer</i> (phosph., 10 pmol/ μl)	1 μl
dNTPs (2mM)	5 μl
NAD^+ (10 mM)	5 μl
„High Fidelity PCR Enzyme Mix“ (5 U/ μl)	0,5 μl
Ampligase (5 U/ μl)	1 μl
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ad 50 μl	

Die Cycle-Bedingungen:

Prozeß	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	10
<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
Elongation	68°C	1 min/kb PCR Produkt	
Denaturierung	94°C	1 min	20
<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
Elongation	68°C	1 min/kb PCR Produkt + 10 sec. /Zyklus	
Finale Elongation	68°C	10 min	1

DpnI-Verdau

Anschließend wurde der Mutagenese-Ansatz unter Vakuum auf ein Volumen unter 20 µl eingengt. Nach Zugabe von 1 µl DpnI (10 U/µl, MBI Fermentas, St. Leon-Roth) wurde mit H₂O_{bidest.} auf 20 µl aufgefüllt und für 2 h bei 37°C inkubiert.

Dann wurden 5-10 µl des Ansatzes für die Transformation in DH5α-Zellen eingesetzt.

Zur Identifizierung der mutierten Plasmide wurde die Plasmid-DNS einiger Klone isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen.

Sequenzierung

Aus den durch Restriktionsanalyse identifizierten mutierten Klonen wurde die Plasmid-DNS isoliert und die Mutation durch Sequenzierung verifiziert.

2.1.12 Triparentale Konjugation

Im Falle von *P. denitrificans* ist weder eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmid-DNS vorhanden, noch kann eine künstliche Kompetenz wie zum Beispiel bei *E. coli* erzeugt werden. Es ist jedoch möglich, Plasmide durch parasexuelle Konjugation in *P. denitrificans* einzubringen (Gerhus *et al.*, 1990). Die *tra*-Funktionen, die für die Konjugationen notwendig sind, werden

durch das konjugative Plasmid RP4-7 *in trans* zur Verfügung gestellt, welches der verwendete Helferstamm MM294 trägt.

Eine Selektion der *Paracoccus*-Zellen, die das gewünschte Donor-Plasmid aufgenommen haben, kann unter Verwendung der Antibiotika-Kombination Rifampicin-Kanamycin-Streptomycin erreicht werden. Beide *E. coli*-Stämme weisen nämlich keine Rifampicin- und Kanamycinresistenz auf, und auch der *Paracoccus*-Stamm ORI4, der diese beiden Resistenzen hat, kann unter Verwendung dieser Kombination nur wachsen, wenn er das Donorplasmid mit dem Streptomycin-Resistenzgen aufgenommen hat.

Je 1 ml der Übernachtskulturen der drei Stämme wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3 min bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. Nachdem die Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert wurden, wurden je 100 µl des Helfer- und des Donorstammes mit 300 µl Empfängerstamm gemischt. Diese Mischkultur wurde erneut bei RT und 6000 rpm für 3 min zentrifugiert und die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine antibiotikafreie LB-Platte getropft und über Nacht bei 32°C im Brutschrank inkubiert.

Der entstandene Bakterienrasen wurde mit einer sterilen Impföse abgetragen und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde 1:20 und 1:40 verdünnt und je 100 µl der Verdünnungen auf einer Agarplatte mit der genannten Antibiotika-Kombination ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation der Platten im Brutschrank bei 32°C konnten einzelne Klone gepickt und auf eine Rif/Sm/Km-Erhaltungsplatte umgestrichen werden.

Die Plasmid-DNS wurde durch Mini-Präparation isoliert und durch Restriktionsverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen charakterisiert.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Membranpräparation von *P. denitrificans* Zellen

Die Membranpräparation von *P. denitrificans* Zellen erfolgte nach einer Modifikation nach Gerhus *et al.* (1990). Die Zellen wurden in Succinat-Medium angezogen und 15 min bei 6500 rpm und 4°C abzentrifugiert (Beckman Avanti J-20XP, JLA-8.1000-Rotor). Die gesammelten Zellen wurden auf Eis in kaltem Puffer (20 mM KP pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die homogenisierten und gefilterten Zellen wurden mit dem Proteaseinhibitor Pefabloc und DNase I versehen und dann mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators (Microfluidizer) bei 2000 psi unter Eiskühlung aufgeschlossen.

Der Zellschrott wurde durch eine einstündige Zentrifugation bei 4000g und 4°C entfernt.

Der Überstand wurde anschließend über Nacht bei 42000 rpm (4°C, 45 Ti Rotor, Beckman UZ) zentrifugiert.

Das erhaltene Zentrifugat bestand aus zwei Schichten: aus einer gelartigen, rotbräunlichen Außenschicht aus Membranen, die vorsichtig abgetrennt und in KP-Puffer (20 mM pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen wurde, und einem sehr festen, weißen Kern aus Speicherstoffen, der verworfen wurde.

Nach Resuspension der Membranen auf Eis mit Hilfe eines Ultra Thurax-Homogenisators konnten die Membranen bei -80°C eingefroren werden.

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde in einer modifizierten Form nach Lowry *et al.* (1951) mit dem Bio-Rad *DC Protein Assay* durchgeführt. Als Proteinstandard zur Erstellung der Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin eingesetzt. Um die Konzentration von Cytochrom-*c*-Oxidase zu bestimmen, wurde die Absorption bei 425 nm bestimmt. Mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{425\text{nm}} = 158 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.3 Anzucht und Aufreinigung von Fv-Fragment

3 x 200 ml LB-Medium/Ampicillin wurden mit je 50 μl Glyzerinkultur 7E2 C50S angeimpft und bei 30°C über Nacht geschüttelt.

12 x 2l LB-Medium wurden zum Temperieren über Nacht bei 24°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde jeder Kolben mit 50 ml Übernachtskultur angeimpft und Ampicillin (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Bei $22,5^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm wurde bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5 geschüttelt. Mit IPTG (Endkonzentration 0.5 mM) wurde die FV-Expression induziert und 3 h weiter inkubiert. Die Ernte erfolgte im GS3-Rotor für 15 min bei 7000 rpm und 4°C . Die Zentrifugate wurden in 250 ml Periplasmapuffer (500 mM Saccharose, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, um die Zellen aufzubrechen. Danach wurde der Zellschrott durch eine zweimalige Zentrifugation im GSA-Rotor bei 12000 rpm für 30 min abgetrennt, und der Überstand in 30 ml Portionen bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Solubilisierung der Membranen

20 ml Membranen wurden mit 1,5 ml 1 M KP pH 8,0, 150 μl 500 mM EDTA, 500 μl (10 mg/ml) Pefabloc, 400 μl (10 mg/ml) Avidin und 20 ml 10 % LM verdünnt und 10 min auf Eis solubilisiert. Nach ca. 15 min wurden nicht solubilierte Membranbestandteile durch eine einstündige Zentrifugation bei 60000 rpm und 4°C (Beckman UZ, 70 Ti-Rotor) sedimentiert.

Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (1,2 μm) und bis zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung auf Eis gelagert.

2.2.5 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cytochrom-*c*-Oxidase

Die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgte über eine Streptavidin-Säule. Diese Säule ist in der Lage, den an das Fv-Fragment fusionierten Strep-Tag zu immobilisieren, das Fv-Fragment selbst bindet an ein Epitop der Untereinheit II der Cytochrom-*c*-Oxidase. Damit ist eine spezifische Aufreinigung der Cytochrom-*c*-Oxidase im Komplex mit dem Fv-Fragment möglich.

Die Streptavidin-Säule wurde mit 20 mM KP, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0,05 % LM vorgespült, und danach das Solubilisat aufgetragen. Anschließend wurde nicht gebundenes Material mit oben genanntem Puffer weggespült und der Cytochrom-*c*-Oxidase-Fv-Komplex mit Puffer unter Zusatz von 2,5 mM Desthiobiotin eluiert.

Zur Entfernung von überschüssigem Fv wurde die oxidasehaltige Fraktion in 50kDa *Cutoff-Centripreps* gewaschen und einkonzentriert.

Die aufgereinigte Cytochrom-*c*-Oxidase wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Core-Untereinheiten Präparation

Um eine *Core*-Untereinheiten-Präparation der Cytochrom-*c*-Oxidase zu erhalten, wurde das oxidasehaltige Eluat der Ni^{2+} -NTA-Chromatographie mit 0,1% LDAO versetzt und 20 min bei 4°C gerührt.

Das LDAO ist in der Lage, die dritte und vierte Untereinheit der Oxidase abzutrennen. Währenddessen wurde eine 5 ml große Q-Sepharose FF-Säule mit Waschpuffer äquilibriert. Das Oxidaseeluat wurde aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit Waschpuffer nachgespült. Anschließend wurde mit LM-Puffer (10 mM KP pH 8,0, 20 mM KCl, 1mM EDTA, 0,05% LM) das Detergenz ausgetauscht und mit Elutionspuffer (10 mM KP pH 8,0, 600 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,05% LM) die Oxidase von der Säule eluiert.

Über *Centriprep*-Konzentratoren (MWCO = 50 kDa) wurde der Salzgehalt abgesenkt und das Protein eingeeengt. Die Cytochrom-*c*-Oxidase wurde dann in geeigneten Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit 12 %igen Gelen.

Pro Tasche des Gels wurden 15-25 μl einer Probe in Probenpuffer (250 mM M Tris-HCl pH 8,0, 7,5 % (w/v) SDS, 12,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 25 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) Bromphenolblau) aufgetragen, die zuvor für 10 min bei 37°C denaturiert wurde. Die übliche Denaturierungstemperatur von 65°C ist für viele Membranproteine ungeeignet, da diese bei derart hohen Temperaturen aggregieren würden.

Zur Ermittlung des apparenten Molekulargewichtes wurde stets auch ein Molekulargewichtsstandard (Prestained Protein Marker, Broad Range, NEB) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel 10 min in einer *DoubleDye*-Färbelösung (0,114 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250, 0,028 % (w/v) Bismarck Braun, 7 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol) bei RT inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch Inkubation in 10 % Essigsäure entfernt. Die Trocknung des Gels erfolgt für ca. 90 min bei 80°C unter Vakuum.

Für fluoreszierende Gele wurde zusätzlich ein fluoreszierender Marker (Fluorescent MW Marker (Low Range), Sigma) mit aufgetragen und das Gel vor dem Färben mit Coomassie mit einer Anregungswellenlänge von 480 nm bei 515 nm betrachtet.

2.2.8 Präparation von in Liposomen inkorporierter Cytochrom-*c*-Oxidase

Die Reinigung von Asolectin (Phosphatidyl Cholin Typ II S, Sigma) erfolgte nach dem Protokoll von Darley-Usmar *et al.* (1987).

40 mg / ml gereinigtes Asolectin wurden in 10 mM HEPES pH 7,3, 10 mM KCl und 2 % Cholat unter Stickstoffatmosphäre gelöst und daraufhin für etwa 2 h bei 4°C solubilisiert. Danach wurde das Lipid mit dem *Branson Sonifier* bis zur Klarheit beschallt. Um unlösliche Anteile abzutrennen, wurde die Lipidlösung bei 4°C und 6000 rpm für 15 min zentrifugiert.

Dann wurde die Cytochrom-*c*-Oxidase in möglichst konzentrierter Lösung bis zu einer Endkonzentration von 4 µM zugegeben und der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert.

Zur Inkorporation der Cytochrom-*c*-Oxidase muß das Detergenz entfernt werden. Dazu wurde der Ansatz in mehreren Schritten dialysiert und dabei sukzessive die Puffer- und Detergenzkonzentration erniedrigt.

1. Dialyse	2. Dialyse	3. Dialyse	4. Dialyse	5. Dialyse
4 h	12 h	12 h	12 h	4 h
100 mM HEPES pH 7,3 10 mM KCl 2 % Cholat	10 mM HEPES pH 7,3 50 mM KCl 50 mM Sucrose	10 mM HEPES pH 7,3 50 mM KCl 50 mM Sucrose	50 µM HEPES pH 7,3 55 mM KCl 55 mM Sucrose	pH 7,3 55 mM KCl 55 mM Sucrose

Nach der Dialyse wurde das Dialysat zentrifugiert (13000 rpm, 5 min) und die Aktivität sowie das *Respiratory Control Ratio* (RCR) nach Müller *et al.* (1986) bestimmt.

2.2.9 Modifikation von Cysteinvarianten mit Fluorescein

Dazu wurde eine 50 μM Cytochrom-*c*-Oxidase-Lösung in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 50 mM KCl und 0,05 % LM hergestellt. Das IAF wurde als eine 10 mM Stammlösung in DMSO gelöst. Unter Rühren wurde unter Lichtabschluß und Argonatmosphäre die 10fache molare Menge an reaktivem Farbstoff zur Proteinlösung zugetropft und die Reaktion 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen fortgeführt. Der freie Farbstoff wurde durch eine Gelfiltrationssäule (PD-10 von Pharmacia) entfernt. Die Bindungsstöchiometrie, Molekül Fluorescein zu Molekül Cytochrom-*c*-Oxidase, wurde spektroskopisch nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{[F]}{[COX]} = \frac{\Delta A_{495} \varepsilon_{425}(COX)}{\Delta A_{425} \varepsilon_{495}(F)}$$

mit

$$\Delta A_{495} = \Delta A_{495}(pH9,5) - \Delta A_{495}(pH5,5)$$

Die dafür verwendeten Extinktionskoeffizienten betragen für die alkalische Form von Fluorescein bei 495 nm $\varepsilon = 68000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Molecular Probes) und für die Cytochrom-*c*-Oxidase bei 425 nm $\varepsilon = 158 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3 Spektroskopische Methoden

2.3.1 VIS-Redoxspektren unter nativen Bedingungen

Die Konzentration der Cytochrom-*c*-Oxidase kann photometrisch über die Absorption der Häm-Gruppen in ihrer Proteinumgebung bestimmt werden.

Bei der optischen Absorptionsspektroskopie wird das Verhältnis der Lichtintensität eines monochromatischen, unpolarisierten Meßlichtstrahls vor und nach dem Durchgang durch eine Probe bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz gilt für die Intensität des Lichts nach dem Passieren der Probe:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cd}$$

$$E = -\log(I / I_0) = \varepsilon cd$$

Die Extinktion E ist der negative dekadische Logarithmus des Quotienten I/I_0 , c ist die Konzentration des Stoffes in M , d die Dicke in cm und ε ist der molare Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die Probe wurde mit Spektrenpuffer (50 mM KP, pH 8,0, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA) verdünnt und mit einer geringen Menge Kaliumhexacyanoferrat (III) vollständig oxidiert und das Absorptionsspektrum im Bereich zwischen 500 und 650 nm aufgezeichnet. Nach vollständiger

Reduktion des Enzyms durch wenig Dithionit wurde erneut das Spektrum in diesem Bereich aufgenommen und anschließend das Differenzspektrum der beiden Redoxzustände gebildet. Aus der Extinktion bei 605 nm abzüglich der Extinktion bei 630 nm (nach Poole et al. (1985)) im Differenzspektrum_{Red-Ox} kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Häm *a* Konzentration bestimmt werden. Hierbei wurde ein spezifischer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{605-630}$ von $11,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angenommen (Ludwig und Schatz, 1980).

Wenn zuvor eine Proteinbestimmung durchgeführt wurde, kann der spezifische Häm *a* Gehalt in nmol/mg der Oxidase-Lösung ermittelt werden.

2.3.2 Bestimmung der Elektronentransferaktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase

Die Elektronentransfer-Aktivität der *aa*₃-Cytochrom-*c*-Oxidase wurde photometrisch über die Absorptionsänderung (550 nm) bei Oxidation des vollständig reduzierten Substrats Ferrocycyochrom *c* aus Pferdeherz bestimmt. Aus der Absorptionsänderung pro Zeiteinheit läßt sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit von reduziertem Cytochrom *c* bestimmen. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{550(\text{red-ox})}$ beträgt $18,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Margoliash und Frohwirt, 1959). Daraus läßt sich bei Kenntnis der Enzymkonzentration (siehe 2.2.2) die Wechselzahl k_{cat} der Cytochrom-*c*-Oxidase berechnen. Als Cytochrom *c*-Konzentration wurden $50 \text{ }\mu\text{M}$ eingesetzt, damit die Reaktion nahe V_{max} (bei RT) ablaufen kann.

Reduktion des Ferricytochrom c

Ferricytochrom *c* aus Pferdeherz wurde in Aktivitätspuffer (10 mM KP, pH 7,4, 40 mM KCl, 1 mM EDTA) gelöst und durch Natriumdithionit reduziert. Überschüssiges Dithionit, das selbst im Bereich um 316 nm absorbiert und mit Sauerstoff in der Küvette reagieren würde, mußte durch eine Gelfiltration (PD-10, Pharmacia) entfernt werden. Die Säule wurde zuvor mit einigen Säulenvolumina Aktivitätspuffer äquilibriert. Die Konzentrationsbestimmung der eluierten Cytochrom *c*-Lösung erfolgte nach Lambert-Beer durch Messung der Extinktion bei 550 nm ($\epsilon_{550} = 19,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Ferrocycyochrom *c*-Lösung kann bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ für einige Tage gelagert werden.

2.3.3 Bestimmung der Pufferkapazität an der Proteinoberfläche

Protonierbare Gruppen an Protein- und Membranoberflächen können als eine Art gebundener Puffer angesehen werden. Sie tragen zur Pufferkapazität bei. Die Pufferkapazität in der Umgebung des oberflächengebundenen pH-Indikators erfolgt über die Bestimmung des Pufferkapazitätsquotienten $\Delta A/\Delta c_{\text{H}^+}$. Damit kann der Einfluß sowohl auf einen löslichen als auch auf einen fest an der Protein-oberfläche verankerten pH-Indikator bestimmt werden.

Um die Pufferkapazität des Proteins zu bestimmen, wurde eine 10 μM Proteinlösung mit pH-Indikator (Fluorescein, Phenolrot) versetzt und abwechselnd eine definierte Menge 10 mM KOH und HCl hinzugefügt. Dabei wurde die Absorptionsänderung bei 495 nm (Fluorescein) bzw. 558 nm (Phenolrot) verfolgt und zu der Protonenkonzentrationsänderung in Relation gesetzt. Diesen Quotienten kann man dann mit dem Quotienten aus der Messung von pH-Indikator alleine vergleichen und so ein Maß für die Pufferkapazität des Proteins erhalten.

2.3.4 Bestimmung der Oberflächenladungsdichte

Die Oberflächenladungsdichte wurde aus der Salzabhängigkeit des apparenten pK des kovalent an die Oberfläche gebundenen optischen pH-Indikators bestimmt. Dazu wurden die Titrationspektren in den einzelnen Salzkonzentrationen der Fluorescein-markierten Cytochrom-*c*-Oxidase mit einem Shimadzu 260 UV/VIS Spektrophotometer aufgenommen. Das Einstellen der Salzkonzentrationen erfolgte durch Zugabe von 3 M KCl zu einer COX-AF-Lösung mit 0,05 % LM.

Die Auswertung der Titrationsdaten, d.h. der Absorptionsänderungen ΔA von Fluorescein bei 495 nm, die in Abhängigkeit vom pH aufgenommen wurden, erfolgte durch eine Umformung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung mit:

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max}}{1 + 10^{n(\text{pK} - \text{pH})}}$$

wobei ΔA_{\max} die maximale Absorptionsdifferenz zwischen der alkalischen (zweifach negativ geladenen) und der neutralen (einfach negativ geladenen) Form, n die Anzahl der Protonen, die an diesem Übergang beteiligt sind und der pK der Mittelpunkt der Titrationskurve ist. Die Anzahl der beteiligten Protonen muß also 1 sein, wenn nur die Umwandlung der alkalischen Form von Fluorescein in die neutrale beobachtet wurde.

2.3.5 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Versuchsaufbau

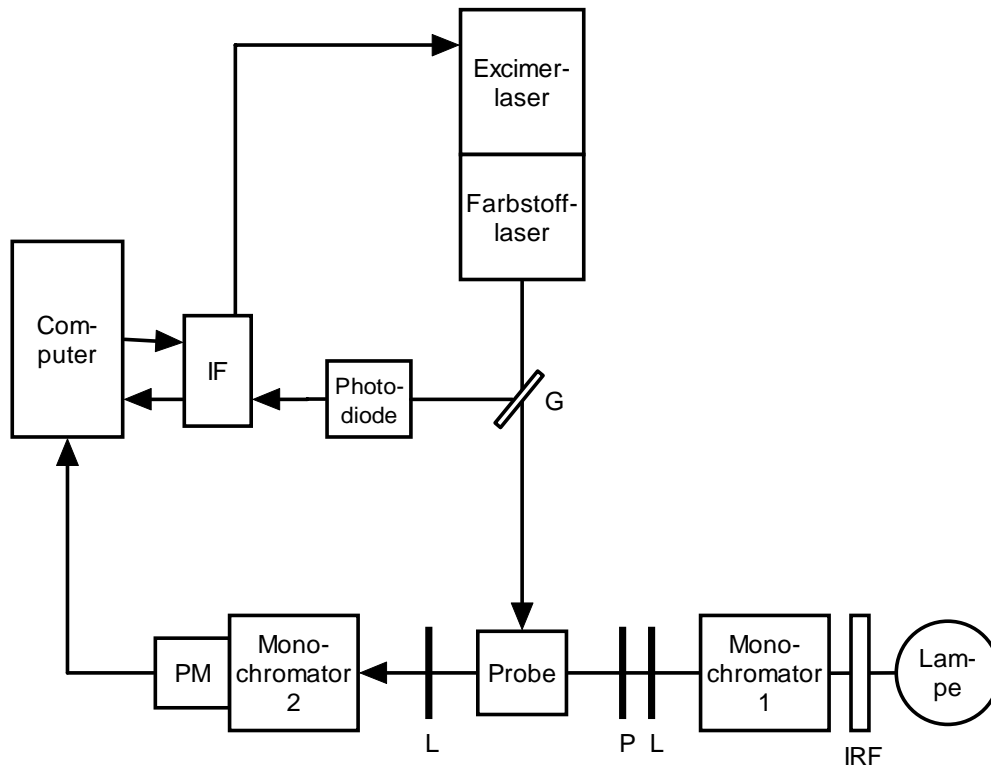


Abb. 2.1: Schema des experimentellen Aufbaus der Meßapparatur: **G** Glasscheibe, **IF** Interface, **IRF** Infrarotfilter, **L** Linse, **P** Polarisator.

Der Anregungsblitz für den Elektronendonator wurde durch einen Excimerlaser (Fa. Lambda Physics) der Wellenlänge 308 nm, der einen Farbstofflaser anregt, erzeugt. Der Farbstofflaser wird ohne Wellenlängenselektion betrieben und man erhält dadurch eine 20 nm breite Wellenlängenverteilung im Bereich des benutzten Farbstoffes. Der Anregungsblitz hat eine Pulslänge von 5-10 ns und eine Energie von 10-15 mJ. Mit einer Photodiode wurde die Laserintensität gemessen.

Der Meßlicht- und der Anregungsstrahlengang stehen senkrecht aufeinander. Als Meßlicht wurde eine 100 W Halogenlampe der Fa. Osram verwendet. Das Meßlicht wird vor und hinter der Probe durch einen Monochromator geleitet. Der erste dient dazu, die Meßwellenlänge einzustellen, der zweite, um Streustrahlung vom Anregungsblitz herauszufiltern. Nach dem zweiten Monochromator wurde das Meßlicht durch einen Photomultiplier registriert und nach Verstärkung durch einen „in-socket“ Vorverstärker über eine A/D Wandler-Karte mit zwei Kanälen auf dem Computer aufgezeichnet.

Bei den zeitaufgelösten Messungen wurde eine Abtastrate von 50 ns für den ersten Kanal und 100 μ s für den zweiten Kanal gewählt. Da die Amplitude des Meßsignals proportional zur Laserintensität ist, kann der Wert der Laserintensität bei jedem Blitz zur Normierung des Signals genutzt werden.

Durchführung

Bei der zeitauflösenden Absorptionsspektroskopie wurde die Absorptionsänderung einer Probe ab einem bestimmten Zeitnullpunkt in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Im Falle der Cytochrom-*c*-Oxidase Messungen wurde der Zeitnullpunkt durch einen Laserblitz gesetzt, der einen elektronenliefernden Rutheniumkomplex in den angeregten Zustand versetzt. Daraufhin wurde die Absorptionsänderung zeitabhängig nach dem Anregungsblitz gemessen.

Die Einelektronen-Reduktion der Cytochrom-*c*-Oxidase erfolgt durch Rutheniumkomplexe (siehe Abb. 2.2). Rutheniumkomplexe sind in der Lage, nach Anregung durch einen ns-Laserblitz ein Elektron abzugeben und bei Bindung an die Cytochrom-*c*-Oxidase das Cu_A in weniger als 1 μ s zu reduzieren (Nilsson, 1992). Um die Elektroneninjektion in Cytochrom-*c*-Oxidase reversibel zu gestalten, muß ein geeigneter Elektronendonator zugefügt werden, der das Ruthenium^{III} wieder reduziert. Dazu wurde Anilin eingesetzt, und als Reduktionsmittel für Anilin wurde der Lösung 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, freies Radikal (3CP) zugesetzt (Zaslavsky *et al.*, 1998).

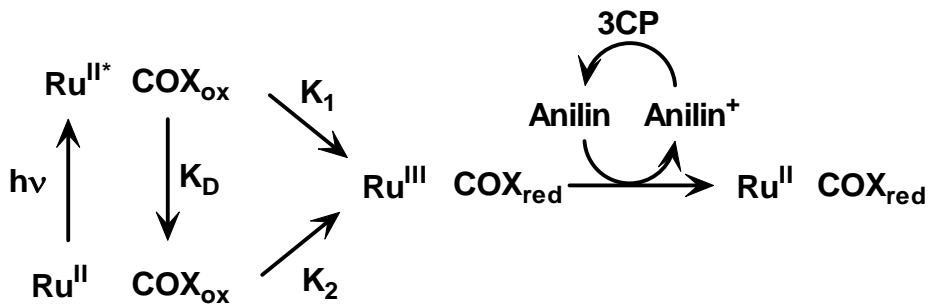


Abb. 2.2: Reaktionsschema von den Rutheniumkomplexen nach Geren *et al.* (1991).

Nach Anregung durch ein Photon wurde der Rutheniumkomplex Ru^{II} in den angeregten Zustand $\text{Ru}^{\text{II}*}$ gebracht und kann dadurch ein Elektron an das oxidierte Protein COX_{ox} abgeben, welches dadurch reduziert wird (COX_{red}). Durch einen Elektronendonator (Anilin) wird ein Elektron an das Ruthenium Ru^{III} zurückgegeben, und somit einen Elektronenrückfluß vom Protein verhindert.

Messung des Elektronentransfers auf Cytochrom-*c*-Oxidase

Die Reduktion des Häm *a* der Cytochrom-*c*-Oxidase wurde bei 605 nm verfolgt. Dazu wurden 10 μ m Cytochrom-*c*-Oxidase mit der geeigneten Menge an Rutheniumkomplex (50 μ M Rubpy, 10

μM RuCyt c , 25 μM Ru $_2$ D) versetzt. Als Elektronendonator dienten Anilin und 3CP in einer Konzentration von 10 mM beziehungsweise 1mM, sie reduzieren das Ruthenium^{III} wieder zum Ruthenium^{II} und verhindern damit den Rückfluß der Elektronen vom Cu $_A$ zum Ruthenium^{III}. Zur Stabilisierung des Proteins wurden 50 mM KCl zugegeben. Gemessen wurde bei pH 7,5. Präparation und Messung fanden im Dunklen statt, da es sonst bereits vor der Blitzlichtanregung zu einer Anregung des Rutheniums und damit zu einer Reduktion der Cytochrom- c -Oxidase kommen kann (Verkhovsky *et al.*, 2001).

Gemessen wurde in einem Volumen von 75 μl in einer 3x3 mm Küvette bei 22,5°C.

Messung der Protonenkonzentrationsänderung

Die Messung der Protonenabgabe- und -aufnahmekinetik erfolgte mit Hilfe optischer pH-Indikatoren. Diese sind Farbstoffe, deren Absorptionseigenschaften von der Protonenkonzentration in ihrer Umgebung beeinflusst werden.

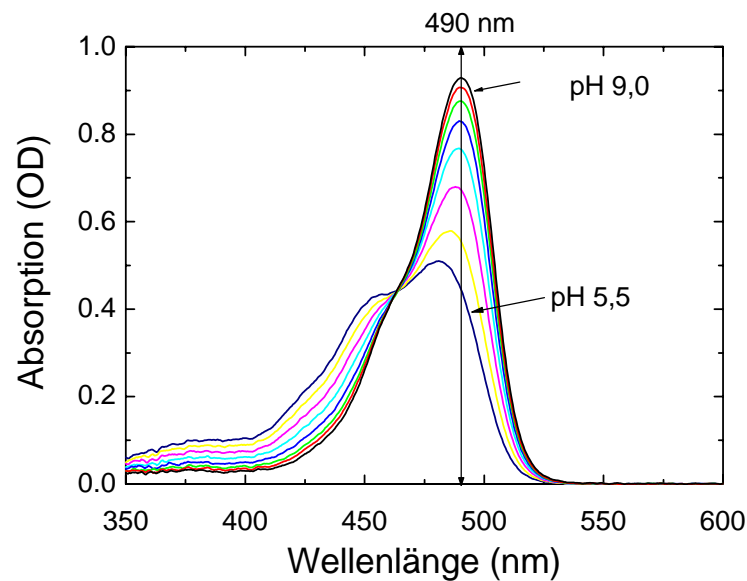


Abb. 2.3: Absorptionsspektren von Fluorescein bei verschiedenen pH-Werten. Je alkalischer der pH, desto größer ist die Absorption bei 490 nm.

Abbildung 2.3 zeigt als Beispiel das Absorptionsspektrum des pH-Indikators Fluorescein bei verschiedenen pH-Werten. Man sieht bei etwa 490 nm eine sehr stark pH-abhängige Absorptionsbande. Diese Bande charakterisiert den Übergang (Dissoziation) von der aziden protonierten zur alkalischen deprotonierten Form des Fluoresceins mit einem pK von $\sim 6,7$. Mit steigender Protonenkonzentration nimmt die Absorption der Bande ab, und kann daher genutzt werden, um Änderungen in der Protonenkonzentration als Folge der elektroneninduzierten Protonenaufnahme und -abgabe der Cytochrom- c -Oxidase mit zeitauflösender Absorptionsspektroskopie zu messen.

In dieser Arbeit sollten die Protonenkonzentrationsänderungen bei Aufnahme eines Elektrons sowohl an der Proteinoberfläche als auch im wässrigen Medium gemessen werden. Als Indikator für die Proteinoberfläche wurde ein Fluoresceinderivat (Iodoacetamidofluorescein, IAF) gewählt, welches kovalent an Cysteinseitenketten gebunden werden kann. Für die Messung von Protonenkonzentrationsänderungen in der wässrigen Umgebung wurde Phenolrot gewählt. Dieser Farbstoff besitzt ein pH-abhängiges Absorptionsmaximum bei 558 nm mit einem pK von $\sim 7,9$, der molare Extinktionskoeffizient ist $60 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In Abbildung 2.4 ist das Absorptionsspektrum von Phenolrot bei verschiedenen pH-Werten abgebildet.

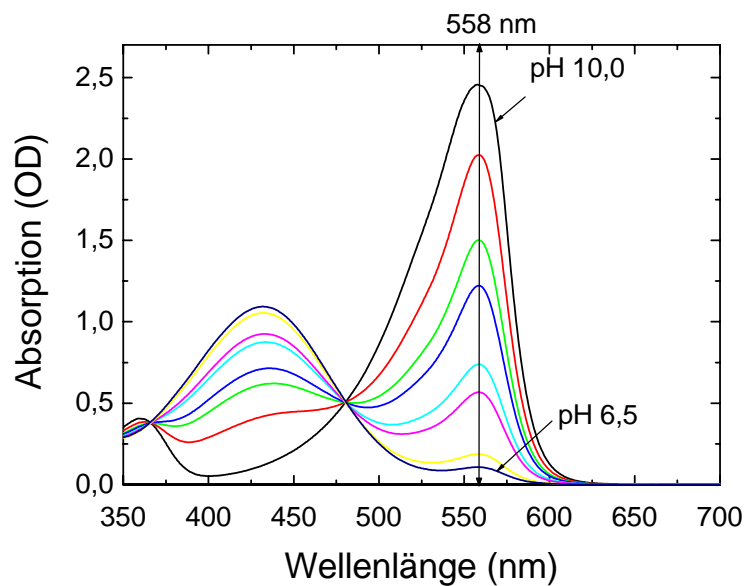


Abb. 2.4: Absorptionsspektren von Phenolrot in 50mM KCl bei verschiedenen pH-Werten. Die stark pH-abhängige Absorptionsbande hat ein Maximum bei 558 nm.

Die Messungen der Absorptionsänderungen des jeweiligen pH-Indikators wurden unter folgenden Bedingungen ausgeführt: 10 μM Cytochrom-*c*-Oxidase in 50 mM KCl, 0,05 % LM, pH 7,5 wurden mit 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP versetzt. Auch hier wurde die Probenpräparation und Messung im Dunklen ausgeführt. Bei Messungen der Protonenkonzentration an der Oberfläche wurde markierte Cytochrom-*c*-Oxidase verwendet, und bei 495 nm über die Zeit gemessen. Für Protonenkonzentrationsänderungen im wässrigen Medium wurde der Lösung 50 μM Phenolrot zugegeben und die Messung bei 558 nm ausgeführt.

Auswertung

Die Anpassung der transienten pH-Indikatorsignale wurde mit einer Summe von Exponentialfunktionen durchgeführt. Diese transienten pH-Indikatorsignale wurden durch Differenzbildung aus den zeitabhängigen Absorptionsänderungen bei der Wellenlänge des pH-sensitiven Absorptionsmaxi-

mums des Indikators von Proben mit und ohne Puffer gewonnen. Bei der Analyse der Indikatorsignale muß man also beachten, daß es sich um Differenzsignale handelt, und deshalb unter Umständen nicht nur eine Protonierung und Deprotonierung des Farbstoffes zu sehen ist.

Zur Auswertung der Meßdaten wurde das Fitprogramm Origin 7.5 (Microcal) verwendet.

3 Ergebnisse und Zusammenfassung - Teil I

Herstellung, Präparation und Charakterisierung von Einzelsystein-Cytochrom-c-Oxidase-Varianten zur ortsspezifischen Einführung von pH-sensitiven Reportergruppen

3.1 Etablierung eines Mutagenesesystems für Untereinheit I und II

Die Kopplung von Reportergruppen an Proteine erfolgt in den meisten Fällen über Thiolseitenketten, wie zum Beispiel der SH-Gruppe von Cysteinen (Haugland, 2002). Da für eine spezifische Protonenkonzentrationsänderungsmessung der Ort der Kopplung des entsprechenden Sensors genau definiert sein muß, ist es von großer Wichtigkeit, daß nur eine reaktive Cysteinseitenkette zur Verfügung steht und oberflächenexponierte Cysteine der Cytochrom-*c*-Oxidase durch nicht koppelungsreaktive Aminosäuren ersetzt werden. Entsprechend der Aufgabenstellung sollen an den protonenwegnahen Stellen Cysteine eingeführt werden, die mit dem Farbstoff markiert werden können. Dies erfordert eine gleichzeitige Mutation von Untereinheit I und Untereinheit II. Die bis dahin verwendeten Mutagenesesysteme lassen jedoch nur die Mutation von entweder Untereinheit I oder Untereinheit II zu.

Daher wurde als erstes ein Mutagenesesystem entwickelt, welches die Einführung von Mutationen in Untereinheit I und Untereinheit II möglich macht. In Zusammenarbeit mit Klaus Hoffmeier (Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main) wurde der Vektor pKH160 konzipiert, der Untereinheit I, II und III kodiert. Da dieser als Mutagenesevektor für die von mir verwendete Mutagenesemethode (in Anlehnung an die Quickchange-Methode der Firma Stratagene) mit über 13000 Basenpaaren zu groß war, wurde ein die Gene *ctaDII* (Untereinheit I) und *ctaC* (Untereinheit II) einschließendes Fragment unter Nutzung der Schnittstellen *XbaI* und *NdeI* ausgeschnitten und in das kleine High-Copy Plasmid pUC18 inseriert. Da bei der Mutagenese *Second-Site*-Mutationen auftreten können, welche später die Replikation bzw. Expression beeinträchtigen, sollte der Mutagenesevektor möglichst klein sein. Dies war durch das nur 5177 Basenpaare umfassende Konstrukt pKK1 gegeben.

Nach erfolgreicher Mutagenese konnte das Fragment aus dem Mutagenesevektor geschnitten, wieder in den Expressionsvektor pKH160 inseriert und die mutierte Cytochrom-*c*-Oxidase mit Hilfe des Expressionsstammes ORI4 exprimiert werden (siehe Abb. 3.1).

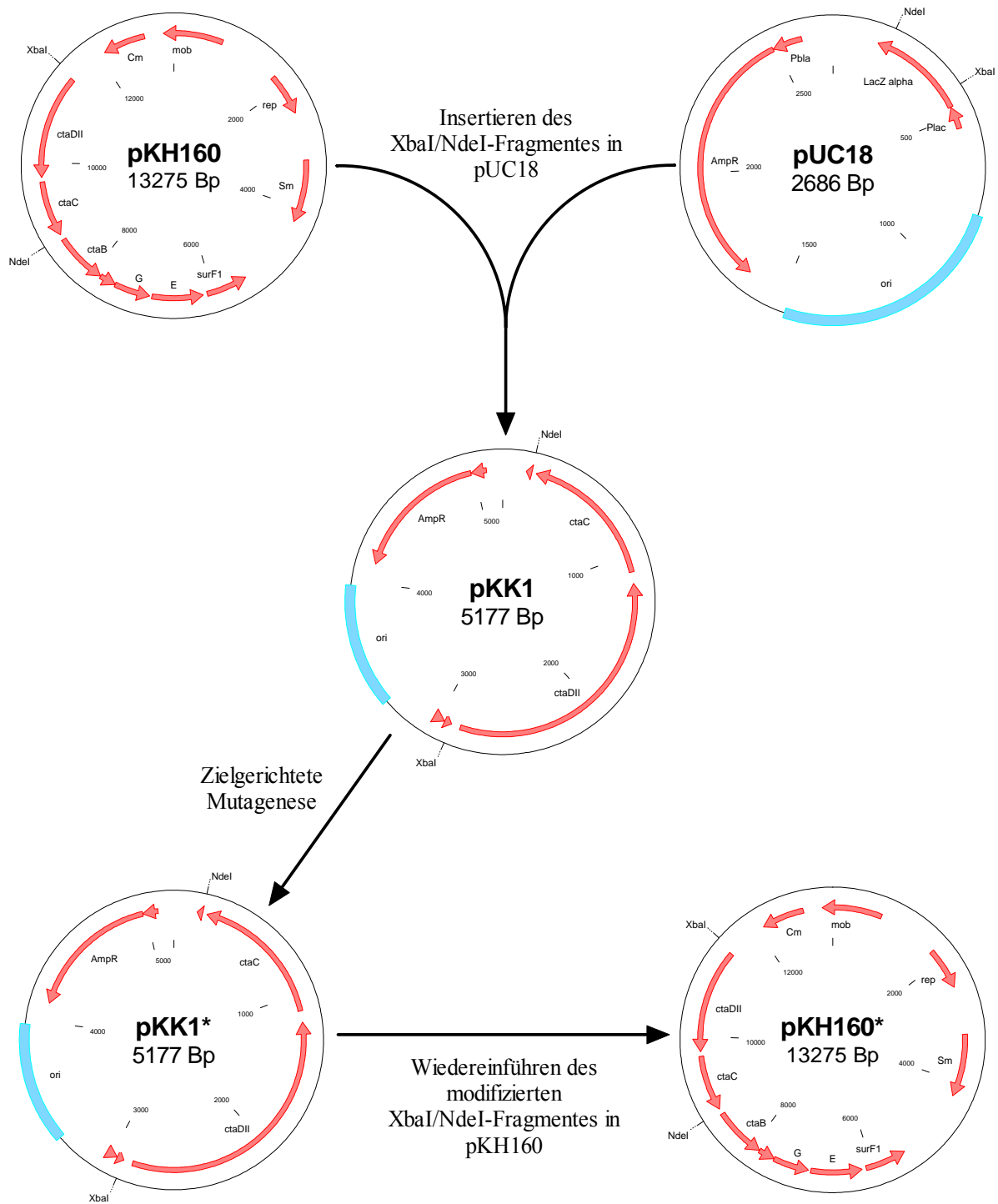


Abb. 3.1: Herstellung eines Mutagenesevektors zur gleichzeitigen Mutation von Untereinheit I und Untereinheit II. Ein Fragment mit den Genen für Untereinheit I und II wird aus dem Expressionsvektor pKH160 mit XbaI /NdeI ausgeschnitten und in den geöffneten Vektor pUC18 inseriert. Der entstandene Vektor pKK1 ist für zielgerichtete Mutagenese geeignet. Das mutierte Fragment kann dann wieder in den Expressionsvektor zurückkloniert werden.

3.2 Herstellung und Charakterisierung einer cysteinfreien Untereinheit I+II-Variante von Cytochrom-c-Oxidase

Da nur an definierten Stellen die Kopplung von Farbstoffen erwünscht war, mußte zuerst eine cysteinlose Variante hergestellt werden. Cytochrom-c-Oxidase besitzt zehn Cysteine, die sich in drei „Arten“ aufteilen lassen: Essentielle Cysteine, für thiolreaktive Reportergruppen unzugängliche und oberflächenexponierte Cysteine.

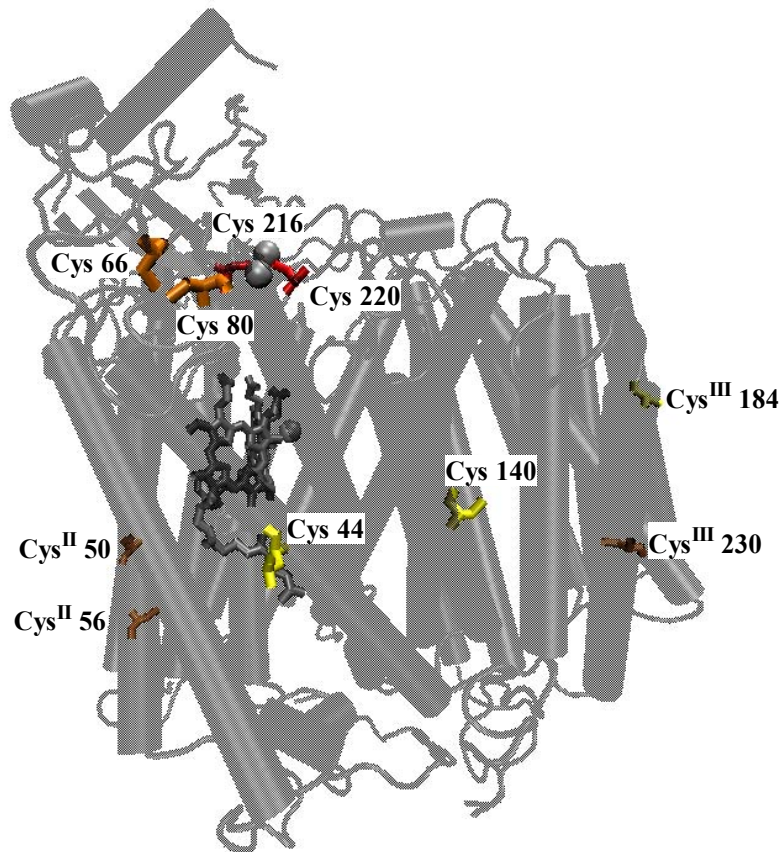


Abb. 3.2: Die vier Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase und die Lage der Cysteine. Rot: essentielle Cysteine, Orange: nicht zugängliche Cysteine, Gelb: oberflächenexponierte Cysteine.

Cys 216 und Cys 220 sind essentielle Cysteine, da sie als Liganden für Cu_A dienen (siehe Abb. 3.2). Sie sind jedoch von außen nicht zugänglich, und deshalb können sie auch nicht mit thiolreaktiven Reagenzien reagieren. Aufgrund der Struktur wurden von den restlichen acht Cysteinen drei als oberflächenexponiert identifiziert: Cys 48, Cys 140 und Cys^{III}184. Cys 66 und Cys 80 sind zwar auch oberflächenexponiert, aber durch eine Schwefelbrücke verbunden und deshalb unter nicht reduzierenden Bedingungen inert. Die anderen Cysteine sind nicht dem Außenmedium zugewandt und daher nicht thiolreaktiv. Dadurch, daß Cys 184 in Untereinheit III frei zugänglich ist, ergaben sich Klonierungsschwierigkeiten, da ein Mutagenese- und Expressionssystem für drei Untereinheiten nicht verfügbar ist. Da nachgewiesen wurde, daß eine Cytochrom-c-Oxidase nur aus den *Core-*

Untereinheiten I und II ebenfalls aktiv ist und Protonenpumpaktivität aufweist (Solioz *et al.*, 1982), habe ich mich für ein Mutagenesesystem nur für Untereinheit I und II und eine darauffolgende *Core*-Untereinheitenaufreinigung entschieden. Durch diese Aufreinigung ist es möglich, eine aktive Oxidase zu erhalten, die nur aus den funktionellen *Core*-Untereinheiten I und II besteht. Dazu wird das Eluat der Streptavidinsäule mit 0,1 % LDAO versetzt. LDAO ist ein zwitterionisches Detergenz, welches dazu genutzt wird, effizient Protein-Protein Interaktionen zu brechen (Lotscher *et al.*, 1984). Unter dem Einfluß von LDAO trennen sich die beiden Untereinheiten III und IV von den *Core*-Untereinheiten ab. Nach Inkubation werden die voneinander getrennten Untereinheiten durch eine Ionenaustauschersäule voneinander separiert, und das LDAO wieder durch LM ersetzt. Durch diese Prozedur erreicht man eine Ausbeute von >10 mg aktivem *Core*-Untereinheiten-Enzym.

Nach oben beschriebenem Verfahren wurden dann die zuvor identifizierten, oberflächenexponierten Cysteine Cys 48 und Cys 140 durch Serine ausgetauscht. Serin ist wie Cystein eine polare ungeladene Aminosäure, die in etwa die gleiche Größe hat, aber nicht mit thiolreaktiven Gruppen reagiert (siehe Abb. 3.3) und sich daher als Ersatz anbietet.



Abb. 3.3: Vergleich der beiden Aminosäuren Cystein und Serin. *Links:* Cystein, *Rechts:* Serin.

Damit konnte eine nicht thiolreaktive Basisvariante Cys 48 Ser-Cys 140 Ser (CS) erhalten werden.

Nach Expression und Aufreinigung der Basisvariante CS konnte anhand des Vergleichs des Absorptionsspektrums mit wt Cytochrom-*c*-Oxidase keine Veränderung festgestellt werden (siehe Abb. 3.4). Die zwei Hauptbanden des Absorptionsspektrums sind die α -Bande bei 598 nm (oxidiertes Zustand) bzw. 605 nm (reduzierter Zustand) und die Soret-Bande bei 425 nm (oxidiertes Zustand) bzw. bei 445 nm (reduzierter Zustand). Die Absorption der α -Bande rührt dabei fast ausschließlich von Häm *a* her (Blair *et al.*, 1982), während die Soret-Bande auf der Absorption beider Häme beruht. Testet man die Enzymaktivität der Variante, indem man bei 550 nm die Oxidation von reduziertem Cytochrom *c* in Anwesenheit von Cytochrom-*c*-Oxidase mißt, erhält man ein Maß für die Fähigkeit der Cytochrom-*c*-Oxidase, reduziertem Cytochrom *c* zu binden und zu oxidieren. Im Einschub von Abb. 3.4 sieht man die typische Zeitkurve eines Aktivitätstestes aufgenommen bei 550 nm. Aus der Anfangssteigung kann man die Wechselzahl des Enzyms berechnen. Die Wechselzahl, bezogen auf die Cytochrom *c* Oxidation, beträgt bei wt und bei CS $\sim 500 \text{ s}^{-1}$.

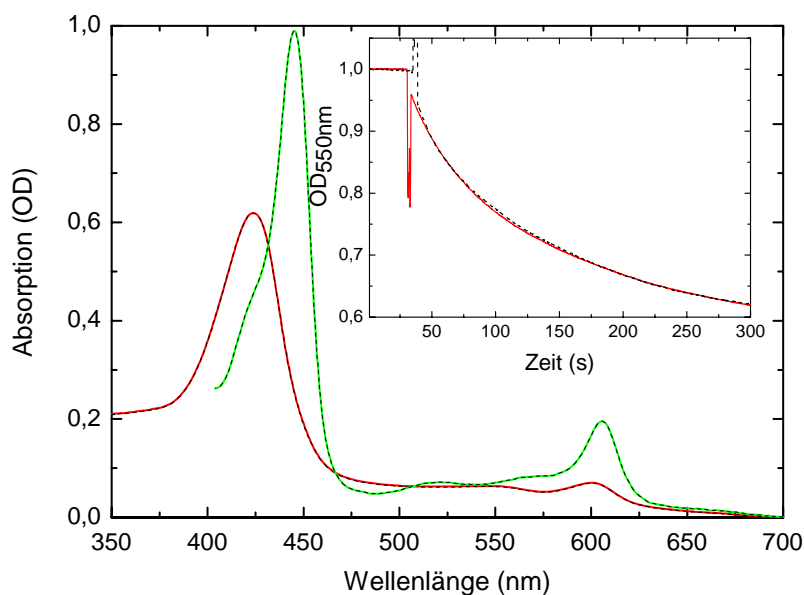


Abb. 3.4: Absorptionsspektren von CS (rot-oxidiert, grün-reduziert) und Wildtyp (schwarz gestrichelt) im Vergleich. Als Einschub sind die Kurven des Aktivitätstests dargestellt. Die Aktivität von CS entspricht der von Wildtyp, wie man an den übereinanderliegenden Kurven sehen kann. Die sich aus den Kinetiken ergebende Wechselzahl ist $\sim 500 \text{ s}^{-1}$. Bedingungen: 10 mM KP pH 7,4, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,05 % LM, RT.

3.3 Einführung von einzelnen Cysteinen an geeignet erscheinenden Positionen im Bereich der putativen Protoneneingangs- und -ausgangsstellen

Nach erfolgreicher Herstellung einer Cytochrom-*c*-Oxidase ohne oberflächenexponierte Sulfhydryle wurden anhand der Struktur Aminosäuren identifiziert, die in der Umgebung der putativen Protoneneintritts- und -austrittsstellen liegen und deren Seitenketten vom Außenmedium her zugänglich sind. Diese wurden dann durch thiolreaktive Cysteine ersetzt, um an ihnen den pH-Indikator kovalent zu koppeln. Die ausgewählten Aminosäuren sind in Abbildung 3.6 dargestellt und in der Tabelle 3.5 noch einmal nach Protoneneingängen (D- und K-Weg) und Protonenausgang zusammengefaßt.

D-Weg Mutationen	K-Weg-Mutationen	Protonenausgang
CS-T26C	CS-S295C	CS-H ^H 29C
CS-N27C	CS-K299C	CS-D ^H 30C
CS-P123C	CS-P301C	CS-R ^H 130C
CS-P128C	CS-I302C	

Tab. 3.5: Tabelle mit den hergestellten „Einzel“-Cysteinvarianten. Allen Varianten liegt die Basismutation CS zugrunde. Die Farben entsprechen den Protonenwegen in Abb. 3.6.

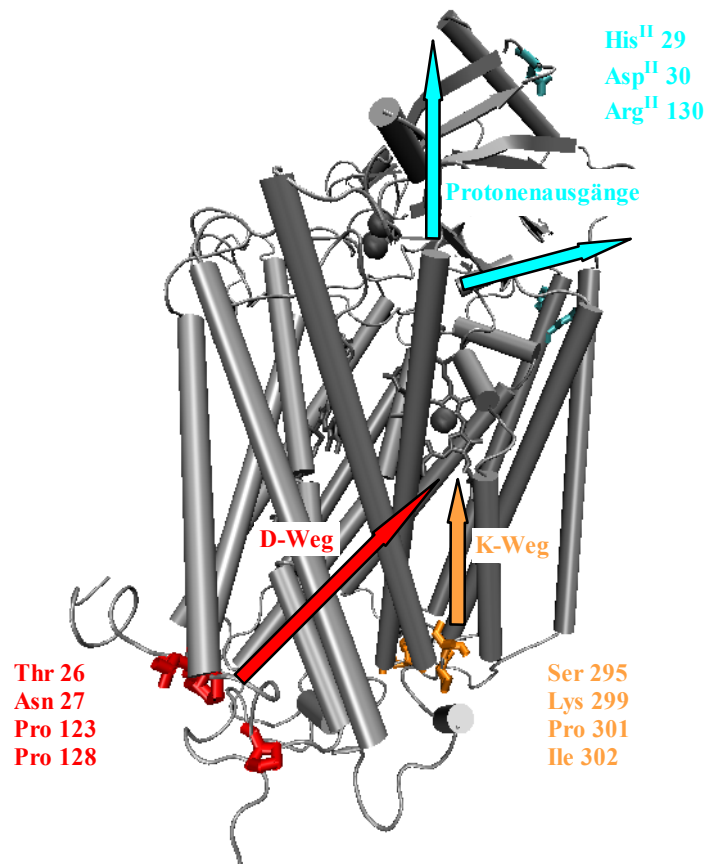


Abb. 3.6: Hergestellte „Einzel“-Cysteinvarianten und ihre Lage im Protein. Untereinheit I ist in hellgrau, Untereinheit II in dunkelgrau dargestellt.

Mit Hilfe des Mutagenesesystems wurden an diesen Positionen Cysteine eingeführt. Nach Expression und Aufreinigung der Varianten wurden sie hinsichtlich ihrer Absorptionsspektren und Aktivität mit Wildtyp verglichen. Abbildung 3.6 zeigt anhand der übereinandergelegten Absorptionsspektren von Wildtyp und den jeweiligen Varianten, daß keine Änderung im Absorptionsverhalten der Variante nach Austausch festzustellen ist. Die Wechselzahlen, die sich aus dem Aktivitätstest berechnen ließen, (siehe Abb. 3.7) liegen in derselben Größenordnung wie die Wechselzahl von wt Cytochrom-*c*-Oxidase. Nachdem festgestellt worden ist, daß bei der Enzymfunktion keinerlei Abweichung oder Änderung vom Wildtyp zu identifizieren war, wurden die Varianten zur selektiven Markierung mit dem pH-Indikator 5-Iodoacetamidfluorescein genutzt.

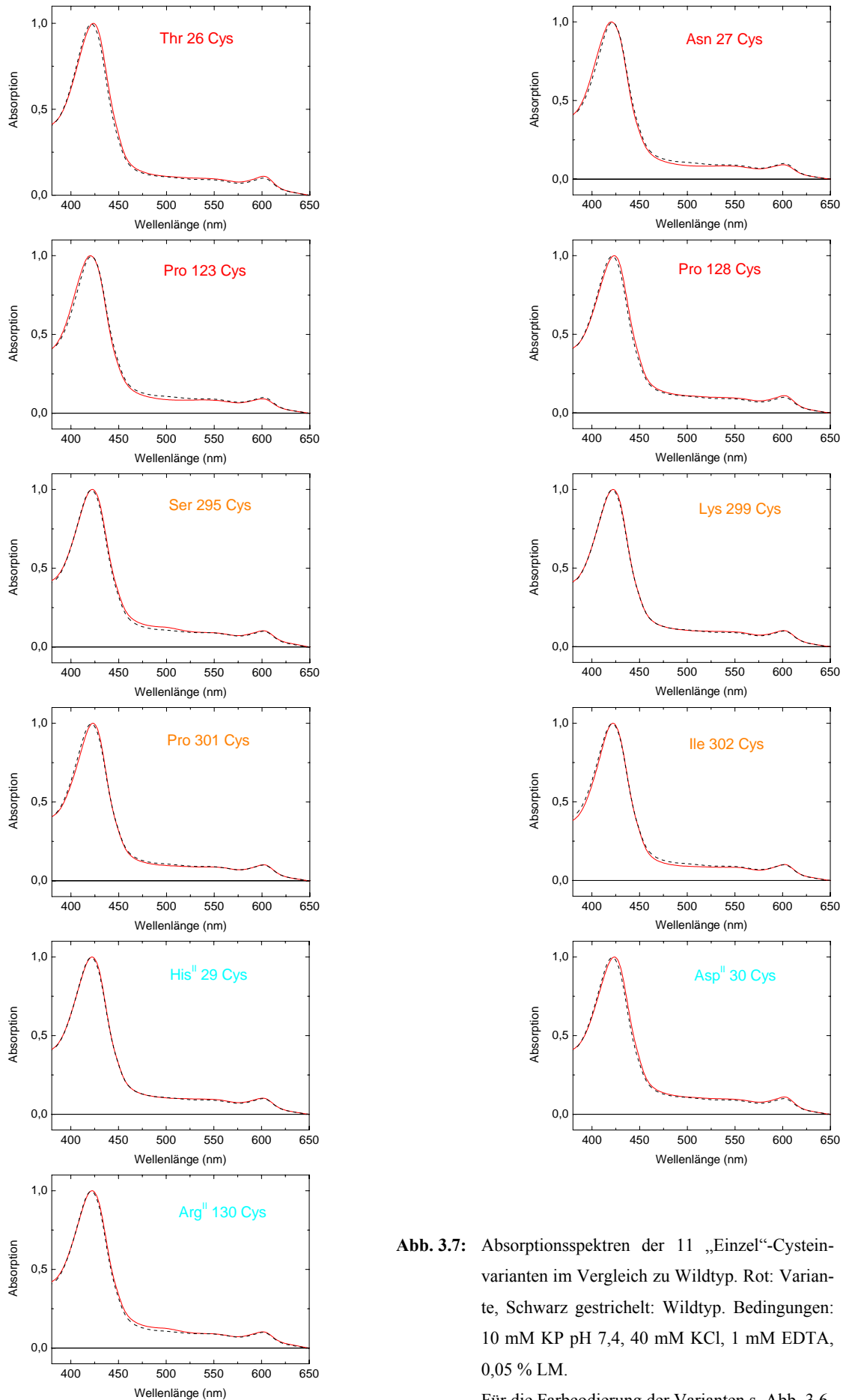


Abb. 3.7: Absorptionsspektren der 11 „Einzel“-Cysteinvarianten im Vergleich zu Wildtyp. Rot: Variante, Schwarz gestrichelt: Wildtyp. Bedingungen: 10 mM KP pH 7,4, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,05 % LM.

Für die Farbcodierung der Varianten s. Abb. 3.6

Variante: Wechselzahl (s^{-1})		Variante: Wechselzahl (s^{-1})		Variante: Wechselzahl (s^{-1})	
CS-T26C	497±20	CS-S295C	490±20	CS-H ^{II} 29C	489±20
CS-N27C	502±20	CS-K299C	504±20	CS-D ^{II} 30C	521±20
CS-P123C	513±20	CS-P301C	507±20	CS-R ^{II} 130C	511±20
CS-P128C	495±20	CS-I302C	499±20	Wt	512±20

Tab. 3.8: Tabelle mit den aus dem Aktivitätstest erhaltenen Wechselzahlen der einzelnen Varianten und von Wildtyp. Alle Wechselzahlen liegen in dem Bereich zwischen 489 und 521 ±20 s^{-1} und können daher als gleich angenommen werden. Für die Farbcodierung der Varianten s. Abb. 3.6.

3.4 Selektive Markierung von Cysteinvarianten mit Fluorescein

Die Modifizierung der Cytochrom-*c*-Oxidase mit dem pH-sensitiven Farbstoff Fluorescein wird mit Fluoresceinderivaten durchgeführt, welche die sulfhydryl-reaktive Gruppe Iodoacetamid besitzen. Sulfhydrylgruppen werden durch die zuvor eingeführten freien Seitenketten der Cysteine zur Verfügung gestellt.

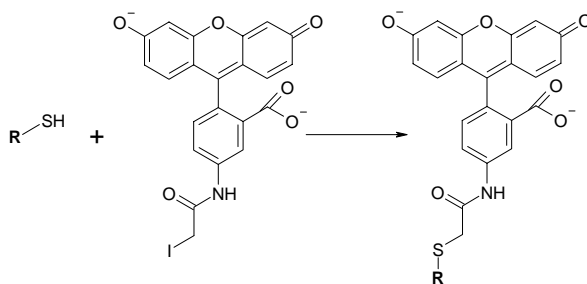


Abb. 3.9: Reaktionsschema von 5-IAF mit einer Sulfhydrylgruppe, z. B. der freien Seitenkette eines Cysteins. R-SH: Molekül mit Sulfhydrylgruppe. Durch die Reaktion bildet sich eine Thioetherbindung aus.

Zur Markierung wurde eine 50 μ M Cytochrom-*c*-Oxidaselösung in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 50 mM KCl und 0,05 % LM hergestellt. Das IAF wurde als eine 10 mM Stammlösung in DMSO gelöst. Unter Rühren wurde unter Lichtabschluß die 10fache molare Menge an reaktivem Farbstoff zur Proteinlösung zugetropft und die Reaktion 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen fortgeführt. Der freie Farbstoff wurde durch eine Gelfiltrationssäule (PD-10 von Pharmacia) entfernt.

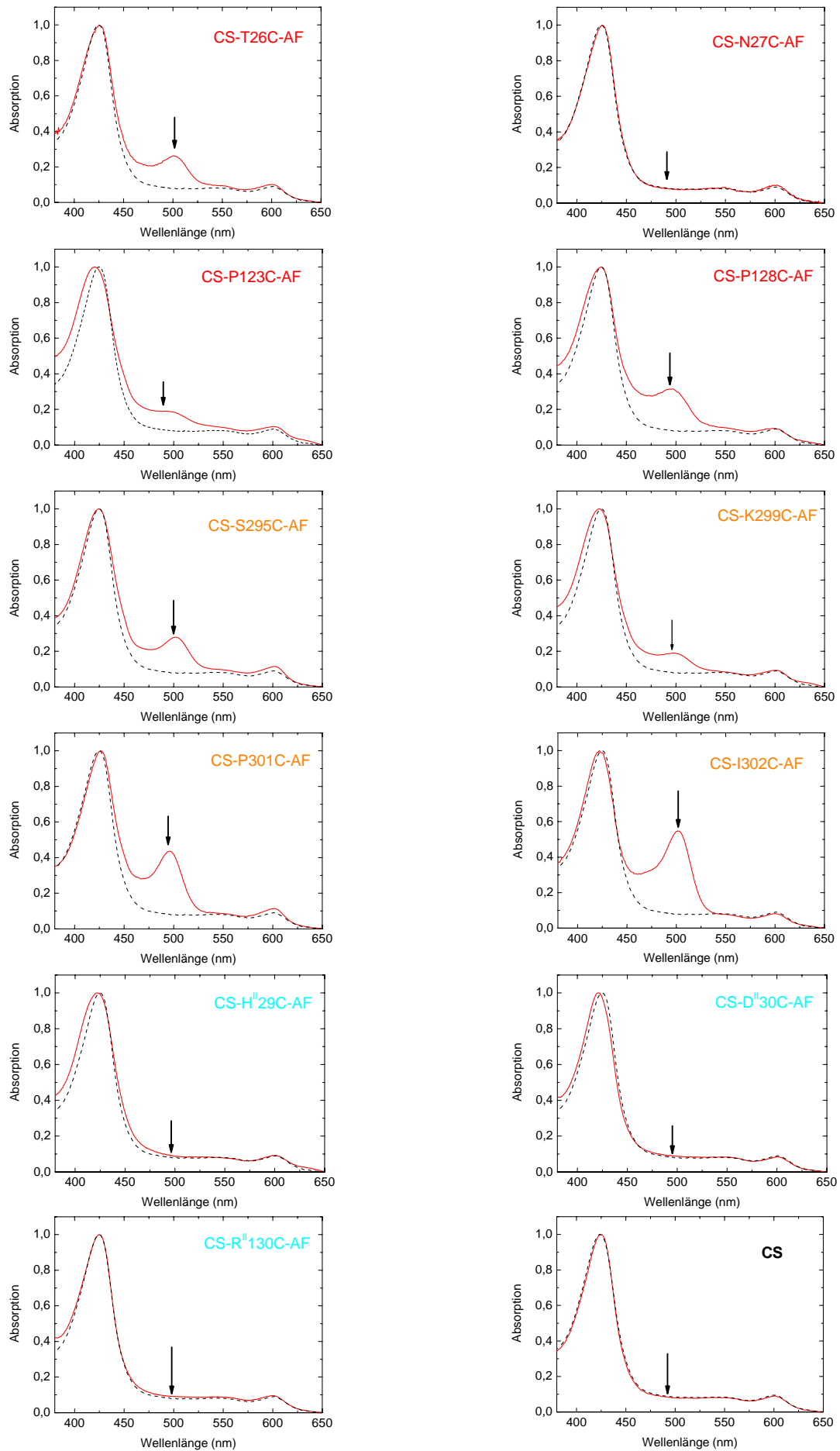
Mit dieser Methode wurden die Einzelsysteinvarianten markiert. Es ergaben sich folgende Koppelungsstöchiometrien (siehe Tab. 3.10):

Variante	COX/AF (%)
CS-T26C-AF	40
CS-N27C-AF	0
CS-P123C-AF	25
CS-P128C-AF	55
Variante	COX/AF (%)
CS-S295C-AF	46
CS-K299C-AF	26
CS-P301C-AF	75
CS-I302C-AF	92
Variante	COX/AF (%)
CS-H ^{II} 29C-AF	0
CS-D ^{II} 30C-AF	0
CS-R ^{II} 130C-AF	0
CS	0

Tab. 3.10: Kopplungsstöchiometrien von Fluorescein an die CS-„Einzel“-Cysteinvarianten (in %). Als Kontrolle wurde die Basisvariante CS genommen. Für die Farbcodierung der Varianten s. Abb. 3.6.

Nächste Seite:

Abb. 3.11: Absorptionsspektren der 11 mit AF-markierten „Einzel“-Cysteinvarianten (rot). Als Vergleich Wildtyp (schwarz gestrichelt). Unten rechts die Basisvariante CS im Vergleich mit Wildtyp. Der Pfeil bezeichnet die pH-sensitive Absorptionsbande von Fluorescein bei 495 nm. Bedingungen: 10 mM KP, 50 mM KCl und 0,05 % LM, pH 9,0. Dieser pH wurde deshalb gewählt, da dort die Absorption des Fluoresceins am höchsten ist. Für die Farbcodierung der Varianten s. Abb. 3.6.



Es stellte sich heraus, daß nicht alle eingebrachten Cysteinreste mit Iodoacetamidfluorescein reagiert haben und die Kopplungsstöchiometrien recht unterschiedlich waren. Bei der Variante CS-I302C jedoch konnte unter den gegebenen Bedingungen eine so gut wie vollständige Markierung von fast 90 % erreicht werden. Eine SDS-PAGE von CS-I302C-AF zeigt, daß auch nur Untereinheit I markiert worden ist und der Farbstoff nicht noch an anderen Untereinheiten gebunden hat (siehe Abb. 3.12). Die Aktivität der gekoppelten Varianten ist gegenüber wt Cytochrom-*c*-Oxidase nicht verändert, wie die Wechselzahlen von $\sim 500 \text{ s}^{-1}$ zeigen. Bei den Varianten CS-N27C, CS-H¹¹29C, CS-D¹¹30Cys, CS-R¹¹130Cys scheint der Sulphydrylrest des Cysteins unter den gegebenen Bedingungen (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5, 50 mM KCl und 0,05 % LM, 1h, RT) nicht zugänglich für die reaktive Gruppe des Iodoacetamidfluoresceins zu sein, da hier so gut wie keine Absorptionsbande bei 495 nm zu detektieren ist.

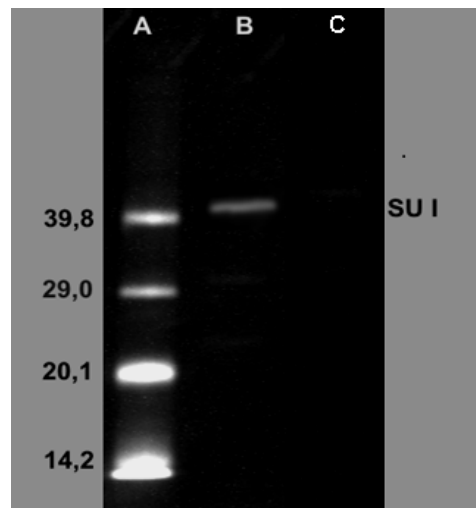


Abb 3.12: 12 % SDS-PAGE der *Core*-Untereinheiten Variante CS-I302C-AF und der 4-Untereinheiten Basisvariante CS, angeregt bei 480 nm, betrachtet bei 515 nm. A: Fluoreszierender Marker, Größen in kDa, B: CS-I302C-AF. C: CS. Deutlich sichtbar ist die markierte Untereinheit I in Spur B im Vergleich zu Spur C. Die anderen Untereinheiten sind bei dieser Ansicht nicht nachweisbar und somit nicht markiert.

3.5 Pufferkapazität an der Proteinoberfläche von Cytochrom-*c*-Oxidase

Protonierbare Gruppen an Protein- und Membranoberflächen können als eine Art gebundener Puffer angesehen werden (Junge und McLaughlin, 1987). Sie tragen zur Pufferkapazität bei. Die Pufferkapazität in der Umgebung des oberflächengebundenen pH-Indikators erfolgt über die Bestimmung des sogenannten Pufferkapazitätsquotienten $\Delta A/\Delta c_{\text{H}^+}$. Dieser ist definiert als die Änderung der Absorption bei 495 nm bei einer definierten Protonenkonzentrationsänderung des Mediums. Je größer ΔA , bei gegebener Protonenkonzentrationsänderung, desto kleiner der Puffereinfluß in der Umgebung des pH-Farbstoffes. Damit konnte der Einfluß sowohl auf einen löslichen als auch auf einen an der Proteinoberfläche kovalent gebundenen pH-Indikator detektiert werden. Da bereits

erfolgreiche Messungen von Bakteriorhodopsin zum Protonentransfer mit Hilfe von pH-Indikatoren durchgeführt wurden, wurde der Pufferkapazitätsquotient von Bakteriorhodopsin als Vergleich genutzt, um Signalgrößen abzuschätzen.

Bei dem Vergleich der Werte des Pufferkapazitätsquotienten dienten zum einen eine Lösung ohne Protein, aber mit Detergenz und freiem Fluorescein und zum anderen eine Lösung mit solubilisiertem Bakteriorhodopsin und freiem Fluorescein als Referenzen. Dabei zeigt es sich, daß diese beiden Referenzen einen fast identischen Wert von $\sim 3,7 \text{ OD mM}^{-1}$ aufweisen. Wildtyp Cytochrom-*c*-Oxidase jedoch, in gleicher Konzentration eingesetzt wie Bakteriorhodopsin, puffert die Lösung ungefähr dreimal so stark ab. Betrachtet man die Cysteinvarianten mit den oberflächengebundenem Fluorescein, so sieht man, daß hier eine noch höhere Pufferwirkung des Proteins zutage tritt, mit Werten zwischen $0,10$ und $0,27 \text{ mOD mM}^{-1}$. Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe Pufferkapazität der protonierbaren Gruppen an der Oberfläche der Cytochrom-*c*-Oxidase hin.

Variante	$\Delta A/\Delta c_{H^+}$ (mOD/mM)	Variante	$\Delta A/\Delta c_{H^+}$ (mOD/mM)	Variante	$\Delta A/\Delta c_{H^+}$ (mOD/mM)
CS-T26C- AF	0,18	CS-S295C- AF	0,27	Wt + 25 μM Flu + 0,05 % LM	1,13
CS-P123C- AF	0,10	CS-K299C- AF	0,13	0,05 % LM + 25 μM Flu	3,71
CS-P128C- AF	0,25	CS-P301C- AF	0,16	BR + 25 μM Flu + 0,05 % LM	3,67
		CS-I302C-AF	0,11		

Tab. 3.13: Die Pufferkapazitätsquotienten $\Delta A/\Delta c_{H^+}$ von den AF-markierten Varianten, sowie Wildtyp Cytochrom-*c*-Oxidase, Detergenz und Bakteriorhodopsin jeweils mit freiem Fluorescein.

3.6 Zusammenfassung – Teil I

Um lokale Protonenkonzentrationsänderungen, die durch Protonenaufnahme und –abgabe des Proteins verursacht werden, zu messen, sollten zeitaufgelöste Absorptionsmessungen von pH-sensitiven Farbstoffen durchgeführt werden, welche an Protonenein- und –ausgängen gebunden sind.

Dazu waren vier Voraussetzungen nötig:

- 1.) Es mußte eine cysteinfreie Variante von Cytochrom-*c*-Oxidase hergestellt werden, damit keine unspezifischen Bindungen von dem Farbstoff erfolgen konnten.
- 2.) Es mußten Cysteine an zuvor identifizierten Stellen in das Protein eingeführt werden, die in der Nähe der Protonenein- und –ausgänge liegen.
- 3.) An diese Cysteine mußte der Farbstoff kovalent gebunden werden und
- 4.) der Farbstoff mußte in der Lage sein, kleine pH-Änderungen zu erkennen und durch Absorptionsänderung anzuzeigen.

Zur Herstellung von Varianten, die sowohl in Untereinheit I als auch in Untereinheit II Mutationen aufweisen, wurde ein neues Mutagenesesystem etabliert. Dazu wurde ein neuer Vektor pKK1 kloniert, der die Gene für Untereinheit I und Untereinheit II, *ctaDII* und *ctaC*, in einem *xbaI/NdeI*-Fragment enthält und klein genug für die Einführung von gezielten Punktmutationen ist. Nach erfolgreicher Mutation konnte das Fragment wieder in den Expressionsvektor inseriert werden und die gewünschte Variante exprimiert und aufgereinigt werden.

Mit diesem Mutagenesesystem wurde die thiol-unreaktive Variante Cys 48 Ser-Cys 140 Ser hergestellt. Sie enthält zwar noch Cysteine, diese sind jedoch nicht oberflächenexponiert und somit nicht reaktiv. Diese Mutante konnte exprimiert und aufgereinigt werden, ihre mit Wildtyp vergleichbare Aktivität konnte nachgewiesen werden. In Markierungsversuchen konnte erfolgreich gezeigt werden, daß alle oberflächenexponierten und damit reaktiven Cysteine entfernt worden sind und die Variante keine Sulfhydrylgruppen mehr besitzt, die mit IAF reagieren können.

Nach Einführung von einzelnen Cysteinen an den zuvor identifizierten Stellen im Protein (CS-T26C, CS-N27C, CS-P123C, CS-P128C, CS-S295C, CS-K299C, CS-P301C, CS-I302C, CS-H^{II}29C, CS-D^{II}30C, CS-R^{II}130C) konnte für diese Varianten nach Expression und Aufreinigung vollständige Enzymaktivität und ein dem Wildtyp gleichendes Spektrum nachgewiesen werden. Die Kopplung von 5-IAF an die Varianten erfolgte mit unterschiedlichen Markierungsstöchiometrien. Die Variante CS-I302C zeigte sich am zugänglichsten für den reaktiven Farbstoff und ließ sich zu 92 % markieren. Einige Varianten hingegen zeigten unter den gegebenen Bedingungen so gut wie keine Markierung (CS-N27C, CS-H^{II}29C, CS-D^{II}30C, CS-R^{II}130C).

Bestimmt man von den markierten Varianten die Pufferkapazität der Umgebung der pH-sensitiven Gruppe, so stellt man fest, daß sich auf der Proteinoberfläche protonierbare Gruppen befinden müssen, die starke Puffereigenschaften besitzen und die Protonenkonzentration um den Farbstoff konstant halten können. Dies hat zur Folge, daß der Farbstoff nur sehr große Protonenkonzentrationsänderungen detektieren kann.

Vergleicht man die gemessenen Pufferkapazitätsquotienten der Varianten mit denen von Bakteriorhodopsin, an dem erfolgreich zeitaufgelöste Protonenkonzentrationsmessungen mit an der Oberfläche gekoppeltem AF durchgeführt worden sind (Alexiev *et al.*, 1994; Scherrer *et al.*, 1994; Alexiev *et al.*, 1995), sieht man, daß der Pufferkapazitätsquotienten von Wildtyp Cytochrom-*c*-Oxidase um einen Faktor drei kleiner ist als der von Bakteriorhodopsin. Das bedeutet, daß Cytochrom-*c*-Oxidase in gleicher Konzentration wie Bakteriorhodopsin die Lösung dreimal so stark abpuffert. An der Oberfläche ist die Pufferkapazität sogar um das fünfzehn- bis dreißigfache höher als bei Bakteriorhodopsin. Bei den Protonensignalmessungen an Bakteriorhodopsin bei Scherrer *et al.* (1994) mit an der cytoplasmatischen Oberfläche kovalent gebundenem AF beträgt $\Delta A = 6$ mOD. Damit ergibt sich für die AF-markierten Cytochrom-*c*-Oxidase-Varianten eine voraussichtliche Absorptionsänderung von ca. 0,2 – 0,4 mOD.

4 Ergebnisse und Zusammenfassung - Teil II

Elektronen- und Protonentransfer der Cytochrom-*c*-Oxidase

4.1 Elektronentransfer auf Häm *a*

Um gezielt einzelne Elektronen auf die Cytochrom-*c*-Oxidase zu übertragen und damit die einzelnen Schritte des katalytischen Zyklus zu steuern, wurden verschiedene Systeme getestet, um die Effektivität des Elektronentransfers zu optimieren. Allen gemeinsam ist das Grundgerüst, ein Rutheniumkomplex, der durch gezielte Lichtblitze in den angeregten Zustand versetzt wird und dabei ein Elektron abgeben kann. Ist der Rutheniumkomplex dabei an die Cytochrom-*c*-Oxidase gebunden, so wird das Elektron auf das Cu_A der Cytochrom-*c*-Oxidase transferiert.

Die Messungen, die in diesem Kapitel beschrieben sind, wurden alle in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ulrike Alexiev, Freie Universität Berlin, durchgeführt.

4.1.1 Charakterisierung des Meßsystems Rubpy-Cytochrom-*c*-Oxidase

Der erste getestete Rutheniumkomplex ist ein Tris(2,2'-bipyridyl)Ruthenium(II)-komplex (Struktur siehe Abb. 4.1). Durch einen ns-Laserblitz auf das Absorptionsmaximum bei 435 nm wird dieser Komplex in seinen angeregten Zustand versetzt und ein Elektron kann abgegeben werden (siehe Abb. 2.2). Dieser Komplex bindet an der P-Seite der Cytochrom-*c*-Oxidase, ungefähr dort, wo sich

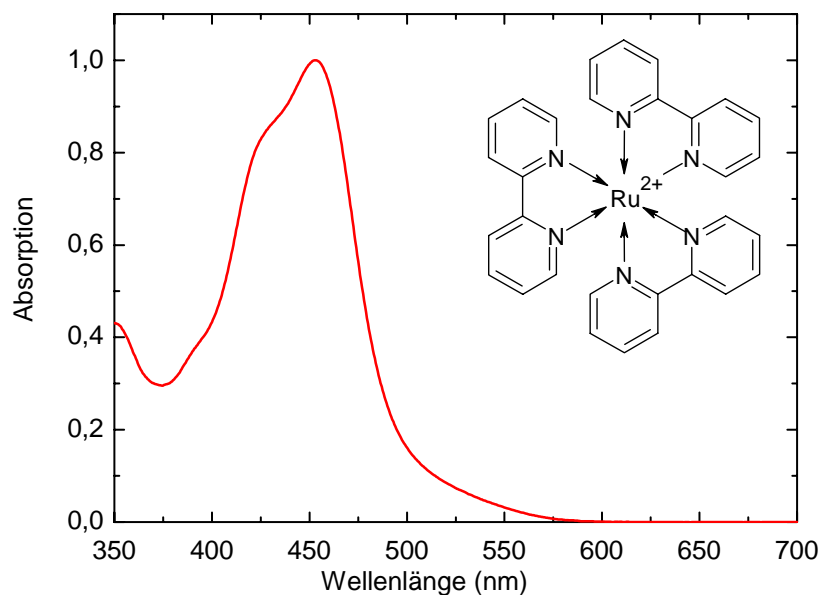


Abb. 4.1: Absorptionsspektrum von Tris(2,2'-bipyridyl)Ruthenium(II). Als Einschub die Struktur.

auch die Cytochrom *c*-Bindestelle befindet (Zaslavsky *et al.*, 1998). Bei Bindung der beiden Moleküle wird das Elektron auf das Cu_A der Oxidase übertragen und von dort auf das Häm transferiert. Daher läßt sich ein erfolgreicher Elektronentransfer anhand der Reduktion des Häm *a* ablesen. Verfolgt man die Absorptionsänderung bei 605 nm, mißt man die Reduktion von Häm *a* und erhält damit ein Maß für die Effizienz des Elektronentransfers (siehe Abb. 4.2). Was man zuerst sieht, ist die starke Lumineszenz des Komplexes, gefolgt von dem Elektronentransfer vom angeregten Rutheniumkomplex. Da kein nachweisbarer Elektronentransfer zum Häm *a* von Cytochrom-*c*-Oxidase stattfindet, ist dieser Komplex für unser Meßsystem ungeeignet.

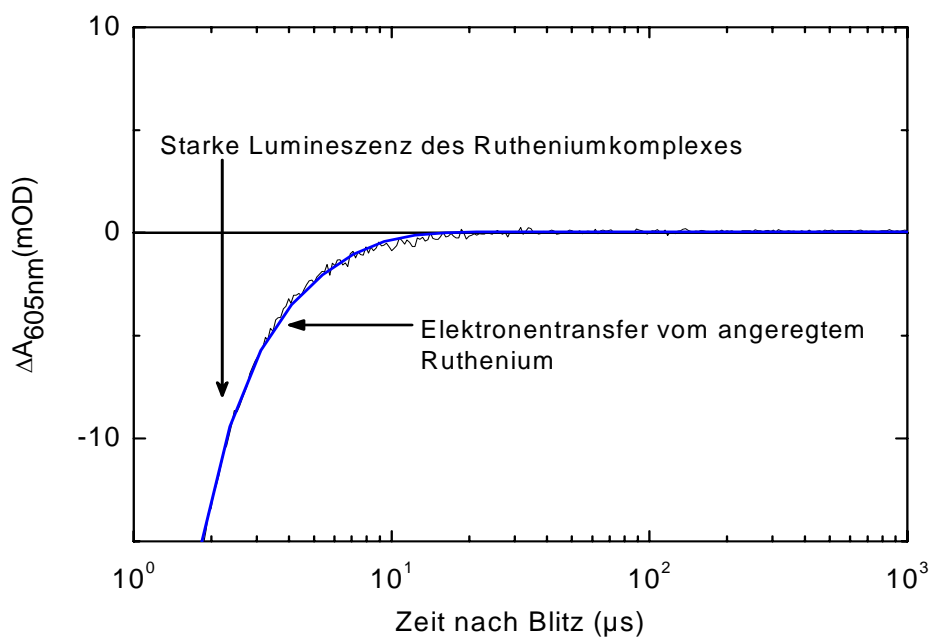


Abb. 4.2: Zeitspur der Absorptionsänderung von Häm *a*, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 14 μM COX, 50 μM Rubpy, 300 μM EDTA, 50 mM KCl, pH 7,51, RT, Doppelblitz, Anregung bei 435 nm.

4.1.2 Charakterisierung des Meßsystems RuCyt*c*-Cytochrom-*c*-Oxidase

Um die Bindungseffizienz zu erhöhen, wurde als nächster Rutheniumkomplex ein *S. cerevisiae* Cytochrom *c* gewählt, welches an seinem His₃₉ einen Rutheniumkomplex kovalent gebunden hat (Struktur siehe Abb. 4.3 Einschub). Dieses Imidazol(2,2'-bipyridyl) Ruthenium-His₃₉-Cytochrom *c* wurde freundlicherweise von Angelo DiBilio (Beckman Institute, California Institute of Technology, Pasadena) zur Verfügung gestellt. Bei Anregung dieses Rutheniumkomplexes bei 450 nm wird das Elektron erst an das Häm *c* des Cytochrom *c* abgegeben (siehe Abb. 4.4 rechts), und von dort bei Bindung weiter an die Cytochrom-*c*-Oxidase geleitet (siehe Abb. 4.4 links). Daß Ruthenium durch den Laserblitz angeregt wird und Elektronen an die Cytochrom-*c*-Oxidase überträgt, erkennt man an der Reduktion und anschließenden Oxidation des Häm *c* bei 550-558 nm.

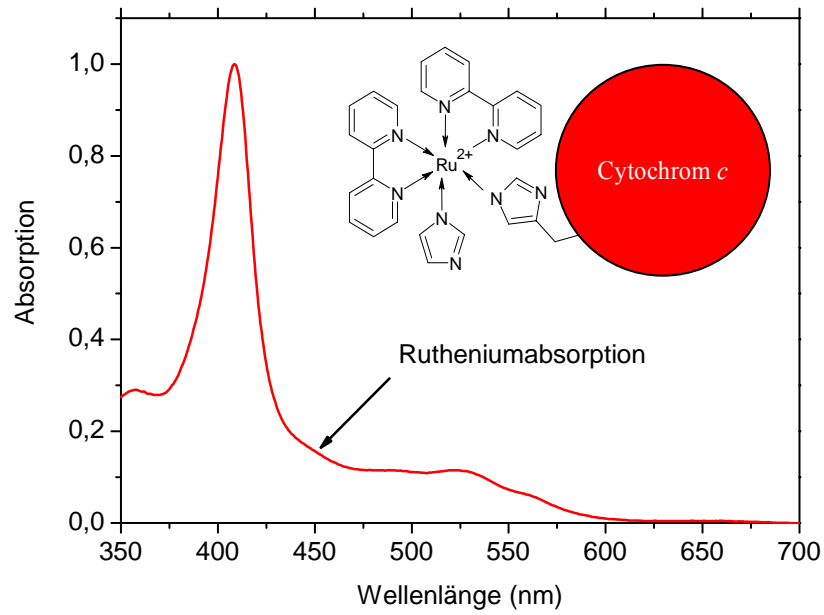


Abb. 4.3: Absorptionsspektrum von RuCyt c, der Pfeil markiert die Absorptionsbande des Rutheniums, die restlichen Absorptionsbanden rühren vom Cytochrom-c her. Als Einschub die Struktur von RuCyt c.

Doch auch hier ist die Effizienz des Elektronentransfers zum Häm *a* der Cytochrom-*c*-Oxidase äußerst gering, sie liegt bei $\sim 0,2\%$.

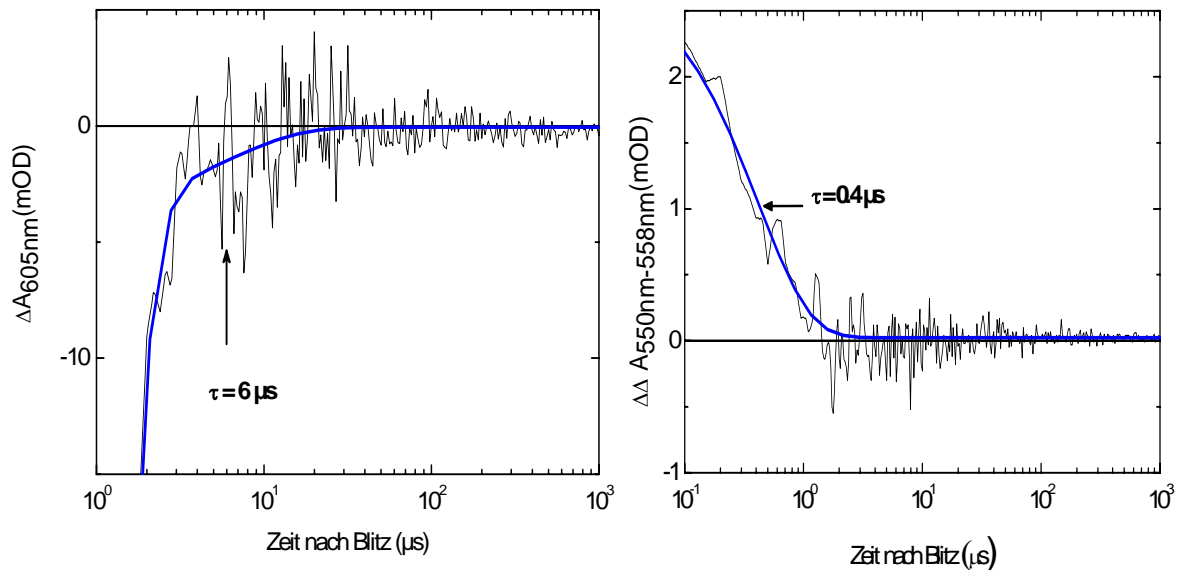


Abb. 4.4: Links: Zeitspur der Absorptionsänderung von Häm *a*, aufgenommen bei 605 nm. Rechts: Reduktion von Häm *c* des Cytochrom *c*. Bedingungen: 10 μM COX, 10 μM RuCyt c, 30 μM EDTA, 50 mM KCl, pH 7,3, RT, Einzelblitz, Anregung bei 450 nm

4.1.3 Charakterisierung des Meßsystems Ru₂D-Cytochrom-*c*-Oxidase

Als letzter Rutheniumkomplex wurde ein [Ruthenium(2,2'-bipyridin)₂]₂quarterpyridin getestet, welcher von Christian Bamann (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/ Main) synthetisiert wurde. Dieser binukleare Komplex hat eine Nettoladung von +4 (siehe Abb. 4.5), welche eine starke Bindung bei niedriger Ionenstärke an die Cytochrom-*c*-Oxidase ermöglicht und nach Photolyse die Elektronen spezifisch an das Cu_A gibt. Dabei sollte durch zwei Rutheniumionen die Ausbeute an angeregten und gebundenen Komplexen deutlich höher sein als bei den vorher getesteten.

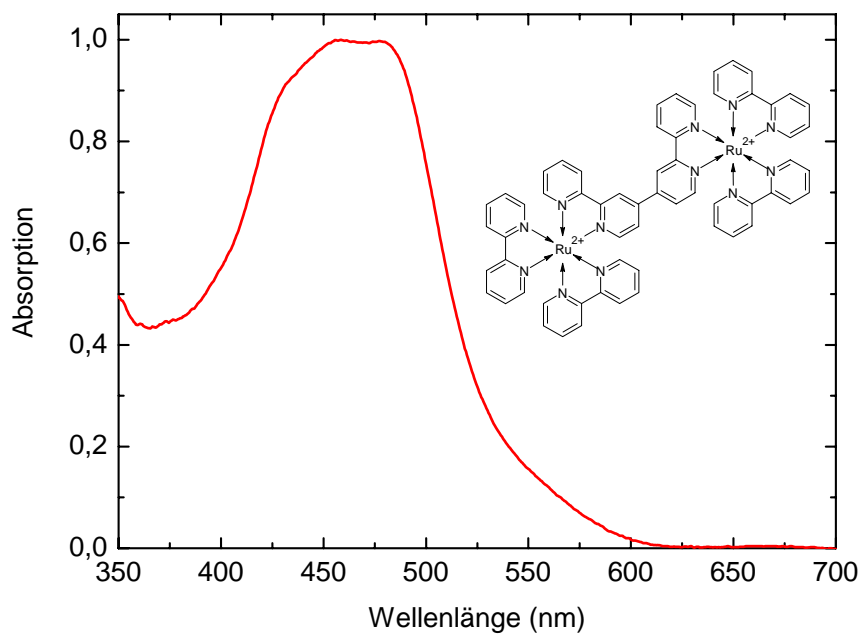


Abb. 4.5: Absorptionsspektrum von Ru₂D. Im Vergleich zu Rubpy fällt das deutlich breitere Maximum auf. Als Einschub die Struktur von Ru₂D.

Bei einer Anregung bei 492 nm konnten hier zwischen 5 und 10 % des Häm *a* reduziert werden (siehe Abb. 4.6). Außerdem ließ sich die Zeitkonstante des Elektronentransfers auf das Häm *a* mit $\tau = 18 \mu\text{s}$ bestimmen.

Damit ist dieser Komplex als Elektronendonator in unserem Meßsystem der am besten geeignete und wurde daher zur weiteren Untersuchung genutzt.

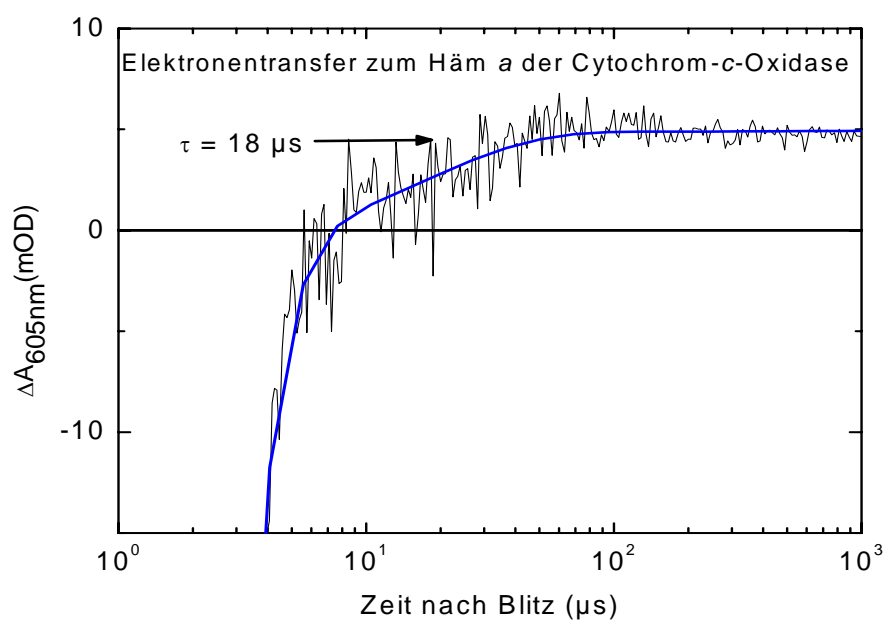


Abb. 4.7: Zeitspur der Absorptionsänderung von Häm *a*, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

4.1.4 Optimierung des Meßsystems

Um eine optimale Ausgangsbasis für die Protonenkonzentrationsmessungen zu haben, also eine möglichst hohe Reduktion des Häm *a* zu erreichen, wurde das Meßsystem weiter optimiert. Dazu wurden die Randbedingungen wie pH und Ionenstärke (Bindung des Rutheniumkomplexes an die Cytochrom-*c*-Oxidase) sowie Laserenergie variiert, um Abhängigkeit auf optimale Elektronentransferbedingungen und maximale Bindung zu testen.

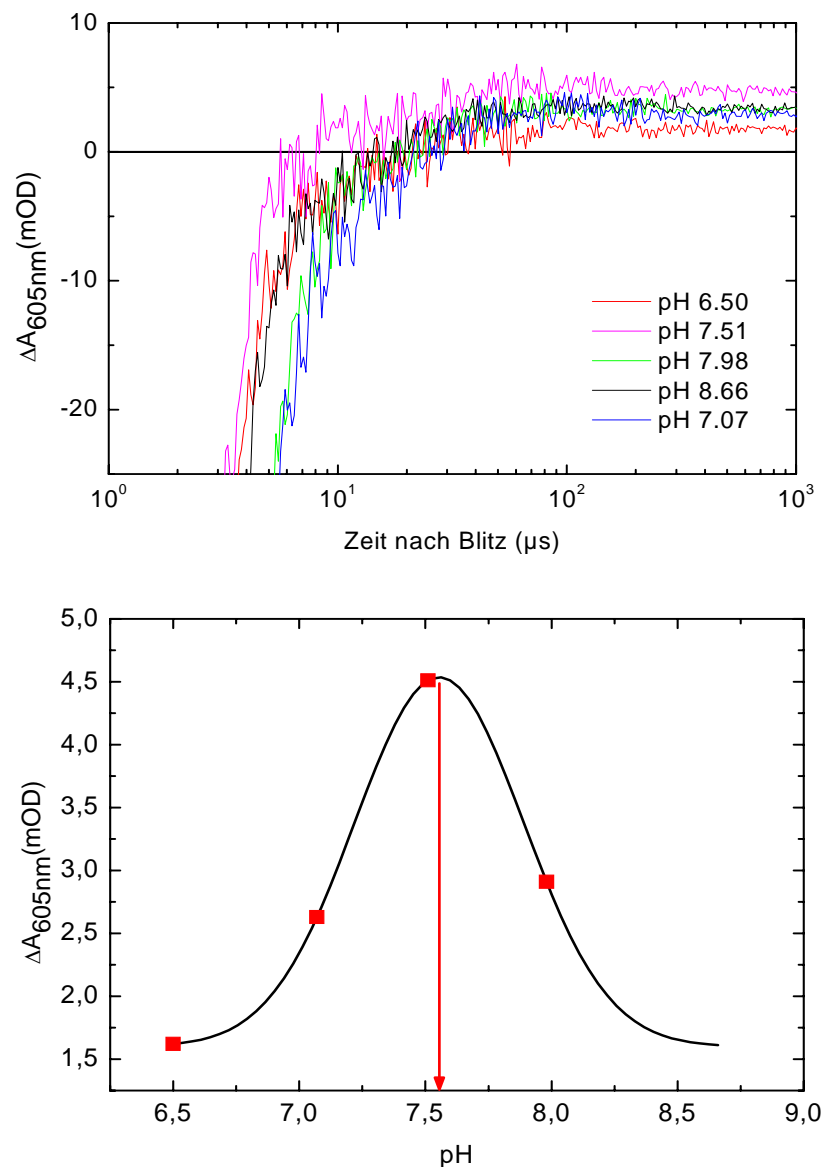


Abb. 4.8: pH-Abhängigkeit des 605 nm-Signals. Das Optimum der Bindung Cytochrom-*c*-Oxidase-Ru₂D liegt bei pH 7,5. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm (Cumarin 307 in EtOH)

Variiert man den pH-Wert des Meßsystems, so sieht man eine deutliche Zunahme der Reduktion des Häm *a* bei einem pH-Wert von 7,5. Hier scheint die Bindung des Komplexes aus Cytochrom-*c*-Oxidase und Ru₂D am höchsten zu sein und eine Elektronenübertragung auf das Häm *a* effektiv zu verlaufen (siehe Abb. 4.8). Da die Aktivität der Cytochrom-*c*-Oxidase bei pH 7,4 ihr Maximum hat und die Aktivität auch bei pH 7,5 nicht wesentlich geringer ist, wurde dieser pH für zukünftige Messungen verwendet.

Die Ionenstärke beeinflusst wesentlich die Bindung des Rutheniumkomplexes an die Cytochrom-*c*-

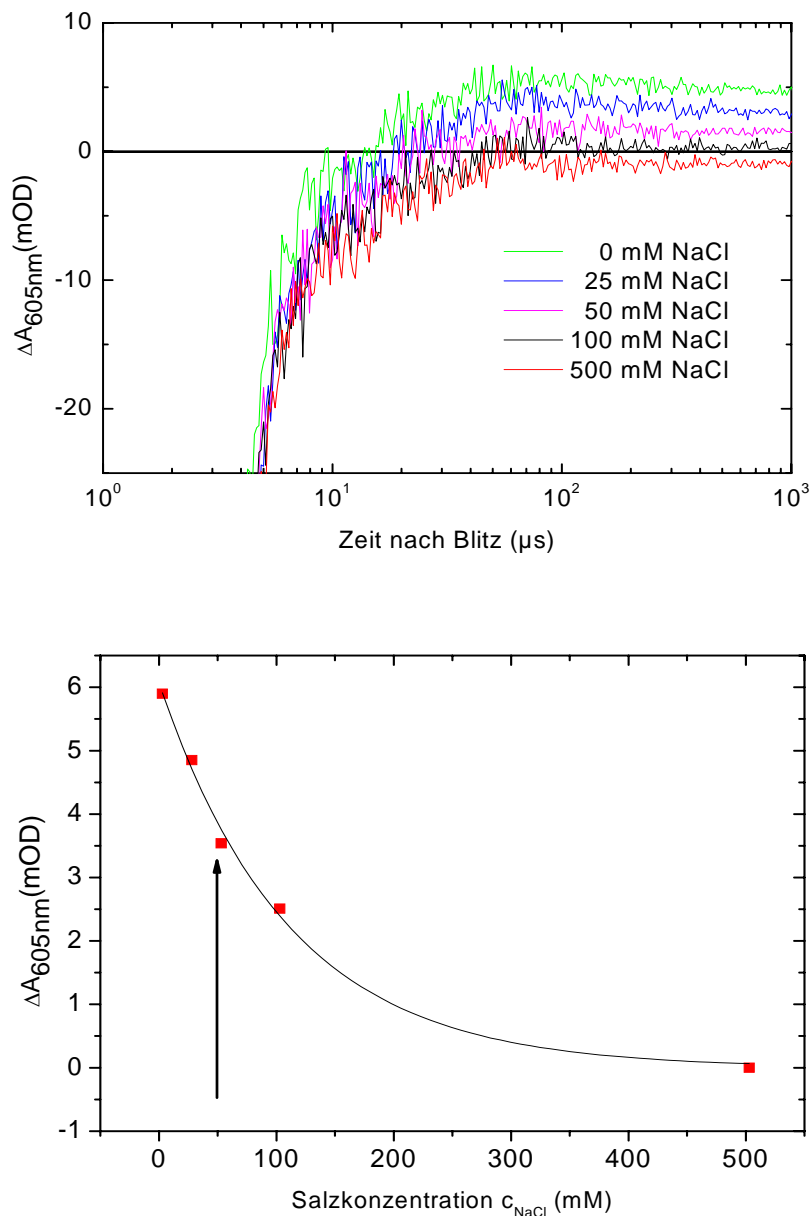


Abb. 4.9: Abhängigkeit des 605 nm-Signals von der Ionenstärke. Die Ionenstärke wurde mit NaCl verändert. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

Oxidase. Deutlich zu sehen ist, daß mit steigender Ionenstärke die Komplexbildung immer geringer wird (siehe Abb. 4.9), und man bei einer Salzkonzentration von 500 mM keine Bindung und damit auch keinen Elektronentransfer mehr beobachtet. Optimal wären also Messungen mit einem Salzgehalt von 0 mM. Dies führt jedoch unter ungepufferten Bedingungen zu einer raschen Aggregation der Cytochrom-*c*-Oxidase, so daß als Kompromiß eine Ionenstärke von 50 mM KCl benutzt wurde.

Wie erwartet zeigte es sich auch, daß die Energie des Laserblitzes entscheidenden Einfluß auf die Anregung des Rutheniumkomplexes hat. Je höher die Energie, desto mehr Ruthenium kann in den angeregten Zustand gebracht werden und desto höher ist die Zahl der Elektronen, die auf die Cy-

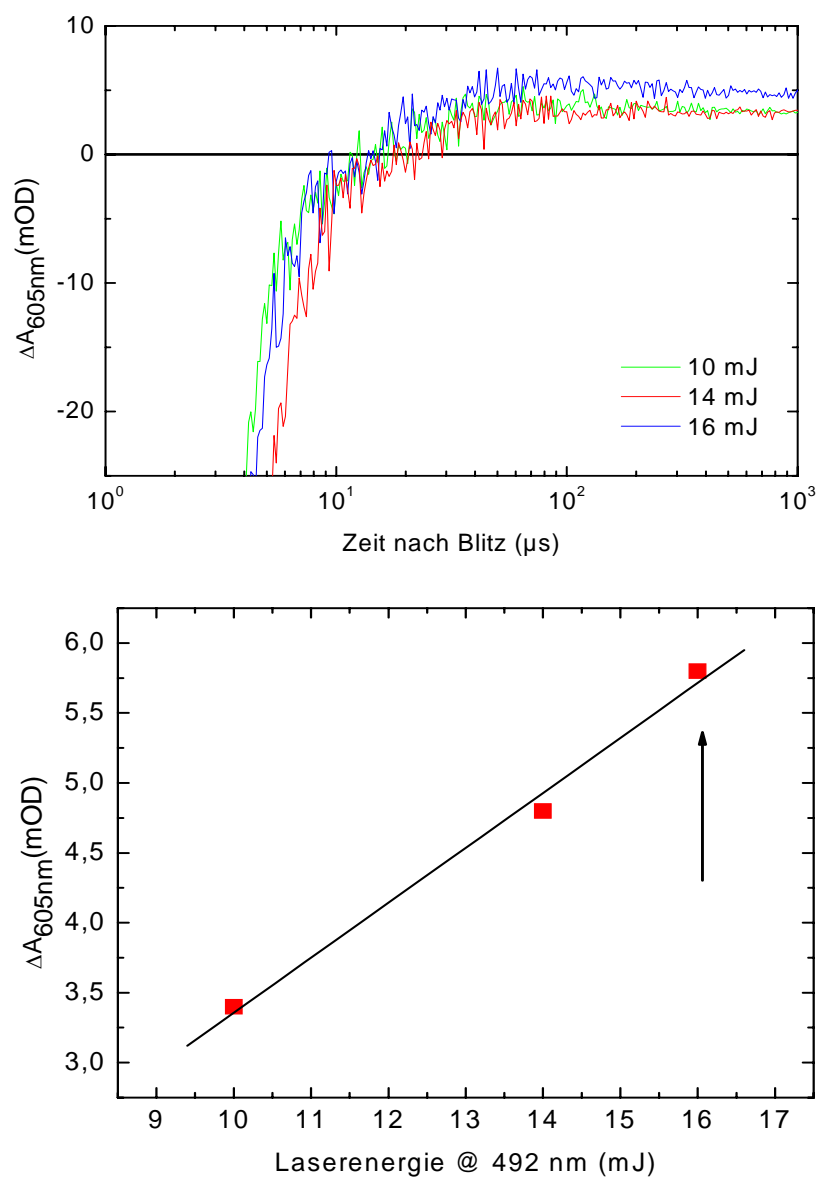


Abb. 4.10: Abhängigkeit des 605 nm-Signals von der Energie des Laserblitzes. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

tochrom-*c*-Oxidase übertragen werden können (siehe Abb. 4.10). Anhand dieser Optimierungen wurde das Meßsystem für die nachfolgenden Protonenkonzentrationsmessungen aufgestellt. Optimale Bedingungen für eine möglichst hohe Elektronentransferrate sind: pH = 7,5, KCl Konzentration $c = 50$ mM und eine Laserenergie bei 492 nm, die höher als 14 mJ ist.

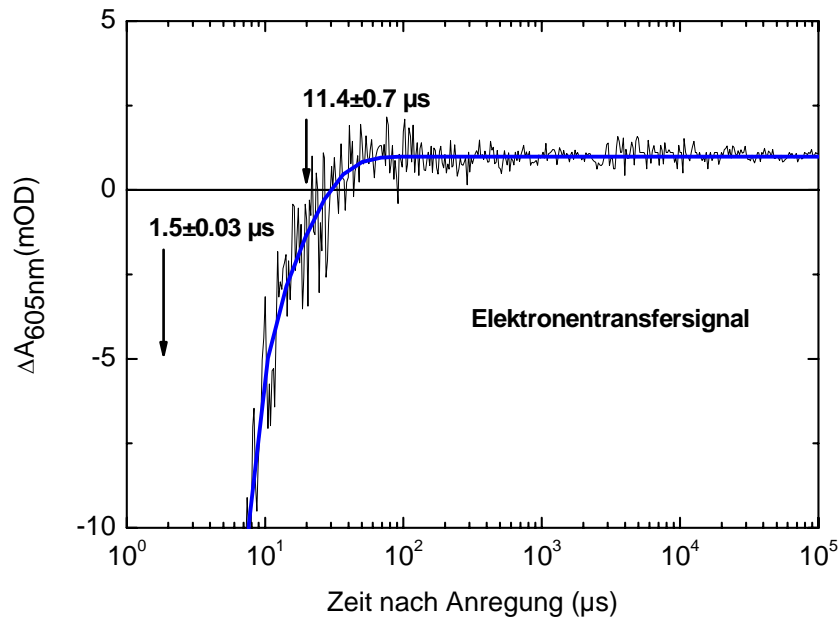


Abb. 4.11: Reduktion von Häm *a*, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 10 μ M COX, 25 μ M Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

Ein typisches Elektronentransfersignal, d.h. die zeitliche Änderung der Absorption bei 605 nm, kann mit zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden (siehe Abb. 4.11). τ_1 beschreibt die Relaxation des Rutheniums, die mit einer sehr schnellen Kinetik von $\sim 1,5$ μ s erfolgt, τ_2 die Aufnahme des Elektrons durch Häm *a*. Durch die Reduktion des Häms erhöht sich die Absorption bei 605 nm, so daß die Kinetik der Aufnahme verfolgt werden kann. Die mittlere Zeitkonstante für den Elektronentransfer auf Häm *a* ist $\tau_2 = 13,66 \pm 2,4$ μ s (Durchschnittswert aus 5 Messungen, Einzelblitz bei 492 nm Anregung, 22°C, 50 mM KCl, pH 7.5) mit einer Elektronentransfereffizienz zum Häm *a* von ungefähr 10 -15 %.

4.2 Protonenaufnahme und Abgabe ins Medium

4.2.1 Charakterisierung von Cytochrom-*c*-Oxidase und freiem Farbstoff Phenolrot

Zur Messung von Protonenkonzentrationsänderungen im Medium wurde der lösliche pH-Indikator Phenolrot benutzt, dessen Absorptionsmaximum auf den isosbestischen Punkt der Cytochrom-*c*-Oxidase bei 558 nm fällt. Titriert man den pH-Indikator mit und ohne Protein, so lassen sich Aussagen über die Umgebung desselbigen treffen. Um die Eigenschaften dieses Systems zu charakterisieren, wurde Phenolrot alleine und mit Cytochrom-*c*-Oxidase jeweils in Detergenz bei verschiedenen pH-Werten titriert. Phenolrot alleine in Detergenz-Lösung hat einen pK von 7,8 (siehe Abb. 4.12), gibt man jedoch Cytochrom-*c*-Oxidase zu der Lösung dazu, so verschiebt sich der pK zu einem Wert von pH = 7,95, ein Zeichen dafür, daß sich der leicht hydrophobe pH-Indikator partiell in der Detergenzhülle des Proteins anlagern kann und damit nahe der negativ geladenen Proteinoberfläche ist.

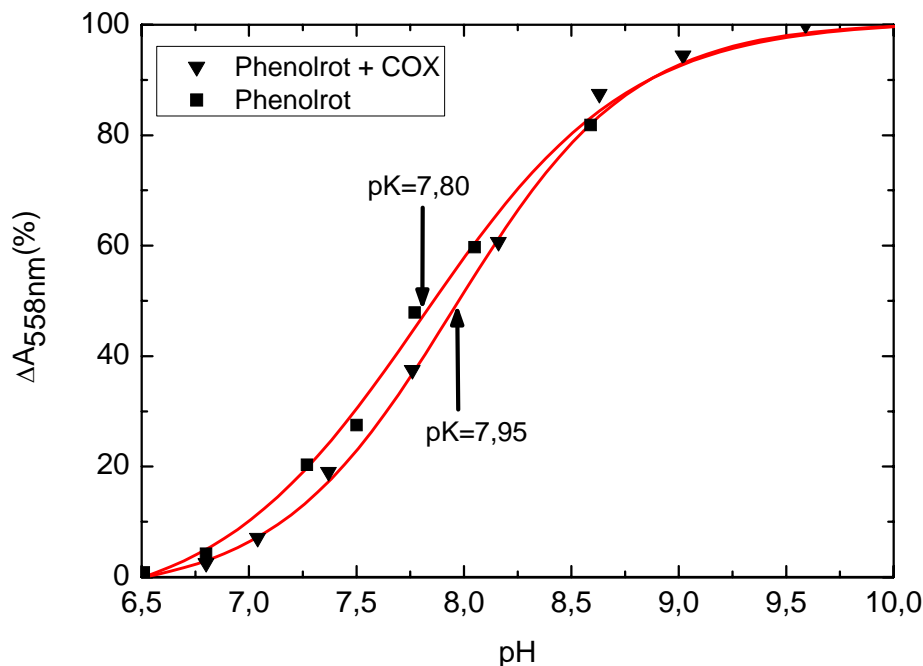


Abb. 4.12: Titrationskurven von Phenolrot ohne und mit Cytochrom-*c*-Oxidase in 50 mM KCl, 0,05 % LM.

4.2.2 Lichtinduzierte Protonenkonzentrationsänderungen der Wildtyp Cytochrom-*c*-Oxidase

Da die AF-markierten Varianten wegen der hohen Pufferkapazität der Cytochrom-*c*-Oxidase nicht für die Messung von Protonensignalen genutzt werden konnten, wurde Wildtyp Cytochrom-*c*-Oxidase mit dem freien pH-sensitiven Farbstoff Phenolrot für die Messungen der Protonenkonzentrationsänderung genommen.

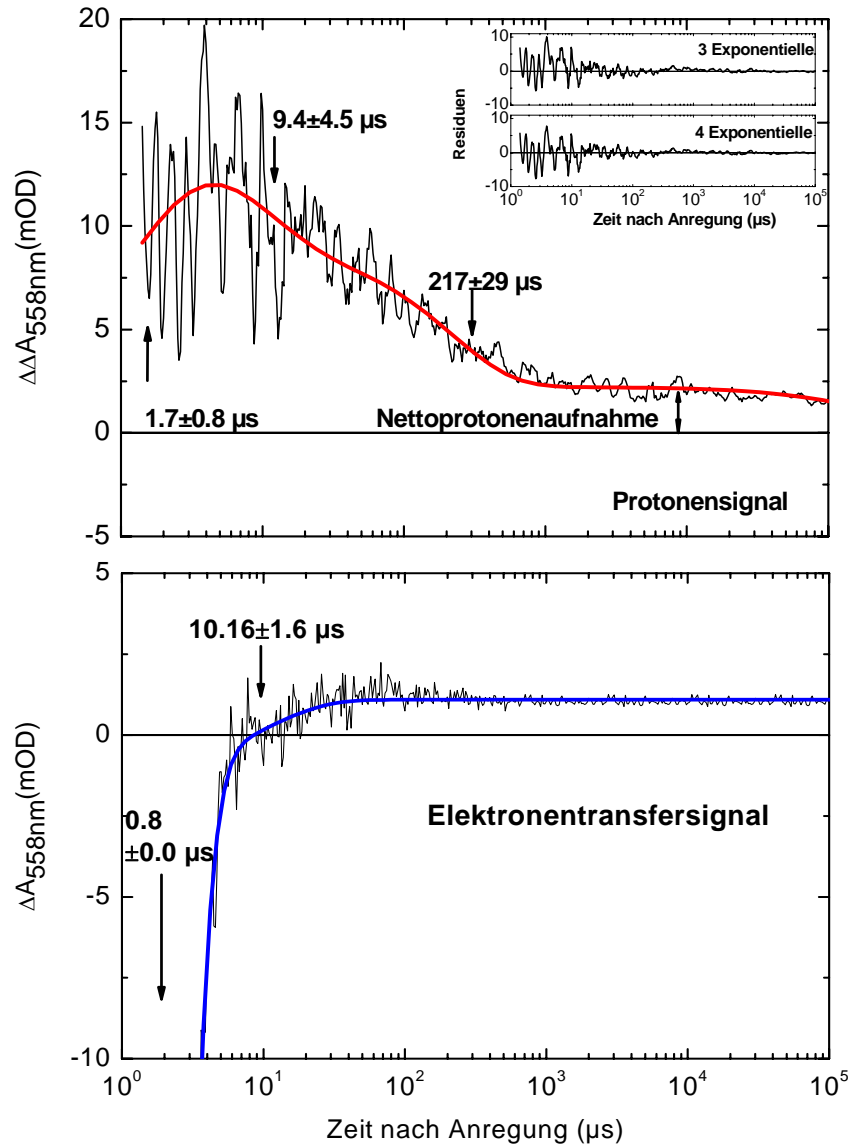


Abb. 4.13: *Oben:* Absorptionsänderung von Phenolrot bei Transfer eines Elektrons auf wt Cytochrom-*c*-Oxidase, aufgenommen bei 558 nm. *Unten:* Zeitspur der Absorptionsänderung von der Reduktion von Häm *a* von Wildtyp Cytochrom-*c*-Oxidase, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

Unter den oben ermittelten optimalen Bedingungen (10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 50 μM Phenolrot, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm) detektiert man bei 558 nm ein Protonensignal, welches mit einer Summe von vier Exponentialfunktionen beschrieben werden kann (siehe Abb. 4.13). Das Protonensignal steigt mit einer Zeitkonstanten $\tau_1 = 1,7 \pm 0,8 \mu\text{s}$ und zeigt damit eine schnelle Protonenaufnahme an. Das folgende Abklingen des Signals, die Protonenabgabe, enthält zwei Komponenten, $\tau_2 = 9,4 \pm 4,5 \mu\text{s}$ und $\tau_3 = 217 \pm 29 \mu\text{s}$. Die Protonenaufnahme überwiegt jedoch gegenüber der Protonenabgabe und man erhält damit eine Nettoprotonenaufnahme bei der Aufnahme eines einzelnen Elektrons.

4.2.3 Protonenaufnahme und -abgabe der Varianten D124N, K354M und D124N-K354M

Der Verlauf der Kinetik der Protonensignale ist bei Wildtyp und den Varianten ähnlich. Die Amplitude jedoch ist bei allen drei Varianten deutlich reduziert, wie in der Zusammenstellung in Abbildung 4.14 deutlich zu sehen ist. Hier wurden die Fitkurven der jeweiligen Protonenänderungszeitspuren zur übersichtlicheren Darstellbarkeit verwendet. Die leicht unterschiedlichen Kinetiken sind aus dieser Darstellung ersichtlich. In den folgenden Abschnitten werden die Protonenkonzentrationsänderungen der Varianten genauer erläutert.

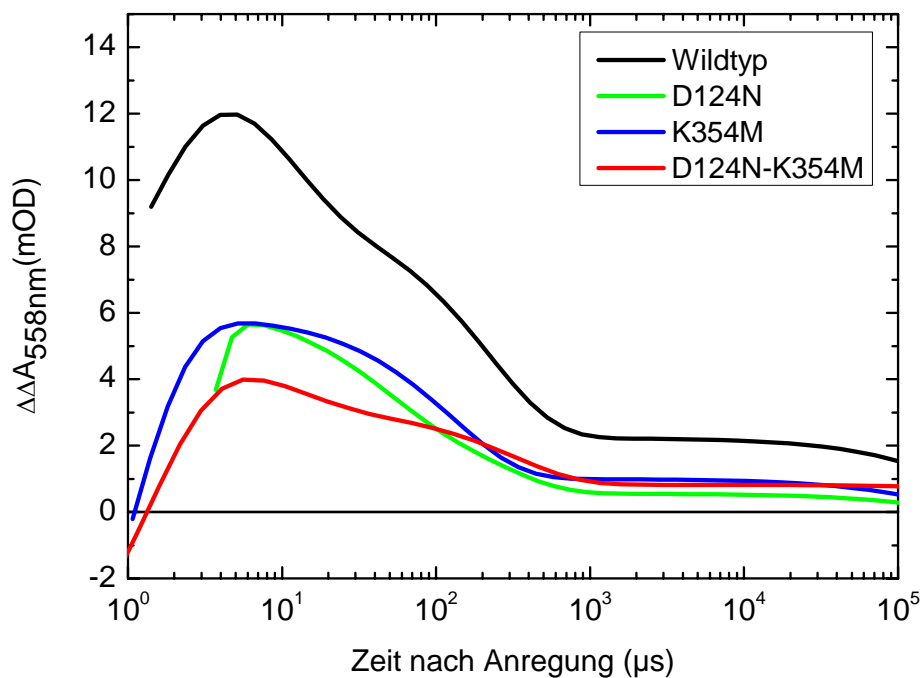


Abb. 4.14: Vergleich der Protonensignale (Fitkurven, Originaldaten s. Abb. 4.13, 4.15, 4.16 und 4.17) bei 558 nm von Wildtyp und den drei Varianten D124N, K354M und D124N-K354M

Variante D124N

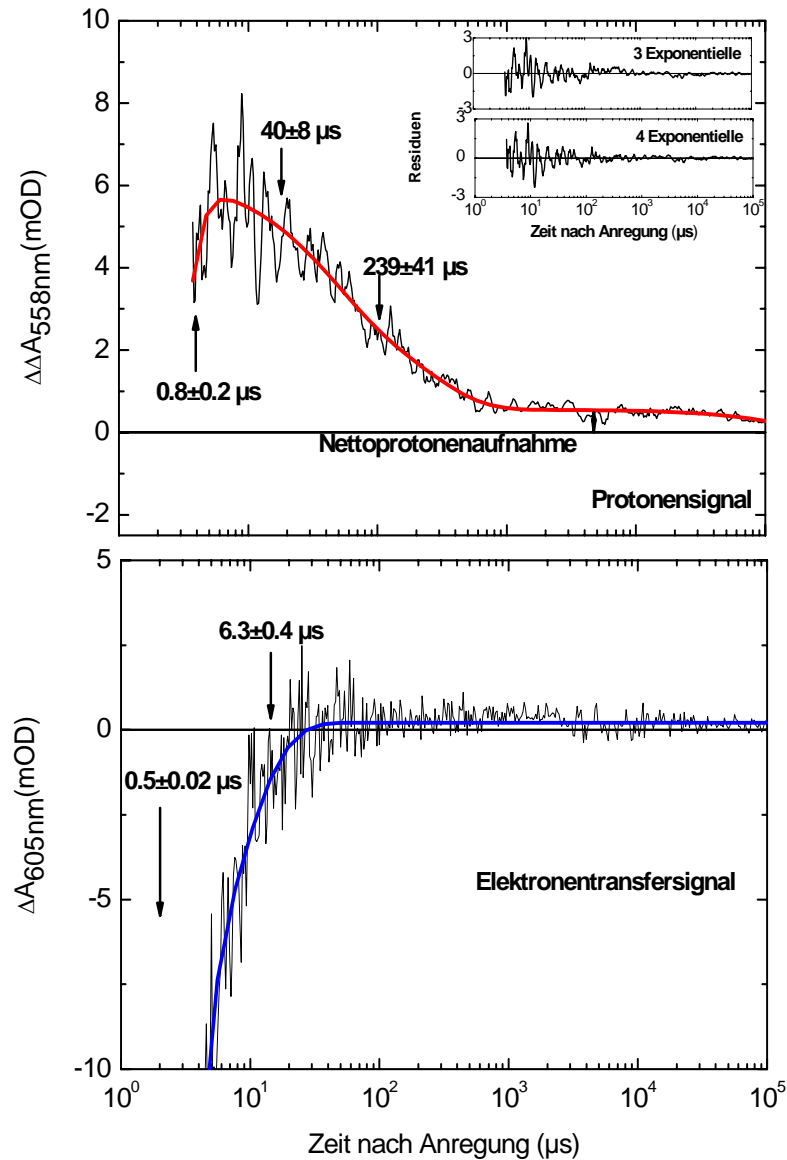


Abb. 4.15: *Oben:* Absorptionsänderung von Phenolrot bei Transfer eines Elektrons auf D124N, aufgenommen bei 558 nm. *Unten:* Zeitliches Spektrum der Reduktion von Häm *a* von D124N, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 10 μ M COX, 25 μ M Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

D124N, eine Variante mit einem blockierten D-Weg, zeigt eine wildtypartige Elektronentransferkinetik. Die Absorptionsänderung bei 605 nm kann mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden, $\tau_1 = 0,5 \pm 0,1 \mu$ s (Ruthenium-Relaxation) und $\tau_2 = 6,3 \pm 0,4 \mu$ s (Elektronentransfer auf Häm *a*). Das Protonensignal bei 558 nm steigt mit $\tau_1 = 0,8 \pm 0,2 \mu$ s (Protonenaufnahme), gefolgt von einem Abfall (Protonenabgabe) $\tau_2 = 40 \pm 8 \mu$ s und $\tau_3 = 239 \pm 41 \mu$ s. Der erste Abfall ist um den Faktor vier gegenüber dem Wildtyp verlangsamt.

Variante K354M

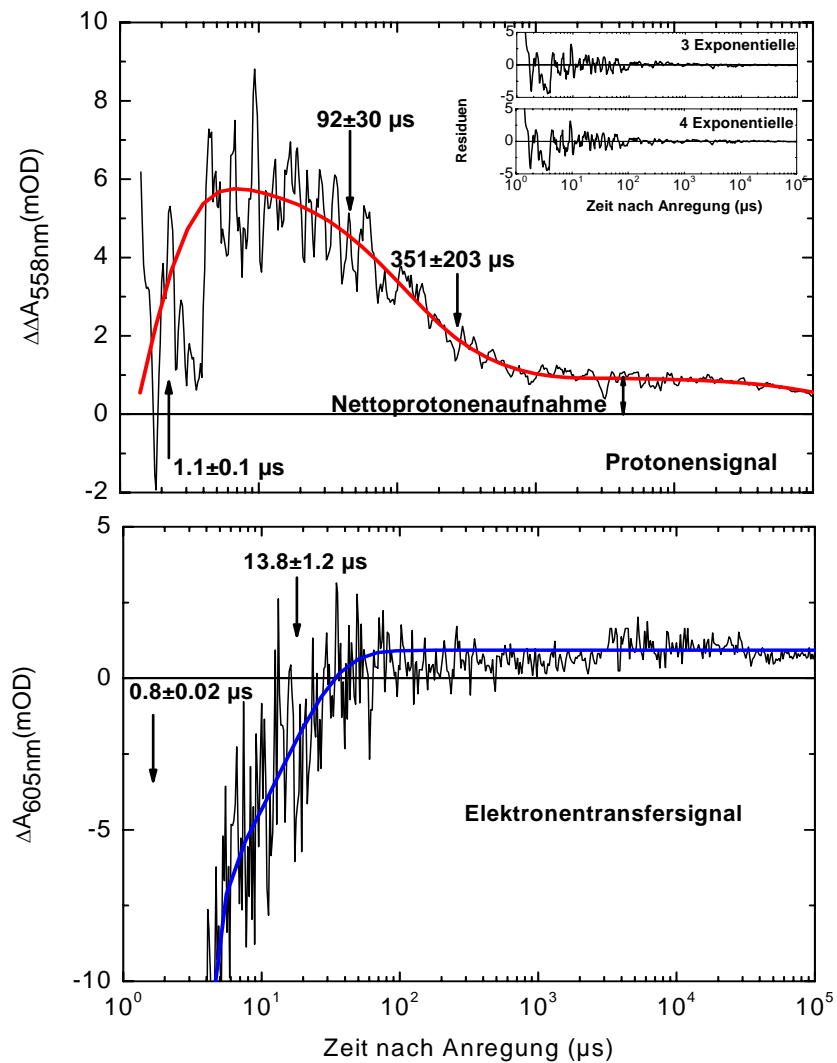


Abb. 4.16: *Oben:* Absorptionsänderung von Phenolrot bei Transfer eines Elektrons auf K354M, aufgenommen bei 558 nm. *Unten:* Zeitspur der Absorptionsänderung von der Reduktion von Häm *a* von K354M, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

Das Elektronentransfersignal der K-Weg blockierten Variante K354M kann ebenfalls mit zwei Zeitkonstanten dargestellt werden, $\tau_1 = 0,8 \pm 0,1 \mu\text{s}$ (Ruthenium-Relaxation) und $\tau_2 = 13,8 \pm 1,2 \mu\text{s}$ (Elektronentransfer auf Häm *a*), vergleichbar zu Wildtyp. Der Anstieg des Protonensignals bei 558 nm kann mit einer Zeitkonstante $\tau_1 = 1,1 \pm 0,1 \mu\text{s}$ (Protonenaufnahme) beschrieben werden. Die Protonenabgabe ist im Vergleich zu Wildtyp verlangsamt, resultiert jedoch immer noch in einer Nettoprotonenaufnahme. Die beiden Abklingkonstanten sind $\tau_2 = 92 \pm 30 \mu\text{s}$ und $\tau_3 = 351 \pm 203 \mu\text{s}$.

Variante D124N-K354M

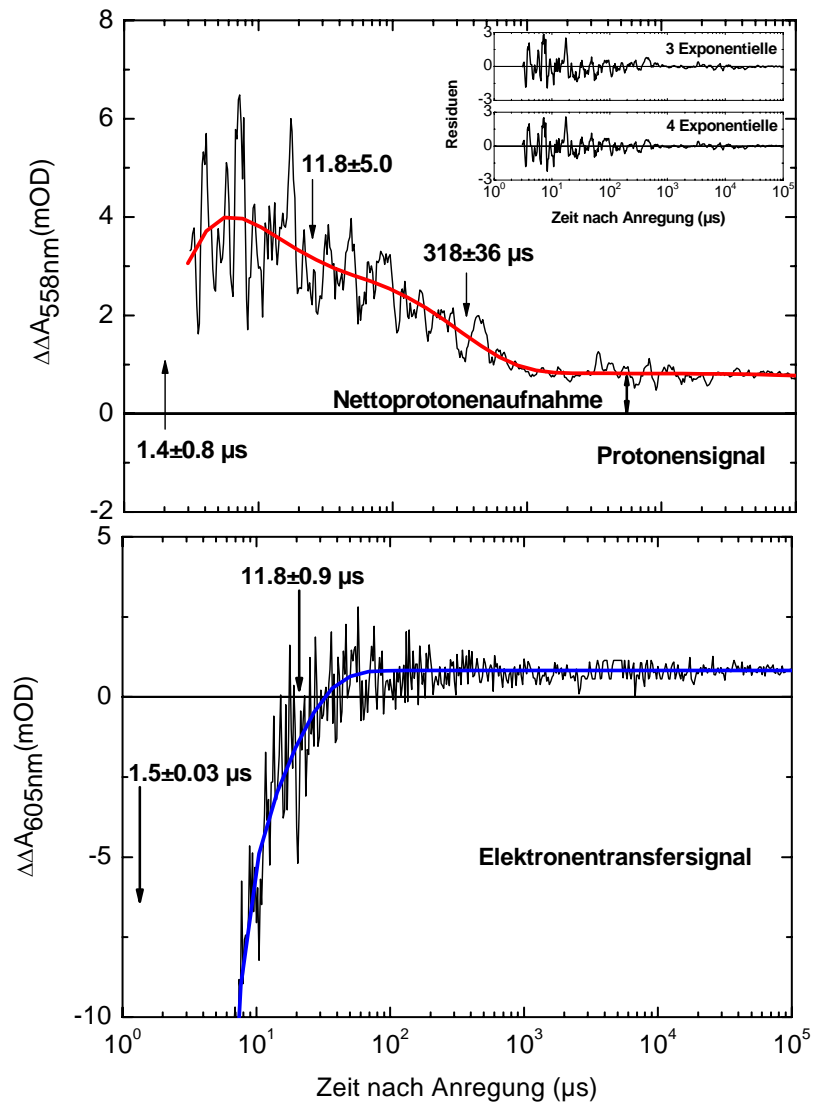


Abb. 4.17: *Oben:* Absorptionsänderung von Phenolrot bei Transfer eines Elektrons auf D124N-K354M, aufgenommen bei 558 nm. *Unten:* Zeitspur der Absorptionsänderung von der Reduktion von Häm *a* von D124N-K354M, aufgenommen bei 605 nm. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

Die Doppelvariante D124N-K354M, bei der sowohl der K- als auch der D-Weg der Protonenaufnahme blockiert sind, zeigt wildtypartiges Verhalten im **O**→**E** Schritt, obwohl diese Mutante als inaktiv bekannt ist. Das Elektronentransfersignal kann wie bei Wildtyp mit zwei Zeitkonstanten gefittet werden, $\tau_1 = 1,5 \pm 0,1 \mu\text{s}$ (Ruthenium-Relaxation) und $\tau_2 = 11,8 \pm 0,9 \mu\text{s}$ (Elektronentransfer auf Häm *a*). Die Protonenaufnahme erfolgt mit einer Zeitkonstanten von $\tau_1 = 1,4 \pm 0,8 \mu\text{s}$, ähnlich wie in Wildtyp (siehe Abb. 4.13). Die zweiphasige Protonenabgabekinetik mit $\tau_2 = 11,8 \pm 5,0$

μs und $\tau_3 = 318 \pm 36 \mu\text{s}$ ist ebenfalls mit der von Wildtyp vergleichbar, jedoch ist die dritte Abklingkonstante etwas langsamer als in Wildtyp.

4.2.4 Lichtinduzierte Änderung der Protonenkonzentration von Cytochrom-*c*-Oxidase in Liposomen

Um die jeweiligen Protonenaufnahme- und abgabeschritte der P- und N-Seite des Enzyms zuzuordnen, wurden die Protonensignalmessungen mit in Liposomen inkorporierter Cytochrom-*c*-Oxidase wiederholt. Dazu wurden Proteoliposomen hergestellt, und dann Phenolrot ins Außenmedium zugegeben.

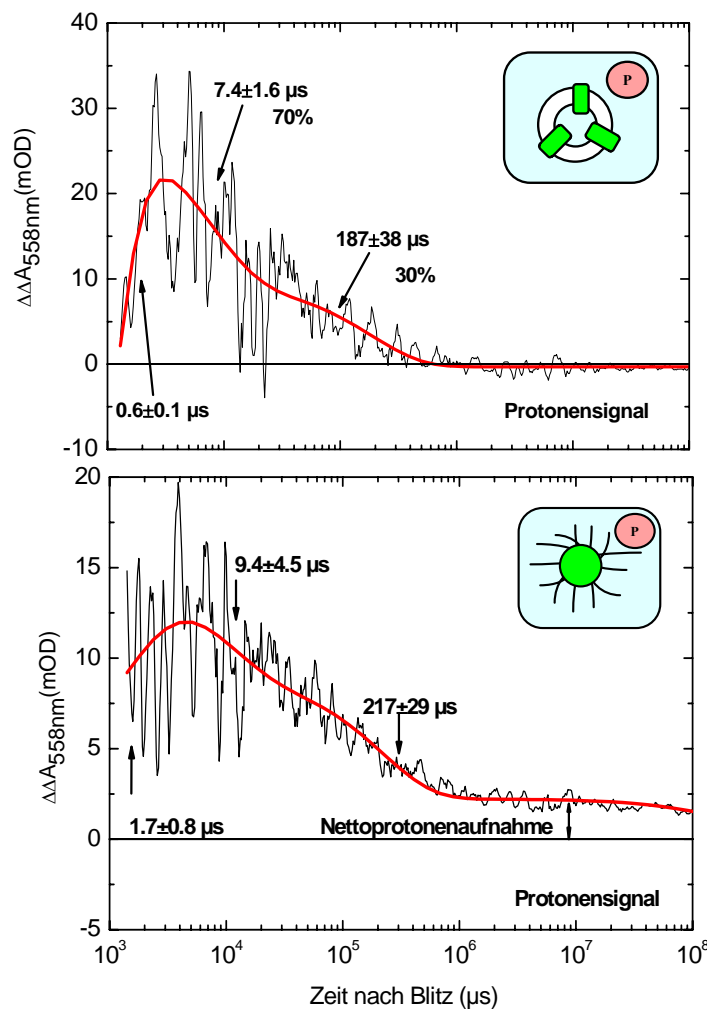


Abb. 4.18: *Oben:* Absorptionsänderung von Phenolrot im Medium bei Transfer eines Elektrons auf wt Cytochrom-*c*-Oxidase, inkorporiert in Liposomen, aufgenommen bei 558 nm. *Unten:* Absorptionsänderung von Phenolrot bei Transfer eines Elektrons auf wt Cytochrom-*c*-Oxidase, aufgenommen bei 558 nm. Bedingungen: 10 μM COX, 25 μM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl, pH 7,5, RT, Einzelblitz, Anregung bei 492 nm.

Das Elektronentransfersignal bei 605 nm konnte wie bei den Messungen mit solubilisiertem Protein mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden, und zwar mit $\tau_1 = 2,7 \pm 0,2 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 13,6 \pm 2,9 \mu\text{s}$.

Das Protonensignal bei 558 nm entspricht in seiner Form ebenfalls dem solubilierten Enzym, zuerst eine Protonenaufnahme mit $\tau_1 = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{s}$, gefolgt von zwei sukzessive Protonenabgaben mit $\tau_2 = 7,4 \pm 1,6 \mu\text{s}$ und $\tau_3 = 187 \pm 38 \mu\text{s}$. Der große Unterschied zwischen solubilisiertem und in Liposomen inkorporiertem Enzym liegt im Endwert der Protonierungsänderung des Farbstoffs. Während man bei der solubilierten Cytochrom-*c*-Oxidase eine Nettoprotonenaufnahme, d.h. eine Absorptionsänderung größer 0 detektiert, geht bei der inkorporierten Cytochrom-*c*-Oxidase, wo der pH-Indikator nur außen, also auf der P-Seite des Enzyms vorliegt, das Protonensignal auf die Nulllinie zurück. Das Experiment mit der orientierten Cytochrom-*c*-Oxidase in Liposomen zeigt damit eindeutig, daß von der P-Seite des Enzyms *keine* Nettoprotonenaufnahme stattfindet. Der Vergleich der Protonensignale in Abb. 4.18 macht die unterschiedliche Nettoprotonenaufnahme in beiden Systemen deutlich. Die Elektronentransfersignale weisen hingegen keine starken Unterschiede auf. Der Elektronentransfer auf das Häm *a* in Liposomen ist mit $13,6 \pm 2,9 \mu\text{s}$ vergleichbar mit der mittleren Zeitkonstante von $13,7 \pm 2,4 \mu\text{s}$, die für den solubilierten Wildtyp detektiert wurde.

4.3 Protonenaufnahme und -abgabe an der Oberfläche

4.3.1 Lichtinduzierte Änderung der Protonenkonzentration an der Proteinoberfläche

Die vorangegangenen Messungen wurden mit einem löslichen pH-Indikator durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, daß die Messung von Protonenkonzentrationsänderungen im Medium bei der Aufnahme eines Elektrons von der Cytochrom-*c*-Oxidase möglich ist, und Aussagen über die Kinetik und die Stöchiometrie getroffen werden können. Der nächste Schritt bestand darin, die lichtinduzierte Protonenkonzentrationsänderung direkt an der Oberfläche der Oxidase zu verfolgen,

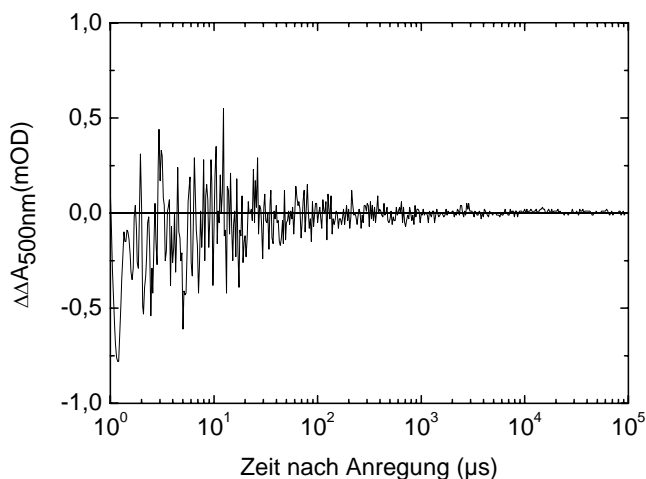


Abb. 4.19: Absorptionsänderung von an der Proteinoberfläche gebundenem Fluorescein bei Transfer eines Elektrons auf CS-I302C-AF, aufgenommen bei 500 nm. Eine Absorptionsänderung ist durch das Rauschen nicht nachweisbar.

um Aussagen über eine lokale Abhängigkeit der Protonenaufnahme zu treffen.

Abbildung 4.19 zeigt die Zeitspur der Absorptionsänderung des in Position 302 oberflächengebundenen Fluoresceins nach lichtinduziertem Elektronentransfer auf die Cytochrom-*c*-Oxidase. Leider konnte keine Protonenkonzentrationsänderung an der Oberfläche des Enzyms nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis läßt sich auf folgende Randbedingungen zurückführen:

1. Die Pufferkapazität des Cytochrom-*c*-Oxidase ist am Ort des oberflächengebundenen Farbstoffs relativ hoch (siehe Abschnitt 3.5). Das heißt, wir erwarten unter den gegebenen Bedingungen (s. u.) Absorptionsänderungen von weniger als 0,4 mOD.
2. Die optimale Konzentration der Cytochrom-*c*-Oxidase ist 10 μM , um die zeitaufgelösten Messungen durchzuführen. Die Fluoresceinkopplungsstöchiometrien sind $\leq 90\%$. Damit ist die Fluoresceinkonzentration ebenfalls $\leq 9\ \mu\text{M}$. Eine Erhöhung der Cytochrom-*c*-Oxidase-Konzentration führt zu einer Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses und damit zu keinem besseren Protonensignal.
3. Erschwerend kommt hinzu, daß die optimale Anregung des elektronenliefernden Komplexes Ru₂D bei 495 nm stattfindet. Dies ist jedoch zugleich die Meßwellenlänge für Protonenkonzentrationsänderungen, da hier die Absorptionsänderungen von Fluorescein mit sich änderndem pH am höchsten sind. Die Folge ist ein nicht zu verhindernder Blitzdurchschlag am Anfang der Meßkurve (siehe Abb. 4.19).

4.3.2 Die Oberflächenladungsdichte auf der N-Seite der Cytochrom-*c*-Oxidase

Der kovalent an die Proteinoberfläche gebundene pH-Indikator Fluorescein kann nicht nur zur Detektion der Protonenaufnahme und -abgabe während des katalytischen Zyklus genutzt werden, sondern er bietet auch die Möglichkeit, das Oberflächenpotential, bzw. die Oberflächenladungsdichte von Cytochrom-*c*-Oxidase aus der Salzabhängigkeit des apparenten pKs des gebundenen pH-Indikators (Fluorescein) zu bestimmen. Die Oberflächenladungsdichte und das daraus resultierende Oberflächenpotential bestimmen die Konzentration der Protonen an der Proteinoberfläche, d.h. den Oberflächen-pH. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Geschwindigkeit der Protonenaufnahme in das Protein, da zum Beispiel bei negativer Oberflächenladungsdichte sich eine höhere Protonenkonzentration an der Oberfläche des Enzyms befindet als in der Lösung.

Um den apparenten pK (pK_{app}) des gebundenen Fluoresceins exakt zu bestimmen, muß bei der Auswertung der Titrationsspektren auch eine eventuelle Absorptionsänderung des Cytochrom-*c*-Oxidase bei der Wellenlänge, bei der Fluorescein sein pH-abhängiges Maximum hat, berücksichtigt werden. Daher wurde ebenfalls Absorptionsspektren von unmarkierter wt Cytochrom-*c*-Oxidase aufgenommen. In Abbildung 4.20 wird der für die Titrationskurven von Fluorescein relevante Bereich dargestellt.

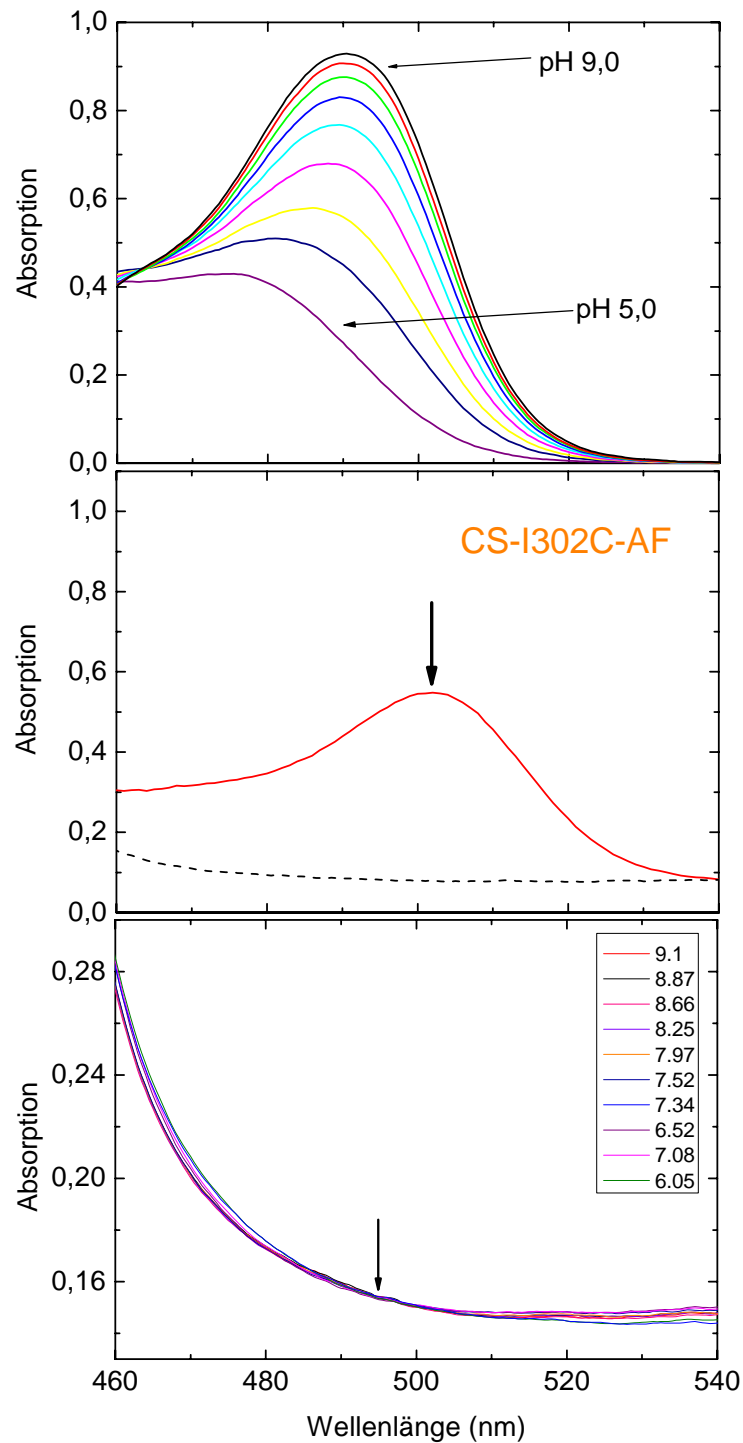


Abb. 4.20: *Oben:* Absorptionsspektren von Fluorescein bei verschiedenen pH-Werten. *Mitte:* Absorptionsspektrum der markierten Variante CS-I302C-AF. Man sieht deutlich die Verschiebung des Absorptionsmaximums des gebundenen Fluoresceins bei 502 nm gegenüber ungebundenem Fluorescein bei 495 nm. *Unten:* Absorptionsspektren von wt Cytochrom-*c*-Oxidase bei verschiedenen pH-Werten. Der Pfeil deutet auf 495 nm, der Wellenlänge für die Messung von Fluorescein. Zwischen 485 und 505 nm ist die Absorption der Cytochrom-*c*-Oxidase nicht pH-abhängig.

Die Absorptionsänderungen der Cytochrom-*c*-Oxidase bei 495 nm im Vergleich zu Fluorescein sind so geringfügig, daß man sie vernachlässigen kann.

Der apparente pK von Fluorescein wurde bei 495 nm und einer Salzkonzentration von 150 mM KCl bestimmt.

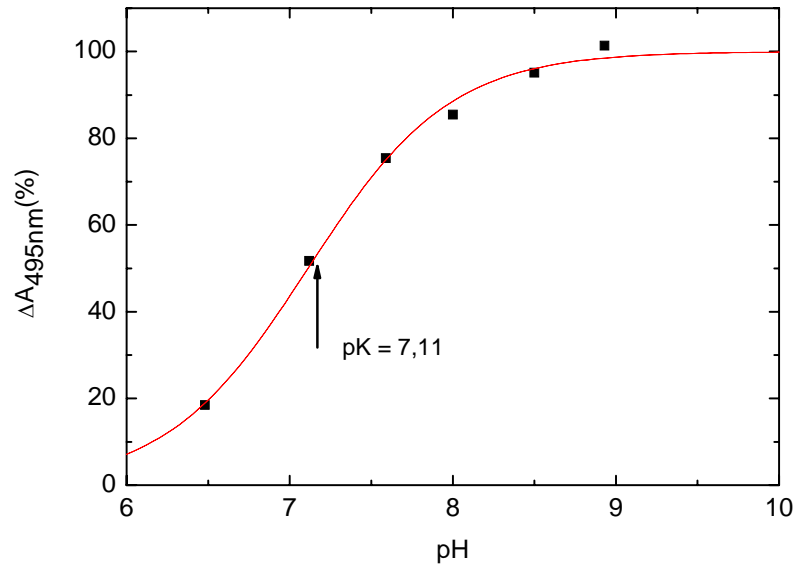


Abb. 4.21: Titrationskurve von CS-I302C-AF bei 495 nm und 150 mM KCl. Der pK-Wert wurde mit $7,11 \pm 0,07$ bestimmt.

Berechnet man aus der erhaltenen Titrationskurve den pK von Fluorescein, so erhält man als Wert $\text{pK}_{\text{app}} = 7,11 \pm 0,07$.

Oberflächengebundenes Fluorescein zeigt eine deutliche Abhängigkeit des pK-Wertes von der Salzkonzentration, wie in Abbildung 4.22 dargestellt ist.

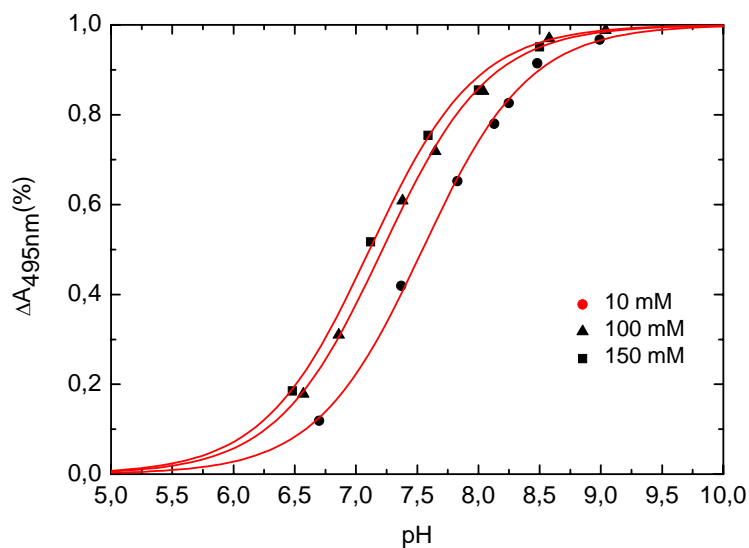


Abb. 4.22: Titrationsdaten und Fit-Kurven für Protein-gebundenes Fluorescein, (in Position 302 auf der N-Seite am Eingang des K-Wegs gebunden), in 10, 100 und 150 mM KCl.

Der apparente pK sinkt mit steigender Salzkonzentration von $pK_{app} = 7,54$ bei 10 mM KCl auf $pK_{app} = 7,11$ bei 150 mM KCl. Vergleicht man diesen Wert mit dem pK_{app} von freiem Fluorescein ($pK_{app} = 6,7$), so ergibt sich eine pK-Differenz von etwa 0,4 pH-Einheiten, wobei der pK des gebundenen Fluoresceins höher liegt. Diese Verschiebung und die Salzabhängigkeit des pKs des gebundenen Fluoresceins deuten auf einen Oberflächenpotential-Effekt hin.

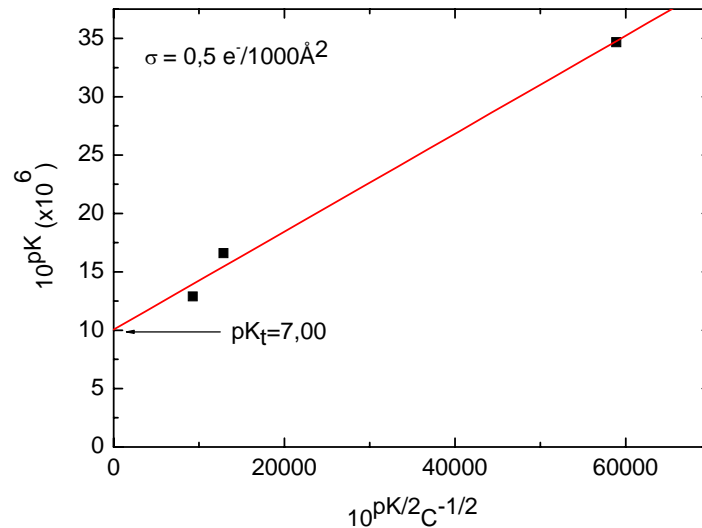


Abb.4.23: Modifizierter Gouy-Chapman-Plot für CS-I302C-AF.

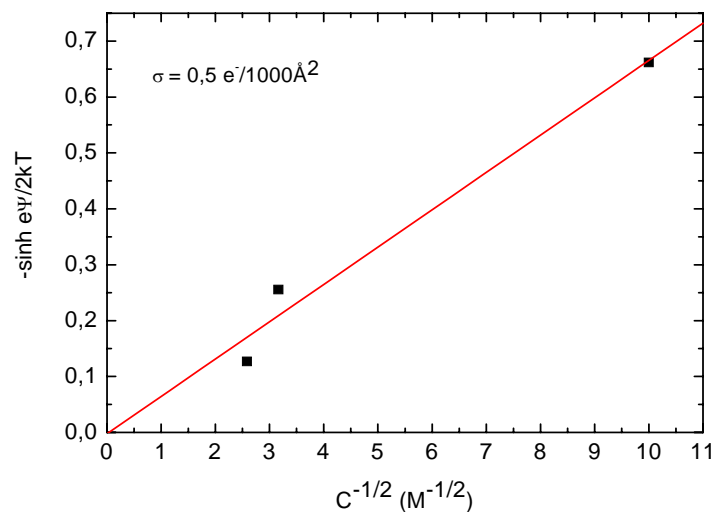


Abb. 4.24: Gouy-Chapman-Plot für CS-I302 AF. Das Oberflächenpotential ist gegen die Salzkonzentration aufgetragen.

In Abbildung 4.24 sind die aus den Titrationsdaten berechneten Oberflächenpotentiale als Funktion der Salzkonzentration aufgetragen. Der echte pK des Fluoresceins (pK bei unendlich hoher Salzkonzentration) wurde mittels Extrapolation aus dem modifizierten Gouy-Chapman-Plot in Abbildung 4.23 berechnet. Der echte pK von Fluorescein an der Stelle 302 (Eingang K-Kanal) bei un-

endlich hoher Salzkonzentration des Proteins beträgt $pK_t = 7,00$. Aus der Differenz zwischen echtem und apparenten pK bei einer gegebenen Salzkonzentration wurde dann das Oberflächenpotential bei dieser Salzkonzentration bestimmt. Mittels der Gouy-Chapman-Gleichung konnte aus der salzabhängigen pK -Verschiebung die negative Oberflächenladungsdichte $\sigma = 0,5 e^-/1000 \text{ \AA}^2$ bestimmt werden, die dem Anstieg im Gouy-Chapman-Plot entspricht.

4.4 Zusammenfassung – Teil II

Um gezielt in einzelnen Schritten des katalytischen Zyklus Protonenkonzentrationsänderungen messen zu können, muß eine möglichst hohe Anzahl von Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexen von einem Zustand in den nächsten überführt werden. Dies geschieht zum Beispiel durch die Aufnahme eines Elektrons. Rutheniumkomplexe sind geeignet, um durch Lichtanregung ein Elektron abzugeben und dieses bei Bindung an die Cytochrom-*c*-Oxidase auf jene zu übertragen. Getestet wurden drei verschiedene Rutheniumkomplexe: Rubpy, RuCyt*c* und Ru₂D. Davon war unter den gegebenen Bedingungen nur mit letzterem eine deutlich sichtbare Reduktion des Häm *a* bei 605 nm nachzuweisen.

Um die Ausbeute zu steigern, wurden die Meßbedingungen optimiert. Dazu wurde die Abhängigkeit der Elektronentransferrate von dem pH und der Salzkonzentration gemessen, die beide die Bindung des Rutheniumkomplexes an die Cytochrom-*c*-Oxidase beeinflussen. Hier erwies sich ein pH-Wert von pH = 7,5 und eine möglichst niedrige Salzkonzentration als ideal. Da es bei einer Salzkonzentration von < 50 mM Probleme mit der Aggregation des Proteins gab, wurde eine Salzkonzentration von 50 mM gewählt. Die Anzahl der angeregten Rutheniumionen konnte durch eine möglichst hohe Laserenergie erheblich gesteigert werden. Nach Optimierung dieser Bedingungen konnte mit 10 µM Cytochrom-*c*-Oxidase, 25 µM Ru₂D, 10 mM Anilin, 1mM 3CP, 50 mM KCl bei pH 7,5 bei einer Anregung von 495 nm eine > 10 %ige Reduktion von Häm *a* erreicht werden.

Die Kinetik der Zeitspur der Absorptionsänderung bei 605 nm läßt sich mit zwei Zeitkonstanten beschreiben: Die erste beschreibt die schnelle Relaxation des Rutheniums mit $\tau_1 = 1,5 \pm 0,03 \mu\text{s}$, die zweite die Aufnahme des Elektrons durch das Häm *a* der Cytochrom-*c*-Oxidase mit $\tau_2 = 13,6 \pm 2,4 \mu\text{s}$.

Unter diesen Bedingungen konnte mit dem löslichen pH-Indikator Phenolrot eine Protonenkonzentrationsänderung während des **O**→**E** Übergangs gemessen werden. Das resultierende Protonensignal von Cytochrom-*c*-Oxidase läßt sich mit vier Exponentialfunktionen beschreiben. Zuerst erfolgt eine Protonenaufnahme mit $\tau_1 = 1,7 \pm 0,8 \mu\text{s}$, gefolgt von zwei Protonenabgabekomponenten, $\tau_2 = 9,4 \pm 4,5 \mu\text{s}$ und $\tau_3 = 217 \pm 29 \mu\text{s}$. Die mit der Protonenabgabe verbundene Absorptionsänderung ist jedoch kleiner als die bei der Protonenaufnahme. Daraus resultiert eine Nettoprotonenaufnahme als Konsequenz des Elektronentransfers zum Häm *a*.

Interessanterweise hat die Blockierung des D-Weges (D124N) oder des K-Weges (K354M) oder beider Wege (D124N-K354M) in den entsprechenden Versuchen keinen signifikanten Einfluß auf das Protonensignal. Die Zeitspuren der Protonenkonzentrationsänderungen dieser drei Varianten haben eine vergleichbare Form wie die von Wildtyp, unterscheiden sich aber in der Signalhöhe und

haben teilweise gegenüber Wildtyp verlangsamte Kinetiken (siehe Tab. 4.25). In allen drei Varianten wurde jedoch eine Nettoprotonenaufnahme detektiert.

	Wildtyp	D124N	K354M	D124N-K354M	Wt (Liposomen)
H⁺-Aufnahme					
τ_1 (μs) (Amplitude in %)	1,7±0,8 (100 %)	0,8±0,2 (100 %)	1,1±0,1 (100 %)	1,4±0,8 (100 %)	0,6±0,1 (100 %)
H⁺-Abgabe					
τ_2 (μs) (Amplitude in %)	9,4±4,5 (41 %)	40±8 (47 %)	92±30 (56 %)	11,8±5,0 (36 %)	7,4±1,6 (70 %)
H⁺-Abgabe					
τ_3 (μs) (Amplitude in %)	217±29 (46 %)	239±41 (39 %)	351±203 (28 %)	318±36 (46 %)	187±38 (30 %)
Nettoprotonenaufnahme	13 %	14 %	16 %	18 %	—
$\tau_1(e^-)$ (μs) (Ruthenium)	0,8±0,0	0,5±0,0	0,8±0,0	1,5±0,0	2,7±0,2
$\tau_2(e^-)$ (μs) (Häm a)	10,2±1,6	6,3±0,4	13,8±1,2	11,8±0,9	13,6±2,9

Tab. 4.25: Zusammenstellung der einzelnen Zeitkonstanten von den Protonensignalen (rot) und den Elektronentransfersignalen (blau) von Wildtyp, den einzelnen Varianten und Wildtyp inkorporiert in Liposomen.

Um die für den Funktionsmechanismus der Cytochrom-*c*-Oxidase entscheidende Frage zu klären, von welcher Seite des Proteins die zuvor beschriebene Nettoprotonenaufnahme stattfindet, wurden Messungen an Liposomen durchgeführt, in die Cytochrom-*c*-Oxidase inkorporiert wurde. Dabei wurde der pH-Indikator Phenolrot dem Außenmedium zugesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte keine Nettoprotonenaufnahme nachgewiesen werden. Daraus folgt, daß die Aufnahme des ersten „Netto“-Protons im O→E Schritt von der N-Seite des Enzyms erfolgt.

Im Gegensatz dazu waren die Protonenkonzentrationsänderungen an der Oberfläche mit den AF-markierten Varianten leider nicht zu detektieren. Eine Variante, CS-I302C-AF, wurde jedoch dazu

genutzt, die Oberflächenladungsdichte an der N-Seite der Cytochrom-*c*-Oxidase zu bestimmen. Man erhält eine negative Oberflächenladungsdichte von $\sigma = 0,5 \text{ e}^-/1000 \text{ \AA}^2$ bei einem intrinsischen pK von $\text{pK}_i = 7,00$. Eine negative Oberflächenladungsdichte begünstigt einen schnellen Protonentransfer in das Protein, da die Protonenkonzentration an der Oberfläche gegenüber der wässrigen Lösung erhöht ist.

5 Diskussion

Die katalytische Sauerstoffreduktion der Cytochrom-*c*-Oxidase findet in mehreren einzelnen Schritten statt, die sowohl mit der Aufnahme von Elektronen und als auch mit der Aufnahme und Abgabe von Protonen verbunden sind (siehe Kapitel 1.3.3). Um die Diskussion über den möglichen Weg einer Protonenaufnahme im ersten Schritt des katalytischen Zyklus vom oxidierten (**O**) Zustand zum Einelektronen-reduzierten (**E**) Zustand beizulegen, wurden in dieser Arbeit mit zeitaufgelöster Laserblitz-Absorptionsspektroskopie die Protonenaufnahme und -abgabe während des **O**→**E** Übergangs gemessen.

Diese Meßmethode hat den Vorteil, daß hier direkt mit Hilfe von pH-sensitiven Farbstoffen Protonenkonzentrationsänderungen in der Umgebung des Indikators gemessen werden können, und zwar mit einer Zeitauflösung im Nanosekundenbereich. Bei den bis dato gemachten Aussagen zur Protonenaufnahme lagen hingegen Resultate von elektrometrischen Messungen zugrunde (Ruitenberg *et al.*, 2000; Verkhovskiy *et al.*, 2001), bei denen jedoch nicht spezifisch der Transport eines Protons betrachtet werden kann, sondern generell nur die Verschiebung von Ladungen.

Um gezielt Elektronen auf die Cytochrom-*c*-Oxidase zu übertragen, wurden durch Licht anregbare Rutheniumkomplexe genutzt. Diese sind in der Lage, durch einen kurzen Laserblitz Elektronen bei Bindung an die Cytochrom-*c*-Oxidase zu übertragen. Diese Methode ist in der Literatur schon des öfteren beschrieben worden. Um die größtmögliche Anzahl an Cytochrom-*c*-Oxidase -Molekülen durch Elektronenübertragung zu reduzieren, wurden verschiedene Rutheniumkomplexe getestet, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Elektronenübertragung auf Cytochrom-*c*-Oxidase beschrieben worden sind: Rubpy (Nilsson, 1992), RuCyt_c (Pan *et al.*, 1993) und Ru₂D (Zaslavsky *et al.*, 1998). Dabei stellte es sich heraus, daß in unserem Meßsystem Ru₂D die höchste Elektronenübertragungseffizienz hatte. Dies geht konform mit den Aussagen von Zaslavsky *et al.* (1998), der eine fünffach höhere Ausbeute mit Ru₂D als mit Rubpy gemessen hat. Diese Beobachtung wird auf die vierfach positive Ladung des Rutheniumdimers zurückgeführt, die den Komplex befähigt, an der negativ geladenen Cytochrom *c*-Bindungsstelle an Untereinheit II der Cytochrom-*c*-Oxidase zu binden. Dies kann auch daran gezeigt werden, daß durch eine Neutralisierung der elektrostatischen Wechselwirkungen mit steigender Ionenstärke (siehe 4.1.4) die Effizienz der Reduktion von Cytochrom-*c*-Oxidase abnimmt. Außerdem ist die Lebensdauer des angeregten Ru₂D-Komplexes mit ca. 1 µs fast doppelt so lange wie der von Rubpy mit 0,6 µs (Sutin und Creutz, 1978).

Durch Verwendung des Ru₂D-Komplexes und unter Optimierung der Meßbedingungen für die höchstmögliche Menge an Elektronen, die auf die Cytochrom-*c*-Oxidase übertragen werden können, konnte eine Reduktion des Häm *a* von ca. 10 %-15 % mit einem einzelnen Laserblitz erreicht werden. Die im Einzelblitz-Experiment gemessenen Zeitkonstanten für das Elektronentransfersig-

nal bei 605 nm von $\tau_1 = 1,5 \pm 0,03 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 13,7 \pm 2,4 \mu\text{s}$ geben die Relaxation des Rutheniumkomplexes und den Transfer des Elektrons auf das Häm *a* bei einer Einelektronen-Reduktion des oxidierten Häm *a* wieder. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung sowohl mit den elektrometrisch ermittelten Werten von $\tau = 21,7 \pm 5,5 \mu\text{s}$ (Ruitenberg *et al.*, 2000) als auch mit spektroskopischen Ergebnissen von Verkhovsky *et al.* (2001) ($\tau \sim 11 \mu\text{s}$) und von Zaslavsky *et al.* (1998) ($\tau \sim 9 \mu\text{s}$) bei *R. sphaeroides* Cytochrom-*c*-Oxidase.

Diese umfassende Optimierung der Parameter, welche die Güte des Protonensignals erheblich beeinflussen können, war für die erfolgreiche Messung von Protonenkonzentrationsänderungen im **O**→**E** Schritt des katalytischen Zyklus von entscheidender Bedeutung.

Protonenkonzentrationsänderungen mit Hilfe von pH-sensitiven Farbstoffen können auf zwei verschiedene Arten detektiert werden: Einmal direkt an der Oberfläche des Proteins mit Hilfe von dort kovalent gebundenen pH-Indikatoren oder im Medium, welches das Protein umgibt, mit Hilfe von löslichen pH-Farbstoffen.

In dieser Arbeit wurden beide Experimente durchgeführt. Dabei stellte es sich jedoch heraus, daß die Pufferkapazität der Cytochrom-*c*-Oxidase in der Umgebung der beiden Protoneneintrittsstellen sehr hoch ist. Im Vergleich zu oberflächenmarkiertem Bakteriorhodopsin puffert die Cytochrom-*c*-Oxidase fünfzehn- bis dreißigfach so stark (siehe Kapitel 3.5). Dies läßt vermuten, daß diese Areale der Cytochrom-*c*-Oxidase als Protonen sammelnde Antennen dienen, indem sie durch eine hohe Ansammlung von Carboxylaten und Histidinen Protonen an den Eintrittsstellen festhalten, um sie bei Bedarf direkt in das Proteininnere weiterleiten zu können. Diese Resultate werden durch Ergebnisse von Marantz *et al.* (1998) und Karpefors *et al.* (1998) bestätigt, die besonders dem Eingang des D-Wegs protonensammelnde Eigenschaften zusprechen.

Diese hohe Pufferkapazität der Cytochrom-*c*-Oxidase verhindert allerdings auch die Detektion von Protonenkonzentrationsänderungen an der Oberfläche. Das zu erwartende Signal ist so klein, daß es im Rauschen der Meßkurve nicht mehr zu beobachten ist.

Protonenkonzentrationsänderungen im Medium konnten hingegen mit dem löslichen pH-Indikator Phenolrot verfolgt werden.

Das Auffälligste ist, daß eine Protonenaufnahme schon mit einer Zeitkonstante von ungefähr $1 \mu\text{s}$ erfolgt, zeitgleich mit der Elektronenaufnahme durch Cu_A . Dies gilt sowohl für den Wildtyp als auch für alle drei untersuchten Varianten, D124N, K354M und D124N-K354M. Interessanterweise folgt dieser schnellen Protonenaufnahme eine schrittweise Protonenabgabe im $10 \mu\text{s}$ - und $200 \mu\text{s}$ -Bereich. Die $10 \mu\text{s}$ -Abgabezeit korreliert mit der Elektronentransferkinetik zu Häm *a*. Trotz der sukzessiven Protonenabgabe wurde am Ende des **O**→**E** Schrittes eine Nettoprotonenaufnahme des Enzyms beobachtet. Die Protonenaufnahmestöchiometrie, aufgenommene Protonen je Elektronenübertrag auf Häm *a*, wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{n_{H^+ \text{-Aufnahme}}}{e^-_{\text{Häm a}}} = \frac{\Delta A_{H^+ \text{-Signal}} \varepsilon_{red 605nm} d}{\frac{\Delta A}{\Delta c_{H^+}} \Delta A_{605nm}}$$

Damit wurde eine initiale Protonenaufnahme in der 1 μs -Komponente von 2,6 H^+/e^- in Wildtyp berechnet. Dieser Wert ist bei den Varianten auf ca. 1 H^+/e^- reduziert.

	Wildtyp	D124N	K354M	D124N-K354M
$n_{H^+ \text{-Aufnahme}} / e^-$	2,6	1,0	1,3	0,9

Tab. 5.1: Initiale Protonenaufnahme von Wildtyp und den Varianten je übertragenem Elektron.

Diese Berechnung zeigt, daß im Wildtyp erstaunlicherweise mehr Protonen aufgenommen werden als überhaupt Elektronen auf das Enzym transferiert werden. Aus elektrostatischer Sicht kann dieser Überschuß an Protonen folgendermaßen erklärt werden: Da die initiale Protonenaufnahme zeitgleich mit der Elektronenaufnahme durch Cu_A erfolgt, ist es sehr wahrscheinlich, daß durch Protonenaufnahme die negative Ladung des Elektrons auf der P-Seite neutralisiert wird. Die verbleibenden 1,6 H^+ in Wildtyp können von der N-Seite durch entweder den K- oder den D-Weg aufgenommen werden (siehe Abb. 5.2a).

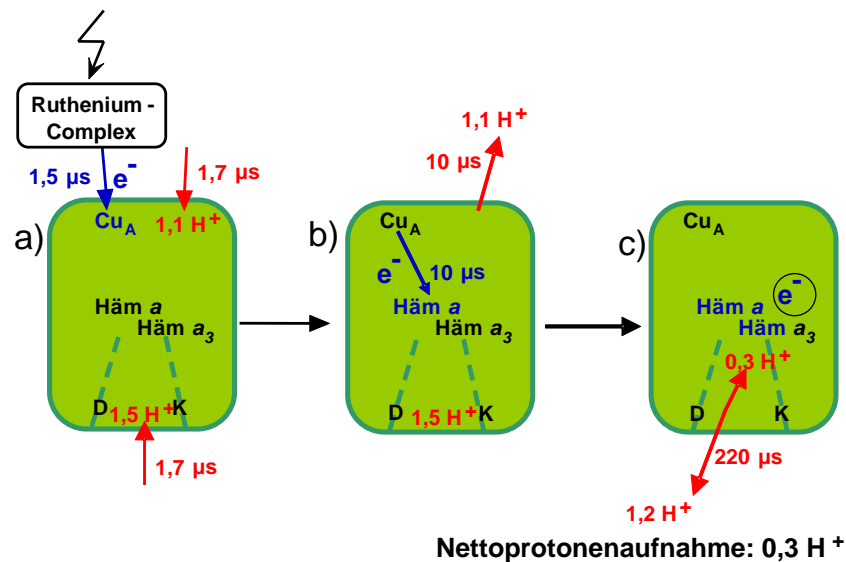


Abb. 5.2: Modell für die Protonenaufnahme- und abgabeschritte während des O→E Schrittes bei wt Cytochrom-c-Oxidase.

Dieses Modell wird von der Beobachtung unterstützt, daß die erste Protonenabgabe von $1,1 \text{ H}^+/\text{COX}$ zeitgleich mit dem Elektronentransfer von Cu_A zu Häm a im Inneren des Enzyms erfolgt (siehe Abb. 5.2b). Die verbleibenden $1,5 \text{ H}^+/\text{COX}$, die wahrscheinlich auf der N-Seite des Proteins aufgenommen werden, stabilisieren dann elektrostatisch die negative Ladung des Elektrons am Häm a .

Mit einer Kinetik von $\tau \sim 220 \mu\text{s}$ wird eine zweite Protonenabgabe von $1,2 \text{ H}^+/\text{COX}$ beobachtet, die mit der Kinetik der elektrogenen Deuteriumeffekt-Phase korreliert, welche von Ruitenberg *et al.* (2000) beobachtet worden ist. Diese Beobachtung und der Verbleib von $0,3 \text{ H}^+/\text{COX}$ im Enzym deuten daraufhin, daß mit einer Zeitkonstante von $200 \mu\text{s}$ ein Teil der von der N-Seite aufgenommenen Protonen von einer noch unbekannt Gruppe X an der Oberfläche in Richtung Häm a transportiert wird (siehe Abb. 5.2c). Die Translokation der $0,3 \text{ H}^+$, die sich bereits im Protein befinden, in Richtung der Häme kann in diesem Experiment nicht direkt detektiert werden, jedoch wird diese Annahme von den Ergebnissen von Ruitenberg *et al.* (2000) gestützt, der die Translokation einer positiven Ladung von der N-Seite in Richtung der Häme mit einer Zeitkonstante von ungefähr $200 \mu\text{s}$ beobachtet hat. Die Anzahl von $0,3 \text{ H}^+$ wird auf der anderen Seite von den Beobachtungen von Verkhovsky *et al.* (1999) gestützt, der eine redox-gebundene protonische Kopplung mit einer Größe von $0,2 - 0,4 \text{ H}^+$ je Häm a/Cu_A Paar ermittelt hat.

In den drei Varianten D124N, K354M und D124N-K354M ist weder die Elektronenaufnahme von Cu_A , noch der darauffolgende Elektronentransfer zu Häm a beeinträchtigt, wie man an den Zeitspuren bei 605 nm sehen kann. Dies wurde auch von Ruitenberg *et al.* (2000) in früheren elektrischen Messungen gefunden. In allen drei Varianten beträgt die initiale Protonenaufnahme jedoch nur ungefähr $1 \text{ H}^+/\text{COX}$. Da die Elektronenaufnahme von Cu_A aber nicht beeinträchtigt ist, erwarten wir analog zu dem Modell von wt Cytochrom- c -Oxidase einen elektrostatischen Ausgleich auf der P-Seite, um das Elektron am Cu_A zu stabilisieren. Die Tatsache, daß in jeder dieser drei Varianten eine Nettoprotonenaufnahme von $0,1$ bzw. $0,2 \text{ H}^+/\text{COX}$ vorhanden ist, deutet daraufhin, daß zumindest für die Einzelvarianten, bei denen nur ein Weg blockiert ist, eine Protonenaufnahme von der N-Seite des Proteins stattfindet. Dabei wird jedoch nur eine geringere Menge an Protonen von der N-Seite des Proteins aufgenommen. Dies ist nicht überraschend, da bei jeder Variante entweder einer von beiden oder sogar beide Protonenaufnahmewege blockiert sind. Zusätzlich führt dieses Ergebnis zu der Folgerung, daß die beiden Protonenwege in ihrer Fähigkeit Protonen aufzunehmen gekoppelt sind.

Folglich wird nach dem Elektronentransfer von Cu_A zu Häm a nur ein Teil der Protonen, die von der P-Seite des Proteins aufgenommen worden sind, um die negative Ladung des Elektrons am Cu_A zu neutralisieren, ins Medium abgegeben. Der zurückbleibende Teil der Protonen auf der P-Seite wird als elektrostatischer Ausgleich benötigt, da nicht genügend Protonen auf der N-Seite vorhanden sind. Jedoch verbleiben bei allen drei Varianten Protonen im Protein.

Dies kann wie folgt erklärt werden (siehe Abb. 5.3 – 5.5):

In *D124N* wird ein kleiner Teil von Protonen, nämlich $0,1 \text{ H}^+/\text{e}^-$ von der N-Seite aufgenommen und wird durch den nicht blockierten K-Weg in Richtung der Häme transloziert. Die Kinetik hierfür ist mit der Kinetik von Wildtyp vergleichbar.

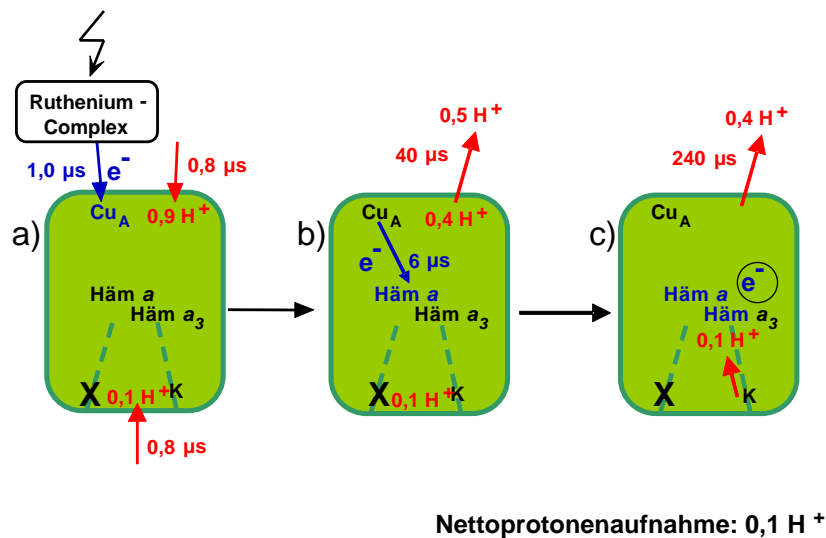


Abb. 5.3: Modell für die Protonenaufnahme- und abgabeschritte während des $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Schrittes bei der D-Weg blockierten Variante *D124N*.

In der Variante *K354M* werden $0,2 \text{ H}^+/\text{e}^-$ von der N-Seite des Proteins aufgenommen. Diese Protonen werden über den D-Weg zu den Hämen transportiert, jedoch mit im Vergleich zu Wildtyp deutlich verlangsamt.

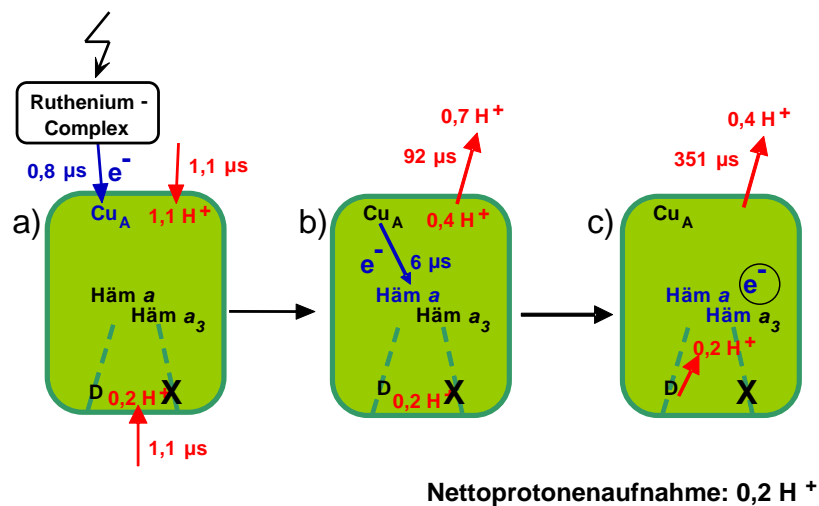


Abb. 5.4: Modell für die Protonenaufnahme- und -abgabeschritte während des $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Schrittes bei der K-Weg blockierten Variante *K354M*.

Der Mechanismus in der Doppelvariante sollte sich jedoch von dem in den beiden Einzelvarianten unterscheiden: Es findet keine Protonenaufnahme von der N-Seite des Proteins statt, da beide Protonenaufnahmewege blockiert sind. Jedoch verbleiben aus elektrostatischen Gründen $0,2 \text{ H}^+/\text{e}^-$ auf der Oberfläche der P-Seite um die Ladung des Elektrons am Häm a auszugleichen.

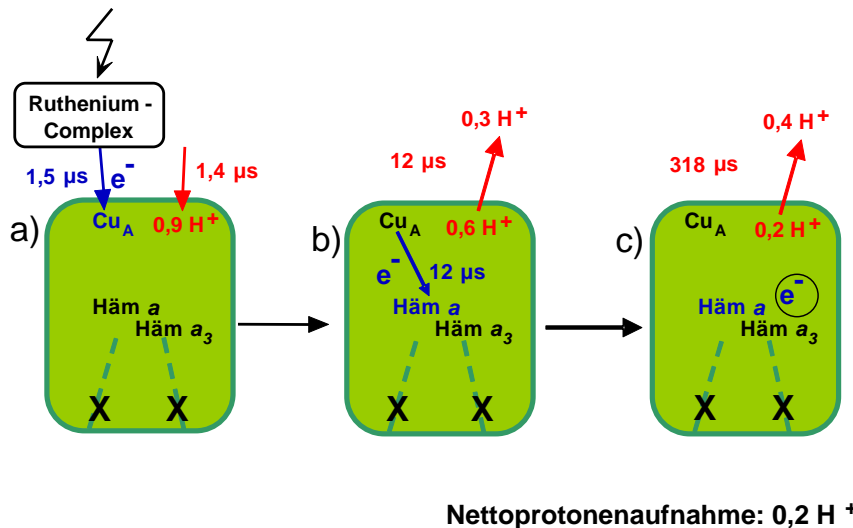


Abb. 5.5: Modell für die Protonenaufnahme- und -abgabeschritte während des $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Schrittes bei der K- und D-Weg blockierten Variante D124N-K354M.

Mit Hilfe von in Liposomen inkorporierter Cytochrom- c -Oxidase konnte gezeigt werden, daß die Nettoprotonenaufnahme in Wildtyp in der Tat von der N-Seite aus stattfindet. Dieses entscheidende Ergebnis unterstützt ebenfalls unsere Modellvorstellungen für den Mechanismus der multiplen Protonentransferschritte im $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Übergang. Aus den Ergebnissen für Cytochrom- c -Oxidase Wildtyp und Varianten läßt sich das folgende allgemeine Modell (siehe Abb. 5.6) für den Funktionsmechanismus im $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Schritt des katalytischen Zyklus der Cytochrom- c -Oxidase aufstellen:

Die Aufnahme des Elektrons durch Cu_A initiiert eine Protonenaufnahme von beiden Seiten des Proteins. Die Protonenaufnahme von der P-Seite erfolgt aus elektrostatischen Gründen, während auf der N-Seite eine noch unbekannte Gruppe X auf der Oberfläche in die Protonenaufnahme involviert ist. Der Transfer des Elektrons zum Häm a bewirkt eine Protonenabgabe auf der P-Seite, und ein geringer Teil der ursprünglich aufgenommenen Protonen verbleibt an der Oberfläche, um die negative Ladung des Elektrons von der P-Seite aus zu stabilisieren. Im zweiten Protonenabgabeschritt mit einer Kinetik von ungefähr $200 \mu\text{s}$ werden die restlichen Protonen auf der P-Seite abgegeben und auf der N-Seite werden $0,3 \text{ H}^+/\text{COX}$ zu den Hämen transduziert, währenddessen der Überschuß an der N-Seite wieder abgegeben wird. Das heißt, es verbleiben nur $0,3 \text{ H}^+/\text{COX}$ im Enzym, die für weitere elektrochemische Reaktionen zur Verfügung stehen. Dies geht konform mit

den Beobachtungen von Verkhovsky *et al.* 1999, die eine redox-gebundene protonische Kopplung mit einer Größe von $0,2 - 0,4 \text{ H}^+$ je Häm a/Cu_A Paar, abhängig vom pH, ermittelt haben.

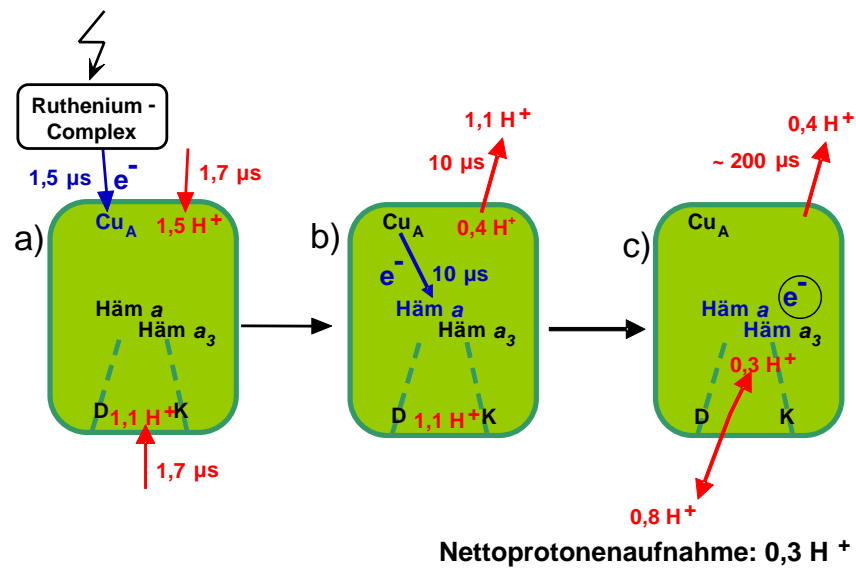


Abb. 5.6: Zusammenfassendes Modell für die Protonenaufnahme- und -abgabeschritte der Cytochrom-c-Oxidase während des $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Schrittes des katalytischen Zyklus.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Untersuchung der Protonenbewegung während des O→E Schrittes im katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c*-Oxidase von *P. denitrificans*.

Die Zuordnung der Protonenbewegung zu den einzelnen Schritten des katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c*-Oxidase ist immer noch ein Gegenstand zahlreicher Kontroversen. Obwohl von Ruitenbergh *et al.* (2000) durch Spannungsmessungen gezeigt wurde, daß die Reduktion von Häm *a* während des ersten Elektrontransfers in das oxidierte Enzyme eine schnelle Protonenaufnahme von der gegenüberliegenden der Membran bewirkt, wurden diese Ergebnisse angezweifelt. Daher sollte mit einer unabhängigen und direkten Methode herausgefunden werden, ob Protonen bereits während des ersten Schrittes des katalytischen Zyklus aufgenommen werden.

Dazu wurde ns-zeitaufgelöste Blitzlicht-Absorptionsspektroskopie in Kombination mit pH-sensitiven Farbstoffen genutzt, und zwar sowohl mit Fluorescein kovalent an der Proteinoberfläche gebunden als auch mit Phenolrot löslich im Medium vorliegend.

Zur kovalenten Kopplung von thiolreaktiven Farbstoffen mußten zuerst die nötigen Voraussetzungen geschaffen werden. Dazu wurde in dieser Arbeit ein Mutagenesesystems für sowohl Untereinheit I als auch Untereinheit II etabliert und eine oberflächencysteinfreien Variante und elf Einzelcystein-Varianten hergestellt, exprimiert und aufgereinigt sowie die Enzymaktivitäten überprüft.

Danach wurde ein Protokoll zur Kopplung der Einzelcysteinvarianten mit Iodoacetamidfluorescein ausgearbeitet und die Varianten Fluorescein-markiert. Dabei zeigte es sich, daß nur sieben Varianten erfolgreich mit IAF reagierten.

Mittels dieser AF-markierten Varianten konnte die Pufferkapazität an der Oberfläche der Cytochrom-*c*-Oxidase bestimmt werden. Es zeigte sich, daß die Pufferkapazität des Enzyms in Lösung im Vergleich zu Bakteriorhodopsin dreimal so groß ist, an der Oberfläche sogar 10-15mal so groß. Dies deutet auf eine hohe Anzahl protonierbarer Gruppen um die für die Markierung ausgewählten Aminosäuren im Bereich der Eintrittsstellen der Protonen hin.

Die gezielte Übertragung eines Elektrons auf die Cytochrom-*c*-Oxidase erfolgte durch Licht anregbare Rutheniumkomplexe. In unserem Meßsystem war die Elektronentransfereffizienz von Ru₂D am höchsten. Nach einer sorgfältigen Optimierung der Meßbedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke und Energie des Lasers konnte eine 10-15 %ige Reduktion von Häm *a* mit einer Zeitkonstanten von $\tau = 13,7 \pm 2,4 \mu\text{s}$ nachgewiesen werden.

Die Protonenkonzentrationsänderungen im Medium konnten durch Phenolrot verfolgt werden. Durch den Vergleich von Funktionsvarianten, bei denen jeweils einer oder beide Protoneneingangswege blockiert sind, konnte ein Modell für die Protonenaufnahme und -abgabe während der Einelektronen-Reduktion der Cytochrom-*c*-Oxidase entwickelt werden. Dies konnte durch Messungen an in Liposomen inkorporierter wt Cytochrom-*c*-Oxidase verifiziert werden. *Die Nettopro-*

tonenaufnahme von der N-Seite der Cytochrom-c-Oxidase beträgt somit $0,3 H^+$ für das im $O \rightarrow E$ Schritt aufgenommene Elektron.

Nachdem die Protonenkonzentrationsänderungen an der Oberfläche mit den AF-markierten Varianten leider nicht nachzuweisen waren, wurde die Variante CS-I302C-AF dazu genutzt, die Oberflächenladungsdichte an der N-Seite der Cytochrom-c-Oxidase zu bestimmen. Die Oberflächenladungsdichte auf der N-Seite des Enzyms in der Nähe zum Eingang des K-Wegs ist negativ und beträgt $0,5 e^-/1000 \text{ \AA}^2$.

7 Literaturverzeichnis

- Alexiev, U., T. Marti, M. P. Heyn, H. G. Khorana und P. Scherrer (1994). "Surface charge of bacteriorhodopsin detected with covalently bound pH indicators at selected extracellular and cytoplasmic sites." Biochemistry **33**: 298-306.
- Alexiev, U., R. Mollaaghababa, P. Scherrer, H. G. Khorana und M. P. Heyn (1995). "Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 372-376.
- Antonini, G., F. Malatesta, P. Sarti und M. Brunori (1993). "Proton pumping by cytochrome oxidase as studied by time-resolved stopped-flow spectrophotometry." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 5949-5953.
- Baker, S. C., S. J. Ferguson, B. Ludwig, M. D. Page, O. M. Richter und R. J. van Spanning (1998). "Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility." Microbiol Mol Biol Rev **62**: 1046-1078.
- Bethesda, R. L. (1986). "*E. coli* DH5a competent cells." Bethesda Research Laboratories Focus **8**: 9.
- Blair, D. F., D. F. Bocian, G. T. Babcock und S. I. Chan (1982). "Evidence for modulation of the heme absorptions of cytochrome c oxidase by metal-metal interactions." Biochemistry **21**: 6928-6935.
- Brandt, U. (1997). "Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction." Biochim Biophys Acta **1318**: 79-91.
- Brandt, U., S. Kerscher, S. Drose, K. Zwicker und V. Zickermann (2003). "Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism?" FEBS Lett **545**: 9-17.
- Brandt, U. und B. Trumppower (1994). "The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria." Crit Rev Biochem Mol Biol **29**: 165-197.
- Bratton, M. R., M. A. Pressler und J. P. Hosler (1999). "Suicide inactivation of cytochrome c oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site." Biochemistry **38**: 16236-16245.
- Budiman, K., A. Kannt, S. Lyubenova, O. M. Richter, B. Ludwig, H. Michel und F. MacMillan (2004). "Tyrosine 167: the origin of the radical species observed in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide in *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **43**: 11709-11716.
- Buse, G., T. Soulimane, M. Dewor, H. E. Meyer und M. Bluggel (1999). "Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase." Protein Sci **8**: 985-990.

- Chance, B., C. Saronio und J. S. Leigh, Jr. (1975). "Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen." J Biol Chem **250**: 9226-9237.
- Cohen, S. N., A. C. Chang und L. Hsu (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**: 2110-2114.
- Darley-Usmar, V., R. Capaldi, S. Takamiya, F. Millett, M. Wilson, F. Malatesta und P. Sarti (1987). Mitochondria - A Practical Approach. Oxford, IRL Press.
- De Gier, J. W., R. J. Van Spanning, L. F. Oltmann und A. H. Stouthamer (1992). "Oxidation of methylamine by a Paracoccus denitrificans mutant impaired in the synthesis of the bcl complex and the aa3-type oxidase. Evidence for the existence of an alternative cytochrome c oxidase in this bacterium." FEBS Lett **306**: 23-26.
- Devries, G. E., N. Harms, J. Hoogendijk und A. H. Stouthamer (1989). "Isolation and Characterization of Paracoccus-Denitrificans Mutants with Increased Conjugation Frequencies and Pleiotropic Loss of a (Ngatcn) DNA-Modifying Property." Archives of Microbiology **152**: 52-57.
- Dürr, K. (2003). Gerichtete Mutagenese im D-Kanal der Untereinheit I der aa3-Cytochrom c Oxidase aus Paracoccus denitrificans. Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe Universität: 81.
- Echabe, I., T. Haltia, E. Freire, F. M. Goni und J. L. Arrondo (1995). "Subunit III of cytochrome c oxidase influences the conformation of subunits I and II: an infrared study." Biochemistry **34**: 13565-13569.
- Fabian, M., W. W. Wong, R. B. Gennis und G. Palmer (1999). "Mass spectrometric determination of dioxygen bond splitting in the "peroxy" intermediate of cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 13114-13117.
- Ferguson, S. J. und M. C. Sorgato (1982). "Proton electrochemical gradients and energy-transduction processes." Annu Rev Biochem **51**: 185-217.
- Flock, D. und V. Helms (2002). "Protein--protein docking of electron transfer complexes: cytochrome c oxidase and cytochrome c." Proteins **47**: 75-85.
- Geren, L., S. Hahm, B. Durham und F. Millett (1991). "Photoinduced electron transfer between cytochrome c peroxidase and yeast cytochrome c labeled at Cys 102 with (4-bromomethyl-4'-methylbipyridine)[bis(bipyridine)]ruthenium2+." Biochemistry **30**: 9450-9457.
- Gerhus, E., P. Steinrucke und B. Ludwig (1990). "Paracoccus denitrificans cytochrome c1 gene replacement mutants." J Bacteriol **172**: 2392-2400.
- Gilderson, G., L. Salomonsson, A. Aagaard, J. Gray, P. Brzezinski und J. Hosler (2003). "Subunit III of cytochrome c oxidase of Rhodobacter sphaeroides is required to maintain rapid proton uptake through the D pathway at physiologic pH." Biochemistry **42**: 7400-7409.

- Haltia, T., A. Puustinen und M. Finel (1988). "The *Paracoccus denitrificans* cytochrome aa3 has a third subunit." *Eur J Biochem* **172**: 543-546.
- Haltia, T., M. Saraste und M. Wikstrom (1991). "Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study." *Embo J* **10**: 2015-2021.
- Han, S., Y. C. Ching und D. L. Rousseau (1990). "Ferryl and hydroxy intermediates in the reaction of oxygen with reduced cytochrome c oxidase." *Nature* **348**: 89-90.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanahan, D. (1985). *Techniques for Transformation of Escherichia-Coli*. Glover, D. M. (Ed.). *DNA Cloning, Vol. 1. A Practical Approach*. Irl Press: Oxford, England; Washington, D.C., USA. Illus. Paper: 109-136.
- Hatefi, Y. (1976). "Composition and enzymatic properties of the mitochondrial NADH- and NADPH-ubiquinone reductase (complex I)." *Adv Exp Med Biol* **74**: 150-160.
- Hatefi, Y. und K. E. Stempel (1967). "Resolution of complex I (DPNH-coenzyme Q reductase) of the mitochondrial electron transfer system." *Biochem Biophys Res Commun* **26**: 301-308.
- Haugland, R. P. (2002). *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Eugene, Molecular Probes.
- Hellwig, P., U. Pfitzner, J. Behr, B. Rost, R. P. Pesavento, W. V. Donk, R. B. Gennis, H. Michel, B. Ludwig und W. Mantele (2002). "Vibrational modes of tyrosines in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*: FTIR and electrochemical studies on Tyr-D4-labeled and on Tyr280His and Tyr35Phe mutant enzymes." *Biochemistry* **41**: 9116-9125.
- Hill, B. C. (1994). "Modeling the sequence of electron transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrome c oxidase with oxygen." *J Biol Chem* **269**: 2419-2425.
- Hiser, L., M. Di Valentin, A. G. Hamer und J. P. Hosler (2000). "Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase." *J Biol Chem* **275**: 619-623.
- Hosler, J. P. (2004). "The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I." *Biochim Biophys Acta* **1655**: 332-339.
- Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig und H. Michel (1995). "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Nature* **376**: 660-669.
- John, P. und F. R. Whatley (1975). "*Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion." *Nature* **254**: 495-498.
- Junge, W. und S. McLaughlin (1987). "The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement." *Biochim Biophys Acta* **890**: 1-5.

- Kannt, A., C. R. Lancaster und H. Michel (1998). "The coupling of electron transfer and proton translocation: electrostatic calculations on *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase." *Biophys J* **74**: 708-721.
- Karpefors, M., P. Adelroth, A. Aagaard, H. Sigurdson, M. Svensson Ek und P. Brzezinski (1998). "Electron-proton interactions in terminal oxidases." *Biochim Biophys Acta* **1365**: 159-169.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Legerski, R. J. und D. L. Robberson (1985). "Analysis and optimization of recombinant DNA joining reactions." *J Mol Biol* **181**: 297-312.
- Lindsay, J. G., C. S. Owen und D. F. Wilson (1975). "The invisible copper of cytochrome c oxidase. pH and ATP dependence of its midpoint potential and its role in the oxygen reaction." *Arch Biochem Biophys* **169**: 492-505.
- Lodish, H., A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore und J. Darnell (2000). Cellular Energetics: Glycolysis, Aerobic Oxidation, and Photosynthesis. *Molecular Cell Biology*. New York, W.H. Freeman & Company: 616-645.
- Lotscher, H. R., C. deJong und R. A. Capaldi (1984). "Interconversion of high and low adenosinetriphosphatase activity forms of *Escherichia coli* F1 by the detergent lauryldimethylamine oxide." *Biochemistry* **23**: 4140-4143.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Ludwig, B. (1986). "Cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Methods Enzymol* **126**: 153-159.
- Ludwig, B. (1992). "Terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*." *Biochim Biophys Acta* **1101**: 195-197.
- Ludwig, B. und G. Schatz (1980). "A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa₃) from *Paracoccus denitrificans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 196-200.
- MacMillan, F., K. Budiman, H. Angerer und H. Michel (2006). "The role of tryptophan 272 in the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase." *FEBS Lett* **580**: 1345-1349.
- MacMillan, F., A. Kannt, J. Behr, T. Prisner und H. Michel (1999). "Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide." *Biochemistry* **38**: 9179-9184.
- Malatesta, F., P. Sarti, G. Antonini, B. Vallone und M. Brunori (1990). "Electron transfer to the binuclear center in cytochrome oxidase: catalytic significance and evidence for an additional intermediate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7410-7413.
- Marantz, Y., E. Nachliel, A. Aagaard, P. Brzezinski und M. Gutman (1998). "The proton collecting function of the inner surface of cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8590-8595.

- Margoliash, E. und N. Frohwirt (1959). "Spectrum of horse-heart cytochrome c." Biochem J **71**: 570-572.
- Margulis, L. (1970). Origin of Eukaryotic Cells. New Haven, Connecticut, Yale University Press.
- Meselson, M. und R. Yuan (1968). "DNA restriction enzyme from E. coli." Nature **217**: 1110-1114.
- Michael, S. F. (1994). "Mutagenesis by incorporation of a phosphorylated oligo during PCR amplification." Biotechniques **16**: 410-412.
- Michel, H. (1998). "The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase [127e comments]." Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 12819-12824.
- Michel, H. (1999). "Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping--a discussion." Biochemistry **38**: 15129-15140.
- Michelsen, B. K. (1995). "Transformation of Escherichia coli increases 260-fold upon inactivation of T4 DNA ligase." Anal Biochem **225**: 172-174.
- Mills, D. A., Z. Tan, S. Ferguson-Miller und J. Hosler (2003). "A role for subunit III in proton uptake into the D pathway and a possible proton exit pathway in Rhodobacter sphaeroides cytochrome c oxidase." Biochemistry **42**: 7410-7417.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.
- Mitchell, R. und P. R. Rich (1994). "Proton uptake by cytochrome c oxidase on reduction and on ligand binding." Biochim Biophys Acta **1186**: 19-26.
- Moody, A. J. (1991). "Ligation and electronation states of cytochrome-c oxidase in relation to other oxidases and peroxidases." Biochem Soc Trans **19**: 617-622.
- Muller, M., M. Thelen, P. O'Shea und A. Azzi (1986). "Functional reconstitution of proton-pumping cytochrome-c oxidase in phospholipid vesicles." Methods Enzymol **126**: 78-87.
- Nicoletti, F., H. Witt, B. Ludwig, M. Brunori und F. Malatesta (1998). "Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: a kinetic study on the two- and four-subunit complexes." Biochim Biophys Acta **1365**: 393-403.
- Nilsson, T. (1992). "Photoinduced electron transfer from tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium to cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 6497-6501.
- Ostermeier, C., A. Harrenga, U. Ermler und H. Michel (1997). "Structure at 2.7 Å resolution of the Paracoccus denitrificans two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 10547-10553.
- Pan, L. P., S. Hibdon, R. Q. Liu, B. Durham und F. Millett (1993). "Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome c derivatives and cytochrome c oxidase." Biochemistry **32**: 8492-8498.

- Pfützner, U., K. Hoffmeier, A. Harrenga, A. Kannt, H. Michel, E. Bamberg, O. M. Richter und B. Ludwig (2000). "Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **39**: 6756-6762.
- Pfützner, U., A. Odenwald, T. Ostermann, L. Weingard, B. Ludwig und O. M. Richter (1998). "Cytochrome c oxidase (heme aa₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I." J Bioenerg Biomembr **30**: 89-97.
- Pheiffer, B. H. und S. B. Zimmerman (1983). "Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions." Nucleic Acids Res **11**: 7853-7871.
- Poole, R. K., B. S. Baines und H. D. Williams (1985). "Sensor sensationalism? Alternative views on the nature and role of 'cytochrome a1' in bacteria." Microbiol Sci **2**: 21-23.
- Proshlyakov, D. A., T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa und T. Kitagawa (1996). "Resonance Raman/absorption characterization of the oxo intermediates of cytochrome c oxidase generated in its reaction with hydrogen peroxide: pH and H₂O₂ concentration dependence." Biochemistry **35**: 8580-8586.
- Puettner, I., E. Carafoli und F. Malatesta (1985). "Spectroscopic and functional properties of subunit III-depleted cytochrome oxidase." J Biol Chem **260**: 3719-3723.
- Pufahl, R. A., C. P. Singer, K. L. Peariso, S. J. Lin, P. J. Schmidt, C. J. Fahrni, V. C. Culotta, J. E. Penner-Hahn und T. V. O'Halloran (1997). "Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1." Science **278**: 853-856.
- Raitio, M., T. Jalli und M. Saraste (1987). "Isolation and analysis of the genes for cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*." EMBO J **6**: 2825-2833.
- Raitio, M., J. M. Pispä, T. Metso und M. Saraste (1990). "Are there isoenzymes of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*?" FEBS Lett **261**: 431-435.
- Richter, O. M., K. L. Durr, A. Kannt, B. Ludwig, F. M. Scandurra, A. Giuffrè, P. Sarti und P. Hellwig (2005). "Probing the access of protons to the K pathway in the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase." Febs J **272**: 404-412.
- Richter, O. M., J. S. Tao, A. Turba und B. Ludwig (1994). "A cytochrome ba₃ functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison." J Biol Chem **269**: 23079-23086.
- Ruitenbergh, M. (2001). Elektronen- und Protonentransport der Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*. Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften. Frankfurt/Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität: 113.
- Ruitenbergh, M., A. Kannt, E. Bamberg, B. Ludwig, H. Michel und K. Fendler (2000). "Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 4632-4636.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saraste, M. (1990). "Structural features of cytochrome oxidase." Q Rev Biophys **23**: 331-366.
- Saraste, M., L. Holm, L. Lemieux, M. Lubben und J. van der Oost (1991). "The happy family of cytochrome oxidases." Biochem Soc Trans **19**: 608-612.
- Saraste, M., T. Penttila und M. Wikstrom (1981). "Quaternary structure of bovine cytochrome oxidase." Eur J Biochem **115**: 261-268.
- Saraste, M., M. Raitio, T. Jalli und A. Peramaa (1986). "A gene in *Paracoccus* for subunit III of cytochrome oxidase." FEBS Lett **206**: 154-156.
- Scherrer, P., U. Alexiev, T. Marti, H. G. Khorana und M. P. Heyn (1994). "Covalently bound pH-indicator dyes at selected extracellular or cytoplasmic sites in bacteriorhodopsin. 1. Proton migration along the surface of bacteriorhodopsin micelles and its delayed transfer from surface to bulk." Biochemistry **33**: 13684-13692.
- Schultz, B. E. und S. I. Chan (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes." Annu Rev Biophys Biomol Struct **30**: 23-65.
- Soloz, M., E. Carafoli und B. Ludwig (1982). "The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system." J Biol Chem **257**: 1579-1582.
- Steinrucke, P., E. Gerhus und B. Ludwig (1991). "Paracoccus denitrificans mutants deleted in the gene for subunit II of cytochrome c oxidase also lack subunit I." J Biol Chem **266**: 7676-7681.
- Steverding, D., D. Kohnke, B. Ludwig und B. Kadenbach (1993). "Proton slippage in cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans*. Membrane-potential measurements with the two-subunit and three-subunit enzyme." Eur J Biochem **212**: 827-831.
- Stouthamer, A. H. (1991). "Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*." J Bioenerg Biomembr **23**: 163-185.
- Stouthamer, A. H., F. C. Boogerd und H. W. van Verseveld (1982). "The bioenergetics of denitrification." Antonie Van Leeuwenhoek **48**: 545-553.
- Sutin, N. und C. Creutz (1978). Properties and Reactivities of the Luminescent Excited States of Polypyridine Complexes of Ruthenium(II) and Osmium(II).
- Thelen, M., P. S. O'Shea, G. Petrone und A. Azzi (1985). "Proton translocation by a native and subunit III-depleted cytochrome c oxidase reconstituted into phospholipid vesicles. Use of fluorescein-phosphatidylethanolamine as an intravesicular pH indicator." J Biol Chem **260**: 3626-3631.
- Thompson, D. A., L. Gregory und S. Ferguson-Miller (1985). "Cytochrome c oxidase depleted of subunit III: proton-pumping, respiratory control, and pH dependence of the midpoint potential of cytochrome a." J Inorg Biochem **23**: 357-364.

- Trumpower, B. L. (1976). "Evidence for a protonmotive Q cycle mechanism of electron transfer through the cytochrome b-c1 complex." Biochem Biophys Res Commun **70**: 73-80.
- Trumpower, B. L. (1990). "The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex." J Biol Chem **265**: 11409-11412.
- Trumpower, B. L. und R. B. Gennis (1994). "Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation." Annu Rev Biochem **63**: 675-716.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono und S. Yoshikawa (1995). "Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science **269**: 1069-1074.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono und S. Yoshikawa (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science **272**: 1136-1144.
- Turchin, A. und J. F. Lawler, Jr. (1999). "The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis." Biotechniques **26**: 672-676.
- van der Oost, J., T. Haltia, M. Raitio und M. Saraste (1991). "Genes coding for cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*." J Bioenerg Biomembr **23**: 257-267.
- Van Spanning, R. J., A. P. de Boer, W. N. Reijnders, J. W. De Gier, C. O. Delorme, A. H. Stouthamer, H. V. Westerhoff, N. Harms und J. van der Oost (1995). "Regulation of oxidative phosphorylation: the flexible respiratory network of *Paracoccus denitrificans*." J Bioenerg Biomembr **27**: 499-512.
- Van Verseveld, H. W., M. Braster, F. C. Boogerd, B. Chance und A. H. Stouthamer (1983). "Energetic Aspects of Growth of *Paracoccus-Denitrificans* - Oxygen-Limitation and Shift from Anaerobic Nitrate-Limitation to Aerobic Succinate-Limitation - Evidence for a New Alternative Oxidase, Cytochrome-A1." Archives of Microbiology **135**: 229-236.
- Verkhovskiy, M. I., A. Jasaitis, M. L. Verkhovskaya, J. E. Morgan und M. Wikstrom (1999). "Proton translocation by cytochrome c oxidase." Nature **400**: 480-483.
- Verkhovskiy, M. I., N. Belevich, J. E. Morgan und M. Wikstrom (1999). "Proton linkage of cytochrome a oxidoreduction in carbon monoxide-treated cytochrome c oxidase." Biochim Biophys Acta **1412**: 184-189.
- Verkhovskiy, M. I., A. Tuukkanen, C. Backgren, A. Puustinen und M. Wikstrom (2001). "Charge translocation coupled to electron injection into oxidized cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Biochemistry **40**: 7077-7083.
- Wikstrom, M. (1977). "Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria." Nature **266**: 271-273.

- Wikstrom, M. (1981). "Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **78**: 4051-4054.
- Wikstrom, M. (1989). "Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping." Nature **338**: 776-778.
- Wikstrom, M. (2004). "Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump." Biochim Biophys Acta **1655**: 241-247.
- Wikström, M. (1987). "Insight into mechanism of cellular respiration from its partial reversal in mitochondria." Chemica Scripta **27B**: 53-58.
- Wikstrom, M. und M. I. Verkhovsky (2002). "Proton translocation by cytochrome c oxidase in different phases of the catalytic cycle." Biochim Biophys Acta **1555**: 128-132.
- Witt, H. und B. Ludwig (1997). "Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*." J Biol Chem **272**: 5514-5517.
- Witt, H., F. Malatesta, F. Nicoletti, M. Brunori und B. Ludwig (1998a). "Cytochrome-c-binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*." Eur J Biochem **251**: 367-373.
- Witt, H., F. Malatesta, F. Nicoletti, M. Brunori und B. Ludwig (1998b). "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**: 5132-5136.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**: 103-119.
- Yoshikawa, S., K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. J. Fei, C. P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki und T. Tsukihara (1998a). "Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase." Science **280**: 1723-1729.
- Yoshikawa, S., K. Shinzawa-Itoh und T. Tsukihara (1998b). "Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution." J Bioenerg Biomembr **30**: 7-14.
- Zaslavsky, D., R. C. Sadoski, K. Wang, B. Durham, R. B. Gennis und F. Millett (1998). "Single electron reduction of cytochrome c oxidase compound F: resolution of partial steps by transient spectroscopy." Biochemistry **37**: 14910-14916.
- Zickermann, I., O. S. Tautu, T. A. Link, M. Korn, B. Ludwig und O. M. Richter (1997). "Expression studies on the ba3 quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A bb3 variant is enzymatically inactive." Eur J Biochem **246**: 618-624.

8 Abkürzungen

3CP	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, freies Radikal
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BR	Bakteriorhodopsin
COX	Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase
COX-AF	Fluorescein-markierte Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase
CS	COX-Variante ohne reaktive Cysteine
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
Flu	Fluorescein
IAF	5-Iodoacetamidofluorescein
KP	Kaliumphosphatpuffer
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LM	Laurylmaltosid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
ORF	<i>open reading frame</i> / offener Leserahmen
<i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
RCR	<i>Respiratory Control Ratio</i> / Atmungskontrollrate
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RT	Raumtemperatur
Rubpy	Tris(2,2'-bipyridyl)Ruthenium(II)
RuCyt _c	Imidazol(2,2'-bipyridyl)Ruthenium-His ₃₉ -Cytochrom <i>c</i>
Ru ₂ D	[Ruthenium(2,2'-bipyridin) ₂] ₂ quarterpyridin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
U	<i>Units</i> / Einheiten
wt	Wildtyp

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kristina Anneliese Dina Kirchberg
Geboren am: 31. Oktober 1974 in Trier

Schulbildung

1981-1985 Grundschole St. Michael, Zemmer
1981 – 1994 Angela-Merici-Gymnasium, Trier
Juni 1994 Abitur

Studium

1994 – 2000 Ruhr-Universität-Bochum, Studium der Biochemie
April 2000 Diplom
Diplomarbeit angefertigt am Institut für Physiologische Chemie, AG Zellbiochemie
(Prof. Dr. Wolf-H. Kunau)
„Strukturanalyse des menschlichen PTS1-Rezeptors Pex5p“

Promotion

Seit Mai 2000 Doktorarbeit am Max-Planck Institut für Biophysik, Abt. Molekulare Membranbiologie (Prof. Dr. Hartmut Michel), Frankfurt am Main
„Untersuchung der Protonenbewegung während des **O**→**E** Schrittes im katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*“

10 Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit wurde von vielen Personen maßgeblich beeinflusst und gefördert.

Ich möchte mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Hartmut Michel für die Bereitstellung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe,

Frau PD Dr. Ulrike Alexiev für die Möglichkeit, ihre Meßapparatur zu nutzen und für stetes Engagement und Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig für viele hilfreiche Diskussionen,

Christian Bamann, Klaus Hoffmeier und Hannelore Müller für tatkräftige Unterstützung,

Meinen „beiden Laboren“ für jegliche Hilfe und liebevolle Aufmunterung,

Und natürlich meinen Eltern, ohne deren Liebe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.