



**Biochemische Charakterisierung der
Cytochrom c Oxidase Biogenesefaktoren
CtaA und Surf1**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Achim Hannappel

aus Diez

Frankfurt am Main 2011

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Prof. Dr. Andreas Reichert

Datum der Disputation: _____

Für meine Familie

„Irrtümer sind die Stationen auf dem Weg zur Weisheit.“

Fjodor Dostojewski, russischer Schriftsteller (1821-1881)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die mitochondriale Atmungskette.....	2
1.2	<i>Paracoccus denitrificans</i> als Modellorganismus.....	5
1.3	Die aa_3-Cytochrom c Oxidase.....	7
1.4	Biogenese der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase	9
1.4.1	Assemblierung der <i>core</i> -Untereinheiten I, II und III	12
1.4.2	Die Biogenesefaktoren CtaA und Surf1	16
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	21
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Materialien.....	23
2.1.1	Geräteliste	23
2.1.2	EDV	24
2.1.2.1	Programme	24
2.1.2.2	Datenbanken.....	24
2.1.3	Chemikalien	25
2.1.4	Chromatographiematerialien.....	26
2.1.5	Größenstandards.....	26
2.1.6	Proteine	27
2.1.6.1	Antikörper / Antiseren	27
2.1.6.2	Enzyme für die Molekularbiologie	27
2.1.6.3	Allgemeine Proteine.....	27
2.1.7	Nukleinsäuren	28
2.1.7.1	Vorhandene Plasmide.....	28
2.1.7.2	Erstellte Plasmide.....	29
2.1.7.3	Oligonukleotide.....	31
2.1.8	Mikroorganismen	32

Inhaltsverzeichnis

2.1.8.1	<i>Escherichia coli</i> K12-Stämme	32
2.1.8.2	<i>Paracoccus denitrificans</i> -Stämme	34
2.1.9	Antibiotika.....	34
2.1.10	Kulturmedien.....	35
2.1.11	Puffer und Lösungen	35
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1	Bakterienanzucht und Lagerung.....	36
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“).....	36
2.2.3	Restriktion von DNA	37
2.2.4	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	38
2.2.5	Auffüllen von DNA-Überhängen (Klenow <i>fill-in</i>).....	38
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	39
2.2.7	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	40
2.2.8	Ligation	40
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.10	Phosphorylierung von Primern.....	42
2.2.11	Gerichtete Mutagenese.....	42
2.2.12	DNA-Sequenzierung	44
2.2.13	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
2.2.14	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen.....	45
2.2.15	Konjugation (<i>Triparentales Mating</i>).....	45
2.3	Proteinbiochemische Methoden	46
2.3.1	Analytische Membranpräparation.....	46
2.3.1.1	<i>E. coli</i> Testexpression	47
2.3.1.2	<i>Paracoccus</i> Kulturen.....	48
2.3.2	Membranpräparation im großen Maßstab	48
2.3.2.1	<i>E. coli</i> Kulturen	48
2.3.2.2	<i>Paracoccus</i> Kulturen.....	50
2.3.3	Solubilisierung von Membranen	51
2.3.3.1	Solubilisierung zur Isolierung von COX UE I.....	51
2.3.3.2	Solubilisierung zur Isolierung von CtaA.....	52
2.3.3.3	Solubilisierung zur Isolierung von Surf1	52
2.3.3.4	Solubilisierung zur Isolierung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	52
2.3.4	Säulenchromatographie.....	53

Inhaltsverzeichnis

2.3.4.1	Isolierung von COX UE I mittels IMAC	53
2.3.4.2	Isolierung von CtaA mittels IMAC.....	54
2.3.4.3	Isolierung von Surf1 mittels IMAC	55
2.3.4.4	Klassische Isolierung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	56
2.3.4.5	Analytische Gelfiltration.....	57
2.3.4.6	Präparative Gelfiltration.....	58
2.3.5	Proteinbestimmung nach Lowry	58
2.3.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	59
2.3.6.1	Tris-Glycin-System nach Laemmli	59
2.3.7	Färbungen für Gele	61
2.3.7.1	Coomassie-Färbung	61
2.3.7.2	Silberfärbung.....	62
2.3.7.3	Häm-Färbung	62
2.3.8	Western Blot	63
2.3.9	Häm-Extraktion.....	65
2.3.10	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	66
2.3.11	<i>In vitro</i> Häm-Transfer Assay	67
2.4	Biophysikalische Methoden	68
2.4.1	Enzymaktivitätstests.....	68
2.4.1.1	Reduktion von Cytochrom <i>c</i>	68
2.4.1.2	Aktivitätsmessung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	69
2.4.2	Spektroskopische Methoden	70
2.4.2.1	Native Redoxspektren	70
2.4.2.2	Pyridin-Hämochromspektren	70
3	Ergebnisse	73
3.1	Bioinformatische Analyse von CtaA und Surf1	73
3.1.1	CtaA	73
3.1.1.1	Transmembran-Vorhersage für CtaA.....	73
3.1.1.2	Sequenzalignment für CtaA	74
3.1.1.3	Phylogenetische Beziehung verschiedener CtaA Homologe.....	77
3.1.2	Sekundärstruktur-Vorhersage für Surf1	77
3.2	Synthetische COX-Reifungsoperons für <i>E. coli</i>.....	79
3.2.1	Konstruktion der Reifungsplasmide.....	79

Inhaltsverzeichnis

3.2.2	Analytik der generierten <i>E. coli</i> Stämme	81
3.2.2.1	Pyridin-Hämochromspektren	81
3.2.2.2	HPLC-Untersuchungen	83
3.2.2.3	Western Blot-Analyse der Membran-Fraktion.....	84
3.2.2.4	Koexpression von COX UE I mit dem Reifungsplasmid pGR54.....	85
3.3	Heterologe Aufreinigung von CtaA aus <i>E. coli</i>.....	88
3.3.1	Analytik der verwendeten Expressionsstämme.....	89
3.3.1.1	Western Blot-Analyse der Membranfraktion.....	89
3.3.1.2	Häm-Analytik.....	90
3.3.2	Aufreinigung von CtaA über Histidin-Affinitäts- <i>tag</i>	91
3.3.2.1	Aufreinigungsstrategie	92
3.3.2.2	Analytische Gelfiltration	94
3.3.2.3	Spektrale Analytik.....	96
3.4	Homologe Aufreinigung von CtaA aus <i>P. denitrificans</i>	98
3.4.1	Aufreinigung von CtaA über Histidin-Affinitäts- <i>tag</i>	99
3.4.2	Analytik der Koelutionen	100
3.4.2.1	Western Blot-Analytik	101
3.4.3	Nachreinigung von CtaA über TEV-Verdau.....	103
3.4.4	Spektrale Analytik.....	104
3.5	<i>In vitro</i> Interaktion von CtaA und Surf1.....	106
3.6	Charakterisierung von Surf1-Mutanten	108
3.6.1	Aufreinigung von Surf1 über Histidin-Affinitäts- <i>tag</i>	109
3.6.2	Spektrale Analytik.....	110
3.7	Komplementationen eines <i>surf1</i>-Deletionsstamms	114
3.7.1	Cytochrom <i>c</i> Oxidase-Aktivität in Membranen.....	114
3.7.2	Cytochrom <i>c</i> Oxidase-Aufreinigungen	115
4	Diskussion	121
4.1	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Reifungsplasmide.....	122
4.2	Die <i>P. denitrificans</i> Häm <i>a</i> Synthase CtaA	126
4.3	Interaktion von CtaA und Surf1.....	129

Inhaltsverzeichnis

4.4	Häm a Binding an Surf1	134
4.5	Häm-Einbau in die <i>Paracoccus</i> Cytochrom c Oxidase.....	138
5	Zusammenfassung	145
6	Literaturverzeichnis.....	149
	Abkürzungsverzeichnis.....	I
	Verwendete Sequenzen.....	V
	Publikationen	VII
	Lebenslauf.....	IX
	Eidesstattliche Erklärung.....	XIII
	Danksagung	XV

1 Einleitung

Das Leben ist ein ständig währendes Bemühen zur Wahrung von Ungleichgewicht. Zwei Beispiele mögen diese Aussage näher verdeutlichen: Um überleben zu können, müssen Zellen ihrer Umgebung Nährstoffe entziehen und innerhalb ihrer zellulären Grenzen anreichern; Ionengradienten über der Zellmembran sind die Voraussetzung für ein funktionierendes Nervensystem.

Die Aufrechterhaltung von Ungleichgewicht als Basis allen biologischen Lebens ist auf die regelmäßige Zufuhr von Energie angewiesen. Dabei ist es lebenden Zellen auf zwei Arten möglich, Energie nutzbar zu machen. Zum einen können energiereiche Nährstoffe gespalten und oxidiert werden (*Chemotrophie*), zum andern kann Licht in chemisch nutzbare Energie umgewandelt werden (*Phototrophie*). Beide Prozesse werden zum Aufbau energiereicher Nukleosid-Triphosphate, insbesondere ATP, genutzt, das als Energiewährung der Zelle thermodynamisch ungünstige zelluläre Prozesse durch Spaltung seiner energiereichen Phosphodiester-Bindungen vermittelt.

Im Laufe chemotropher Energiegewinnung werden im Rahmen von Fettsäure-Oxidation, Glykolyse und Citratzyklus energiereiche Kohlenstoff-Verbindungen zu Kohlendioxid oxidiert. Dabei anfallende Reduktionsäquivalente in Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) müssen effizient regeneriert werden. Phototrophe Prozesse im Rahmen der oxygenen Photosynthese von Cyanobakterien sind der Grund für das massive Auftreten molekularen Sauerstoffs in der Atmosphäre vor ca. 2,4 Milliarden Jahren [1]. Im Laufe der Evolution haben sich Mechanismen entwickelt, die den ursprünglich toxischen Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor im Rahmen der Atmungskette nutzen. Damit hat die Evolution durch die Atmungskette zwei basale Probleme lösen können: Reduktionsäquivalente aus katabolen Prozessen können effizient regeneriert und deren Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die dabei frei werdende Energie kann schließlich für die Synthese von ATP genutzt werden.

Die Atmungsketten-Komplexe sind hierbei eines der kompliziertesten, in lebenden Zellen bekannten Beispiele für interorganellare Kommunikation, Untereinheiten-

Assemblierung und Nutzung verschiedener Kofaktoren. Die Erforschung der Biogenese dieser Komplexe ist somit zum Verständnis der Grundprinzipien des Lebens unerlässlich.

1.1 Die mitochondriale Atmungskette

Die Atmungskette dient aerob lebenden Organismen als Hauptquelle zur Erzeugung von ATP, der Energiewährung der Zelle. In Eukaryonten findet dieser Prozess in abgeschlossenen Kompartimenten, den Mitochondrien statt, die als „Kraftwerke der Zellen“ im allgemeinen Sprachgebrauch bekannt sind. Die Anzahl von Mitochondrien hängt stark vom betrachteten Organismus und vom Zelltyp ab, wobei beispielsweise 15-20 Prozent des Volumens einer typischen Säugetier-Leberzelle von diesem Organell-Typ eingenommen werden können [2]. Die Mitochondrien sind mit einer Doppelmembran umhüllt, die das Organell in verschiedene Subkompartimente teilt: die äußere Membran, der Intermembranraum (IMS), die innerer Membran sowie die mitochondriale Matrix [2].

Die innere Mitochondrienmembran stellt den Ort dar, der die membrangebundenen Proteinkomplexe der Atmungskette beherbergt. Ausgehend von den aus der Glykolyse und dem Citratzyklus stammenden Reduktionsäquivalenten NADH und FADH₂ können Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser übertragen werden. Die freie Energie dieses Prozesses wird zum schrittweisen Aufbau eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran genutzt, der schlussendlich die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP antreibt (Abb. 1.1). Die Kopplung von Elektronentransfer und Protonentransport zur Erzeugung von ATP wurde erstmals 1961 von P. Mitchell im Rahmen der chemiosmotischen Theorie vorgeschlagen [3].

Das Elektronentransport-System besteht aus vier hintereinander geschalteten Membranprotein-Komplexen: einer NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), einer Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), einer Ubichinol:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (Komplex III) und einer Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV). Hierbei koppeln die Komplexe I, III und IV den Elektronentransfer an die Protonentranslokation und sind so am Aufbau des H⁺-Gradienten beteiligt, während Komplex II eine reine Elektronentransfer-Funktion besitzt. Innerhalb der Kette

fungieren Ubichinon (Q) und Cytochrom *c* als bewegliche Elektronenüberträger zwischen den Enzymkomplexen. Der aufgebaute Protonengradient kann schließlich von der ATP-Synthase (Komplex V) zur Bildung von ATP genutzt werden. Abbildung 1.1 fasst die Vorgänge im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette nochmals zusammen.

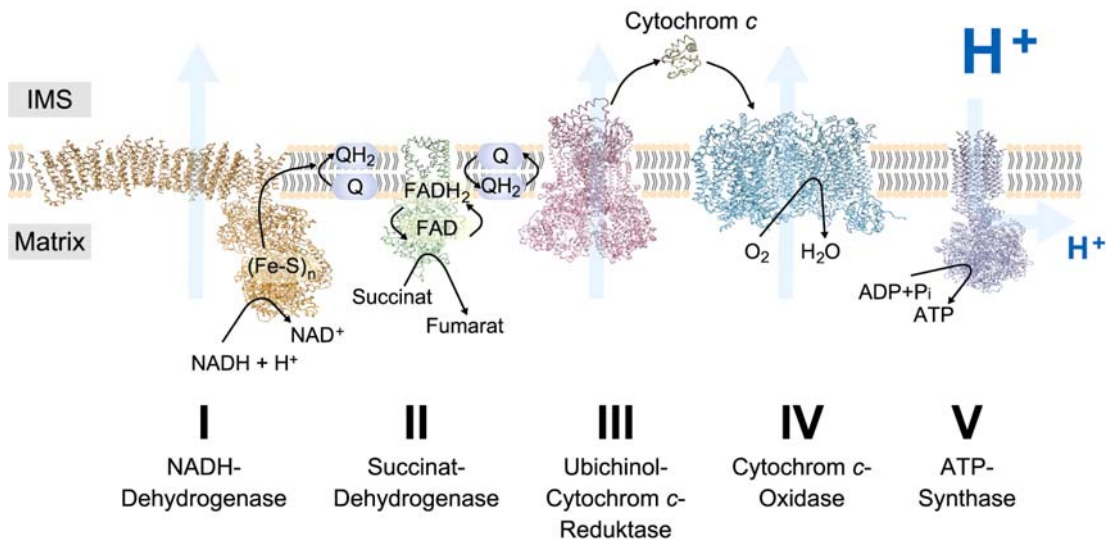


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette

Die Raumstrukturen der Atmungsketten-Komplexe wurden mit Hilfe des Programms VMD visualisiert. Verwendung fanden: Komplex I aus *T. thermophilus* (pdb-Code: 3M9S; für den eukaryontischen Komplex I aus *Y. lipolytica* stehen derzeit noch keine frei zugänglichen Struktur-Datensätze zur Verfügung, weshalb in der Abbildung der homologe prokaryontische Komplex Verwendung fand), Komplex II aus *G. gallus* (pdb-Code: 2H88), Komplex III aus *S. cerevisiae* (pdb-Code: 3CX5), Komplex IV aus *B. taurus* (pdb-Code: 3AG2), Cytochrom *c* aus *T. alalunga* (pdb-Code: 3CYT) und Komplex V aus *S. cerevisiae* (pdb-Code: 2XOK). Protonentransport-Vorgänge sind mit blauen Pfeilen gekennzeichnet.

Der Eintritt der Elektronen in die Atmungskette wird ausgehend von NADH durch Komplex I vermittelt. Am matrixständigen hydrophilen Teil des Komplexes wird NADH zu NAD⁺ oxidiert und die Elektronen zunächst auf Flavinmononukleotid (FMN) übertragen, das als prosthetische Gruppe an den Komplex gebunden ist. Von dort gelangen sie über eine Serie von acht Eisen-Schwefel-Zentren schlussendlich auf Ubichinon (Q), welches zu Ubichinol (QH₂) reduziert wird. Hierbei werden pro Elektron zwei Protonen von der Matrixseite der Membran in den Intermembranraum transloziert [4]. Aufgrund seiner Komplexität von bis zu 45 verschiedenen Untereinheiten wie im Falle von *B. taurus* [5] war die Raumstruktur des Komplexes lange Zeit auf Cryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen beschränkt [6].

Zunächst konnte der hydrophile Teil des Enzymkomplexes aus *T. thermophilus* kristallisiert werden, bevor 2010 die Gesamtstruktur sowohl für Pro- als auch für Eukaryonten gelöst werden konnte [7-9].

Komplex II stellt mit der Oxidation von Succinat eine direkte Verbindung der Atmungskette mit dem Citratzyklus dar. An dieser Stelle können also ebenfalls Elektronen in die Transportkette eingeschleust werden. Die Elektronen des Succinats werden zunächst auf FAD übertragen, welches zu FADH₂ reduziert wird. Über eine Serie von drei Eisen-Schwefel-Zentren und einen Häm *b*-Kofaktor können die Elektronen schließlich auf das membrangebundene Ubichinon (Q) übertragen werden, welches zu Ubichinol (QH₂) reduziert wird [10].

Das hydrophobe Ubichinol stellt also den ersten mobilen Elektronenüberträger innerhalb der Atmungskette dar. Es gibt seine Elektronen im Rahmen einer als Q-Zyklus bezeichneten Redoxschleife an Komplex III ab, der sie an den zweiten mobilen Elektronen-Überträger Cytochrom *c* weiterleitet [11]. Mit Hilfe seiner beiden Häm *b*-Kofaktoren in Untereinheit Cytochrom *b* (*b_H* und *b_L*), dem Rieske-Eisen-Schwefel Protein (ISP) und dem Cytochrom *c*₁ kann der Komplex vom bis dato stattfindenden Zwei-Elektronen-Transport in Gestalt von Ubichinol auf einen Ein-Elektronen-Transport mittels Cytochrom *c* umschalten [12]. Auch Komplex III koppelt die Elektronentransport-Prozesse an eine Translokation von Protonen in den Intermembran-Raum, alles in allem mit einer Stöchiometrie von zwei H⁺/Elektron [13].

Der hydrophile Elektronen-Transporteur Cytochrom *c* kann nun schrittweise 4 Elektronen an die Cytochrom *c* Oxidase (COX, Komplex IV) weiterleiten. Dieser Enzym-Komplex gehört zur Familie der Häm-Kupfer Oxidasen, die die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser katalysieren [14]. Die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff stellt den Endpunkt der gesamten Elektronentransportkette dar. Auch die Cytochrom *c* Oxidase ist hierbei in der Lage, durch Translokation von 4 Protonen pro reduziertem O₂ zum H⁺-Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran beizutragen. Eine detaillierte Beschreibung des Reaktionsmechanismus folgt im Abschnitt 1.3.

Der durch die Komplexe I, III und IV aufgebaute Protonengradient kann abschließend von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt werden. Die Protonen fließen hierbei über den membranständigen F_O-Teil des

Enzyms zurück in die mitochondriale Matrix. Dies versetzt den F_0 -Teil in Rotation, dessen Drehbewegung über die γ -Untereinheit an den F_1 -Teil weitergeleitet wird. Diese Rotation bewirkt Konformationsänderungen im F_1 -Teil des Enzymkomplexes, die schlussendlich die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat sowie dessen Freisetzung erlauben [15].

Die Oxidative Phosphorylierung im Rahmen der Atmungskette stellt wie bereits erwähnt den Großteil der in der Zelle benötigten Energie zu Verfügung. Zur Steigerung der Effizienz dieses Prozesses sind die Komplexe sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten in Superkomplexen organisiert [16]. Während die enzymatischen Mechanismen für die einzelnen Proteinkomplexe zum großen Teil aufgeklärt sind, ist die Erforschung der Biogenese dieser komplizierten Komplexe ein bisher weniger beachtetes Feld. Nichtsdestotrotz stellt die Assemblierung dieser Multienzym-Komplexe die Zelle vor enorme Herausforderungen, die bei Störungen zu schweren Krankheitsbildern führen können [17].

1.2 *Paracoccus denitrificans* als Modellorganismus

Paracoccus denitrificans ist ein gram-negatives, kokkenförmiges Bodenbakterium, das 1908 vom Mikrobiologen M. Beijerinck aufgrund seiner Fähigkeit zu anaerobem Wachstum auf Nitrat isoliert und charakterisiert wurde [18].

Die Analyse der 16S rRNA des Bakteriums erlaubt eine Zuordnung in die α_3 -Untergruppe der Proteobakterien [19]. Das Bakterium wurde lange Zeit als möglicher Vorfahre eukaryontischer Mitochondrien im Rahmen der Endosymbiontentheorie diskutiert [20]. Obwohl neuere Forschungen den Ursprung der Mitochondrien eher in photosynthetisch aktiven Purpurbakterien sehen [21], ist *P. denitrificans* ein wichtiger Modellorganismus für die mitochondriale Atmungskette, da es im Gegensatz zu anderen Bakterien (wie beispielsweise *E. coli*) alle vorgestellten Enzymkomplexe der Oxidativen Phosphorylierung besitzt. Dabei zeigen die Komplexe aus *P. denitrificans* eine hohe Homologie zu den katalytischen Kern-Untereinheiten der mitochondrialen Atmungsketten-Komponenten, sind darüber hinaus aber weniger komplex aufgebaut [22].

Als Bodenbakterium muss *P. denitrificans* in der Lage sein, sich verschiedenen Umweltbedingungen anpassen zu können. Das Bakterium erreicht dies durch ein weit verzweigtes Elektronentransport-Netzwerk innerhalb der Cytoplasmamembran (Abb. 1.2).

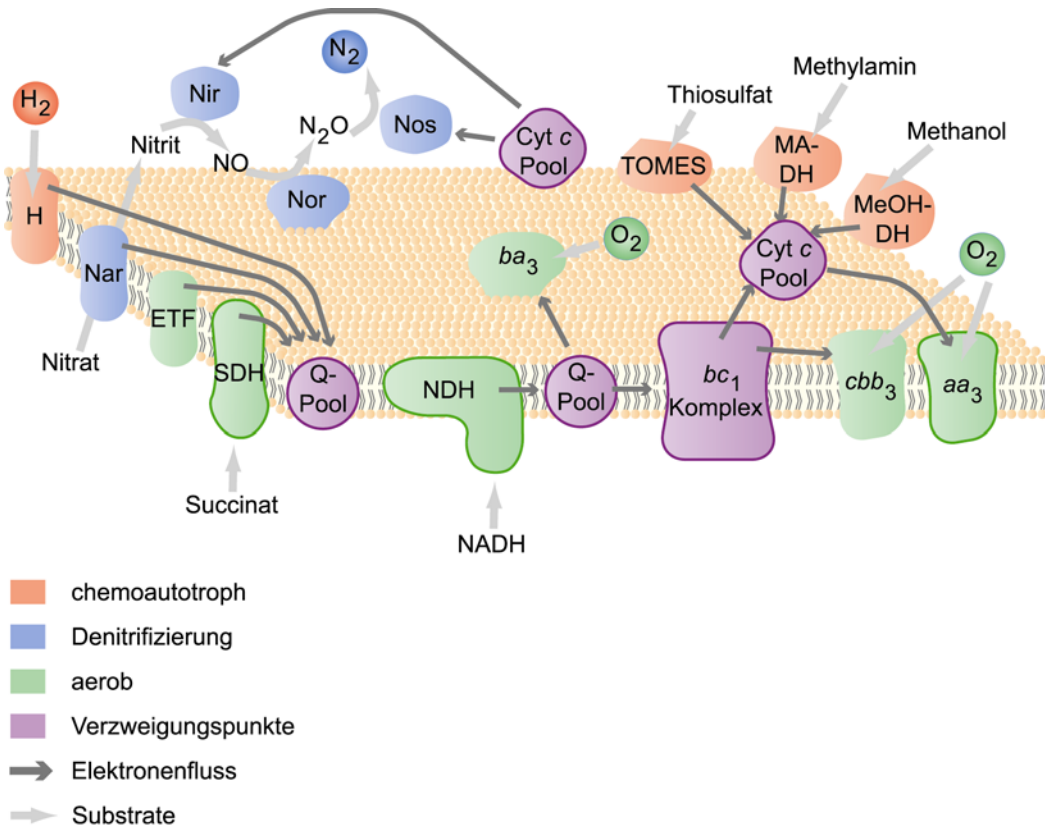


Abb. 1.2: Elektronentransport-Wege in *P. denitrificans*

Die den mitochondrialen Atmungsketten-Komplexen homologen Komponenten sind mit Rahmen gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

(Abkürzungen: H: Hydrogenase; TOMES: Thiosulfat-Oxidation Multienzymkomplex; MA-DH: Methylamin-Dehydrogenase; MeOH-DH: Methanol-Dehydrogenase; Nar: Nitrat-Reduktase; Nir: Nitrit-Reduktase; Nor: Stickstoffmonoxid-Reduktase; Nos: Distickstoffmonoxid-Reduktase; ETF: Elektronentransport-Flavoprotein; SDH: Succinat-Dehydrogenase; NDH: NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase; bc₁-Komplex: Ubichinol:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase; Q: Ubichinon; Cyt c: Cytochrom *c*; aa₃, ba₃ und cbb₃: terminale Häm-Kupfer Oxidasen.)

Unter aeroben Wachstumsbedingungen können Glukose oder Succinat als Kohlenstoffquelle oxidiert und deren Elektronen innerhalb einer dem mitochondrialen Fall entsprechenden Elektronentransport-Kette auf Sauerstoff übertragen werden. Hierbei hat das Bakterium allerdings die Möglichkeit, neben der dem Mitochondrium vergleichbaren aa₃-Cytochrom *c* Oxidase abhängig von der

Sauerstoffkonzentration zwei weitere alternative Oxidasen zu exprimieren: eine *ba*₃-Ubichinol Oxidase sowie eine *cbb*₃-Cytochrom *c* Oxidase bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken [23].

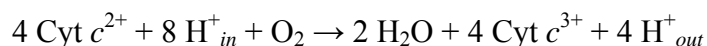
Neben Succinat kann das Bakterium auch die C₁-Kohlenstoffquellen Methanol und Methylamin sowie die anorganischen Verbindungen Wasserstoff, Sulfit und Thiosulfat als Elektronendonatoren für seine Atmungskette nutzen und so chemoautotrophes Wachstum gewährleisten [24, 25].

Die Denitrifizierung stellt ebenfalls einen wichtigen Weg innerhalb der Energiegewinnung von *P. denitrificans* dar. Durch Nutzung membrangebundener sowie periplasmatischer Enzymkomplexe kann Nitrat schrittweise zu Stickstoff reduziert werden, was dem Bakterium die Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen erlaubt [26, 27].

Der Ubichinol-Pool, der *bc*₁-Komplex sowie der Cytochrom *c*-Pool stellen bei den genannten aeroben, chemoautotrophen und anaeroben Wegen wichtige Verzweigungspunkte dar, die an sämtlichen Elektronentransport-Wegen beteiligt sind [22].

1.3 Die *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase

Die *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase katalysiert wie bereits angedeutet die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und koppelt die dabei freiwerdende Energie an die Translokation von 4 Protonen über die Membran. Zum Aufbau des Protonengradienten tragen hierbei nicht nur die gepumpten Protonen bei, sondern auch die „chemischen“ Protonen, die zur Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser gebraucht werden. Die gesamte Reaktionsgleichung lässt sich wie folgt zusammenfassen:



Im Laufe des Reaktionszyklus werden die Elektronen durch Cytochrom *c* über das in Untereinheit II lokalisierte Cu_A-Zentrum in die Oxidase eingeschleust. Anschließend werden sie über Häm *a* in der so genannten *low-spin site* an das Häm *a*₃•Cu_B-Zentrum (binukleäres Zentrum) weitergeleitet (Abb. 1.3).

Die Bindung von Sauerstoff an das binukleäre Zentrum erfolgt, wenn dieses durch zwei Elektronen vollständig reduziert wurde [28]. Die Spaltung der Sauerstoff-Bindung geschieht unter Beteiligung organischer Radikal-Zwischenstufen, wahrscheinlich vermittelt über ein konserviertes Tyrosin in unmittelbarer Nähe des binukleären Zentrums [29, 30]. Die Aufnahme zweier weiterer Elektronen dient der Reduktion des organischen Radikals sowie des Ferryl-Ions (Fe^{4+}) am Häm a_3 •Cu_B-Zentrum. Dies überführt das Enzym insgesamt wieder in den oxidierten Grundzustand und erlaubt so einen weiteren enzymatischen Zyklus.

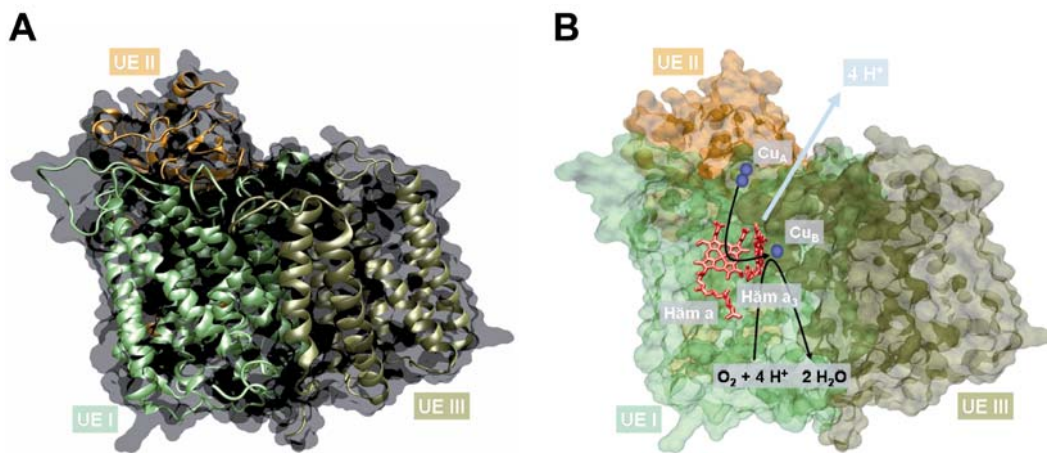


Abb. 1.3: Kern-Untereinheiten der *Paracoccus denitrificans* aa₃-Cytochrom c Oxidase

(A) α -helikale Darstellung der Untereinheiten I-III (pdb-Code 1QLE). (B) Oberflächendarstellung mit Lage der Redox-Zentren. Kupfer-Ionen sind in blau dargestellt, Häm a -Moleküle in rot.

Zur Aufnahme der insgesamt 8 Protonen während des Reaktionszyklus werden zwei verschiedene Protonenkanäle diskutiert: D-Kanal und K-Kanal. Ein für das bovine Enzym zusätzlich vorgeschlagener H-Kanal konnte in der bakteriellen Variante des Enzyms nicht gefunden werden [28, 31-33]. Der D-Kanal liefert hierbei sowohl chemische Protonen zur Bildung von Wasser als auch gepumpte Protonen, die am Aufbau des H^+ -Gradienten über der Membran beteiligt sind. Ein konservierter Glutamat-Rest scheint hierbei eine Art *gating*-Funktion zu besitzen und erlaubt die Diskriminierung zwischen chemischen und gepumpten Protonen [34].

Die eukaryontischen Versionen der Cytochrom c Oxidase setzen sich aus bis zu 13 Untereinheiten zusammen, während im Falle von *P. denitrificans* nur vier Untereinheiten zu finden sind. Die Kristallstrukturen beider Oxidasen sind seit

langem bekannt und zeigen für die Kern-Untereinheiten I, II und III eine große strukturelle Übereinstimmung [32, 33, 35]. Untereinheit II beherbergt wie bereits erwähnt das so genannte Cu_A -Zentrum, welches zwei Kupfer-Ionen in einem gemischten Ladungszustand enthält (*mixed valence state*; $\text{Cu}^{1+}\cdot\text{Cu}^{2+}$) [36]. Untereinheit I bindet die beiden Häm *a*-Moleküle (*a* und *a*₃) sowie ein weiteres Kupfer-Ion (Cu_B). Bei *P. denitrificans* finden sich für diese Untereinheit zwei verschiedene Genorte, *ctaDII* und sein Isogen *ctaDI* [22]. Untereinheit III des Enzyms enthält keine Redox-Kofaktoren und ist für die Funktion nicht essentiell, scheint allerdings für die Integrität des binukleären Zentrums während des Substratumsatzes wichtig zu sein, da ihr Verlust zur so genannten Suizid-Inaktivierung führt [37]. Die Untereinheiten II und III sind bei *P. denitrificans* im *cta*-Operon kodiert, in welchem neben diesen strukturellen Untereinheiten auch die Biogenesefaktoren Häm *o* Synthase (*ctaB*), *surf1c* und *ctaG* zu finden sind. Untereinheit IV des *Paracoccus* Enzyms besitzt keine Homologie zu den Untereinheiten der mitochondrialen Oxidase und ihr Verlust hat keine Auswirkungen auf Struktur und Funktion des bakteriellen Enzymkomplexes [38].

1.4 Biogenese der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase

Die mitochondriale Cytochrom *c* Oxidase besteht bei Säugern aus 13 verschiedenen Untereinheiten. Die Assemblierung dieser Untereinheiten ist ein gerichteter und koordinierter Prozess, indem zwei verschiedene genetische Systeme (Zellkern und Mitochondrium) aufeinander abgestimmt werden müssen. Nur die drei Haupt-Untereinheiten I, II und III werden vom mitochondrialen Genom kodiert, während die übrigen 10 Untereinheiten rein akzessorische Aufgaben besitzen und vom nukleären Genom kodiert werden. Die Assemblierung der Oxidase hängt folglich vom Import dieser Untereinheiten in das Mitochondrium ab. Der Protein-Import in dieses Organell unterliegt den Transport-Komplexen der äußeren und inneren Mitochondrien-Membran (TOM und TIM) [39]. Allgemein lassen sich die Vorgänge der COX-Biogenese wie folgt unterteilen: (i) Transkription/Translation und Membraninsertion, (ii) Kofaktor-Biosynthese und -Einbau in UE I/II, (iii) Assemblierung der Untereinheiten zum Holoenzym.

Einen groben Überblick über die ablaufenden Assemblierungsschritte konnte durch Studien an humanen Leukämie-Zellen gewonnen werden [40]. Hier ließen sich drei verschiedene Assemblierungsintermediate nachweisen, die jeweils durch Inkorporation weiterer Untereinheiten ineinander überführt werden. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die bisher bekannten Assemblierungsvorgänge beim Menschen.

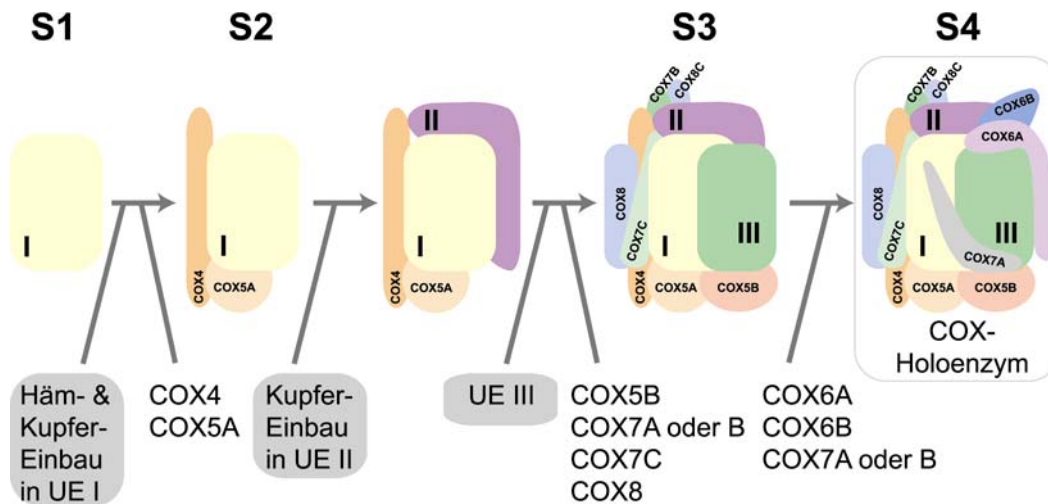


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der humanen COX-Biogenese

Darstellung der COX-Biogenese beim Menschen mit vier Assemblierungsintermediaten S1-S4. Die Abbildung wurde erstellt nach [17, 40].

Die Biogenese startet mit der Inkorporation von UE I in die Mitochondrien-Membran (Assemblierungsintermediat S1) und dem Einbau der beiden Häm-Moleküle und des Cu_B -Ions. Es schließt sich die Anlagerung von COX4 an (S2), bevor UE II und III sowie weitere kernkodierte Untereinheiten inkorporiert werden (S3). Der Einbau der Kupfer-Ionen in das Cu_A -Zentrum von UE II geschieht, bevor die Untereinheit im Assemblierungsprozess verwendet wird. In einem letzten Schritt werden noch fehlende kernkodierte Untereinheiten assoziiert und das fertige Holoenzym (S4) kann dimerisieren und schlussendlich in Superkomplexe eingebaut werden [16, 41].

Eine Vielzahl von Hilfsproteinen ist neben den strukturellen Untereinheiten an der Biogenese der Oxidase beteiligt. In Hefe konnten bisher mit Hilfe genetischer Screens mehr als 30 verschiedene Biogenesefaktoren identifiziert werden, von denen aber nur etwa 20 beim Menschen zu finden sind [42, 43]. Auch *P. denitrificans*

besitzt Biogenesefaktoren, allerdings beschränkt sich die Anzahl auf diejenigen, denen eine direkte Rolle im Rahmen der Kofaktor-Synthese und -Inkorporation in die strukturellen Untereinheiten I und II zugesprochen wird.

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über aus Hefe bekannte Biogenesefaktoren sowie deren vermutete Rolle während des Assemblierungsprozesses.

Tabelle 1.1: Auswahl an Oxidase-Biogenesefaktoren in Hefe nach [43, 44]

Für fett hinterlegte Biogenesefaktoren finden sich auch Homologe bei *P. denitrificans*.

Protein	Funktion	Humanes Homolog
<i>Translationsaktivatoren</i>		
Pet309p	aktiviert Translation der UE I mRNA	LRPPRC
Mss51p	reguliert UE I Translation	
Cox14p	reguliert UE I Translation	
Pet111p	aktiviert Translation der UE II mRNA	
Pet54p	aktiviert Translation der UE III mRNA	RBM9
Pet122p	aktiviert Translation der UE III mRNA	
Pet494p	aktiviert Translation der UE III mRNA	
<i>Membraneinbau</i>		
Oxa1p	Membraneinbau mitochondrialer Untereinheiten	Oxa1
Mba1p	Oxa1-unabhängiger Membraneinbau	
Cox18p	UE II Einbau	Cox18
Mss2p	Translokation des C-Terminus von UE II	
Pnt1p	Translokation des C-Terminus von UE II	
<i>Häm-Biosynthese und –Einbau</i>		
Cox10p	Häm o Synthase (Farnesyltransferase)	Cox10
Cox15p	Häm a Synthase	Cox15
Yah1	Ferredoxin, beteiligt an Häm a Synthase	AdR
Shy1p	vermutete Beteiligung an Häm-Einbau in UE I	Surf1
<i>Kupfereinbau</i>		
Sco1p/Sco2p	beteiligt am Kupfereinbau in UE II	Sco1/Sco2
Cox11p	beteiligt am Kupfereinbau in UE I	Cox11
Cox17p	Abgabe von Kupfer an Cox11 und Sco1	Cox17
<i>untereinheitenspezifische Proteine</i>		
Cox20p	Chaperon für UE II	Cox20
Pet100p	erleichtert Einbau nukleärer Untereinheiten	

1.4.1 Assemblierung der *core*-Untereinheiten I, II und III

Im Folgenden soll insbesondere auf die Reifung und Assemblierung der mitochondrial kodierten Haupt-Untereinheiten I-III (*core*) näher eingegangen werden. Der Fokus liegt hierbei auf den Vorgängen während des Kofaktor-Einbaus in UE I und II.

Die mRNA der *core*-Untereinheiten werden von mitochondrialen Ribosomen translatiert. Zu diesem Zweck erkennen in Hefe untereinheitenspezifische Translationsaktivatoren den 5'-untranslatierten Bereich der mRNA und regulieren die Protein-Biosynthese. Die Translation von UE I wird hierbei durch Pet309 und Mss51 kontrolliert; für UE II wird die Translationskontrolle durch Pet111 vermittelt, für UE III durch Pet54, Pet122 und Pet494 [44]. Die verschiedenen Aktivatoren sorgen letztendlich für eine stöchiometrische Regulation der Syntheseraten der *core*-Untereinheiten. Dabei werden Transkription und Translation anscheinend an bestimmte Regionen innerhalb der inneren Mitochondrienmembran geleitet und determinieren so spezifische Assemblierungsstellen für die Oxidase [45]. Der Einbau der *core*-Untereinheiten in die mitochondriale Membran geschieht kotranslational und wird durch Oxa1 vermittelt, dessen Homologe auch die Membraninsertion von Proteinen in Chloroplasten und Bakterien katalysieren [46].

Die Häm- und Kupfer-Kofaktoren der Untereinheit I sind zu ca. einem Drittel in die Tiefe der Membrandoppelschicht eingebettet, weshalb im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass der Inkorporationsprozess kotranslational stattfindet [47]. Über die Inkorporationsvorgänge für die Häm-Moleküle und das Cu_B-Ion ist bisher wenig bekannt, zum großen Teil deswegen, weil sich diese frühen Assemblierungsintermediate nicht anreichern und eine Nachstellung der Prozesse unter *in vitro* Bedingungen aufgrund der Hydrophobizität der beteiligten Komponenten schwierig ist. Trotz allem konnten aber sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Systemen Faktoren charakterisiert werden, die an diesen grundlegenden Biogeneseschritten beteiligt zu sein scheinen.

Häm-Kofaktoren, insbesondere vom *b*- und *c*-Typ, besitzen bei einer Reihe von zellulären Prozessen wichtige Funktionen, allerdings ist für Häm *a* nur eine Rolle im Rahmen der Atmungskette als Kofaktor der Cytochrom *c* Oxidase bekannt. Dieser besondere Häm-Typ wird also ausschließlich im Mitochondrium gebildet und seine Synthese startet ausgehend von Häm *b*. Diesem wird in einem ersten Schritt eine

Farnesyl-Seitenkette angehängt, wodurch es in Häm *o* umgewandelt wird. Katalysiert wird diese Reaktion durch die membranständige Häm *o* Synthase (Cox10 bei Eukaryonten, CtaB bei Prokaryonten) [48]. Dieses Häm-Intermediat wird seinerseits durch Oxidation einer Methyl- zu einer Formyl-Gruppe in Häm *a* umgewandelt. Dieser Schritt wird von der Häm *a* Synthase (Cox15 bei Eukaryonten, CtaA bei Prokaryonten) katalysiert [48]. Auch Cox15 ist ein membranständiges Enzym und für eine erfolgreiche enzymatische Reaktion möglicherweise auf ein Ferredoxin/Ferredoxin-Reduktase System (Arh1p und Yah1p in Hefe) angewiesen [49, 50]. Der genaue Mechanismus der Inkorporation der Häm *a*-Moleküle in Untereinheit I ist unbekannt, doch mehren sich die Hinweise, dass der Assemblierungsfaktor Surf1 (Shy1p in Hefe) direkt daran beteiligt sein könnte (siehe Diskussionsteil dieser Arbeit).

Auch die Inkorporation des Cu_B-Ions ist bisher nicht aufgeklärt. Es gibt indirekte Hinweise für *R. sphaeroides*, dass Cox11 der entscheidende Faktor hierfür ist [51]. Cox11 ist ebenfalls ein membranständiges Protein, dessen lösliche periplasmatische Domäne intensiv auf seine Kupferbindungseigenschaften untersucht wurde [42, 52-54]. Alle diese Studien weisen auf ein wichtiges CFCF-Motif hin, das für die Kupferbindung an das Protein unerlässlich ist. Auch für den Kupfer-Einbau stellt man sich einen kotranslationalen Mechanismus vor, da in *S. pombe* eine dem mitoribosomalen Protein Rsm22 homologe Domäne an Cox11 fusioniert ist [55]. Cox 11 erhält seine Kupfer-Ionen vom löslichen Chaperon Cox17, welches sowohl im Intermembranraum des Mitochondriums als auch im Cytosol nachweisbar ist, weshalb ihm eine Kupfershuttle-Funktion zugeschrieben wird, die das Mitochondrium mit Kupfer versorgt [56]. In einem *in vitro* Experiment mit gereinigten Proteinen konnte der spezifische Transfer von Kupfer ausgehend von Cox17 sowohl auf Cox11 als auch auf Sco1 verfolgt werden [57]. Die Kupfer-Abgabe von Cox11 auf UE I konnte bislang nicht bewiesen werden. Das *Paracoccus* Homolog CtaG könnte zukünftig hierzu verwendet werden, da es ein kupferabhängiges spektroskopisches Signal aufweist, das anderen Cox11-Varianten fehlt [43].

Die Biogenese der UE II ist ebenfalls von der Inkorporation von Kupfer-Ionen in das Cu_A-Zentrum abhängig. Hierzu scheint allerdings kein kotranslationaler Vorgang vonnöten zu sein, da das Cu_A-Zentrum innerhalb der hydrophilen periplasmatischen Domäne des Proteins zu finden ist. UE II wird als Vorläuferprotein synthetisiert und

muss nach erfolgreicher Insertion in die Membran proteolytisch von einer N-terminalen Präsequenz befreit werden. Dieser Prozess wird vom UE II-spezifischen Chaperon Cox20 koordiniert [58]. Nach erfolgreicher proteolytischer Prozessierung können die Kupfer-Ionen des Cu_A -Zentrums eingebaut werden. Dies geschieht unter Vermittlung des Kupfer-Chaperons Sco1, für das eine direkte Interaktion mit UE II nachgewiesen werden konnte [59]. In Hefe findet sich mit Sco2 ein weiteres Sco-Protein, welches jedoch keinen unmittelbaren Einfluss auf die Oxidase-Biogenese hat. Im Gegensatz dazu tritt Sco2 im humanen System als Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase für Sco1 auf und ist damit indirekt ebenfalls an der Reifung von UE II beteiligt [60]. Abbildung 1.5 fasst die beschriebenen Ereignisse während der Biogenese der *core*-Untereinheiten nochmals schematisch zusammen.

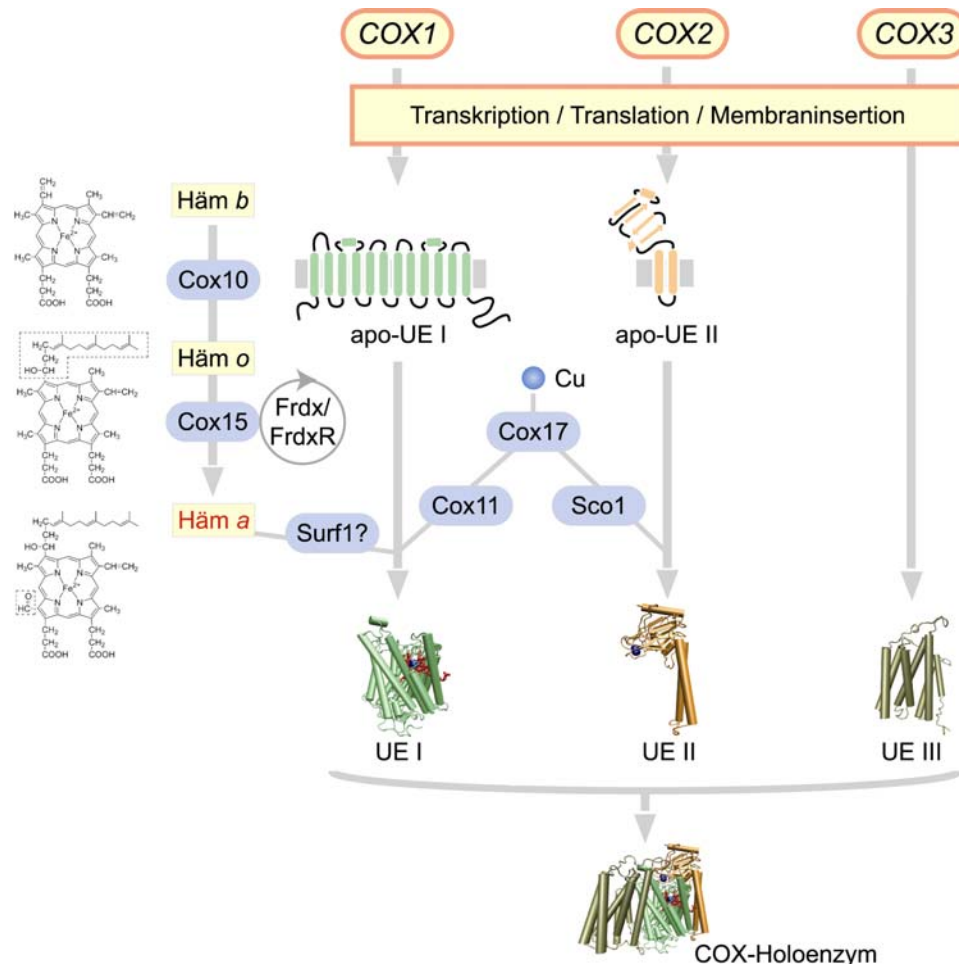


Abb. 1.5: Biogenese der *core*-Untereinheiten I-III

Schematische Darstellung der Biogenese der *core*-Untereinheiten I-III (pdb-Code: 1QLE). In blauen Kästen hervorgehoben sind Assemblierungsfaktoren, die an der Synthese und dem Einbau der Häm- und Kupfer-Kofaktoren beteiligt sind. Die Abbildung wurde modifiziert nach [44]. Für Details siehe Text.

Die enorme Bedeutung einer gerichteten und erfolgreichen Oxidase-Biogenese zeigt sich an einer großen Anzahl beschriebener COX-Defizienzen, die durch Verlust mitochondrial kodierter *core*-Untereinheiten oder fehlgeleitetem Kofaktor-Einbau aufgrund mutierter oder fehlender Assemblierungsfaktoren hervorgerufen werden (Tabelle 1.2). Hierbei führen Mutationen in den *core*-Untereinheiten erst in der Adoleszenz zu klinischen Symptomen, da mitochondriale Mutationen einem Dosiseffekt unterliegen, weil pro Organelle mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms vorliegen und innerhalb einer Zelle eine gewisse Anzahl von Mitochondrien geschädigt sein muss, bevor sich klinische Symptome manifestieren [61]. Mutationen oder Verlust von kernkodierten Assemblierungsfaktoren wirken sich aufgrund autosomal-rezessiver Vererbung bereits im frühen Kindesalter aus, wobei sich allerdings gewebe- und organspezifische Krankheitsbilder feststellen lassen, deren Ursachen weitgehend ungeklärt sind [62, 63].

Tabelle 1.2: Auswahl an Genen, die mit COX-Defizienz assoziiert sind (nach [64])

Gen	Funktion	Klinischer Phänotyp
Mitochondriale Gene		
<i>COXI</i>	Strukturgen, UE I	Enzephalopathie, MND, MELAS-ähnlich, Myoglobinurie, Sideroblastische Anämie
<i>COXII</i>	Strukturgen, UE II	Enzephalopathie, Myopathie
<i>COXIII</i>	Strukturgen, UE III	Enzephalopathie, MELAS, Leigh-ähnlich
Nukleäre Gene		
<i>surf1</i>	früher Assemblierungsfaktor, möglicherweise am Häm α -Einbau in UE I beteiligt	Leigh Syndrom
<i>sco1</i>	Kupfer-Chaperon	Enzephalopathie, Hypertrohe Kardiomyopathie, Ketoazidose, Leberversagen
<i>sco2</i>	Kupfer-Chaperon	hypertrophe Kardiomyopathie, Enzephalopathie
<i>cox10</i>	Häm α Synthase	Tubulopathie, Leukodystrophie, Leigh Syndrom, hypertrophe Kardiomyopathie
<i>cox15</i>	Häm α Synthase	hypertrophe Kardiomyopathie, Leigh Syndrom

MND: Motor Neuron Disease; MELAS: Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktat-Azidose und schlaganfallähnliche Symptome

Die häufigste Form mitochondrialer Enzephalopathien stellt das Leigh Syndrom dar, welches erstmals 1951 beschrieben wurde [65]. Das Syndrom ist charakterisiert durch Läsionen im zentralen Nervensystem, die zu schweren neurodegenerativen Störungen führen [66]. Die molekularen Ursachen des Leigh Syndroms sind vielgestaltig, interferieren aber in allen Fällen mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel. Neben Mutationen im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex sind vor allem Defekte in den Komponenten der Oxidativen Phosphorylierung von Bedeutung [67, 68]. Bisher konnten als Ursache für das Leigh Syndrom Defizienzen in allen mitochondrialen Atmungskettenkomplexen gefunden werden. Ein Überblick findet sich in der OMIM-Datenbank der John Hopkins Universität, Baltimore (Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/256000>)

Das Syndrom kann wie bereits angedeutet auch durch Verlust der Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität hervorgerufen werden. Die Krankheit bedingt hierbei einen 80-90 %igen Verlust der COX-Aktivität in allen Geweben [66, 69]. Zunächst konnten dem Syndrom Mutationen im *surf1*-Gen zugeordnet werden [70, 71], mittlerweile konnten aber auch Defekte in den Genen für die Häm *a* Synthase (Cox15) und einem Translationsaktivator für UE I (TACO1) nachgewiesen werden [72-74].

1.4.2 Die Biogenesefaktoren CtaA und Surf1

Die Inkorporation der Häm *a*-Moleküle in die Untereinheit I der Oxidase ist Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Biogenese des Enzyms und kann als Startpunkt des gesamten Assemblierungsprozesses betrachtet werden.

Da Häm *a* ausschließlich in terminalen Oxidasen Verwendung findet, können sowohl die Häm *o* Synthase (Cox10 oder CtaB) sowie die Häm *a* Synthase (Cox15 oder CtaA) als Biogenesefaktoren für die Oxidase betrachtet werden, obwohl bisher keine direkte Beteiligung am Einbau der Häm-Moleküle in UE I nachgewiesen ist.

Die enzymatische Synthese von Häm *a* startet wie bereits erwähnt ausgehend von Häm *b*. Cox10 katalysiert zunächst das Anhängen einer Hydroxyethyl-Farnesyl-Seitenkette, bevor Cox15 die C8-Methylgruppe zu einer Formyl-Gruppe oxidiert [48]. Für die Enzyme aus *B. subtilis* und *R. sphaeroides* konnte eine Interaktion bei

heterologer Expression in *E. coli* nachgewiesen werden [75]. In diesem Zusammenhang kann folglich von einem Häm *a*-Biosynthesekomplex aus Cox10 und Cox15 gesprochen werden.

Über den enzymatischen Mechanismus der durch Cox15 vermittelten Oxidation ist bisher wenig bekannt. Bei Expressionsstudien in *E. coli* zeigte sich eine strikte Sauerstoff-Abhängigkeit des Prozesses, wobei allerdings das inkorporierte Sauerstoff-Atom entgegen den Erwartungen nicht aus molekularem Sauerstoff, sondern aus Wasser zu kommen scheint [76, 77]. Die frühesten Charakterisierungen am gereinigten CtaA-Protein aus *Bacillus* legen nahe, dass das Enzym zwei getrennte Häm-Bindungsstellen besitzen könnte: eine Bindungsstelle für einen Häm *b*-Kofaktor und eine Bindungsstelle, an der Häm *o* zu Häm *a* oxidiert wird [78]. Allerdings sind die Häm-Bindungsstellen bisher nicht eindeutig charakterisiert und Mutationsstudien aus verschiedenen Laboren kommen zu widersprüchlichen Ergebnissen [79, 80].

CtaA besitzt im Normalfall acht Transmembranhelices (TMH), wobei aber auch archaische Varianten mit nur vier TMH bekannt sind, weshalb vermutet wurde, dass die heute dominierende Form mit acht TMH aus Genduplikationen hervorgegangen sein könnte [81]. Die Regulation der Häm *a*-Biosynthese in Hefe ist strikt kontrolliert, indem beispielsweise die Transkription von *COX15* über den Häm *b* kontrollierten Transkriptionsfaktor Hap1 geregelt wird [82]. Über das CtaA Protein aus *P. denitrificans* und die Regulation der Häm *a*-Biosynthese in diesem Bakterium ist bisher nichts bekannt (siehe Diskussionsteil dieser Arbeit).

Dem Assemblierungsfaktor Surf1 fällt aufgrund seines Fehlens beim mit COX-Defizienz assoziierten Leigh Syndrom eine besondere Rolle während der Oxidase-Biogenese zu. Bisher wurden mehr als 40 verschiedene krankheitsauslösende Mutationen beschrieben [83].

Das *surf1*-Gen ist das erste Gen innerhalb des hochkonservierten *surfeit*-Genlocus auf Chromosom 9, der für sechs Haushaltsgene kodiert [84]. Das Gen kodiert für ein 30 kDa großes Protein mit mitochondrialer Lokalisation; Homologe konnten in verschiedenen pro- und eukaryontischen Spezies identifiziert werden und weisen eine hohe Sequenz-Konservierung sowie eine generell gleiche Protein-Topologie auf [85]. Die Abwesenheit des Proteins führt wie bereits erwähnt zum Leigh Syndrom,

das auf der molekularen Ebene durch 80-90 %igen Verlust an COX-Aktivität charakterisiert ist. Surf1 ist folglich nicht strikt essenziell für die Biogenese der Oxidase, allerdings muss es in frühen Stadien des Assemblierungsprozesses wichtig sein, da die Assemblierungsintermediate S1 und S2 (siehe Abb. 1.4) akkumulieren [86-88].

Das bisher bestuntersuchte Surf1 Protein ist das Hefe-Homolog Shy1p (*surf1 homolog of yeast*). Es ist im Vergleich zu anderen Surf1 Proteinen mit 45 kDa deutlich größer und weist insbesondere in der zentralen *loop*-Region zwischen den beiden Transmembranhelices zusätzliche Sequenzbereiche auf.

Interessanterweise können sich Shy1p und humanes Surf1 in entsprechenden Deletionsstämmen nicht wechselseitig komplementieren [87, 89], weshalb davon ausgegangen werden muss, dass Shy1p trotz genereller Sequenzähnlichkeit unterschiedliche oder zusätzliche Aufgaben in der Biogenese der Hefe-Oxidase wahrnimmt. So konnte Shy1p aus Hefe neben Oxidase-Untereinheiten unter anderem auch zusammen mit Untereinheiten des Komplex III isoliert werden, weshalb von einer Beteiligung an der Bildung von Superkomplexen ausgegangen werden kann [90].

Studien an bakteriellen Surf1 Proteinen beschränken sich derzeit auf Homologe aus *R. sphaeroides* und *P. denitrificans* und lassen darauf schließen, dass das Protein an der Assemblierung der Häm *a*-Kofaktoren beteiligt sein könnte [91, 92]. Interessanterweise besitzt *Paracoccus* zwei verschiedene Surf1-Homologe, Surf1c und Surf1q, die jeweils für die Reifung einer *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase sowie einer *ba*₃-Ubichinol Oxidase wichtig sind [91]. Auch neuere Studien aus Hefe geben indirekte Hinweise auf eine Beteiligung an der Bildung des Häm *a*₃•Cu_B-Zentrums [93]. Die genauen Abläufe während der Inkorporation der Häm *a*-Kofaktoren in UE I sind derzeit nicht bekannt, ebenso wenig die Rolle von Surf1 während dieser Prozesse (siehe Diskussionsteil dieser Arbeit).

Die große strukturelle Ähnlichkeit der mitochondrialen *core*-Untereinheiten zu den prokaryontischen Cytochrom *c* Oxidasen sowie das Vorhandensein von Biogenesefaktoren, die mit dem Einbau der Häm- und Kupfer-Kofaktoren assoziiert werden, deuten auf ähnliche Assemblierungsmechanismen für Pro- und Eukaryonten hin. Dabei ist die leichtere Handhabbarkeit der bakteriellen Systeme von entscheidender

Bedeutung für das Studium dieser Vorgänge auf der molekularen Ebene. Die nahe Verwandtschaft der Atmungskette von *P. denitrificans* zu der der Mitochondrien macht dieses Bakterium folglich zu einem interessanten Modellorganismus für das Studium prinzipieller Biogenese-Vorgänge der Komponenten der Oxidativen Phosphorylierung, insbesondere der Cytochrom *c* Oxidase.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Studium der Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase ist von entscheidender Bedeutung bei der Bewertung von mitochondrial verursachten Krankheitsbildern wie dem Leigh Syndrom. Bakteriellen Modellsystemen fällt hierbei eine wichtige Rolle zu, da ihre Cytochrom *c* Oxidasen einfacher aufgebaut sind und dem mitochondrialen System homologe, essenzielle Assemblierungsfaktoren ebenfalls zu finden sind.

Insbesondere *P. denitrificans* eignet sich als Modellorganismus, da seine Atmungskette große Ähnlichkeit zur mitochondrialen aufweist und die *Paracoccus* Oxidase seit langem als Studienobjekt für Struktur-Funktionsbeziehungen des Enzyms genutzt wird. Die prinzipiellen Biogenese-Mechanismen, insbesondere der Kofaktor-Einbau in die Untereinheiten I und II, scheint von denselben Assemblierungsfaktoren gesteuert zu sein wie im eukaryontischen Fall.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Kofaktor-Einbau in die Untereinheit I der *Paracoccus* Oxidase näher zu untersuchen. Dabei wurde versucht, die Reifung dieser Untereinheit mit den entsprechenden Assemblierungsfaktoren im heterologen *E. coli* System nachzuvollziehen. Die biochemische Charakterisierung der Biogenese-Faktoren Häm *a* Synthase (CtaA) und Surf1 nach heterologer Expression in *E. coli* und homologer Expression in *Paracoccus* wurde unternommen, um Einblicke in die Synthese und mögliche Inkorporation der Häm *a*-Kofaktoren durch diese Biogenesefaktoren zu gewinnen. Schließlich wurde versucht, die Inkorporationsmechanismen für die Häm-Moleküle durch Charakterisierung der Cytochrom *c* Oxidase auf molekularer Ebene nach Reinigung aus *P. denitrificans* näher zu betrachten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller
Äkta Purifier Chromatographiesystem	GE Healthcare
Analysenwaage Basic	Sartorius
Autoklaven	Getinge
Biofuge 13	Heraeus Instruments
Biopilot Pharmacia Chromatographiesystem	GE Healthcare
Brutschränke	Heraeus Instruments
Elektrophoresesysteme	Biorad, Harnischmacher
Geldokumentationskamera Powershot G5	Canon
Konzentratoren	Sartorius, Millipore
Kulturschüttler	Infors AG, New Brunswick Scientific
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
pH-Meter pH340i	WTW
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Scanner Perfection 4990 Photo	Epson
Schüttelplattformen	Edmund Bühler, New Brunswick Scientific
Spannungsgeber	Biorad, IBI
SpeedVac Plus	Savant
Spektrophotometer U-3000	Hitachi
Spektrophotometer U-1100	Hitachi
Spektrophotometer Uvikon 941	Kontron
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler	Hybaid, Biorad
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson
Ultra-Turax-Homogenisator T25	IKA Labortechnik
Ultrazentrifuge L-70	Beckman

Gerät	Hersteller
White/UV Transilluminator	UVP
Zellpresse Manton-Gaulin	APV Schröder
Zentrifuge HiCen 21C	Herolab
Zentrifugen Sorvall RC 5B, RC 3C	Dupont

2.1.2 EDV

2.1.2.1 Programme

Adobe Illustrator 9.0	Adobe Systems Incorporated
Clone Manager Suite	Scientific & Educational Software
Clustal X 2.0	http://www.clustal.org/ [94, 95]
EndNote X1	Thomson Reuters
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/
Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation
Origin 6.1	Origin Lab Corporation
Sable	http://sable.cchmc.org/ [96]
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/ [97]
UNICORN	GE Healthcare
Visual Molecular Dynamics (VMD) Version 1.8.4.	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/ [98]

2.1.2.2 Datenbanken

Elektronische Zeitschriften Bibliothek	http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=UBFM
Expasy Proteomics Server	http://www.expasy.org/
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	http://www.genome.jp/kegg/
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
RCSB Protein Data Bank (PDB)	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

2.1.3 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamidlösung Rotiphorese	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Peqlab
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roth
Antibiotika	AppliChem, Roth
Bernsteinsäure	Fluka
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Fermentas
Coomassie Brilliantblau R250 und G250	Roth
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Calbiochem, Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	AppliChem
Gel-Extraktionskits	Qiagen, Zymo Research
Hefeextrakt	Becton-Dickinson
HPLC-Lösungen	Roth
Imidazol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Fermentas
β -Mercaptoethanol	Fluka
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD ⁺ /NADH)	Appllichem
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
Nitrocellulose-, Nylonmembran	Whatman
Pefabloc SC	Biomol
Ponceau S	AppliChem
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem, Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ)	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton/Pepton	Roth

In der Liste nicht aufgeführte Standardchemikalien von *p.a.* Qualität wurden von AppliChem, Merck, Roche, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Wasser für alle proteinbiochemischen Anwendungen wurde mit einer PRO 90 CN Anlage der Firma Seral entsalzt. Für alle molekularbiologischen Anwendungen wurde das Wasser zusätzlich sterilfiltriert und autoklaviert.

2.1.4 Chromatographiematerialien

Chromatographiematerialien werden zur langfristigen Lagerung mit 20 % Ethanol gewaschen, zur kurzfristigen Lagerung mit 1 mM Natriumazid. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C. Die Lagerung der μ RPC C2/C18 Säule erfolgt in 70 % (v/v) Methanol.

Diethylaminoethyl-(DEAE)-Sephacel CL 6B	GE Healthcare
μ RPC C2/C18	GE Healthcare
Ni ²⁺ -NTA-Agarose Superflow	Qiagen
Sephadex G25	GE Healthcare
Superose 6	GE Healthcare
Ultrogel AcA 34	Sigma-Aldrich

2.1.5 Größenstandards

λ -Phagen DNA, EcoRI/HindIII geschnitten	hergestellt im Arbeitskreis (Prof. Ludwig, Universität Frankfurt)
Gene Ruler TM 1 kb DNA Ladder SM#0311	Fermentas
Unstained Protein Molecular Weight Marker SM#0431	Fermentas

2.1.6 Proteine

Enzyme für die Molekularbiologie wurden in den von den Herstellern mitgelieferten Puffern gemäß Vorschrift eingesetzt. Alle hier aufgeführten Proteine werden bei -20 °C gelagert.

2.1.6.1 Antikörper / Antiseren

Antiseren gegen Cytochrome <i>c</i> Oxidase: - UE I und II (anti-BG) - UE I (anti-AH) - UE II (anti-AI)	Prof. Ludwig, Universität Frankfurt
Antiserum gegen CtaG aus <i>P. denitrificans</i> (anti-CtaG)	
Protein A/Alkalische-Phosphatase-Konjugat (AAP)	Sigma
Maus-anti-Penta-His-Antikörper (anti-His)	Novagen
Ziege-anti-Maus-IgG / Alkalische- Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich

2.1.6.2 Enzyme für die Molekularbiologie

Ampligase	Epicentre
<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (CIAP)	Fermentas
<i>phusion</i> DNA-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Fermentas
Ribonuklease A (RNase A)	AppliChem
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-Polynucleotid-Kinase (PNK)	Fermentas

2.1.6.3 Allgemeine Proteine

Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Cytochrom <i>c</i> aus Pferdeherz	Sigma
Lysozym	Biomol
<i>tobacco etch virus</i> (TEV) Protease	Prof. Ludwig, Universität Frankfurt

2.1.7 Nukleinsäuren

2.1.7.1 Vorhandene Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pBluescript	Klonierungsvektor, <i>fl ori</i> , <i>lacZα</i>	Amp	Stratagene
pEC86	<i>ccm</i> -Operon zur Cytochrom <i>c</i> Reifung hinter <i>tet</i> -Promotor	Cm	[99]
pET24a	induzierbarer Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , <i>T7</i> -Promotor, <i>lacO</i> , <i>lacI</i>	Km	Novagen
pFA48	<i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (NdeI/SacI)	Amp	[100, 101]
pFA48-H193A	H193A-Mutante von <i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (NdeI/SacI)	Amp	[100, 101]
pFA49	<i>surf1q</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (NdeI/SacI)	Amp	[100, 101]
pFA49-H202A	H202A-Mutante von <i>surf1q</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (NdeI/SacI)	Amp	[100, 101]
pFA61	<i>cta2-surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag zur Expression in <i>P. denitrificans</i>	Sm	[91, 100]
pGR40	<i>ctaDII</i> mit N-terminalem <i>t7</i> -tag und C-terminaler TEV- <i>site</i> und His ₁₀ -tag in pET24a (BamHI/XhoI)	Km	[42]
pSelN	<i>cta</i> -Operon aus <i>P. denitrificans</i> in pAlter	Amp	[102]
pUC18/19	Klonierungsvektoren, <i>lacZα</i>	Amp	[103]

2.1.7.2 Erstellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pGR50	pEC86-Derivat, <i>tet</i> -Promotor, <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pGR51	pGR50-Derivat, <i>ctaB</i> hinter <i>tet</i> -Promotor, weitere Gene über <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pGR52	pGR51-Derivat, <i>ctaB</i> und <i>ctaA</i> hinter <i>tet</i> -Promotor, weitere Gene über <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pGR53	pGR52-Derivat, <i>ctaB</i> , <i>ctaA</i> und <i>surf1c</i> hinter <i>tet</i> -Promotor, weitere Gene über <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pGR54	pGR53-Derivat, <i>ctaB</i> , <i>ctaA</i> , <i>surf1c</i> und <i>ctaG</i> hinter <i>tet</i> -Promotor, weitere Gene über <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pGR55	pGR52-Derivat, <i>ctaB</i> , <i>ctaA</i> und <i>ctaG</i> hinter <i>tet</i> -Promotor, weitere Gene über <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pGR56	pGR54-Derivat, <i>ctaB</i> , <i>ctaA</i> , <i>surf1c</i> , <i>ctaG</i> und <i>frdx</i> hinter <i>tet</i> -Promotor, weitere Gene über <i>Acc65I/XhoI</i> klonierbar	Cm
pFA48-W24F	W24F-Mutante von <i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (<i>NdeI/SacI</i>)	Amp
pFA48-Q25A	Q25A-Mutante von <i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (<i>NdeI/SacI</i>)	Amp
pFA48-Y196F	Y196F-Mutante von <i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (<i>NdeI/SacI</i>)	Amp
pFA48-W200F	W200F-Mutante von <i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (<i>NdeI/SacI</i>)	Amp
pFA49-W25F	W25F-Mutante von <i>surf1q</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (<i>NdeI/SacI</i>)	Amp
pFA49-Q26A	Q26A-Mutante von <i>surf1q</i> mit N-terminalem His ₁₀ -tag in pET22b (<i>NdeI/SacI</i>)	Amp

Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pFA49-Y205F	Y205F-Mutante von <i>surf1q</i> mit N-terminalem His ₁₀ - <i>tag</i> in pET22b (NdeI/SacI)	Amp
pFA49-W209F	W209F-Mutante von <i>surf1q</i> mit N-terminalem His ₁₀ - <i>tag</i> in pET22b (NdeI/SacI)	Amp
pFA61-W200F	W200F-Mutante von <i>surf1c</i> mit N-terminalem His ₁₀ - <i>tag</i> in pFA61	Sm
pHA01	<i>ctaA</i> mit N-terminalem <i>t7-tag</i> und C-terminaler TEV- <i>site</i> und His ₆ - <i>tag</i> in pET24a (NdeI/XhoI)	Km
pHA02	<i>ctaA</i> mit C-terminaler TEV- <i>site</i> und His ₆ - <i>tag</i> über AatII/XhoI aus pHA01 in pGR52	Cm
pHA21	<i>ctaA</i> mit N-terminalem <i>t7-tag</i> und C-terminaler TEV- <i>site</i> und His ₆ - <i>tag</i> in pFA61 (NdeI/SmaI)	Sm
pHA23	<i>ctaA</i> mit C-terminaler TEV- <i>site</i> und His ₆ - <i>tag</i> in pGR50	Cm

Alle in die aufgeführten Plasmide einklonierten Gene wurden mittels DNA-Restriktion und DNA-Sequenzierung auf Richtigkeit der Sequenz überprüft, um ungewollte Mutationen auszuschließen.

2.1.7.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biospring, Alt Fechenheim 34, 60386 Frankfurt a.M. bezogen.

Name	Sequenz (5'→3')
50-F	ATGGAAGCCGGCGGCACCTC
50-R	CTCGAGTATAGGGTACCACACGGTGCCTGACTGCGTT
51-CtaB-F	TCAAGGTGTACAAAGGAGATACTCATGGCCGATATCAACGCATAT
51-CtaB-R	TAATAGCTCGAGATATGGGTACCTCACCATCCTCCGACCCAG
52-CtaA-F	TCAAGGTGTACAAAGGAGATACTCATGTTCGCGCCCGATCGAGAAG
52-CtaA-R	TAATAGCTCGAGATATGGGTACCTCATCGGACAGTTCCCCG
53-Surf1-F	TCAAGGTGTACAAAGGAGATACTCATGCGCCGTTACCTGTTCCC
53-Surf1-R	TAATAGCTCGAGATATGGGTACCCTAGAATTGCCGCTGCCTG
54-CtaG-F	TCAAGGTGTACAAAGGAGATACTCATGAGCGGCGGGAAGCCAAG
54-CtaG-R	TAATAGCTCGAGATATGGGTACCTCAGTTTACGGTCCGTTCC
56-Frdx-F	TCAAGGTGTACAAAGGAGATACTCATGGCCAAGATCACTTATATCGA GC
56-Frdx-R	TAATAGCTCGAGATATGGGTACCTCAGATCTGGCGTTCGGGCAGGTTCC
CtaA His ₆ -F	ATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGA TCCATGTCGCGCCCGATCGAGAA
CtaA His ₆ -R	TATATCTCGAGTCA(ATGGTG) ₃ GCCCTGAAAATAAAGATTCTCACCCG GACCGGGACCTCGGACAGTTCCCCGGAC
tet-prom	ATCATCGATAAGCTTTAATGC
tet-term	GGAGTGGTGAATCCGTTAG
Surf1c-W24F	CGCTGGGCATGTTCCAGCTGCAGCGGCTGGAC
Surf1c-96-rv	AAATCAGGATGGCGCAGCCCAC
Surf1c-Q25A	CGCTGGGCATGTGGGCGCTGCAGCGGCTGGAC
Surf1c-Y196F	CCACCTGAGCTTTGCCGCCCAATGGTTCATG
Surf1c-W200F	TATGCCGCGCAATTCTTCATGATCGCT
Surf1q-W25F	GCGCTGATGGCCCTGGGGTCTTCCAGGTGCAG
Surf1q-89-rv	CACGAAGACCGCCAGCGCCCCGGCCAG
Surf1q-Q26A	GCGCTGATGGCCCTGGGGTCTGGGCGGTGCAGC
Surf1q-Y205F	CATCTGGGCTTTGCGGCGACGTGGTTTTTC
Surf1q-641-rv	GCTGTTGCGAAAACGGACCACGGTCA
Surf1q-W209F	CGACCTTCTTTTCGCTGGCGGCGCTTTGGGCCGGCTGGCTGCTGT
Surf1q-657-rv	CCGCATAGCCCAGATGGCTGTT

2.1.8 Mikroorganismen

2.1.8.1 *Escherichia coli* K12-Stämme

Name	Charakterisierung	Herkunft
DH5 α	supE44, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, ϕ 80dlacZ Δ M15, <i>hsdR</i> 17(<i>r</i> _K ⁻ , <i>m</i> _K ⁺), <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> ⁻ 1, <i>relA</i> 1, <i>deoR</i>	[104, 105], DSMZ
RP4-4	J53-Derivat, Helferstamm für triparentales Mating, Amp ^r , Tet ^r	[106]
C41	BL21(DE3)-Derivat, Expressionsstamm für pET-Plasmide	[107]
GR50	DH5 α , enthält pGR50	diese Arbeit
GR51	DH5 α , enthält pGR51	diese Arbeit
GR52	DH5 α , enthält pGR52	diese Arbeit
GR53	DH5 α , enthält pGR53	diese Arbeit
GR54	DH5 α , enthält pGR54	diese Arbeit
GR55	DH5 α , enthält pGR55	diese Arbeit
GR56	DH5 α , enthält pGR56	diese Arbeit
GR40/GR54	C41-Derivat, enthält pGR40 und pGR54	diese Arbeit
FA48	C41-Derivat, enthält pFA48	[100, 101]
FA48/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48 und pGR52	[100, 101]
FA48-W24F/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48-W24F und pGR52	diese Arbeit
FA48-Q25A/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48-Q26A und pGR52	diese Arbeit
FA48-H193A/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48-H193A und pGR52	[100, 101]

Material und Methoden

Name	Charakterisierung	Herkunft
FA48-Y196F/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48-Y196F und pGR52	diese Arbeit
FA48-W200F/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48-W200F und pGR52	diese Arbeit
FA49	C41-Derivat, enthält pFA49	[100, 101]
FA49/GR52	C41-Derivat, enthält pFA49 und pGR52	[100, 101]
FA49-W25F	C41-Derivat, enthält pFA49-W25F und pGR52	diese Arbeit
FA49-Q26A	C41-Derivat, enthält pFA49-Q26A und pGR52	diese Arbeit
FA49-H202A/GR52	C41-Derivat, enthält pFA49-H202A und pGR52	diese Arbeit
FA49-Y205F	C41-Derivat, enthält pFA49-Y205F und pGR52	diese Arbeit
FA49-W209F	C41-Derivat, enthält pFA49-W209F und pGR52	diese Arbeit
FA61-W200F	DH5 α -Derivat, enthält pFA61-W200F	diese Arbeit
HA02	DH5 α -Derivat, enthält pHA02	diese Arbeit
HA21	DH5 α -Derivat, enthält pHA21	diese Arbeit
HA23	DH5 α -Derivat, enthält pHA23	diese Arbeit

2.1.8.2 *Paracoccus denitrificans*-Stämme

Name	Charakterisierung	Herkunft
Pd1222	Spc ^r , Rif ^r , “enhanced mating frequency”	[108]
Pd1222-HA21	Pd1222-Derivat, enthält pHA21	diese Arbeit
MR31	<i>ctaDI::Km^r</i> , <i>ctaDII::Tet^r</i>	Wikström, Universität Helsinki
MR31-HA21	MR31-Derivat, enthält pHA21	diese Arbeit
ST4	<i>cta</i> -Operon:: <i>Km^r</i> (<i>ctaCBGE</i> deletiert)	[109]
ST4-HA21	ST4-Derivat, enthält pHA21	diese Arbeit
FA3	Pd1222-Derivat, Δ <i>surfIc::Km^r</i> , Δ <i>surfIq::Gm^r</i>	[91, 100]
FA3.61	FA3-Derivat, enthält pFA61	[91, 100]
FA3.61-W200F	FA3-Derivat, enthält pFA61-W200F	diese Arbeit
FA3-HA21	FA3-Derivat, enthält pHA21	diese Arbeit

2.1.9 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in 50% Glycerin (v/v)	100 µg/ml
Chloramphenicol	60 mg/ml in Ethanol	60 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in 50% Glycerin (v/v)	25 µg/ml
Streptomycin	25 mg/ml in 50% Glycerin (v/v)	25 µg/ml
Rifampicin	15 mg/ml in Methanol	60 µg/ml

2.1.10 Kulturmedien

Luria-Bertani-Medium (LB)	1 % (w/v) Bacto-Trypton,
[110]	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl
für Platten	1,6 % (w/v) Agar-Agar
Gefrierkultur-Medium	15% (v/v) Glycerin in 2x LB
Autoinduktionsmedium (ZYM-5052)	25 mM KH_2PO_4 , 25 mM Na_2HPO_4 ,
[111]	50 mM NH_4Cl , 5 mM NaSO_4 , 2 mM MgSO_4 ,
	0,01 mM FeCl_3 , 0,05 % (w/v) Glucose,
	0,2 % (w/v) α -Lactose, 0,5 % (v/v) Glycerin,
	1 % (w/v) Bacto-Trypton,
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
Succinat-Medium	50 mM K_2HPO_4 , 40 mM Bernsteinsäure,
[112]	10 mM NH_4Cl , 1 mM MgSO_4 , 1 mM Citrat,
	0,2 ‰ (v/v) Spurenelementlösung,
	ad pH 6,2 mit KOH
Spurenelementlösung (1000x)	100 mM CaCl_2 , 100 mM CaCl_2 , 5 mM CuSO_4 ,
	90 mM FeCl_3 , 5 mM H_3BO_3 , 50 mM MnCl_2 ,
	10 mM Na_2MoO_4 , 25 mM ZnCl_2
	in 50 % (v/v) HCl

2.1.11 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit entsalztem Wasser (PRO 90 CN Anlage der Firma Seral) angesetzt. Für molekularbiologischen Anwendungen wurden die Lösungen zusätzlich sterilfiltriert und autoklaviert. Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung insbesondere für Gelfiltrationen wurden sterilfiltriert und unter

Vakuum entgast. Sofern nicht anders gekennzeichnet, beziehen sich alle angegebenen pH-Werte auf Raumtemperatur.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht und Lagerung

Für molekularbiologische Anwendungen werden im Allgemeinen Flüssigkulturen von 2 ml LB-Medium verwendet. *Escherichia coli* Stämme werden bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler über Nacht angezogen, *Paracoccus denitrificans* Stämme bei 32 °C und 200 rpm ebenfalls über Nacht. Die verwendeten Antibiotika werden dem Medium in den entsprechenden Verdünnungen zugesetzt.

Das Wachstum auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten erfolgt für *E. coli* bei 37 °C im Brutschrank, für *P. denitrificans* bei 32 °C. Eine Lagerung der Platten kann für *E. coli* bei 4 °C erfolgen, für *P. denitrificans* bei RT.

Für eine dauerhafte Lagerung der verwendeten Stämme werden Gefrierkulturen angelegt. Hierbei werden 2 ml einer Übernachtflüssigkeitskultur für 2 min bei 6000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend in 500 µl Gefrierkulturmedium resuspendiert und kann bei -80 °C gelagert werden.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“)

Lösungen:

Lyse	0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS
Neutralisation	3 M Kaliumacetat, pH 5 (4 °C)
Chloroform/Isoamylalkohol	96 % (v/v) Chloroform, 4 % (v/v) Isoamylalkohol

Zur Isolierung bakterieller Plasmid-DNA werden 1,5 ml einer Übernachtflüssigkultur für 2 min bei 13000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Zellpellet in 100 µl kaltem H₂O resuspendiert. Durch Zugabe

von 200 μ l NaOH/SDS-Lösung erfolgt die Lyse der Zellen nach vorsichtigem Mischen durch Invertieren für 5 min auf Eis. Eine Zugabe von 150 μ l eiskalter Kaliumacetat-Lösung neutralisiert die Mischung, sodass chromosomale DNA, Proteine und andere Zellbestandteile ausgefällt werden können. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis können die ausgefallenen Bestandteile durch Zentrifugation (10 min bei 13000 rpm und 4 °C) abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA verbleibt im klaren Überstand.

Der Überstand wird nun mit einem Volumen einer Chloroform/Isoamylalkohol Mischung (24:1) versetzt und sorgfältig für 1 min gemischt, um Restprotein auszufällen. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation bei 13000 rpm und RT kann die wässrige obere Phase vorsichtig abgenommen werden. Die ausgefallenen Proteine sammeln sich als weißliche Zwischenphase an der Grenze zur organischen Phase und sollten keinesfalls mitpipettiert werden.

Aus der wässrigen Phase kann die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Volumen eiskalten Ethanol (Entzug der Hydrathülle) ausgefällt und durch 30minütige Zentrifugation bei 4 °C abgetrennt werden. Das erhaltene Pellet wird einmalig mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand entfernt und das erhaltene Pellet sorgfältig luftgetrocknet, um abschließend in 50 μ l Wasser gelöst zu werden.

Durch Zugabe von 1 μ l RNase A (2 mg/ml) und Inkubation bei 37 °C für 30 min kann ebenfalls mitpräparierte RNA verdaut werden.

2.2.3 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind ein vielfach genutztes Werkzeug für molekularbiologische Arbeiten. Überwiegend werden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, die zumeist palindromische DNA-Sequenzen von 4-12 Basenpaaren erkennen und spezifisch durch nukleophilen Angriff auf die Phosphodiesterbindung des DNA-Rückgrats schneiden können. Hierbei können entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder 3' bzw. 5' überhängende Enden (*sticky ends*) produziert werden.

Da jedes Restriktionsenzym spezielle Anforderung an Ionenstärke, pH-Wert und Reaktionstemperatur stellt, sollte darauf geachtet werden, unter möglichst optimalen Bedingungen zu arbeiten, um Spezifität und Effizienz des Enzyms zu gewährleisten. Dies gilt insbesondere für Doppelverdau mit zwei verschiedenen Enzymen.

Die Einheit (Unit, U) des Enzyms ist im Falle der Restriktionsendonukleasen definiert als die Enzymmenge, die 1 µg lineare DNA in 1 Stunde spalten kann. Üblicherweise werden die Enzyme in Konzentration von 10 U/µl vertrieben.

Gewöhnlich werden Restriktionsansätze von 20 µl Volumen verwendet, die bis zu 1 µg DNA enthalten können. Der Verdau der DNA erfolgt bei optimaler Temperatur für 1 h, kann aber auch über Nacht verlängert werden. Die meisten Enzyme können nach Herstellerangaben durch Hitzeinaktivierung gestoppt werden. Bei anschließender Agarose-Gelelektrophorese kann das Abstoppen aber auch durch Zugabe von DNA-Probenpuffer erfolgen.

2.2.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um bei Klonierungsexperimenten die Religation geschnittenen Plasmids zu verhindern, können Phosphatasen verwendet werden. Sie katalysieren die Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen, sodass die dephosphorylierten Enden bei einer anschließenden Ligationsreaktion nicht wieder zusammengeführt werden können.

Häufige Verwendung findet hierfür beispielsweise die Alkalische-Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP), da sie in nahezu allen Restriktionsenzymuffern aktiv ist. Nach erfolgter Restriktion werden die Endonukleasen also zunächst hitzeinaktiviert, 1 µl CIAP hinzu gegeben und für 30 min bis 1 h bei 37 °C inkubiert.

Alternativ kann die *Antarctic Phosphatase* verwendet werden, die allerdings zur Entfaltung ihrer Aktivität zusätzlich Zink-Ionen benötigt.

2.2.5 Auffüllen von DNA-Überhängen (Klenow *fill-in*)

Nach DNA-Restriktion mit einem 5'-Überhänge produzierenden Restriktionsenzym kann das entstandene DNA-Molekül durch Inkubation mit einer DNA-Polymerase zu

einem glatten Ende vervollständigt werden. Hierzu werden die Restriktionsendonukleasen des Restriktionsansatzes zunächst hitzeinaktiviert. Anschließend werden 0,5-1 Units einer DNA-Polymerase zugegeben (bspw. das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I) und Didesoxynukleotide (dNTPs). Es folgt eine 30minütige Inkubation bei 37 °C. Abschließend kann das Klenow-Fragment ebenfalls hitzeinaktiviert werden und die DNA-Moleküle liegen nun mit glatten Enden vor.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Lösungen:

DNA-Probenpuffer	30 mM EDTA, 0,02 (w/v) % Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin in TBE-Puffer
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris/HCl, 1 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in H ₂ O

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Agarosekonzentration, gewöhnlich 0,5 % bis 2 % (w/v), bildet sich eine Polymermatrix mit verschiedenen großen Porendurchmessern. Dies erlaubt die Auftrennung innerhalb eines gewissen Größenbereichs (bspw. von 0,8 – 10 kb bei einem 0,7 %igem Gel). Zum Gießen des Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in der Mikrowelle mit 1x TBE-Puffer bis zum Lösen aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen erfolgt der Zusatz von Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml. Dies erlaubt eine spätere Detektion der DNA unter UV-Licht. Das flüssige Gel wird nun in eine Kammer gegossen und Kämme eingesetzt, um die Auftragstaschen zu erhalten. Nach Erkalten des Gels können die Kämme entfernt werden und das Gel kann feucht bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wird das Gel in einer Elektrophoresekammer platziert und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden vorsichtig in die Taschen pipettiert und können bei Anlegen einer konstanten Spannung in

Richtung Anode wandernd nach ihrer Größe getrennt werden. Hierbei werden große DNA-Moleküle stärker retardiert als kleine und die Laufstrecke ist dementsprechend geringer als bei kleinen Fragmenten. Die angelegte Spannung ist von der Länge der Elektrophoresekammer abhängig und sollte 5 V/cm betragen.

Nach Abschluss der Elektrophorese kann die DNA durch das in sie interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Durch Vergleich der Laufstrecken mit einer Marker-DNA kann die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente bestimmt, durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten die DNA-Menge abgeschätzt werden.

Sollen die DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung aus dem Agarosegel zurück gewonnen werden, sollte zur Vermeidung von Mutationen energieärmeres, langwelligeres UV-Licht (366 nm) verwendet und die Expositionsdauer auf ein Minimum beschränkt werden.

2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen fand das Gel-Extraktionskit der Firma Zymo Research (ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit) Verwendung, dessen Arbeitsschritte im Manual des Herstellers nachzulesen sind.

Nach Ausschneiden des gewünschten DNA-Fragmentes aus dem Agarosegel wird das Agar-Blöckchen in 3 Volumen ADB-Puffer bei 55 °C gelöst. Hierbei entsprechen 100 mg Agar-Blöckchen 100 µl ADB-Puffer. Nach Lösen der Agarose wird die Mischung auf eine mitgelieferte Säule aufgetragen, mit ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen und die DNA schließlich mit 10 µl Wasser von der Säule eluiert. Zur Effektivitätssteigerung des Elutionsvorgangs kann mit auf 60 °C erhitztem Wasser gearbeitet werden.

2.2.8 Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten wird als Ligation bezeichnet und durch Ausbilden einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe durch DNA-Ligasen katalysiert. Zur Aktivierung des zu

verknüpfenden 5'-Phosphatrestes benötigen Ligasen je nach Enzymtyp entweder NADH oder ATP als Kofaktor. In dieser Arbeit wurde die DNA-Ligase des Phagen T4 verwendet, die ATP-abhängig arbeitet.

Ein Ligationsansatz umfasst üblicherweise ein Volumen von 10 µl und die Ligase wird in einer Menge von 1 CEU (*cohesive-end ligation unit*) zugesetzt. Der Ansatz wird bei 22 °C für 1 h oder über Nacht inkubiert und kann anschließend in kompetente Zellen transformiert werden.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation von DNA *in vitro* und nutzt dabei das Prinzip der Primerextension, um Bereiche auf der Ziel-DNA (*template*) exponentiell zu vervielfältigen. Unter Zuhilfenahme eines *Thermocyclers* werden drei verschiedene Temperaturphasen zyklisch abgewechselt: Bei 95-98 °C wird die *template*-DNA (1-2 ng für Plasmid-DNA, 50-100 ng für genomische DNA) zunächst aufgeschmolzen und in Einzelstränge überführt. Die Anlagerung der Primermoleküle erfolgt bei 45-72 °C und ist von der Länge und Sequenz des verwendeten Oligonukleotids abhängig und kann näherungsweise über folgende Formel berechnet werden:

$$T_a = 2^{\circ}\text{C} \cdot (A + T) + 4^{\circ}\text{C} \cdot (G + C) - 5^{\circ}\text{C}$$

Hier stehen A, T, C und G für die Anzahl der jeweiligen Basen im Primermolekül. Die Länge der Primer liegt zwischen 15 bp und 30 bp, und die *annealing*-Temperatur der beiden Primer sollte sich nicht um mehr als 20 °C unterscheiden. Es folgt schließlich die so genannte Elongationsphase bei 72 °C, bei der thermostabile DNA-Polymerasen zum Einsatz kommen und ausgehend von den gebundenen Primermolekülen die Ziel-DNA vervielfältigen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der *phusion*-Polymerase der Firma Finnzymes gearbeitet, da sie eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion besitzt. Die Dauer der Elongationsphase richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes und der verwendeten Polymerase. Für die *phusion*-Polymerase gelten Elongationsgeschwindigkeiten von bis zu 3800 bp/min. Neben den obligativen Didesoxynukleotiden und Magnesiumionen können noch weitere Additive wie beispielsweise DMSO zugesetzt

werden. Genaue Konzentrationsangaben sowie Optimierungsvorschläge können dem Manual der Firma Finnzymes entnommen werden.

Ein typisches Temperaturprotokoll ist wie folgt aufgebaut:

	primäre Denaturierung der DNA	1 min bei 98 °C
30 Zyklen	Denaturierung der DNA	15 s bei 98 °C
	Anlagerung der Primer (<i>annealing</i>)	30 s
	Elongation	15-30 s pro kb bei 72 °C
1 Zyklus	Elongation vervollständigen (<i>final extension</i>)	2 min bei 72 °C

2.2.10 Phosphorylierung von Primern

Grundvoraussetzung zur Ligation von DNA-Fragmenten ist das Vorhandensein von endständigen 5'-Phosphatgruppen. Damit dies auch bei PCR-Produkten der Fall ist, kann das PCR-Produkt nachträglich phosphoryliert werden oder es werden in der PCR-Reaktion bereits phosphorylierte Primer verwendet. Das Phosphorylieren der Primer kann beispielsweise durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert werden. Hierzu wird der Primer in einer Endkonzentration von 5 µM eingesetzt und in Anwesenheit von ATP und 10 Units PNK für 30 min bei 37 °C phosphoryliert. Die Reaktion kann durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 10 min gestoppt werden und der Primer kann ohne vorherige Aufreinigung direkt in einem PCR-Ansatz Verwendung finden.

2.2.11 Gerichtete Mutagenese

Zur gezielten Einführung von Punktmutationen in Plasmiden wurden zwei verschiedene Mutagenese-Methoden verwendet. Zum einen die *quik[®]change* Mutagenese-Methode (Stratagene) und zum andern eine inverse PCR-Methode.

Beide Methoden sind geeignet Punktmutationen mit Hilfe mutagener Oligonukleotide einzuführen und verwenden *thermocycling*-Verfahren. Die *quik[®]change* Methode arbeitet hierbei mit nur einem mutagenen Primer, der bis auf

die auszutauschende(n) Base(n) komplementär zur Ziel-DNA ist. Die inverse PCR benötigt zusätzlich noch einen nicht-mutagenen reversen Primer, der sich am Gegenstrang in entgegen gesetzter Richtung zum mutagenen Primer anlagert. Beide Verfahren verwenden ein der PCR entsprechendes Temperaturprogramm mit den Temperaturphasen Denaturierung, *annealing* und Elongation. Da die *quik[®]change* Methode mit nur einem Primer arbeitet, ergibt sich eine lineare Amplifikation der Ziel-DNA zu einem DNA-Einzelstrang. Bei der inversen PCR ergibt sich ein exponentielles Wachstum für die mutierte DNA zu einem Doppelstrang. Das Ergebnis dieser Methode lässt sich dem entsprechend auch mittels Agarose Gelelektrophorese auf Erfolg überprüfen. Es sollte ein deutlich sichtbares DNA-Fragment von der Größe des linearisierten Plasmids zu sehen sein. Der Unterschied zwischen linearem Wachstum bei der *quik[®]change* Methode und dem exponentiellen Wachstum bei der inversen PCR bedingt auch einen Unterschied in der Menge der einzusetzenden *template*-DNA. Im ersten Fall muss die *template*-Menge auf ca. 50 ng pro Ansatz erhöht werden, während im zweiten Fall eine Menge von 2 ng Plasmid-DNA ausreicht. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht darin, dass dem Ansatz bei der *quik[®]change*-Methode eine thermostabile Ligase (Ampligase) zugesetzt ist, die die entstehenden Einzelstränge zu einem Ring schließt. Damit dies möglich ist, muss von Anfang an mit phosphorylierten Primern gearbeitet werden. Nach Abschluss des *thermocycling*-Prozesses muss die eingesetzte *template*-DNA durch das Restriktionsenzym DpnI abgebaut werden. Dieses Enzym erkennt methylierte und hemimethylierte DNA und schneidet sie. Auf diese Weise wird dafür Sorge getragen, dass die mutagenisierte, nicht-methylierte Plasmid-DNA nach Transformation in *E. coli* Zellen nicht durch zelleigene DNA-Reparatursysteme erkannt und abgebaut wird. Auch die inverse PCR bedarf eines Ligationsschrittes zu ringförmiger Plasmid-DNA bevor transformiert werden kann. Allerdings kann hier mit einer normalen DNA-Ligase gearbeitet werden. Auch hier müssen die Enden der DNA phosphoryliert vorliegen, entweder durch Einsatz phosphorylierter Primer oder nachträglich durch Behandlung mit dem Enzym PNK. Ligation und Phosphorylierung können hierbei durchaus gleichzeitig bei 22 °C erfolgen.

Beide Methoden sind geeignet Punktmutationen einzuführen. Das *quik[®]change* Verfahren bietet den Vorteil, dass mehrere Mutationen durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer verschiedener mutagener Primer eingeführt werden können. Im Gegensatz dazu hat die inverse PCR Vorteile bei der Deletion von DNA-Bereichen,

die für ganze Protein-Domänen kodieren. Auch das Einführen interner *tag* Sequenzen ist hier einfach möglich.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von den Firmen Scientific Research and Development GmbH (SRD GmbH), Daimlerstraße 13a, D-61293 Bad Homburg und GATC Biotech AG, Jakob-Stadler-Platz 7, D-78467 Konstanz durchgeführt.

2.2.13 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Lösungen:

TFB I-Puffer	30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8
TFBII-Puffer	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,8

Da *E. coli*-Zellen keine natürliche Fähigkeit zur Aufnahme von DNA-Molekülen besitzen (Kompetenz), müssen sie künstlich kompetent gemacht werden. In dieser Arbeit wurden mit Rubidium und Calcium chemisch kompetent gemachte Zellen verwendet. Hierzu werden ausgehend von einer dicht gewachsenen 2 ml LB-Übernachtskultur 50 ml frisches LB-Medium 0,5 %ig angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,5 wachsen gelassen. Die Zellen werden daraufhin auf Eis abgekühlt und sanft bei 2000 g und 4 °C für 10 min geerntet. Nach Resuspendieren in 7,5 ml eiskaltem TFB I-Puffer erfolgt eine einstündige Inkubation auf Eis. Es schließt sich ein erneutes Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in 8 ml TFB-II an. Die nun kompetenten *E. coli*-Zellen können als 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

Die Kompetenz (üblicherweise 10⁷ Klone/µg DNA) wird durch Transformation mit einer bekannten Menge Plasmid-DNA überprüft. Um Kontaminationen sicher

ausschließen zu können, werden Zellausstriche auf antibiotikahaltigen Agarplatten angefertigt.

2.2.14 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen

Transformation bezeichnet eine Gentransfermethode zum Einbringen nackter DNA-Moleküle in bakterielle Zellen. Hierzu werden 100 µl kompetente Zellen für 15 min auf Eis aufgetaut und unter vorsichtigem Mischen mit 5-10 µl Ligationsansatz oder Plasmid-Lösung (ca. 2 ng Plasmid-DNA) versetzt. Anschließend an eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis wird ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min durchgeführt. Nach weiterer zweiminütiger Inkubation auf Eis erfolgt die Zugabe von 900 µl LB-Medium und die Zellen werden anschließend für 1 h bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können sich die Zellen vom Stress des Transformationsvorgangs erholen und die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum kann sich ausbilden. Abschließend werden die Zellen auf antibiotikumhaltigen Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Um sicher zustellen, dass Einzelklone erhalten werden, können verschiedene Volumina ausplattiert werden.

2.2.15 Konjugation (*Triparentales Mating*)

Da *P. denitrificans* weder eine natürlich Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA besitzt noch durch entsprechende Behandlung chemisch kompetent gemacht werden kann, muss bei diesem Organismus auf Elektroporation oder Konjugation zurückgegriffen werden.

Bei *P. denitrificans* arbeitet man bevorzugt mit einer besonderen Form der Konjugation, dem so genannten Triparentalen Mating (*triple mating*). Das zu übertragende Plasmid befindet sich hierbei in einem Donorbakterium (z.B. *E. coli* DH5α). Für den Transfer des Plasmids in einen Empfängerstamm (*P. denitrificans*) benötigt der Donorstamm Transferegene (*tra*-Gene), die er aufgrund biologischer Sicherheitsüberlegungen nicht besitzt. Diese *tra*-Gene werden plasmidkodiert durch einen Helferstamm (*E. coli* RP4-4) zur Verfügung gestellt.

Zur Durchführung eines *triple matings* werden die drei zu verwendenden Stämme (Donor, Helfer und Empfänger) als 2 ml Übernachtskulturen angezogen. Man mischt zunächst 300 µl der *P. denitrificans* Kultur (Empfänger) mit jeweils 100 µl der beiden *E. coli* Kulturen (Donor und Helfer). Die Bakterienmischung wird durch Zentrifugation bei 6000 rpm (Biofuge) für 2 min pelletiert und in 100 µl antibiotikafreiem LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wird anschließend mittig auf eine LB-Agarplatte getropft und über Nacht bei 32 °C bebrütet. Nun können die konjugativen Übertragungen der Plasmide über Zell-Zellkontakte ungestört stattfinden. Am folgenden Tag wird der Zellhaufen unter Zuhilfenahme eines Drigalski-Spatels und 1 ml frischen LB-Medium von der Platte gelöst und die Bakterienmischung in verschiedenen Verdünnung (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32) auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Die Wahl der Antibiotika zur Selektion der gewünschten *P. denitrificans* Klone richtet sich nach dem zu übertragenden Plasmid und der Art des verwendeten Empfängerstamms. Die Verdünnungsplatten werden abschließend bei 32 °C im Brutschrank inkubiert bis sich deutlich sichtbare Kolonien gebildet haben (zwei Tage).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Analytische Membranpräparation

Lösungen

Puffer 1	50 mM NaP _i , 10 mM EDTA, pH 7 (4 °C)
Zellaufschluss	10 mg/mL Lysozym
Puffer 2	20 mM NaP _i , 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8 (4 °C)

Zur Gewinnung analytischer Membranen wird sowohl für *E. coli* Kulturen als auch für *Paracoccus* Kulturen gleich vorgegangen. Die Zellkultur wird auf Eis abgekühlt und die Zellen bei 6000 x g für 15 min geerntet. Der Kulturüberstand wird entfernt und das Zellpellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe des Proteaseinhibitors Pefabloc (100 µM Endkonzentration) erfolgt die Zellyse durch

Zugabe 1/100 Volumens Lysozym für 1 h auf Eis. Die Zellsuspension wird anschließend für mindestens 1 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren, um die Lyseeffizienz zu steigern. Nach Auftauen erscheint die Zellsuspension durch Austritt genomischer DNA viskos und kann durch Beschallen mit Ultraschall (2 x 5 min auf Eis) weiter bearbeitet werden. Die genomische DNA wird durch die erzeugten Scherkräfte effektiv zerkleinert und bis dato nicht lysierte Zellen können ebenfalls aufgeschlossen werden. Zelltrümmer und nicht lysiertes Material werden anschließend bei $10\ 000\ \text{x g}$ für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Der Überstand wird einem weiteren Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge unterworfen ($140\ 000\ \text{x g}$ für 1 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das Pellet nach Ultrazentrifugation enthält die Membranfraktion, die in $200\text{-}500\ \mu\text{l}$ Puffer 2 resuspendiert wird und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Verwendung gelagert werden kann.

Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt als 1:50, 1:100 oder 1:200 Verdünnung mittels des Lowry-Protokolls (Abschnitt 2.3.5).

2.3.1.1 *E. coli* Testexpression

Testexpressionen von pET basierten Vektoren wurden im Maßstab von 150 ml LB-Kulturen durchgeführt, die mit entsprechenden *E. coli* C41 Zellen 1 %ig beimpft wurden. Die Bakterienkultur wird bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm geschüttelt. Das Zellwachstum wird bei einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm stündlich kontrolliert. Bei einer OD_{600} von 0,8 befinden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase und die Proteinexpression kann durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden. Im Weiteren wird stündlich bei 1 ml der Kultur die OD_{600} bestimmt und anschließend das Zellmaterial durch Zentrifugation ($6000\ \text{x g}$, 2 min) pelletiert. Das Zellpellet wird zu einer theoretischen OD von 10 in SDS-PAGE Probenpuffer resuspendiert. Die so gewonnenen Ganzzelllysate können mittels SDS-PAGE und Western Blot auf erfolgreiche Expression des Zielgens untersucht werden. Nach 4stündiger Induktion der Proteinexpression werden die Zellen auf Eis abgekühlt und die Membranen wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben präpariert.

2.3.1.2 *Paracoccus* Kulturen

Zur Membranpräparation aus *Paracoccus* im kleinen Maßstab werden 500 ml Succinat-Medium mit 20 ml einer *Paracoccus* LB-Übernachtskultur angeimpft und für mindestens 24 Stunden bei 32 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

Die Kultur wird am nächsten Tag auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall GSA, 6000 rpm, 20 min, 4 °C). Die Zellen werden dann in 10 mL Puffer 1 resuspendiert und die Membranpräparation erfolgt wie in 2.3.1 beschrieben.

Sollen die Membranen für Oxidase-Aktivitätsmessungen verwendet werden, wird die Membranfraktion nach Ultrazentrifugation in 20 mM KP_i , 1 mM EDTA, pH 8 (4 °C) resuspendiert.

2.3.2 Membranpräparation im großen Maßstab

2.3.2.1 *E. coli* Kulturen

Lösungen

Puffer 1 50 mM NaP_i , 1 mM EDTA, pH 8 (4 °C)

Puffer 2 20 mM NaP_i , 10 mM NaCl, pH 8 (4 °C)

Expression von COX UE I:

Zur Expression von COX UE I (kodiert auf pGR40) zusammen mit den Oxidase-Reifungsfaktoren *ctaB*, *ctaA*, *surf1c* und *ctaG* (kodiert auf pGR54) wird eine 100 ml LB-Vorkultur des entsprechenden *E. coli* C41 Stammes in Schikanekolben bei 200 rpm und 32 °C über Nacht angezogen. Ausgehend von dieser Vorkultur werden Schikanekolben mit 1,5 Litern LB-Medium 1 %ig beimpft (insgesamt 15 Liter) und bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei 32 °C und 150 rpm wachsen gelassen bevor die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG für 3 Stunden bei RT induziert wird.

Die Zellkultur wird anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 100 ml kaltem

Puffer 1 resuspendiert und mit 100 μM frisch angesetzten Protease-Inhibitors Pefabloc SC versetzt.

Expression von CtaA:

Da die Expression von CtaA über den konstitutiv aktiven *tet*-Promotor kontrolliert wird, werden 20-30 Liter LB-Medium, das mit 10 μM FeCl_3 versetzt wird, 1 %ig mit den entsprechenden Stämmen beimpft und für 18-24 Stunden bei 32 °C und 150 rpm geschüttelt. Je nach gewünschtem Belüftungsniveau werden die Zellkulturen in Normalkolben (limitierte Belüftung) oder in Schikanekolben (hohe Belüftung) angezogen.

Die Zellkultur wird anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 100 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und mit 100 μM frisch angesetzten Protease-Inhibitors Pefabloc SC versetzt.

Expression von Surf1c [100, 101]:

Zur Expression von apo-Surf1c werden die entsprechenden *E. coli* C41-Stämme in 15 Liter LB-Medium angezogen (32 °C und 150 rpm) und bei einer OD_{600} von 0,8 mit 1 mM IPTG für 4 Stunden induziert.

Bei Koexpression von Surf1 mit der *Paracoccus* Häm *a* Reifungsmaschinerie (*ctaB* und *ctaA*, kodiert auf pGR52) wird mit Autoinduktions-Medium in Schikanekolben gearbeitet. Hierbei wird die Hauptkultur nach 1 %igem Beimpfen für 24 Stunden bei 32 °C und 150 rpm geschüttelt [100].

Die Zellkultur wird anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 100 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und mit 100 μM frisch angesetzten Protease-Inhibitors Pefabloc SC versetzt.

Zellaufschluss und Membranpräparation:

Zum Aufschluss der geernteten Zellen wird sich einer Manton-Gaulin-Pressen bedient. Die Presse wird zunächst mit 1 Liter Wasser und 1 Liter Puffer gespült.

Überschüssiger Puffer wird abgepumpt ehe das Zellmaterial eingefüllt wird. Die Zellsuspension wird zuerst bei Normaldruck zur Mischung in der Presse umgepumpt, bevor die Zellen für 10 Minuten bei 400 bar Druck aufgeschlossen werden. Dabei wird die Suspension beständig über eine Kühlspirale mit Eiswasser gekühlt, um eine Überhitzung des Materials zu vermeiden. Abschließend wird das aufgeschlossene Zellmaterial mit Puffer 1 aus der Presse gespült und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C), um unaufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wird für 15 Stunden bei leicht höherer Zentrifugationskraft (GS3-Rotor, 8000 rpm, 4 °C) weiter zentrifugiert. Hierbei pelletiert die Membranfraktion und kann so von der Cytosolfraktion getrennt werden. Die Membranen werden in Puffer 2 aufgenommen und vollständig resuspendiert, bevor sie nochmals in der Ultrazentrifuge (140 000 x g für 1 h bei 4 °C) pelletiert werden, um abschließend in möglichst wenig Puffer 2 resuspendiert werden. Die Lagerung der Membranen erfolgt bei – 80 °C.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt als 1:50, 1:100 oder 1:200 Verdünnung mittels des Lowry-Protokolls (Abschnitt 2.3.5).

2.3.2.2 *Paracoccus* Kulturen

Lösungen

CtaA und Surf1

Puffer 1 50 mM NaP_i, 1 mM EDTA, pH 8 (4 °C)

Puffer 2 20 mM NaP_i, 10 mM NaCl, pH 8 (4 °C)

aa₃-Cytochrom c Oxidase

Puffer 1 100 mM KP_i, 1 mM EDTA, pH 8 (4 °C)

Puffer 2 20 mM KP_i, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8
(4 °C)

Für Membranpräparationen aus *P. denitrificans* in großem Maßstab werden zunächst 100 ml LB-Vorkulturen (32 °C, 200 rpm für 18 Stunden) angezogen, mit denen eine 2,5 Liter Succinat-Kultur beimpft werden kann (32 °C, 150 rpm für 18 Stunden). Ausgehend von dieser Succinat-Vorkultur werden 25-50 Liter frisches Succinat-Medium 4 %ig beimpft und für 24 Stunden bei 32 °C und 150 rpm inkubiert.

Die Zellkultur wird anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 100 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und mit 100 µM frisch angesetzten Protease-Inhibitors Pefabloc SC versetzt.

Der Zellaufschluss mit einer Manton-Gaulin-Pressen sowie die Präparation der Membranfraktion erfolgt wie in 2.3.2.1 beschrieben.

2.3.3 Solubilisierung von Membranen

Um Membranproteine über Säulenchromatographie aufzureinigen zu können, müssen die isolierten Membranen zuerst solubilisiert werden. Dabei stellen nicht nur die Wahl des Detergenz, dessen verwendete Menge und Konzentration des eingesetzten Membranproteins wichtige Parameter dar, sondern auch pH-Wert, Art des Puffersystems und Ionenstärke. Die optimalen Solubilisierungsbedingungen müssen für jedes Membranprotein neu definiert werden. Bei der Herstellung eines Solubilisierungsansatzes sollte darauf geachtet werden, dass das Detergenz vorsichtig und unter Rühren als letzte Komponente zum Ansatz zugegeben wird.

Zur Solubilisierung wurden in dieser Arbeit die Detergenzien Triton X-100 bzw. DDM (*n*-Dodecyl-β-D-maltosid) verwendet. Die Membranproteinkonzentration betrug 10 mg/ml.

2.3.3.1 Solubilisierung zur Isolierung von COX UE I

Der Solubilisierungsansatz wird mit entsprechenden Stammlösungen auf folgende Endkonzentrationen eingestellt: 10 mg/ml Membransuspension, 50 mM NaPi (pH 8 bei 4 °C), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 µg/ml Pefabloc SC und DDM in 2facher Menge (w/w) relativ zur eingesetzten Membranproteinmenge. Der Ansatz

wird für 1 h bei 4 °C gerührt und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 140 000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wird vor Auftragen auf Chromatographiesäulen durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.3.2 Solubilisierung zur Isolierung von CtaA

Der Solubilisierungsansatz wird mit entsprechenden Stammlösungen auf folgende Endkonzentrationen eingestellt: 10 mg/ml Membransuspension, 50 mM NaPi (pH 8 bei 4 °C), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 µg/ml Pefabloc SC und Triton X-100 in 5facher Menge (w/w) relativ zur eingesetzten Membranproteinmenge. Der Ansatz wird für 1 h bei 4 °C gerührt und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 140 000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wird vor Auftragen auf Chromatographiesäulen mit 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol auf eine Tritonkonzentration von 2,5 % verdünnt und abschließend nochmals durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.3.3 Solubilisierung zur Isolierung von Surf1

Der Solubilisierungsansatz wird mit entsprechenden Stammlösungen auf folgende Endkonzentrationen eingestellt: 10 mg/ml Membransuspension, 50 mM NaPi (pH 8 bei 4 °C), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 µg/ml Pefabloc SC und Triton X-100 in 3facher Menge (w/w) relativ zur eingesetzten Membranproteinmenge. Der Ansatz wird für 1 h bei 4 °C gerührt und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 140 000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wird vor Auftragen auf Chromatographiesäulen mit 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol auf eine Tritonkonzentration von 2,5 % verdünnt und abschließend nochmals durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.3.4 Solubilisierung zur Isolierung der Cytochrom c Oxidase

Der Solubilisierungsansatz wird mit entsprechenden Stammlösungen auf folgende Endkonzentrationen eingestellt: 10 mg/ml Membransuspension, 20 mM KPi (pH 8

bei 4 °C), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml Pefabloc SC und DDM in 1,5facher Menge (w/w) relativ zur eingesetzten Membranproteinmenge. Der Ansatz wird für 30 min bei 4 °C gerührt und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 140 000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wird vor Auftragen auf Chromatographiesäulen nochmals durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.4 Säulenchromatographie

Proteinchromatographische Methoden wurden unter Verwendung steril filtrierter Puffer bei 4 °C durchgeführt.

2.3.4.1 Isolierung von COX UE I mittels IMAC

Lösungen

Puffer A*	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,2 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer A	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer B	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, 500 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)
Puffer C	20 mM NaP _i , 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Die Isolierung von COX UE I erfolgt über eine Ni²⁺-NTA Säule (SV = 20 ml, Qiagen). Das Solubilisat wird mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen und mit Puffer A* gewaschen bis sich eine stabile Basisabsorption ergibt (5 SV). Es folgen Waschschrte mit 20 mM, 40 mM und 80 mM Imidazol über jeweils 5 SV, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, bevor COX UE I durch 250 mM Imidazol von der Säule eluiert wird. Die verschiedenen Imidazolkonzentrationen werden durch anteiliges Mischen der Puffer A und B erhalten. Nach Ankonzentrieren in Ultrafiltrationskammern (Sartorius Vivaspin,

Ausschlussvolumen 50 kDa) auf ca. 1 ml wird das in der Probe enthaltene Imidazol durch mehrmaliges Waschen mit Puffer C entfernt. Nach abschließendem Ankonzentrieren kann das Protein in 10-100 μ l Aliquots bis zur Verwendung bei -80 °C weg gefroren werden.

2.3.4.2 Isolierung von CtaA mittels IMAC

Lösungen

Puffer A	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer B	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, 500 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)
Puffer C	20 mM NaP _i , 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Die Aufreinigung von CtaA-His₆ erfolgt über eine zweistufige Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), wobei Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen) als Säulenmaterial verwendet wird. Histidin-*tag* tragende Proteine können über ihre deprotonierten Histidinreste an die Ni²⁺-Ionen der Säulenmatrix binden und so aus einem Proteingemisch isoliert werden.

Das auf 2,5 % Triton X-100 verdünnte Solubilisat wird mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine Ni²⁺-NTA Säule (Säulenvolumen SV = 20 ml) aufgetragen. Alle folgenden Wasch- und Elutionsschritte werden bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Zunächst erfolgt ein Waschschrift mit 20 mM Imidazol über eine Länge von 7,5 SV. Ein sich anschließender Waschschrift von 40 mM Imidazol über 7,5 SV führt bereits zu einer Teilelution von CtaA. Die Hauptmenge an CtaA kann mit 100 mM Imidazol (7,5 SV) von der Säule eluiert werden. Die verschiedenen Imidazolkonzentrationen werden durch anteiliges Mischen der Puffer A und B erhalten. Bei einer Aufreinigung aus *P. denitrificans*-Membranen schließt sich ein weiterer Waschschrift mit 200 mM Imidazol an, um eine vollständige Elution des Proteins zu gewährleisten. Bei der Verwendung von *E. coli*-Membranen ist dieser Waschschrift optional.

Die Fraktionen mit der Hauptmenge an CtaA (40 mM und 100 mM Imidazol-Fraktionen) werden mit Ultrafiltrationskammern auf unter 1 ml ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kDa). Das Imidazol wird mit Hilfe einer Sephadex G-25 Entsalzungssäule (SV = 30 ml, Pharmacia) unter Verwendung von Puffer A entfernt, wobei sich das Volumen auf ca. 10 ml vergrößert. Der His₆-tag wird durch proteolytischen Verdau mit TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus* Protease) abgeschnitten, um eine Nachreinigung der CtaA-Probe zu ermöglichen. Hierzu werden die CtaA-His₆ enthaltenen Fraktionen nach der Entsalzungssäule für 18 h unter leichtem Schütteln bei 4 °C mit TEV-Protease (Endkonzentration 0,02 mg/ml) inkubiert.

Nach Proteaseverdau wird der Ansatz auf eine Ni²⁺-NTA Säule (SV = 5 ml) aufgetragen und mit Puffer A nachgewaschen. Im Durchlauf befindet sich sauberes CtaA-Protein, Verunreinigungen, TEV-Protease sowie unverdautes CtaA-His₆ binden an die Säulenmatrix und können bei Bedarf mit 250 mM Imidazol zurück gewonnen werden. Der Säulendurchlauf wird abschließend per Ultrafiltration auf 1 ml ankonzentriert, einmalig mit Puffer C im Konzentrator 20fach verdünnt, um die Salzkonzentration zu senken, und abschließend auf das gewollte Volumen eingengt (< 1 ml). Das Protein wird in Aliquots von 10-100 µl bei -80°C bis zur Benutzung weg gefroren.

2.3.4.3 Isolierung von Surf1 mittels IMAC

Lösungen

Puffer A*	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,2 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer A	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer B	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, 500 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)
Puffer C	20 mM NaP _i , 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Die Isolierung von Surf1 erfolgt über eine Ni²⁺-NTA Säule (SV = 20 ml, Qiagen) wie beschrieben [100, 101]. Das Solubilisat wird mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen und mit Puffer A* gewaschen bis sich eine stabile Basisabsorption ergibt (5 SV). Es folgen Waschstschritte mit 20 mM, 50 mM und 80 mM Imidazol über jeweils 5 SV, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, bevor Surf1 durch 200 mM Imidazol von der Säule eluiert wird. Die verschiedenen Imidazolkonzentrationen werden durch anteiliges Mischen der Puffer A und B erhalten. Nach Ankonzentrieren in Ultrafiltrationskammern (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kDa) auf ca. 1 ml wird das in der Probe enthaltene Imidazol mittels einer Sephadex G-25 Entsalzungssäule (SV = 30 ml, Pharmacia) unter Verwendung von Puffer C entfernt. Nach abschließendem Ankonzentrieren kann das Protein in 10-100 µl Aliquots bis zur Verwendung bei -80 °C weg gefroren werden.

2.3.4.4 Klassische Isolierung der Cytochrom c Oxidase

Lösungen

Puffer A*	20 mM KP _i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer A	20 mM KP _i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer B	20 mM KP _i , 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer C	20 mM KP _i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer D	20 mM KP _i , 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Die Aufreinigung nativer aa₃-Cytochrom c Oxidase erfolgt mittels dreier chromatographischer Schritte unter Verwendung von Anionenaustausch- und Gelfiltrationssäulen.

Zunächst wird das Solubilisat auf eine Anionenaustauschersäule (DEAE-Sepharose CL-6B, SV = 200 ml) mit einer Flussrate von ca. 2 ml/min aufgetragen. Es ist zu beachten, dass pro 1000 mg eingesetzten Membranproteins 100 ml Säulenmaterial zu verwenden sind. Nach Auftrag des Solubilisats wird mit 1 SV Puffer A* nachgewaschen. Es folgt ein linearer Salzgradient von 100-600 mM NaCl (Puffer A und B) über 5 SV bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Fraktionen von 7,5 ml Volumen werden gesammelt und grünliche Fraktionen werden mittels Redoxspektren auf Anwesenheit von Oxidase überprüft, die etwa ab 280 mM NaCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen werden gepoolt und per Ultrafiltration auf ca. 2 ml ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 50 kDa).

Das Konzentrat wird auf eine mit Puffer A äquilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen (Ultrogel AcA 34, SV = 250 ml) und bei einer Flussrate von 0,2 ml/min von der Säule in 3 ml Fraktionen mit Hilfe von 1,5 SV Puffer A eluiert. Das Auftragsvolumen sollte sich zwischen 1-2 % des Säulenvolumens bewegen, um eine optimale Trennung der Gelfiltration zu gewährleisten. Grünliche Fraktionen werden wiederum mittels Redoxspektren auf Oxidase überprüft und gepoolt.

Der Gelfiltrationspool wird abschließend wiederum auf eine mit Puffer C äquilibrierte Anionenaustauschersäule (DEAE-Sepharose CL-6B, SV = 200 ml) aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer C (1 SV) wird ein Salzgradient von 100-400 mM NaCl (Puffer C und D) über 5 SV genutzt, um letzte Verunreinigungen zu entfernen. Grünliche Fraktionen werden wiederum per Redoxspektren auf die Anwesenheit von Oxidase untersucht, gepoolt, ankonzentriert und in Aliquots von 10-100 µl bis zur Verwendung bei -80 °C weg gefroren.

2.3.4.5 Analytische Gelfiltration

Gelfiltrationsexperimente sind geeignet, den Aggregationszustand gereinigter Proteinproben auf Monodispersität zu überprüfen und mögliche nicht native Aggregationsformen abzutrennen. Insbesondere bei Proteinen, deren Funktion nicht durch Aktivitätsmessung zugänglich ist (bspw. COX UE I, CtaA und Surf1), sollte sich eine Gelfiltration anschließen.

Für die Analyse von COX UE I, CtaA und Surf1 wird eine Gelfiltrationssäule (Superose 6 10/30, GE Healthcare, SV = 24 ml) an einem Äkta Purifier System mit

Puffer (20 mM NaP_i, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 bei 4 °C) äquilibriert. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min werden 100-500 µg ankonzentriertes, steril filtriertes Protein über eine 100 µl Auftragsschleife (*sample loop*) aufgetragen und über 1,5 SV von der Säule eluiert. Fraktionen von 1 ml Volumen werden gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Eine Abschätzung des Molekulargewichts erfolgte mittels einer Eichkurve, die durch geeignete Eichproteine bei Läufen in detergenzhaltigem Puffer ermittelt wurde [100].

2.3.4.6 Präparative Gelfiltration

Für präparative Zwecke werden 5-20 mg ankonzentriertes, steril filtriertes Surf1 an einem Äkta-Purifier System mit Hilfe eines 1 ml *sample loops* auf eine in Puffer (20 mM NaP_i, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 bei 4 °C) äquilibrierte Superose 6 Säule (SV = 220 ml) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgt über 1,5 SV bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Es werden 3 ml Fraktionen gesammelt. Anhand des Elutionsprofils werden die monodispersen Fraktionen gepoolt, ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kDa) und in Aliquots von 50 µl bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.3.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Lösungen

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

Proteinkonzentrationen werden nach einem modifizierten Lowry-Protokoll in Anwesenheit von 0,5 % (w/v) SDS bestimmt [113, 114]. Hierzu wird zunächst eine

Arbeitslösung, bestehend aus 20 ml Lowry A, je 0,2 ml Lowry B1 und B2 sowie 0,5 ml Lowry C, frisch angesetzt. Eine Eichreihe aus BSA-Lösungen von 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 und 1,5 mg/ml sowie unbekannte Proben in verschiedenen Verdünnungen werden hergestellt. Sämtliche Proben sollten als Doppel- oder Mehrfachbestimmung durchgeführt werden, um zu verlässlichen Konzentrationswerten zu gelangen.

Zu 50 µl Probe (Eichreihe und unbekannte Proben) werden 850 µl Arbeitslösung gegeben und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µl Folin-Lösung und ein weiterer Inkubationsschritt bei RT für 30 min im Dunkeln. Abschließend wird die Absorption der Proben bei 750 nm gegen Wasser bestimmt. Mit Hilfe der Eichreihe lässt sich eine Eichkurve erstellen anhand derer sich die Konzentration der unbekanntenen Proben in mg/ml ermitteln lässt.

2.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.3.6.1 Tris-Glycin-System nach Laemmli

Lösungen SDS-PAGE

Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris/HCl, 8 mM EDTA, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl, 8 mM EDTA, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid
Probenpuffer (2x)	20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in 2x Sammelgelpuffer
Laufpuffer (5x)	125 mM Tris, 0,96 M Glycin, 1 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt mit dem Tris-Glycin-System nach Laemmli [115]. Hierbei werden die Proteine durch Anlagerung von SDS denaturiert, wobei sich ein konstantes

Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein einstellt. Hierdurch wird die Eigenladung des Proteins völlig überdeckt und eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht ist in einem Polyacrylamid-Gel möglich. Allerdings können Membranproteine wegen ihrer großen hydrophoben Bereiche tendenziell mehr SDS anlagern, weshalb sich ihre Laufweite im Gel vergrößert und sie folglich bei niedrigeren Molekulargewichten im Polyacrylamid-Gel zu finden sind (apparentes Laufverhalten). Membranproteinproben werden mit SDS-Probenpuffer verdünnt bei 37 °C für 20 min inkubiert.

Die verwendeten Polyacrylamid-Gele bestehen aus 12 %igen oder 15 %igen Trenngelen, wobei das Verhältnis von Acrylamid zu Bis-Acrylamid 37,5 : 1 beträgt. Die Radikalstarter TEMED und Ammoniumperoxosulfat initiieren den Polymerisationsprozess, nach dessen Abschluss 5 %ige Sammelgele auf die Trenngele polymerisiert werden. Probenkämme im Sammelgel erlauben das Herstellen von Taschen, in die die Probe geladen werden kann.

Nach Auftragen der Proben können die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld getrennt werden und laufen in Richtung Anode, wobei jedoch größere Proteine eine stärkere Retardation aufweisen als kleinere Proteine. Das Arbeiten mit Sammel- und Trenngel (diskontinuierliche Elektrophorese) führt zu verbesserten Auftrennungen und erhöht die Bandenschärfe. Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung von 180 V für 45-80 min. Zur Abschätzung des Molekulargewichts kann mit den Banden eines Markerproteingemischs verglichen werden, wobei das apparente Laufverhalten von Membranproteinen Berücksichtigung finden sollte.

Lösungen LDS-PAGE

Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid
Probenpuffer (2x)	20 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in 2x Sammelgelpuffer
Laufpuffer (5x)	125 mM Tris, 0,96 M Glycin, 1 mM EDTA

2.3.7.2 Silberfärbung

Lösungen

Fixierlösung	50 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,5 ml/l 37 % (w/v) Formaldehyd
Vorbehandlungslösung	0,2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
Färbelösung	0,2 % (w/v) AgNO_3 , 0,75 ml/l 37 % (w/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung	6 % (w/v) Na_2CO_3 , 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 ml/l 37 % (w/v) Formaldehyd

Die Silberfärbung erlaubt den Nachweis von 5-30 ng Protein pro Bande und ist somit um ein vielfaches sensitiver als die Coomassie-Färbung.

Das Gel wird nach der Elektrophorese für mindestens 2 Stunden, besser aber über Nacht, mit Fixierlösung inkubiert. Es folgen drei zwanzigminütige Waschschrte mit 50 %igem (v/v) Ethanol. Darauf wird das Gel für eine Minute mit Vorbehandlungslösung geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser schließt sich eine zwanzigminütige Inkubation mit Färbelösung an. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit Wasser wird Entwicklerlösung zugegeben. Die Färbereaktion kann durch Austausch gegen 50 mM EDTA gestoppt werden, wenn der gewünschte Färbegrad erreicht ist.

2.3.7.3 Häm-Färbung

Lösungen

Lösung 1	0,25 M Natriumacetat, pH 5
Färbelösung	450 mg/l TMBZ, 30 % (v/v) Methanol in Lösung 1
Entwicklerlösung	0,24 % (v/v) H_2O_2 , 30 % (v/v) Methanol in Lösung 1
Lösung 4	30 % (v/v) Isopropanol in Lösung 1

Mit Hilfe von TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) und Wasserstoffperoxid lassen sich Häm-Gruppen bzw. Häm-Proteine aufgrund ihrer Peroxidaseaktivität spezifisch anfärben. Dies ist insbesondere nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese nützlich, um Häm-Proteine sichtbar zu machen [117]. Die Färbereaktion kann sowohl direkt in Polyacrylamid-Gelen, als auch nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgen. In beiden Fällen wird zunächst kurz in Lösung 1 äquilibriert, bevor das Gel oder die Membran für 2 Stunden auf Eis mit Färbelösung inkubiert werden. Sämtliche Schritte sollten im Dunkeln durchgeführt werden, um die Spaltung von TMBZ durch Lichteinwirkung zu verhindern. Durch Zugabe von Entwicklerlösung kann die Färbereaktion gestartet werden. Die Häm-Gruppen katalysieren hierbei den Umsatz von TMBZ zu einem türkisen Farbstoff. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbungen kann kurz mit Lösung 4 gewaschen werden.

Gefärbte PVDF-Membranen können nach der Dokumentation mit Methanol entfärbt und für Western Blot-Analysen weiterverwendet werden.

2.3.8 Western Blot

Lösungen

Transferpuffer (Nass-Blot)	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % SDS
Transferpuffer (<i>semidry</i> -Blot)	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,0375 % SDS
Transferpuffer nativ (für anschließende Häm-Färbung)	25 mM Tris, 190 mM Glycin
Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % TCA
TBS	10 mM Tris/HCl, 7,5 mM NaCl, pH 7,5
TBS-TT	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5
BSA	3 % (w/v) BSA in TBS

Material und Methoden

TMN	100 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, pH 9,5
NBT-Lösung	75 mg/ml in 70 % (v/v) DMF
BCIP-Lösung	50 mg/ml in DMF
Färbelösung	45 µL NBT-Lösung, 45 µL BCIP-Lösung in 10 ml TMN
Stopplösung	50 mM EDTA, pH 8

Die Methode des Western Blots dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Transfer auf eine Membran. Der Nachweis nutzt die spezifische Bindung eines Antikörpers oder eines Antikörpergemischs (Antiserum) an ein zu untersuchendes Zielprotein. Im Weiteren kann an den Erstantikörper ein zweiter Antikörper binden, dessen Verknüpfung mit einem Reporterprotein eine Detektion erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Zweitantikörper verwendet, die mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt sind. Im Falle von Antiseren als Erstantikörper wurde ein Protein A-Alkalische Phosphatase Konjugat (AAP) verwendet.

Die zur Western Blot-Analytik bestimmten Proteinproben werden zunächst über Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es folgt ein Transfer auf eine Nitrocellulose-(NC) oder Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran. Bei Verwendung von PVDF-Membranen muss vor Benutzung eine Aktivierung durch Äquilibrieren in Methanol erfolgen. Zum Transfer wird ein *semidry*- oder Nass-Blot-Verfahren genutzt. In beiden Fällen wird das Gel luftblasenfrei auf eine Membran gelegt und zwischen Transferpuffer-getränkten Filterpapieren zu einem Paket gepackt. Im Falle des Nass-Blot Verfahrens wird dieses Paket zusätzlich durch zwei Plastiklochplatten und Gummibänder zusammengehalten. Im Fall des *semidry*-Verfahrens erfolgt der Aufbau des Pakets direkt auf der Plattenanode des verwendeten Geräts. Der Transfer-Vorgang erfolgt beim *semidry*-Verfahren bei konstanter Spannung von 15 V für 1 h, beim Nass-Blot Verfahren hingegen bei konstanten 400 mA ebenfalls für 1 h. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld aus dem Gel heraus und werden auf der Membran fixiert.

Nach Ende des Transfers wird die Membran in einer Glasschale kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, um anschließend mit Ponceau-Lösung gefärbt zu werden. Dies erlaubt es, die Transfereffizienz zu überprüfen und im Falle der Verwendung eines ungefärbten Markers, dessen Banden mit einem Detergenz-beständigen Kuli zu markieren. Die Ponceau-Lösung kann mit TBS-Puffer wieder abgewaschen werden. Es folgt das Absättigen (Blocken) der freien Bindungsstellen auf der Membran mit BSA-Lösung unter leichtem Schütteln für mindestens 1 h, besser über Nacht.

Die Membran wird nach Absättigen je zweimalig mit TBS-TT und TBS gewaschen. Es schließt sich eine einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper an. Die Antikörper und Antiseren werden ausgehend von ihrer Stammlösung in einer 1:1000 Verdünnung in 3 % BSA eingesetzt, für das Antiserum gegen das *Paracoccus* Kupferchaperon CtaG jedoch in einer 1:100 Verdünnung. Es folgen weitere Waschschriffe mit je zweimal TBS-TT und TBS. Der Zweitantikörper wird ebenfalls für 1 h auf den Blot gegeben. Abschließend erfolgt stringenteres Waschen mit 5mal TBS-TT und zweimal TBS, um sämtliche nicht spezifischen Antikörperbindungen an die Membran aufzulösen. Das Signal-zu-Rauschen Verhältnis wird hierdurch stark verbessert. Ein weiterer Waschschriff mit TMN-Puffer bereitet die Membran auf die folgende Färbereaktion vor. Hierzu wird Färbelösung auf die Membran gegeben und die Farbentwicklung erfolgt im Dunkeln bis die Banden deutlich sichtbar angefärbt sind und noch keine Hintergrundfärbungen zu sehen sind. Die Färbereaktion kann durch Stopplösung beendet werden. Der Blot kann zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und durch Scannen digitalisiert werden.

2.3.9 Häm-Extraktion

Lösungen:

basisches Aceton	10 mM NH ₄ OH, 90 % (v/v) Aceton
saures Aceton	1,2 M HCl, 90 % (v/v) Aceton
Salzsäure	1,2 M HCl

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) wurde in dieser Arbeit zur Analytik von Häm-Extrakten eingesetzt. Hierbei nutzt man das unterschiedliche Elutionsverhalten einzelner Häm-Spezies von einer hydrophoben Säulenmatrix (μ RPC-C2/C18-Säule, GE Healthcare) mit verschiedenen hydrophoben organischen Lösungsmitteln (bspw. Acetonitril). Es wurde apparativ bedingt bei 4 °C gearbeitet. Verschiedene Acetonitril-Konzentrationen ergeben sich durch anteiliges Mischen der Puffer A und B, die in HPLC-Qualität eingesetzt werden müssen.

Die verwendete HPLC-Säule (μ RPC-C2/C18-Säule, SV = 1,66 ml, GE Healthcare) wird zunächst mit 5 SV 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA mit einem Äkta Purifier System äquilibriert. Die zu analysierenden Häm-Extrakte werden auf eine Endkonzentration von 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA eingestellt und steril filtriert. Anschließend wird die Probe über einen 100 μ l *sample loop* auf die Säule aufgetragen. Es folgt ein Waschschriff mit 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) über 2 SV, bevor ein linearer Gradient von 50 %-100 % Acetonitril über eine Länge von 5 SV angelegt wird. Hierbei eluiert Häm *b* zuerst (9,7 min), gefolgt von Häm *a* (23,5 min) und als letztem Häm *o* (25,4 min). Bei Bedarf können 1 ml Fraktionen gesammelt und spektral weiter analysiert werden.

2.3.11 *In vitro* Häm-Transfer Assay

Lösungen:

Puffer A	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Puffer B	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, 500 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)
Puffer C	20 mM NaP _i , 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

CtaA und apo-Surf1c werden in Puffer C mit einer Endkonzentration von 0,75 mg/ml CtaA und 0,895 mg/ml apo-Surf1c gemischt. Dies entspricht einem molaren

Verhältnis von CtaA : apo-Surf1c von 1 : 2. Die Mischung wird bei 25 °C für 1 h inkubiert. Die Proteine können anschließend wieder über eine Ni²⁺-NTA Säule (SV = 5 ml) voneinander getrennt werden. Die Proteinmischung wird auf die Säule aufgetragen und es wird mit Puffer A gewaschen bis sich eine stabile Basislinie ergibt (5 SV). Im Durchlauf befindet sich zurück gewonnenes CtaA. Es folgt ein Waschschriff mit 50 mM Imidazol über 5 SV, bevor Surf1c mit 200 mM Imidazol ebenfalls über eine Länge von 5 SV wieder von der Säule eluiert wird. Die verschiedenen Imidazolkonzentrationen werden durch anteiliges Mischen der Puffer A und B erhalten. Sämtliche Fraktionen werden getrennt gesammelt, ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kDa) und im Konzentrator mit Puffer C gewaschen, um Imidazolreste zu entfernen. Die Proteinkonzentrationen werden mittels des Lowry-Assays bestimmt, bevor weitere Analysen mit SDS-PAGE und UV/vis Spektroskopie folgen.

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Enzymaktivitätstests

Aktivitätsmessung, sowie die Konzentrationsbestimmungen der Substrate wurden an einem U-3000 UV/vis-Spektrophotometer der Firma Hitachi durchgeführt.

2.4.1.1 Reduktion von Cytochrom *c*

25 mg Cytochrom *c* (aus Pferdeherz) werden in 500 µl 20 mM KP_i, pH 8 gelöst und durch Zugabe einiger weniger Natriumdithionit Kristalle reduziert. Diese Reaktion lässt sich durch einen Farbumschlag von dunkelrot nach rot-orange beobachten.

Das überschüssige Dithionit wird anschließend über eine Gelfiltration (Sephadex G25, Pharmacia) entfernt. Da Dithionit eine starke Absorption um 350 nm zeigt, wird zur Kontrolle der vollständigen Abtrennung ein Spektrum von 300 nm bis 650 nm aufgenommen. Durch Nachreduktion lässt sich feststellen, ob eine vollständige Reduktion der Cytochrom *c*-Lösung erreicht wurde. Die Bestimmung der

Konzentration erfolgt mittels eines Redoxspektrums im Bereich von 500 nm bis 650 nm ($\Delta\epsilon_{550-535} = 19,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.4.1.2 Aktivitätsmessung der Cytochrom *c* Oxidase

Lösungen

Puffer für Cytochrom <i>c</i>	20 mM KP_i , pH 8
Aktivitätspuffer	20 mM KP_i , 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8

Die aa_3 -Cytochrome *c* Oxidase katalysiert durch die Oxidation von Cytochrom *c* die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff.

Zur Bestimmung der Aktivität verfolgt man die Oxidation von Cytochrom *c* bei 550 nm ($\Delta\epsilon_{\text{cyt } c, 550 \text{ nm}} = 19,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Cytochrom *c* wird mit Aktivitätspuffer auf eine Endkonzentration von 20 μM verdünnt. Nach Zugabe von 5 μl einer geeigneten Verdünnung einer Oxidaseprobe wird die Abnahme der Absorption bei 550 nm über einen Zeitraum von 10 Sekunden verfolgt und die Steigung durch lineare Regression bestimmt.

Die spezifische Aktivität kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon \cdot c \cdot d} \left[\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$$

Hier ist ΔE die Absorptionsänderung, V der Verdünnungsfaktor, ϵ der molare Extinktionskoeffizient für das Substrat, c die Proteinkonzentration und d die Schichtdicke der Küvette. Bei aufgereinigtem Enzym lässt sich die Wechselzahl des Enzyms wie folgt berechnen, wobei M_w das Molekulargewicht des Enzyms bezeichnet.

$$\text{Wechselzahl} = \text{Aktivität} \cdot \frac{M_w}{60} \left[\frac{1}{s} \right]$$

2.4.2 Spektroskopische Methoden

Alle optischen Spektren wurden an einem U-3000 UV/vis-Spektrophotometer der Firma Hitachi aufgenommen.

2.4.2.1 Native Redoxspektren

Solubilisierte Membranproteinproben oder aufgereinigte Proteine können in geeigneten Verdünnungen mit Redox-Differenzspektren analysiert werden. Die Absorption der Probe wird in einem Wellenlängenbereich von 375 nm bis 650 nm bestimmt. Zunächst wird ein oxidiertes Spektrum aufgezeichnet, das die Probe im Zustand ihrer Präparation bestimmt (luftoxidiert). Um eine vollständige Oxidation zu gewährleisten, wird Kaliumhexacyanoferrat zugesetzt und erneut gemessen. Das Reduktionsmittel Natriumdithionit überführt die Probe in einen reduzierten Zustand und erlaubt die Aufnahme eines reduzierten Spektrums. Durch Differenz des oxidierten Spektrums vom reduzierten bestimmt man das für jedes hämhaltige Protein charakteristische Redox-Differenzspektrum. Hierbei ist besonders der α - und β -Bereich des Häm-Spektrums von Bedeutung, aus dem sich im Falle der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase die Konzentration über den Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon_{(\text{redox}, 605-630 \text{ nm})} = 11,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmen lässt [119].

2.4.2.2 Pyridin-Hämochromspektren

Denaturierende Pyridin-Hämochromspektren erlauben die Analyse von Häm-Komponenten ohne die spezifischen Einflüsse der jeweiligen Proteinumgebung. Hierzu wird die zu untersuchende Probe mit 20 % (v/v) Pyridin, 100 mM NaOH versetzt. Die Lauge denaturiert das Protein und sorgt für die Freisetzung der Häm-Gruppen. Pyridin kann nun die fünfte und sechste Koordinationsstelle des Eisenatoms besetzen. Die Aufnahme von Redoxspektren erfolgt wie beschrieben (vgl. 2.4.2.1) im Bereich von 500 bis 650 nm.

Die Absorptionsbanden im α - und β -Bereich erlauben die Identifizierung verschiedener Häm-Typen und die Bestimmung der Konzentration über beschriebene Extinktionskoeffizienten:

Häm-Typ	Wellenlänge λ (nm)	Extinktionskoeffizient ϵ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Quelle
Häm <i>a</i>	587-620	21,7	[120]
Häm <i>b</i>	557-540	22,1	[120]
Häm <i>o</i>	552-535	24,0	[121]

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden in mehreren Teilbereichen dargestellt, in denen die experimentellen Ergebnisse jeweils durch eine kurze theoretische Betrachtung eingeleitet werden.

3.1 Bioinformatische Analyse von CtaA und Surf1

Diese Arbeit beschäftigt sich im Besonderen mit den Oxidase-Biogenesefaktoren CtaA und Surf1 aus *Paracoccus denitrificans*, die zunächst mit gängigen bioinformatischen Analysen näher betrachtet werden sollen.

3.1.1 CtaA

Die Häm *a* Synthase, Cox15 bei Eukaryonten und CtaA bei Prokaryonten, ist ein integrales Membranprotein, das die Synthese der Häm *a*-Kofaktoren für terminale Häm-Kupfer Oxidasen, insbesondere die Cytochrom *c* Oxidase, katalysiert. Wie in den einleitenden Kapiteln eingeführt, werden dem Protein acht Transmembranhelices vorausgesagt (vgl. Abschnitt 1.4.2), in denen die katalytisch aktiven Reste liegen.

3.1.1.1 Transmembran-Vorhersage für CtaA

Die Proteinsequenz für das *Paracoccus* CtaA-Homolog (Pden_3699) wurde mit dem Programm TMHMM (Technische Universität Dänemark, DTU) auf Membranhelices untersucht [97]. Das Programm ordnet jeder Aminosäure einen Hydrophobizitätswert zu und sucht so nach hydrophoben Bereichen innerhalb von Proteinsequenzen. Es ist zur Vorhersage von α -helikalen Membranproteinen geeignet und berücksichtigt dabei auch das Vorkommen positiv geladener Aminosäurereste am cytoplasmatischen Ende einer Transmembranhelix, die so genannte *positive-inside rule*, womit auch eine Orientierungsanalyse des Membranproteins möglich ist [122].

Das *Paracoccus* CtaA-Homolog wird mit acht Transmembranhelices vorhergesagt, wobei nur zwischen Helix I und II sowie Helix V und VI längere periplasmatische Bereiche zu erwarten sind (Abb. 3.1). Die beiden Termini des Proteins weisen ins Cytoplasma, wobei der N-Terminus deutlich länger ist. Der kürzere C-Terminus wurde im Weiteren als Ansatzpunkt für einen Affinitäts-tag gewählt.

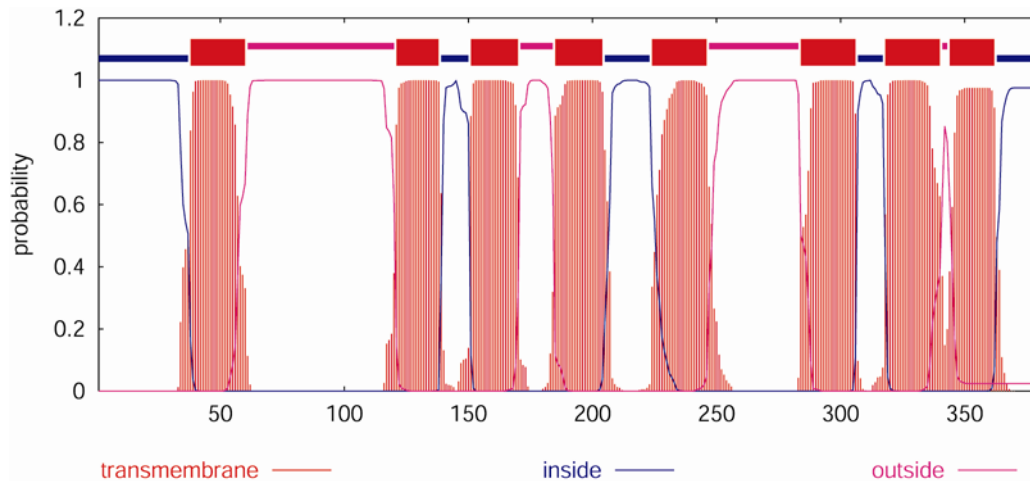


Abb. 3.1: Transmembranhelix-Vorhersage für *Paracoccus* CtaA

Die Vorhersage wurde mit dem Programm TMHMM erstellt. Transmembranhelices sind in rot hervorgehoben, cytoplasmatische Regionen in blau und periplasmatische Bereiche in magenta. Für CtaA werden acht Transmembranhelices vorausgesagt, beide Termini weisen ins Cytoplasma.

3.1.1.2 Sequenzalignment für CtaA

Zu Beginn dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob sich die für das *Bacillus subtilis* Homolog beschriebenen, katalytisch wichtigen Aminosäurereste ebenfalls im *Paracoccus* CtaA-Protein (Gen-Nr.: Pden_3699) finden. In der Tat weisen die beiden CtaA-Varianten aus *Bacillus* und *Paracoccus* mit 32,9 % eine große Sequenzähnlichkeit auf (Sequenzidentität: 20,2 %). Ein Vergleich des *Paracoccus* Proteins mit der humanen Version zeigt jedoch, dass sich beide Proteine sehr viel ähnlicher sind: 34,4 % Sequenzidentität und 46,4 % Sequenzähnlichkeit.

Ein Sequenzalignment (Abb. 3.2) wurde mit dem Programm ClustalX 2.0 erstellt [94, 95]. Hierzu wurden neben den eukaryontischen Cox15-Homologen aus *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Mus musculus* und *Saccharomyces cerevisiae* auch die bakteriellen CtaA-Homologe aus *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium*

japonicum, *Paracoccus denitrificans* und *Rhodobacter sphaeroides* ausgewählt. Allen verwendeten Organismen ist gemein, dass sie ein Surf1-Homolog besitzen. Für das Alignment wurden weiterhin CtaA-Sequenzen von *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* genutzt. Im Genom dieser Organismen lässt sich kein *surf1*-Homolog nachweisen. Trotz allem besitzen sie aber *a*-Typ Häm enthaltende terminale Oxidasen. Tabelle 3.1 fasst die für das Sequenzalignment verwendeten CtaA-Sequenzen zusammen.

Tabelle 3.1: Überblick über im Sequenzalignment verwendete Cox15/CtaA-Sequenzen

Cox15/CtaA-Homolog aus	Swiss-Prot Nummer	Surf-Homolog	Alignment-Gruppe	Häm <i>a</i> enthaltende Oxidase
<i>H. sapiens</i>	Q7KZN9	Ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>B. taurus</i>	Q08DG6	ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>M. musculus</i>	Q8BJ03	ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>S. cerevisiae</i>	P40086	ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>A. tumefaciens</i>	Q7CZN9	ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>B. japonicum</i>	Q89KD9	ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>P. denitrificans</i>	A1B8C2	ja	A	<i>aa</i> ₃ , <i>ba</i> ₃
<i>R. sphaeroides</i>	A3PQK0	ja	A	<i>aa</i> ₃
<i>B. subtilis</i>	P12946	nein	B	<i>aa</i> ₃ , <i>caa</i> ₃
<i>L. monocytogenes</i>	Q8Y5K2	nein	B	<i>aa</i> ₃
<i>S. aureus</i>	A7X127	nein	B	<i>aa</i> ₃

Aus Abbildung 3.2 wird ersichtlich, dass beide Cox15/CtaA Gruppen A und B alle katalytisch wichtigen Reste streng konserviert innerhalb der Transmembranhelix-Bereiche (TMH) vorliegen haben, wobei Häm-koordinierende Histidin-Reste mit einem Pfeil markiert sind. Gruppenweise Unterschiede lassen sich allerdings besonders in den periplasmatischen Bereichen zwischen TMH I und II, III und IV sowie V und VI erkennen. Auch die Übergänge von TMH I und III in den periplasmatischen Bereich weisen starke Unterschiede zwischen den beiden Organismen-Gruppen auf. Diese zusätzlichen Bereiche des Proteins könnten möglicherweise regulatorische Angriffspunkte darstellen, die mit der reinen enzymatischen Funktion des Proteins nicht unmittelbar zusammenhängen. Sie könnten folglich im Biogenese-Prozess der Cytochrom *c* Oxidase wichtig sein und beispielsweise Bindungsstellen für Biogenesefaktoren wie Surf1 generieren.

Ergebnisse

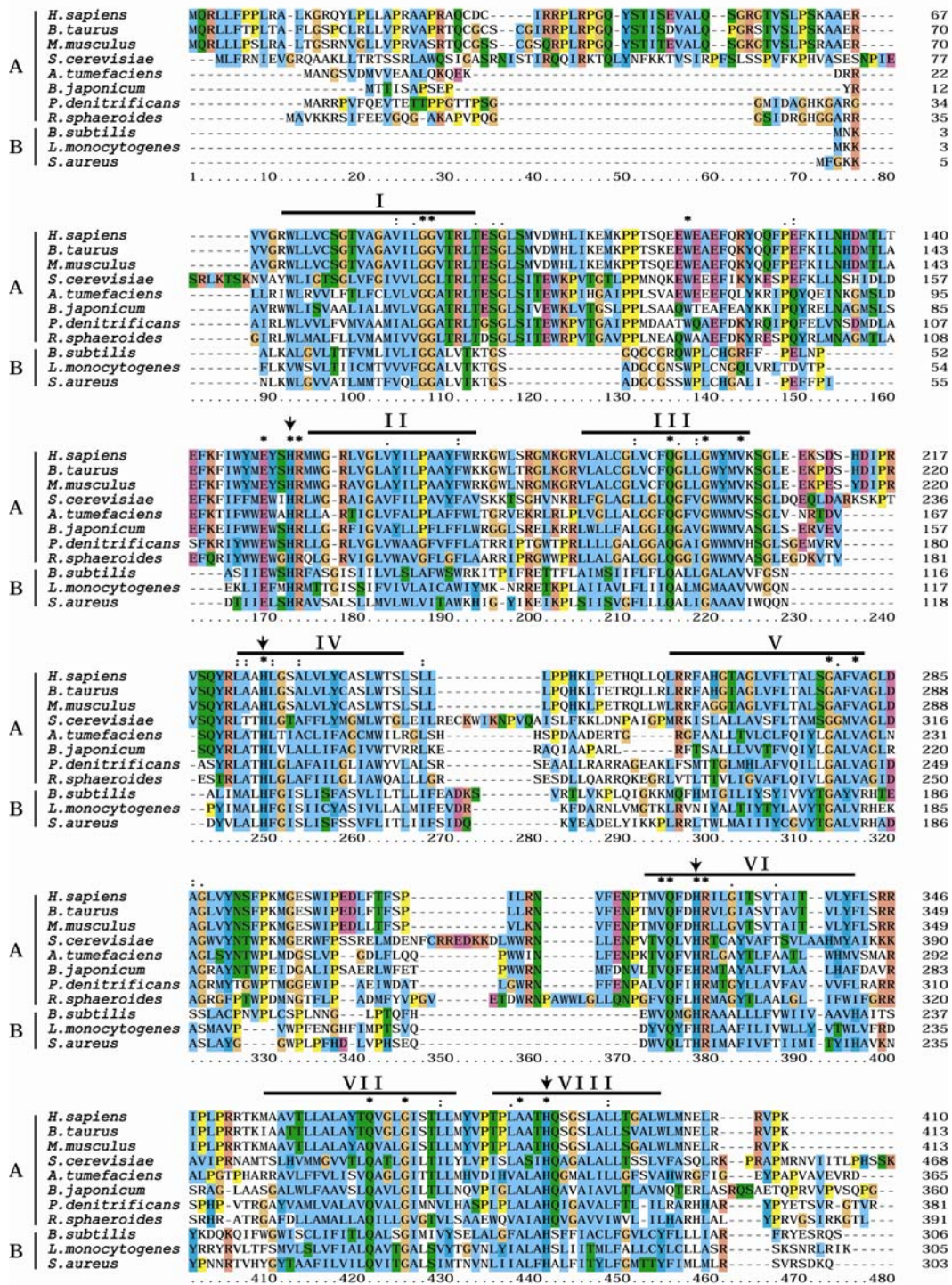


Abb. 3.2: Aminosäure-Sequenzalignment von CtaA-Proteinen

Die für das *Paracoccus* CtaA-Homolog vorhergesagten Transmembranhelices sind als schwarzer Querbalken gekennzeichnet und mit I-VIII durchnummeriert. Konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern (*) markiert, Häm-koordinierende Histidine zusätzlich mit einem Pfeil (↓). Die CtaA-Sequenzen wurden der Swiss-Prot Datenbank entnommen (siehe Tabelle 3.1) und können in eine Organismengruppe zusammengefasst werden, die ein Surf1-Homolog enthalten (A) und solche, die kein Surf1-Homolog enthalten (B). Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalX 2.0 erstellt.

3.1.1.3 Phylogenetische Beziehung verschiedener CtaA Homologe

Die gruppenweise Einteilung der im beschriebenen Sequenzalignment verwendeten Cox15/CtaA Sequenzen lässt sich auch deutlich anhand einer phylogenetischen Analyse rechtfertigen. Hierzu wurde das Programm Phylogeny.fr benutzt, das sich als *online*-Version auf einer gleich lautenden Website findet [123].

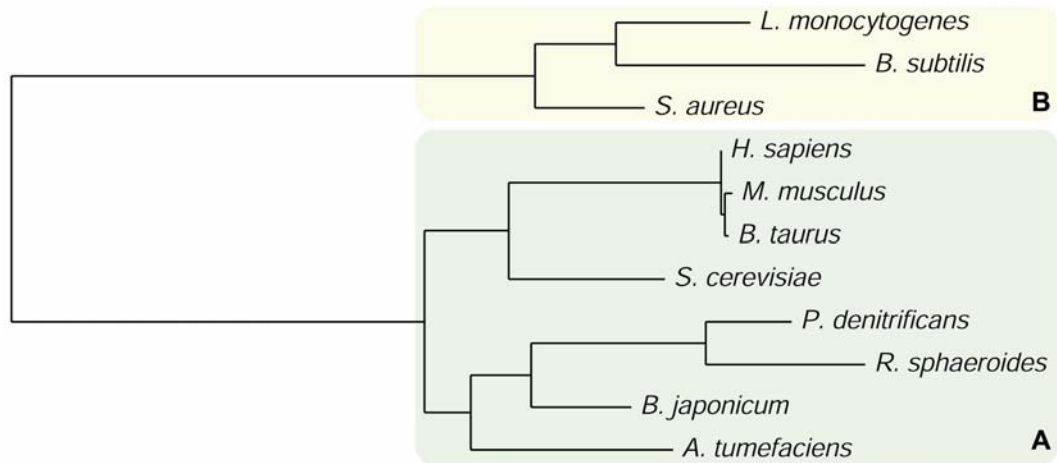


Abb. 3.3: Phylogenetische Beziehung ausgewählter Cox15/CtaA Sequenzen

Gruppe A enthält Cox15/CtaA Sequenzen von Organismen, die auch ein Surf1 Protein besitzen, während Gruppe B Sequenzen beinhaltet, die aus Organismen ohne Surf1-Homolog stammen.

3.1.2 Sekundärstruktur-Vorhersage für Surf1

Für den Oxidase-Biogenesefaktor Surf1, dessen Fehlen beim Menschen Ursache des Leigh Syndroms ist, sind noch keine Raumstrukturen verfügbar.

Sequenzalignments und Transmembranhelix-Vorhersagen ergeben aber für alle Surf1-Homologe denselben Aufbau: Zwischen zwei Transmembranhelices befindet sich eine große *loop*-Region, die im bakteriellen Fall ins Periplasma, im mitochondrialen Fall in den Intermembranraum ragt. Die Protein-Sequenzen für Surf1c und Surf1q aus *P. denitrificans* wurden von verschiedenen Sekundärstruktur-Vorhersage-Programmen analysiert (verfügbar auf www.expasy.org). Alle getesteten Programme liefern vergleichbare Ergebnisse (nicht gezeigt). Im Weiteren sind exemplarisch die Vorhersagen des Programms SABLE (Solvent AccessiBiLitiEs) graphisch dargestellt. Das Programm ordnet unter Verwendung des Algorithmus

DSSP abhängig von der Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken die Sekundärstrukturelemente Helix, β -Faltblatt und *coiled-coil* zu [96].

Die Sekundärstruktur-Vorhersage ergibt für den periplasmatischen Teil des Proteins hauptsächlich Faltblatt und *coiled-coil* Regionen, während helikale Bereiche vornehmlich auf die Transmembranbereiche beschränkt sind (Abb. 3.4).

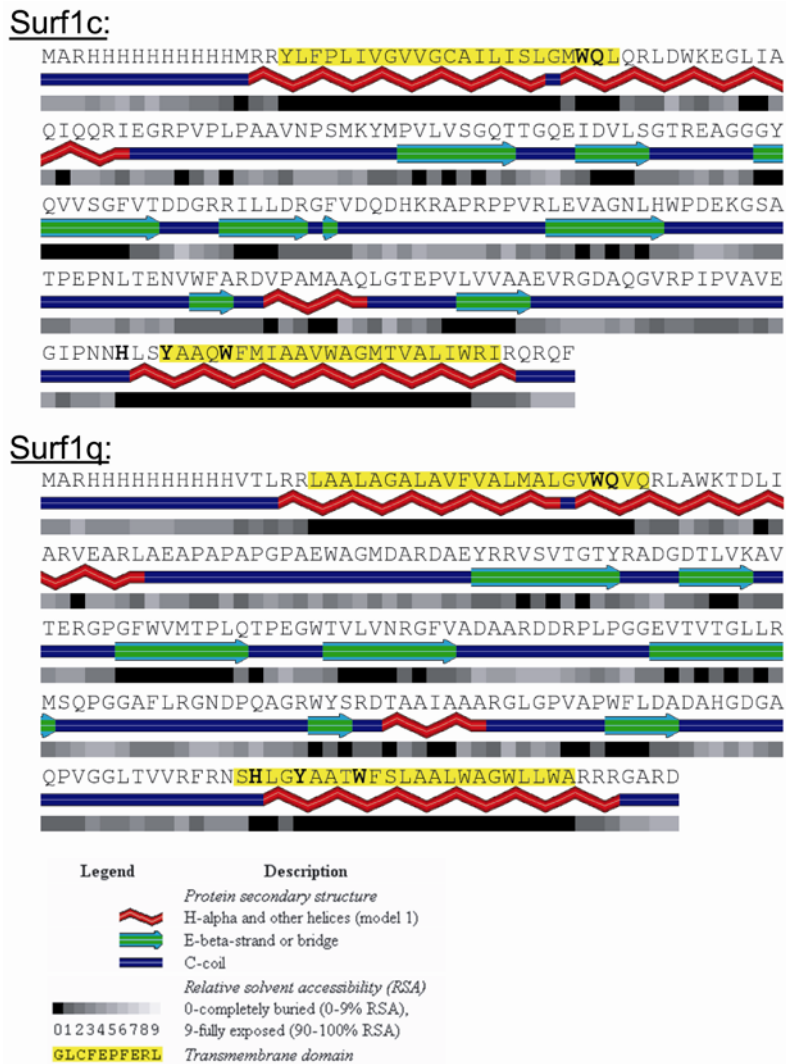


Abb. 3.4: Sekundärstruktur-Vorhersage für *Paracoccus* Surf1 Proteine

Die mit N-terminalen Dekahistidin-*tag* versehenen Surf1 Proteine aus *Paracoccus* wurden mit dem Sekundärstruktur-Vorhersageprogramm SABLE analysiert. Zugeordnete Sekundärstrukturelemente sind in der Legende beschrieben. Innerhalb der Sequenzen sind konservierte Aminosäurereste fett hinterlegt, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

3.2 Synthetische COX-Reifungsoperons für *E. coli*

Das Fehlen einer Cytochrom *c* Oxidase in *Escherichia coli* macht dieses Bakterium zu einem interessanten Wirtssystem zur Untersuchung von COX-Assemblierungsfaktoren und -reaktionen, da es endogen keine bekannten COX-Biogenesefaktor-Gene besitzt. Diese Faktoren können aber auf Plasmiden kodiert leicht in das Bakterium eingebracht werden.

Aus diesem Grund wurde eine Serie von Plasmiden kloniert, die die aus *Paracoccus denitrificans* bekannten Reifungsgene für die Oxidase Untereinheit I *ctaB*, *ctaA*, *surf1c*, *ctaG* und Ferredoxin (*frdx*) in unterschiedlicher Zusammensetzung kodieren. Die Gene stehen hierbei unter der Kontrolle des konstitutiven *tet*-Promotors und werden als polycistronische *messenger*-RNA abgelesen, wobei vor jedem Gen eine Ribosomenbindungsstelle zu finden ist. Die Klonierungsstrategie wurde von P. Greiner in Rahmen seiner Doktorarbeit entwickelt [42], die praktische Durchführung und Analytik aber im Rahmen dieser Arbeit verwirklicht.

Mit Hilfe der verschiedenen Reifungsoperons sollte überprüft werden, ob im heterologen *E. coli* System ein Einbau der Häm- und Kupfer-Kofaktoren in die Untereinheit I der Oxidase möglich ist.

3.2.1 Konstruktion der Reifungsplasmide

Der zur Reifung von *c*-Typ Cytochromen bekannte Vektor pEC86 [99] wurde zunächst mit Hilfe einer PCR verkürzt und zu einem neuen Vektor pGR50 ligiert. Der neu konstruierte Vektor beinhaltet eine *Acc65I* sowie eine *XhoI* Restriktionsschnittstelle, in die durch gerichtetes Klonieren Gene unter der Kontrolle des *tet*-Promotors eingeführt werden können. Die Klonierungsstrategie nutzt das Entstehen kompatibler kohesiver Enden bei der Verwendung der Restriktionsenzyme *Acc65I* (GGTAC/C) und *BsrGI* (T/GTACA). Ligieren zwei mit diesen Enzymen restringierte DNA-Moleküle miteinander, ist das Ligationsprodukt weder durch *Acc65I* noch durch *BsrGI* schneidbar, so dass die Schnittstellen für weitere Klonierungsversuche nutzbar bleiben.

Die einklonierten Gene wurden per PCR amplifiziert, wobei über den *forward* Primer eine *BsrGI* Schnittstelle sowie eine für *E. coli* optimierte

Ergebnisse

Ribosomenbindungsstelle (RBS) eingeführt wurde. Der *reverse* Primer kodierte zusätzlich für eine Acc65I und eine XhoI Schnittstelle. Eine Restriktion des Plasmids pGR50 mit Acc65I und XhoI linearisierte das Vektormolekül und erlaubte das Einklonieren von Insert-DNA über die BsrGI und XhoI Schnittstellen. Zunächst wurde das Gen der Häm *o* Synthase, *ctaB*, einkloniert und der neu entstandene Vektor (pGR51) diente als Ausgangspunkt für das sukzessive Einklonieren weiterer Gene. Eine Übersicht über die erstellten COX-Reifungsplasmide findet sich in Abbildung 3.5. Der Erfolg der Klonierungen wurde mittels Restriktion und anschließender Agarose-Gelelektrophorese sowie Sequenzierung überprüft.

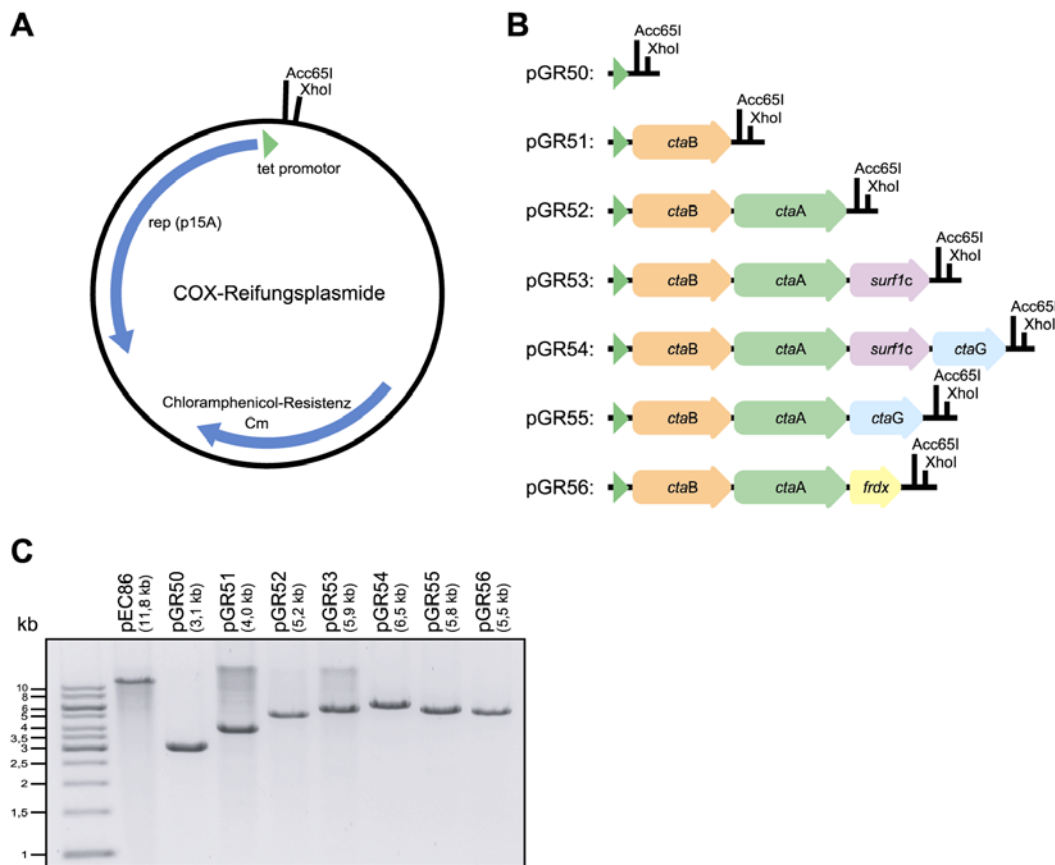


Abb. 3.5: Übersicht über erstellte COX-Reifungsplasmide

Als Ausgangsvektor diente der in (A) dargestellte Vektor pGR50. Die erstellten Plasmide dienen der konstitutiven Expression der bekannten COX-Reifungsgene in *E. coli* in unterschiedlichen Zusammensetzungen (B). Die Gene stehen unter der Kontrolle des *tet*-Promotors und werden als polycistronische mRNA abgelesen. Vor jedem Gen befindet sich eine Ribosomenbindungsstelle. Die annotierten Restriktionsschnittstellen erlauben das gerichtete Einklonieren weiterer Gene. In einem 0,7 % Agarosegel weisen die erstellten Plasmide nach Linearisierung durch XhoI die erwarteten Größen auf (C). Verdaut wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA.

3.2.2 Analytik der generierten *E. coli* Stämme

Zur Überprüfung der erfolgreichen Expression der Gene im Kontext des jeweiligen COX-Reifungsplasmids wurden LB-Flüssigkulturen im Maßstab von 2,5 Litern in Normalkolben und 1,5 Litern in Schikanekolben angezogen. Die Expression der Zielgene erfolgt ausgehend vom Promotor als polycistronische mRNA, an die der Translationsapparat über die Ribosomenbindestellen die Proteinsynthese initiieren kann. Das Zellmaterial nach Wachstum über Nacht bei 32 °C wurde nach erfolgter Zellernte zur Gewinnung von Häm-Extrakten und Membranen im analytischen Maßstab geteilt. Die funktionale Expression der Häm *a*-Biogenesegene, *ctaB* und *ctaA*, wurde durch Nachweis ihres jeweiligen enzymatischen Endproduktes bestätigt. Zum Nachweis der Expression des Kupferchaperons CtaG diente ein spezifisches Antiserum (anti-CtaG). Die Expressionsprodukte der Gene *surf1c* und Ferredoxin (*frdx*) waren wegen fehlender funktionaler Antiseren nicht direkt nachweisbar.

3.2.2.1 Pyridin-Hämochromspektren

Die gewonnenen Häm-Extrakte wurden mittels Pyridin-Hämochromspektren auf ihren Häm-Gehalt überprüft. In Abbildung 3.6 dargestellt sind die auf das jeweilige Absorptionsmaximum normierten Spektren nach Anzucht in Normalkolben (limitierte Belüftung, schwarze Kurven, N) und in Schikanekolben (hohe Belüftung, rote Kurven, S). Häm-Extrakte aus *E. coli* DH5 α -Zellen zeigen ein Maximum bei 556 nm (gestrichelte Linie), was im allgemeinen Häm *b* entspricht. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich mit Expression von *ctaB* (GR51-56) unabhängig von den Anzuchtbedingungen das Peakmaximum auf 553 nm blau verschiebt. Nur bei Anwesenheit von *ctaA* (GR52-56) und hoher Belüftungsrate lässt sich Häm *a* bei 587 nm detektieren (GR52S-56S). In Normalkolben unterbleibt die Bildung von Häm *a*, die Synthese bleibt auf Stufe des Häm *o* stehen. Mitochondriales Ferredoxin spielt in der COX-Biogenese auf Ebene der Häm *a* Bildung eine wichtige Rolle und wird als Teil eines Monooxygenase-Komplexes diskutiert, der im enzymatischen Mechanismus bei der Hydroxylierung der Methylgruppe des Häm *o* wichtig ist [49, 50]. Ein homologes Ferredoxin befindet sich auch im *P. denitrificans* Genom (Pden_4027). Das entsprechende Gen wurde in pGR56 hinter *ctaB* und *ctaA* eingeführt. Wie in Abbildung 3.6 ersichtlich, erleichtert auch das Einführen des

Ferredoxin-Gens die Häm *a* Bildung in Normalkolben nicht. Die Bildung von Häm *a* im heterologen *E. coli* System ist also streng belüftungsabhängig und kann nur unter Verwendung von Schikanekolben erfolgen. In Häm-Extrakten lässt sich Häm *a* spektral erst nach mindestens 8 Stunden Wachstum nachweisen (nicht gezeigt), weshalb zur optimalen Bildung dieses Häm-Typs auf Übernachtskulturen zurückgegriffen werden sollte.

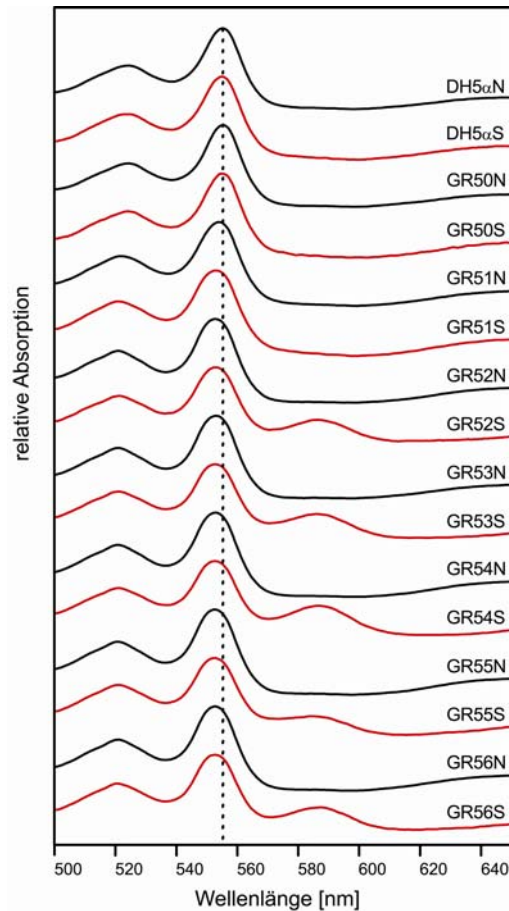


Abb. 3.6: Pyridin-Hämochromspektren Häm-extrahierter *E. coli* Zellen

Die aufgenommenen Redoxspektren wurden zur besseren Darstellung auf ihr Peakmaximum normiert. Kontrollzellen (DH5 α und GR50) zeigen ein Absorptionsmaximum bei 556 nm (gestrichelte Linie). Das Maximum verschiebt sich zu 553 nm für GR51-56, unabhängig von den Anzuchtbedingungen (Normalkolben N, schwarze Kurven; Schikanekolben S, rote Kurven). Nur in Anwesenheit von *ctaA* (GR52-56) und Anzucht in Schikanekolben lässt sich die Bildung von Häm *a* bei 587 nm detektieren.

3.2.2.2 HPLC-Untersuchungen

Eine nähere Untersuchung der erhaltenen Häm-Extrakte erfolgte mittels HPLC in einem Acetonitril-Gradienten von 50-100 % (Abb. 3.7). Unter den gewählten Laufbedingungen eluiert Häm *b* um 11,7 min, Häm *a* bei 23,5 min und Häm *o* bei 25,4 min.

Im Bereich der Häm *b* Elution zeigen sich bei diesen Ganzzell-Hämextrakten noch weitere Absorptionen, die als in der Zelle vorhandene Häm-Vorstufen bzw. -Abbauprodukte interpretiert wurden, aber keinerlei Einfluss auf die Aussagen über Häm *a* und *o* haben.

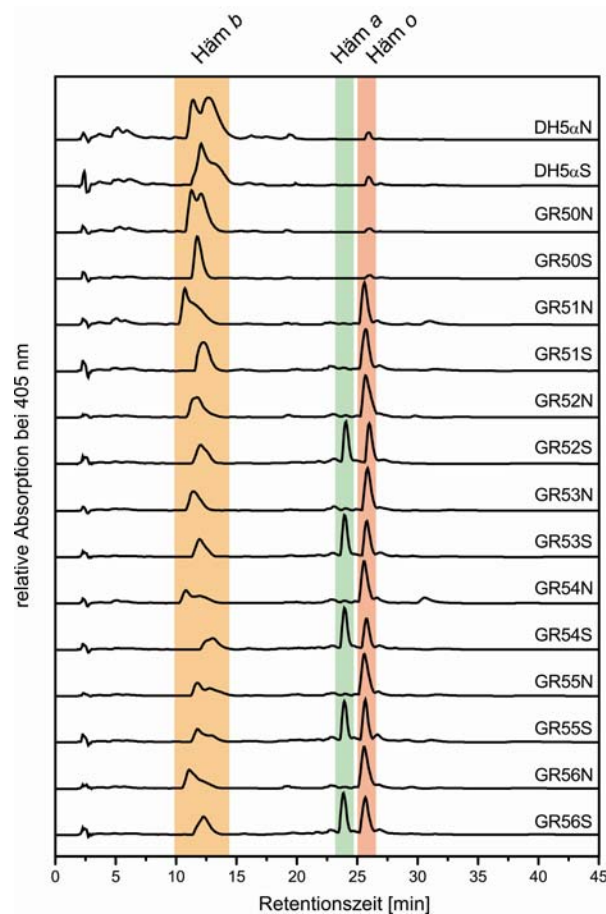


Abb. 3.7: HPLC-Untersuchung Häm-extrahierter *E. coli* Zellen

Häm-Extrakte wurden in einem 50-100% Acetonitril-Gradienten aufgetrennt und zur besseren Darstellung auf ihr Peakmaximum normiert. In Anwesenheit von *ctaB* (GR51-56) erfolgt eine starke Zunahme an Häm *o*, während Häm *a* nur bei Anwesenheit von *ctaA* und hohen Belüftungsraten gebildet werden kann (GR52S-56S); *surf1c*, *ctaG* und Ferredoxin haben keinen signifikant positiven Einfluss auf die Menge an Häm *a* relativ zu Häm *o*. (N, Anzucht bei niedriger Belüftung in Normalkolben; S, Anzucht bei hoher Belüftung in Schikanekolben).

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen decken sich mit den Ergebnissen der Pyridin-Hämochromspektren. Nur in Anwesenheit von *ctaA* und hoher Belüftung in Schikanekolben kann im heterologen *E. coli* System Häm *a* gebildet werden. Des Weiteren ist zuerkennen, dass *E. coli* Zellen, die keine *Paracoccus*-Fremdgene enthalten (DH5 α und GR50) Häm *o* nur in sehr geringen Mengen bilden. Erst das Einbringen von *ctaB* (pGR51-56) bedingt einen starken Zuwachs an Häm *o*. Zwischen den Stämmen mit den verschiedenen Reifungsplasmiden lässt sich kein Trend zu verstärkter Häm *a*-Bildung in Abhängigkeit von *surf1c*, *ctaG* oder Ferredoxin (*frdx*) erkennen (GR52S-56S).

3.2.2.3 Western Blot-Analyse der Membran-Fraktion

Die Expression des Kupferchaperons CtaG kann durch Western Blot-Analyse auf Ebene der Membranfraktion überprüft werden. Hierzu wurden Membranen der *ctaG* exprimierenden Stämme (GR54-55) gewonnen. Abbildung 3.8 zeigt einen Western Blot mit anti-CtaG Serum, in dem das Protein als spezifische Doppelbande bei ca. 21 kDa anfärbbar ist. Interessanterweise enthalten die Membranen aus GR54-Zellen trotz Inkubation mit SDS ein zusätzliches Signal bei ca. 45 kDa. Dieses Signal hatte auch nach Inkubation der Probe bei 65 °C und 95 °C Bestand (nicht gezeigt). Da *ctaG* als letztes Gen innerhalb des synthetischen Operons vorliegt, wurde die Expression von *surf1c* im Falle des Stammes GR54 vorausgesetzt.

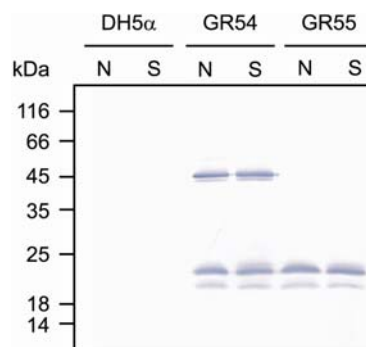


Abb. 3.8: Anti-CtaG Western Blot von Membranen

Western Blot von Membranen nach Anzucht der Zellen in LB-Medium über Nacht bei 32 °C. 50 μ g Membranprotein wurden pro Bahn aufgetragen. CtaG lässt sich als Doppelbande bei ca. 21 kDa nachweisen. Ein zusätzliches Signal bei 45 kDa in GR54 Membranen zeigt sich unabhängig von den Anzuchtbedingungen. (N, Anzucht bei niedriger Belüftung in Normalkolben; S, Anzucht bei hoher Belüftung in Schikanekolben).

3.2.2.4 Koexpression von COX UE I mit dem Reifungsplasmid pGR54

Wie in den vorigen Abschnitten beschrieben enthält der Vektor pGR54 die COX-Reifungsfaktoren *ctaB*, *ctaA*, *surflc* und *ctaG*. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Koexpression von COX UE I mit den auf pGR54 kodierten Biogenesefaktoren zum Einbau von Häm *a* und Kupfer in UE I führt. Hierzu wurde sich zur Expression von UE I eines induzierbaren pET24a Vektors bedient (pGR40). Dieser Vektor erlaubt die Expression von COX UE I mit einem C-terminalen Dekahistidin-*tag* [42]. Die beiden Plasmide pGR40 und pGR54 wurden in den Expressionsstamm *E. coli* C41 transformiert. Der Stamm wurde unter hoher Belüftung in Schikanekolben bei 32 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wachsen gelassen, bevor die Expression von UE I mit 0,5 mM IPTG induziert wurde. Die Kultur wurde anschließend für 3 Stunden bei Raumtemperatur weiter geschüttelt, bevor die Zellen geerntet und die Membranen isoliert wurden. Nach Solubilisierung der Membranen mit DDM wurde UE I über Metallionen-Affinitätschromatographie isoliert [42]. Das verwendete Stufenelutionsprotokoll sieht Waschschritte mit 20, 40 und 80 mM Imidazol vor, an die sich eine Elution der UE I mit 250 mM Imidazol anschließt.

Aus Abbildung 3.9 A geht hervor, dass UE I über den His₁₀-*tag* aufreinigbar ist. Allerdings sind in der 250 mM Imidazol-Fraktion noch deutlich Kontaminationen zu erkennen. Zusätzlich kommt es schon zu einer nicht unerheblichen Teilelution des Proteins beim 80 mM Imidazol Waschschritt. Die Auftrennung der 250 mM Imidazol-Probe in einem semidenaturierenden LDS-Gelsystem und Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erlaubt eine anschließende Häm-Färbung. Hieraus wird ersichtlich, dass die exprimierte UE I Häm-Gruppen enthält. Zur näheren Charakterisierung dieser Häm-Gruppen wurden für die 40 und 80 mM Imidazol Waschschritte sowie die 250 mM Imidazol Elutionsfraktion Pyridin-Hämochromspektren aufgenommen (Abb. 3.9 B).

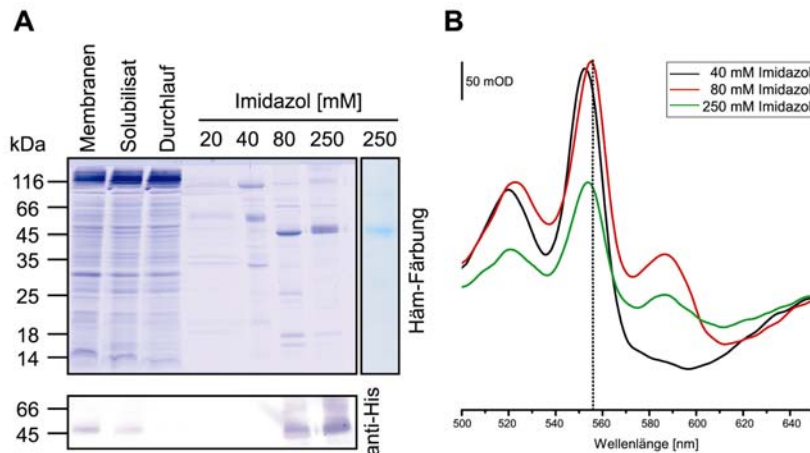


Abb. 3.9: Aufreinigung und Häm-Gehalt von UE I nach Koexpression mit pGR54

Oxidase UE I wurde zusammen mit dem COX-Reifungsplasmid pGR54 heterolog in *E. coli* exprimiert. Protein Expression wurde mit 0,5 mM IPTG bei einer OD_{600} von 0,8 induziert und für 3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die nach Zellernte isolierten Membranen wurden mit DDM solubilisiert und UE I mit einer Ni^{2+} -NTA Säule über ein Imidazol-Stufenelutionsprotokoll isoliert. Ein Coomassie gefärbtes 12 % SDS-PAGE zeigt, dass UE I nach Waschschritten bei 20, 40 und 80 mM Imidazol mit 250 mM Imidazol von der Säule eluiert werden kann. Ein Western Blot gegen den C-terminalen His-tag identifiziert UE I bei ca. 45 kDa. Häm-Färbung nach semidenaturierender LDS-PAGE und anschließender Häm-Färbung auf einer PVDF-Membran zeigt, dass UE I Häm gebunden hat (A). Pyridin-Hämochromsspektren für die 40, 80 und 250 mM Fraktionen erlauben die Identifikation der verschiedenen Häm-Typen (B). Die Häm *b*-Absorption bei 556 nm ist mit einer gestrichelten Linie markiert. Für nähere Beschreibungen siehe Text.

Die 40 mM-Fraktion hat ein Absorptionsmaximum bei 553 nm, was vermutlich auf die Häm-Typen *b* und *o* zurückzuführen ist. Die 80 mM-Fraktion besitzt ein Maximum bei 555 nm (Häm *b*) und bei 587 nm (Häm *a*). Die 250 mM-Elutionsfraktion führt zu Absorptionsmaxima bei 554 nm (Mischung aus Häm *b* und *o*) und 587 nm (Häm *a*). Die in UE I nachweisbaren Häm-Gruppen (siehe Häm-Färbung) sind folglich den Häm-Typen *b*, *o* und *a* zuzuordnen. Der Häm *a*-Gehalt berechnet sich für die 250 mM-Fraktion zu ca. 8 % bezogen auf UE I. Die erhaltene Ausbeute ist mit 0,8 mg UE I pro Gramm eingesetzter Membran sehr niedrig.

Die erhaltene UE I Probe wurde zur Überprüfung ihrer Monodispersität auf eine analytische Superose 6 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) aufgetragen (Abb. 3.10). Es ergaben sich drei Hauptpeaks, deren Molekulargewichtsabschätzung nach Vergleich mit Eichproteinen möglich war: 7,84 ml (133 MDa), 11,5 ml (5,1 MDa) 15,64 ml (127 kDa), sowie eine kleinere Schulter bei 16,54 ml (57 kDa). Die beiden ersten Peaks befinden sich außerhalb des Auflösungsereich der Säule und stellen höhermolekulare Aggregationsformen dar. SDS-PAGE Analytik mit anschließender

Silberfärbung und Western Blot gegen den Histidin-*tag* weisen hier UE I nach. Für den Peak bei 11,5 ml lässt sich im Elutionsprofil der Gelfiltration keine Absorption bei 410 nm feststellen, was darauf hindeutet, dass es sich hier um ungefaltete, aggregierte UE I ohne Häm-Kofaktoren handelt. Im Gegensatz dazu zeigt die Peakfraktion bei 15,64 ml ein deutliches Signal sowohl bei 280 nm als auch bei 410 nm. Sie enthalten UE I, aber auch zwei weitere kontaminierende Proteinbanden bei 45 und 18 kDa (siehe silbergefärbtes SDS-PAG, Bahn 5).

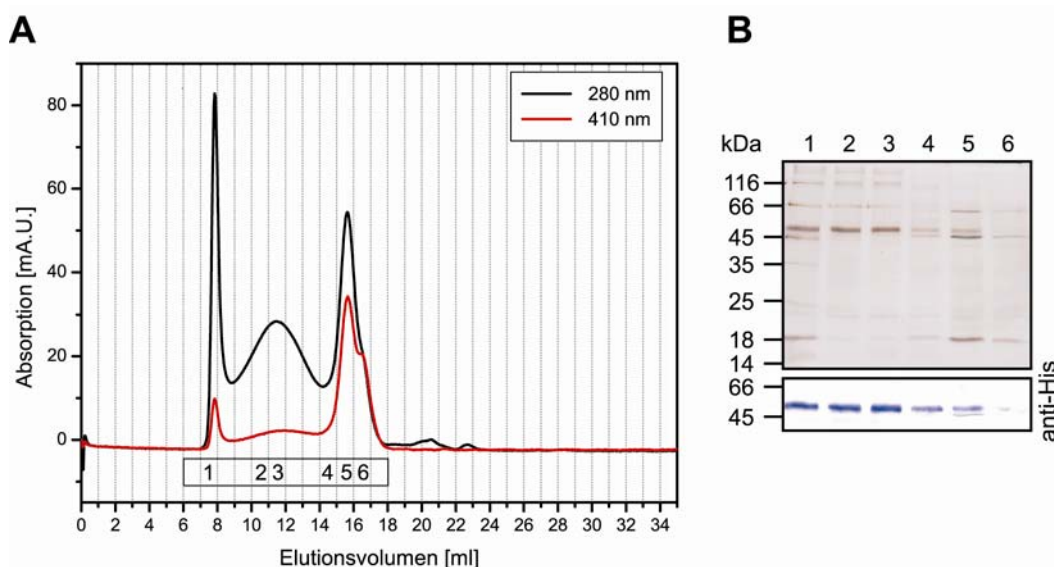


Abb. 3.10: Elutionsprofil aufgereinigten UE I-Proteins auf einer Superose 6 Säule

Die über Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigte COX UE I wurde auf einer Superose 6 10/300 Gelfiltrationssäule analysiert. In schwarz dargestellt ist die UV-Absorption bei 280 nm, in rot die Soret-Absorption gebundener Häm-Gruppen bei 410 nm (**A**). 20 μ l der gesammelten Fraktionen (1-6) wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung sowie einem Western Blot gegen den C-terminalen Histidin-*tag* analysiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es bei Koexpression der auf dem Plasmid pGR54 kodierten COX-Reifungsfaktoren zu einem Einbau von Häm in UE I kommen kann. Heterologe Expression von UE I in *E. coli* ohne zusätzliche Faktoren liefert eine apo-Form ohne Häm und Kupfer [42, 43]. Allerdings werden im hier vorgestellten Fall einer Koexpression von UE I mit pGR54 die Häm-Typen *b*, *o* und *a* in das Protein eingebaut.

Um eine klare Häm-Stöchiometrie zugunsten von *a*-Typ Häm zu gewährleisten, wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet: Expression in autoinduktivem Medium, IPTG induzierte Expression über Nacht bei 32 °C und

20 °C, konstitutive Koexpression der UE I mit pGR54, zusätzliche Koexpression der strukturellen Oxidase Untereinheiten II und III. Keiner der aufgeführten Expressionsbedingungen verbesserte die Ausbeute, die Sauberkeit der isolierten UE I oder die Häm-Kofaktor-Zusammensetzung zugunsten von Häm *a* (nicht gezeigt).

3.3 Heterologe Aufreinigung von CtaA aus *E. coli*

Die Ergebnisse des Abschnitts 3.2 zeigen, dass im heterologen *E. coli* System eine erfolgreiche Biosynthese von Häm *a* möglich ist. CtaA als letztem Enzym im Biosyntheseweg des Häm *a* kommt hierbei naturgemäß die wichtigste Rolle zu. Zur näheren Charakterisierung des Enzyms wurde dessen Expression in *E. coli* mit anschließender proteinchromatographischer Aufreinigung in Angriff genommen.

Zunächst wurde ein induzierbares Expressionssystem basierend auf einem pET-Vektor zur Expression von CtaA gewählt. Hierzu wurde das *ctaA*-Gen per PCR amplifiziert, wobei der *forward*-Primer für einen N-terminalen *t7-tag* kodierte und der *reverse*-Primer einen durch TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus* Protease) schneidbaren C-terminalen Hexahistidin-*tag* einführte. Das PCR-Produkt wurde schließlich über eine NdeI/XhoI Restriktion in pET24a einkloniert (pHA01). Die Expression dieses Konstrukts konnte erfolgreich in *E. coli* C41 Zellen verfolgt werden (sowohl IPTG induziert, als auch autoinduktiv). Allerdings waren die in Häm-Extrakten nachweisbaren Häm *a* Mengen im Vergleich zu einer konstitutiven Expression (GR52, Abschnitt 3.2) sehr gering, weshalb auch für die Enzymversion mit Histidin-*tag* eine Expression unter der Kontrolle des *tet*-Promotors sinnvoller erschien. Hierzu wurde CtaA-His₆ ausgehend von pHA01 in pGR52 subkloniert. Hierbei konnte sich der in den Vektoren vorhandenen XhoI Schnittstelle sowie einer endogen im *ctaA*-Gen enthaltenen AatII-Schnittstelle bedient werden. Das entstandene Konstrukt (pHA02) kodiert demnach verbunden über eine Ribosomenbindestelle für *ctaB* und *ctaA*-His₆. Der N-terminale *t7-tag* wurde somit verworfen. Das Plasmid pHA02 diente weiterhin als *template* zur Amplifikation von *ctaA*-His₆ mittels PCR zur Klonierung in den Vektor pGR50 wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. Das entstandene Plasmid pHA23 kodiert also *ctaA*-His₆ und ist geeignet zur konstitutiven Expression von *ctaA* in Abwesenheit von *ctaB*.

3.3.1 Analytik der verwendeten Expressionsstämme

Die klonierten Plasmide pHA02 und pHA23 können direkt in *E. coli* DH5 α -Zellen verwendet werden und bedürfen keiner speziellen Expressionszellen wie dies für induzierbare System oft der Fall ist. Die Ergebnisse des Abschnitts 3.2 zeigen, dass die Biosynthese von Häm *a* in *E. coli* von hohen Belüftungsraten abhängt. Folglich wurden zur Charakterisierung der pHA02 und pHA23 enthaltenden Stämme die Zellen erneut in Normalkolben (N, limitierte Belüftung) und in Schikanekolben (S, hohe Belüftung) angezogen.

3.3.1.1 Western Blot-Analyse der Membranfraktion

Zur Kontrolle der erfolgreichen Expression von *ctaA*-His₆ wurden zunächst Membranen in analytischem Maßstab aus LB-Übernachtskulturen gewonnen und einer Western Blot-Analytik unterzogen. Wie in Abbildung 3.11 ersichtlich, lässt sich ein spezifisches Signal (Doppelbande bei ca. 35 kDa) gegen den Histidin-*tag* nachweisen, der in GR52-Kontrollzellen nicht auftritt und somit CtaA-His₆ zugeschrieben werden kann.

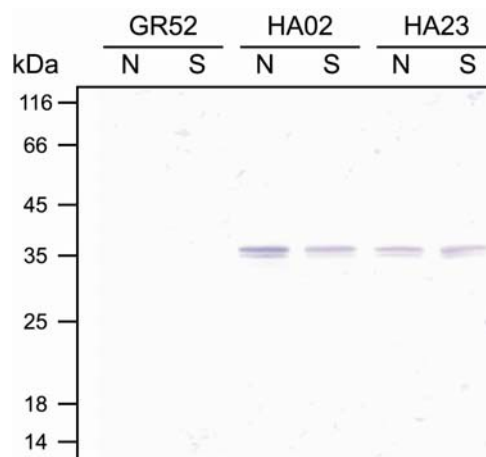


Abb. 3.11: Anti-His Western Blot von *E. coli* Membranen

Western Blot von Membranen nach Anzucht der Zellen in LB-Medium über Nacht bei 32 °C. 50 µg Membranprotein wurden pro Bahn aufgetragen. CtaA-His₆ ist als Doppelbande bei 35 kDa nachweisbar. Das Expressionsniveau ist unabhängig von den Anzuchsbedingungen in Normalkolben (N, limitierte Belüftung) oder Schikanekolben (S, hohe Belüftung). Auch CtaB (HA02 vs. HA23) hat keinen Einfluss auf die Expressionsrate von CtaA-His₆.

Das apparente Laufverhalten von CtaA in Polyacrylamid-Gelen weicht somit deutlich vom berechneten Molekulargewicht von 45 kDa ab. Die Expressionsrate ist nicht abhängig von den Anzuchtsbedingungen (N, limitierte Belüftung; S, hohe Belüftung). Ebenso wenig hat die Anwesenheit von CtaB Einfluss auf die Menge nachweisbaren CtaA Proteins.

3.3.1.2 Häm-Analytik

Zur Überprüfung der Funktionalität der mit Histidin-*tag* versehenen CtaA-Variante wurden Zellen nach Anzucht in Normalkolben (N) und Schikanekolben (S) einer acetonsauren Häm-Extraktion unterzogen. Die gewonnenen Häm-Extrakte wurden anschließend mit Pyridin-Hämochromspektren sowie HPLC analysiert (Abb. 3.12).

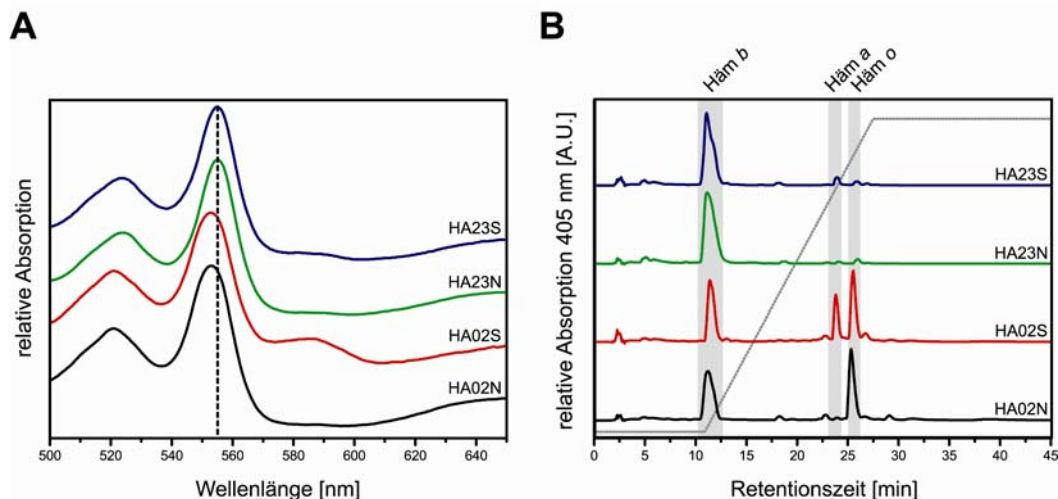


Abb. 3.12: Analytik von Häm-Extrakten aus CtaA-His₆ exprimierenden *E. coli* Zellen

E. coli Zellen wurden nach Anzucht in LB-Medium bei 32 °C über Nacht Häm-extrahiert. Die Extrakte wurden mittels Pyridin-Hämochromspektren (A) und HPLC (B) auf ihren Häm-Gehalt untersucht. Zur besseren Darstellung wurde auf die jeweiligen Peakmaxima normiert. CtaA ist ohne CtaB (HA23) nicht in der Lage Häm a zu bilden. Der Kofaktor kann nur bei hoher Belüftung und Anwesenheit von CtaB (HA02S) gebildet werden. (N, Anzucht bei niedriger Belüftung in Normalkolben; S, Anzucht bei hoher Belüftung in Schikanekolben). Der C-terminale His₆-*tag* stört die enzymatische Funktion nicht.

In Anwesenheit von *ctaB* (HA02) lässt sich analog zur CtaA-Version ohne *tag* in GR52 eine Bildung von Häm a nur dann feststellen, wenn die Anzuchtsbedingungen hohe Belüftungsraten gewährleisten (HA02S). Deshalb kann davon ausgegangen

werden, dass der C-terminale Hexahistidin-*tag* sich nicht störend auf die enzymatische Aktivität auswirkt und eine Aufreinigung über den Affinitäts-*tag* in Angriff genommen werden konnte. CtaA ist allerdings in *E. coli* nicht effektiv in der Lage ohne CtaB Häm *a* zu bilden. Nur ein kleines Signal im HPLC-Lauf für Häm-Extrakte aus HA23S (blaue Kurve in Abb. 3.12) ist detektierbar.

3.3.2 Aufreinigung von CtaA über Histidin-Affinitäts-*tag*

Zur Aufreinigung von CtaA-His₆ aus *E. coli* wurden die entsprechenden Stämme (HA02 und HA23) im Maßstab von 20-30 Litern LB-Medium für 18 h bei 32 °C angezogen. Auch hier wurde wiederum in Wachstum unter hohen Belüftungsraten in Schikankolben (S) und niedriger Belüftung in Normalkolben (N) unterschieden. Die erhaltenen Membranen wurden mit Triton X-100 solubilisiert und auf eine Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen. Ein Detergenzaustausch gegen DDM-haltigen Puffer schloss sich an. In Elutionsexperimenten mit linearen Imidazolkonzentrationsgradienten zeigte sich, dass CtaA-His₆ bereits ab 50-60 mM Imidazol von der Säule zu eluieren beginnt. Im Folgenden wurde deshalb eine Stufenelution mit 20 mM, 40 mM und 100 mM Imidazol unternommen. Im Weiteren ist eine exemplarische Aufreinigung für CtaA-His₆ aus HA02S dargestellt.

Bereits bei 40 mM Imidazol lässt sich eine beträchtliche Menge an CtaA im Eluat detektieren. Die Hauptmenge jedoch kann mit 100 mM Imidazol von der Säule gewaschen werden (Abb. 3.13).

3.3.2.1 Aufreinigungsstrategie

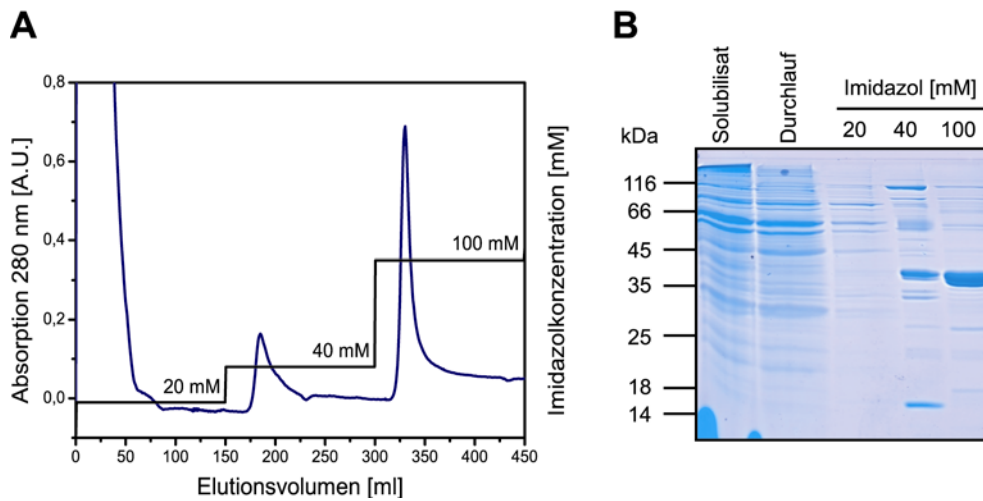


Abb. 3.13: Aufreinigung von CtaA-His₆ aus *E. coli*

Exemplarische Aufreinigung für CtaA-His₆ aus HA02S. Das Elutionsprofil (**A**) zeigt in blau die UV-Absorption bei 280 nm, in schwarz die Elutionsstufen mit steigenden Imidazolkonzentrationen. (**B**) Coomassie gefärbtes 12 % SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. Für das Solubilisat wurden 100 µg Protein aufgetragen, für Durchlauf und 20 mM Imidazol-Fraktion jeweils 20 µl. Die CtaA-His₆ enthaltenen Fraktionen (40 und 100 mM Imidazol) enthalten jeweils 5 µg Protein.

Aus Abbildung 3.13 geht hervor, dass sowohl in der 40 mM als auch in der 100 mM Imidazolfraktion noch bedeutende Mengen an verunreinigenden Proteinen zu sehen sind. In Folge dessen war ein Nachreinigungsschritt erforderlich. Hier konnte sich der durch die TEV Protease schneidbare Histidin-*tag* zunutze gemacht werden. Nach Inkubation mit TEV Protease über Nacht bei 4 °C konnte das Material aus der 40 mM und 100 mM Imidazol-Elutionsfraktion erneut auf eine Ni²⁺-NTA Säule geladen werden (Abb. 3.14). CtaA, dessen Histidin-*tag* abgespalten wurde, verliert seine Bindungsaffinität für die Ni²⁺-NTA Säulenmatrix und kann aus dem Säulendurchlauf zurück gewonnen werden. Proteinverunreinigungen aus der ersten Säulenreinigung, CtaA-His₆ sowie TEV Protease binden erneut an das Säulenmaterial und können damit effizient von CtaA abgetrennt werden. Dies ist allerdings nur möglich, da die eingesetzte TEV Protease ebenfalls einen Histidin-*tag* trägt und die Proteolyse des *tags* in imidazolfreiem Puffer stattfindet. Die Verunreinigungen können wieder bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM von der Säule gewaschen werden. In der Durchlaufraktion ist in einem Western Blot

gegen einen Histidin-*tag* kein Signal mehr detektierbar, während in der 250 mM Fraktion nur die TEV Protease bei ca. 30 kDa nachweisbar ist.

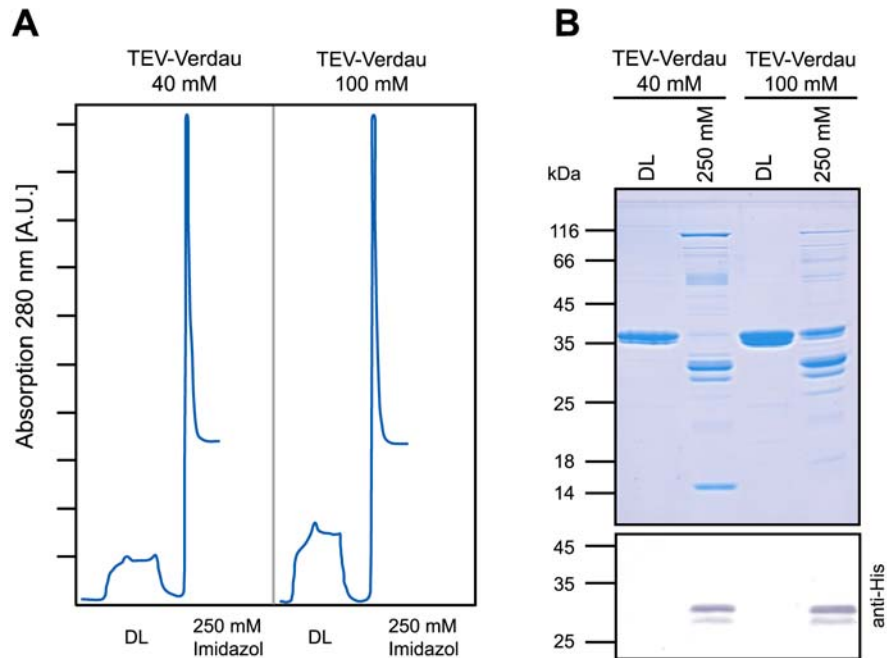


Abb. 3.14: Nachreinigung über TEV-Verdau und anschließende zweite Ni²⁺-NTA Säule

Exemplarische Nachreinigung für CtaA aus HA02S. Das Elutionsprofil (A) zeigt in blau die UV-Absorption bei 280 nm. (B) Coomassie gefärbtes 12 % SDS-PAG sowie anti-His Western Blot der erhaltenen Fraktionen. Im Säulendurchlauf (DL) befindet sich CtaA Protein ohne *tag*, an die Säule binden Verunreinigungen und TEV Protease (250 mM Fraktion), die im Western Blot bei ca. 30 kDa nachweisbar ist. Pro Bahn wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen.

Wie Abbildung 3.14 zeigt, kann CtaA nach der Nachreinigung über TEV Verdau und eine zweite Ni²⁺-NTA Säule sauber erhalten werden. Dies gilt ebenfalls für CtaA Protein, das aus den *E. coli* Stämmen HA23N und HA02N gereinigt wurde. Abbildung 3.15 fasst die Aufreinigung des Proteins aus den drei unterschiedlichen Stämmen bzw. Anzuchtbedingungen nochmals zusammen. Alle Varianten können mit vergleichbarer Reinheit isoliert werden. Die Ausbeuten sind aufgrund der Expression unter der Kontrolle des konstitutiven *tet*-Promotors vergleichsweise gering und ergeben sich zu ca. 0,15 mg CtaA pro Liter Kultur.

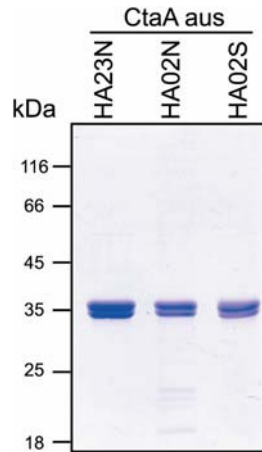


Abb. 3.15: Aufgereinigtes CtaA Protein aus unterschiedlichen *E. coli* Stämmen

Coomassie gefärbtes 12 % SDS-PAG von 5 µg gereinigten Proteins nach Nachreinigung über TEV Verdau und anschließende Metallionen-Affinitätschromatographie. HA23 exprimiert einzig *ctaA*-His₆, HA02 *ctaB* und *ctaA*-His₆ (N, Anzucht bei niedriger Belüftung in Normalkolben; S, Anzucht bei hoher Belüftung in Schikanekolben).

3.3.2.2 Analytische Gelfiltration

Zur Überprüfung der Qualität gereinigter Proteinproben bieten sich Gelfiltrationsexperimente an, da sie eine Aussage über den Homogenitätsgrad, das heißt die Monodispersität der Probe, erlauben. Hierzu wurde sich einer Superose 6 Gelfiltrationssäule bedient, die eine theoretische Trennleistung von 5-500 kDa besitzt. Die Trennleistung bezieht sich allerdings auf globuläre lösliche Proteine und ist für Membranproteine und detergenzhaltige Puffer stark reduziert [100].

Für eine Analyse der gereinigten CtaA Proben wurden 100-500 µg auf eine Superose 6 10/300 Säule (GE Healthcare) aufgetragen und mit 1,5 SV Puffer (20 mM NaP_i, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 bei 4 °C) von der Säule an einem Äkta Purifier Chromatographiesystem (GE Healthcare) eluiert.

Für alle Proteinproben lässt sich anhand des Hauptelutionspeaks ein hoher Homogenitätsgrad feststellen (Abb. 3.16). Leichte Schultern bei kleineren Elutionsvolumina ergeben sich nur bei den CtaA-Proben aus HA02S und HA02N. Diese Schultern deuten auf einen leichten Aggregationsgrad der Probe hin, sind aber verglichen mit dem Peakmaximum vernachlässigbar. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die CtaA Proteine, unabhängig vom Stamm bzw. den

Anzuchtbedingungen nach dem etablierten Aufreinigungsprotokoll homogen und monodispers erhalten werden können.

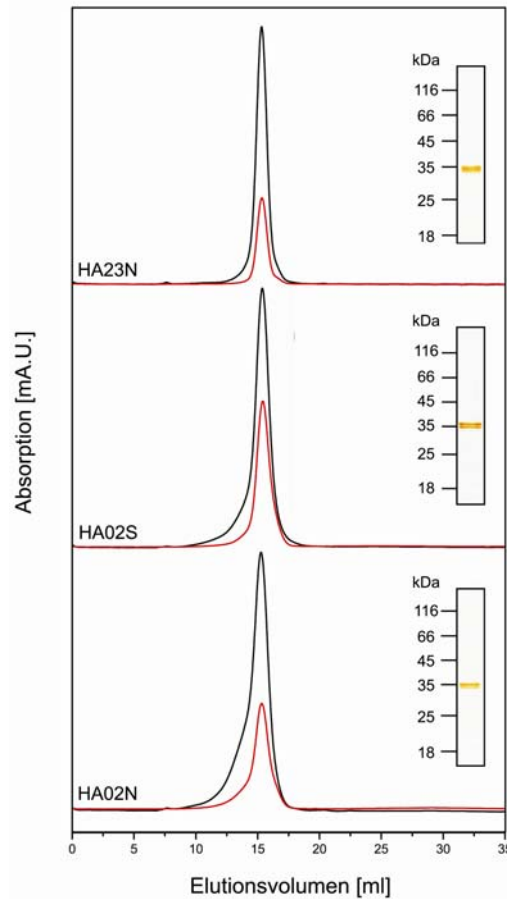


Abb. 3.16: Elutionsprofile aufgereinigter CtaA Proteine auf einer Superose 6 Säule

Die über Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigten CtaA Proteine wurden auf einer Superose 6 10/300 Gelfiltrationssäule analysiert. In schwarz dargestellt ist die UV-Absorption bei 280 nm, in rot die Soret-Absorption gebundener Häm-Gruppen bei 410 nm. 20 μ l der gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Als Einschub dargestellt sind die Silberfärbungen der Fraktionen der jeweiligen Peakmaxima nach 12 % SDS-PAGE. HA23 exprimiert einzig *ctaA*-His₆, HA02 *ctaB* und *ctaA*-His₆ (N, Anzucht bei niedriger Belüftung in Normalkolben; S, Anzucht bei hoher Belüftung in Schikanekolben).

Anhand der Elutionsvolumina der Peakmaxima lässt sich durch Vergleich mit Eichproteinen bekannter Größe eine Molekulargewichtsabschätzung für CtaA durchführen. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse für die betrachteten CtaA-Proben zusammen. Das Molekulargewicht lässt sich demnach auf ca. 165 kDa bestimmen. Hierbei muss allerdings die Größe der Detergenzmicelle berücksichtigt werden. Für DDM gilt hierbei eine durchschnittliche Micellengröße von 70 kDa [124]. Nach

Ergebnisse

deren Abzug bliebe für CtaA ein Molekulargewicht um 95 kDa übrig. Da CtaA ein theoretisches Molekulargewicht von 44 kDa besitzt, könnte die durch Gelfiltration bestimmte Größe von 95 kDa einem Dimer entsprechen. Allerdings lässt sich nicht genau bestimmen, wie viele Detergenzmoleküle pro CtaA Molekül gebunden sind, weshalb die Abschätzung einer Micellengröße von 70 kDa als reine Annahme betrachtet werden muss.

Tabelle 3.2: Molekulargewichtsabschätzung von CtaA mittels analytischer Gelfiltration

CtaA aus	Elutionsvolumen des Hauptpeaks [ml]	Molekulargewicht ^a [kDa]
HA23N	15,34	166,1
HA02S	15,39	158,9
HA02N	15,32	169,1
Durchschnitt:	15,35	164,7

^a Gesamtgewicht der Proteine mit gebundenem Detergenz bestimmt mit einer Eichgerade für die verwendete Superose 6 Säule nach [100].

Die analytische Gelfiltration erlaubt also keine abschließende Beurteilung über den Aggregationszustand von CtaA (Monomer oder Dimer), zeigt aber eindeutig, dass die entwickelte Aufreinigungsstrategie zu monodispersen Proteinproben führt, deren weitere Charakterisierung im Folgenden besprochen wird.

3.3.2.3 Spektrale Analytik

Die aus unterschiedlichen Stämmen bzw. Anzuchtbedingungen aufgereinigten CtaA Proben wurden mittels UV/vis Spektroskopie auf ihren Häm-Gehalt überprüft.

Die Häm-Analytik der verwendeten Expressionsstämme HA23 und HA02 (vgl. Abschnitt 3.3.1.2) legte nahe, dass es möglich sein sollte, das Protein in verschiedenen Häm-Bindungszuständen zu isolieren.

Aus Abbildung 3.17 geht hervor, dass bei Expression von CtaA in Abwesenheit von CtaB nur *b*-Typ Häm im aufgereinigtem Enzym zu finden ist (HA23N, grüne Kurve). Das Nativspektrum für dieses CtaA zeichnet sich durch ein Maximum bei 561 nm mit einer Schulter bei 556 nm aus, während das Pyridin-Spektrum eindeutig

nur Häm *b* nachweist. Hierbei könnte die Aufspaltung der Häm *b*-Absorption im Nativspektrum auf verschiedene Ligandierungszustände des Kofaktors hindeuten, entweder durch Koordinierung in zwei unterschiedlichen Bindungsstellen oder durch unterschiedliche Protein-Konformere an ein und derselben Bindungsstelle.

In Anwesenheit von CtaB (HA02) hängt der Typ des gebundenen Häms von den Anzuchtbedingungen ab. Bei Anzucht in Normalkolben (HA02N, schwarze Kurve) ergibt sich im Nativspektrum ein Maximum bei 560 nm. Im dazugehörigen Pyridin-Spektrum erkennt man deutlich das Vorhandensein von Häm *b* bei 556 nm sowie ein weiteres Maximum bei 552 nm, was Häm *o* entspricht. Bei Anzucht in Schikanekolben (HA02S, rote Kurve) ist schließlich sowohl im Nativspektrum bei 592 nm als auch im Pyridin-Spektrum bei 587 nm Häm *a* nachweisbar.

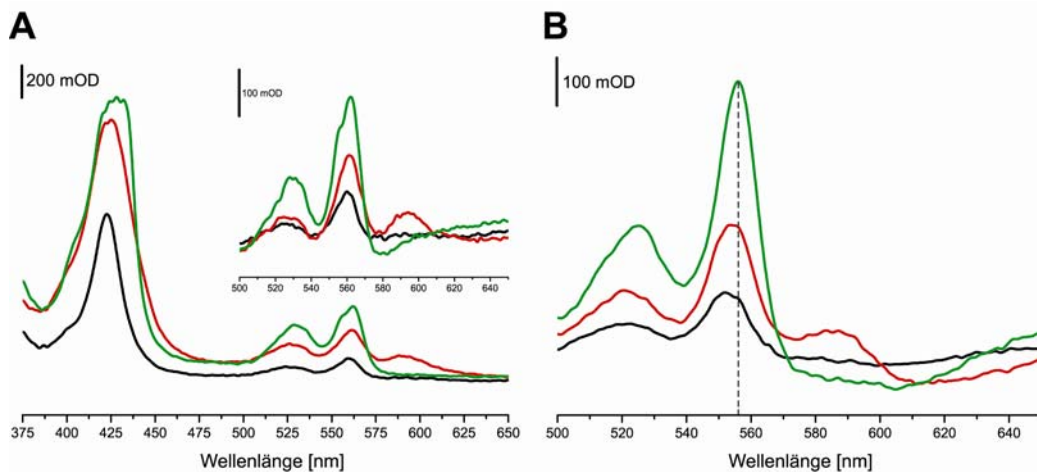


Abb. 3.17: Redox-Differenzspektren aufgereinigter CtaA Proteine

Redox-Differenzspektren für CtaA aus HA23N in grün, HA02N in schwarz und HA02S in rot. **(A)** Natives Redoxspektrum. Der Einschub zeigt den vergrößerten $\alpha\beta$ -Bereich des Spektrums von 500-650 nm. **(B)** Pyridin-Redoxspektrum. Die gestrichelte Linie markiert die Absorption von *b*-Typ Häm bei 556 nm, Häm *o* absorbiert bei 552 nm und Häm *a* bei 587 nm. Die Proteinkonzentration betrug 25 μ M in allen Spektren.

CtaA kann also aus dem heterologen *E. coli* System abhängig von der Anwesenheit von CtaB sowie den Anzuchtbedingungen in drei spektral unterscheidbaren Formen isoliert werden. Tabelle 3.3 fasst abschließend die spektralen Eigenschaften der drei CtaA-Varianten zusammen.

Tabelle 3.3: Spektrale Eigenschaften von CtaA aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Stamm	Expression von	Belüftung bei Anzucht	Absorptionsmaxima Nativspektrum [nm] ^a	Häm-Typ nach Pyridin-Redoxspektrum
HA23N	<i>ctaA</i> -His ₆	niedrig (N)	556, 561	<i>b</i>
HA02N	<i>ctaB</i> -RBS- <i>ctaA</i> -His ₆	niedrig (N)	560	<i>b, o</i>
HA02S	<i>ctaB</i> -RBS- <i>ctaA</i> -His ₆	hoch (S)	561, 592	<i>b, a, (o)</i> ^b

^a Absorptionsmaxima im $\alpha\beta$ -Bereich des Spektrums von 500-650 nm.

^b Je nach Qualität der CtaA-Präparation können Spuren von Häm *o* vorhanden sein.

3.4 Homologe Aufreinigung von CtaA aus *P. denitrificans*

Zur weiteren Charakterisierung von CtaA schien es sinnvoll, das Enzym im nativen Wirtssystem *Paracoccus* näher zu betrachten. Als erster Schritt wurde versucht, eine *ctaA*-Deletionsmutante über doppelthomologe Rekombination zu generieren. Die Klonierung entsprechender Suizidplasmide, die einen Austausch von *ctaA* gegen eine Kanamycin- bzw. Gentamycin-Resistenzkassette erlauben, konnte problemlos durchgeführt werden. Allerdings ließ sich mit den erstellten Konstrukten nach Überprüfung von über tausend Klonen keine erfolgreiche Deletion nachweisen. Es ist unwahrscheinlich, dass CtaA für *Paracoccus* essenziell ist, da sein enzymatisches Endprodukt Häm *a* nur in der Biogenese terminaler Oxidasen Verwendung findet und es für *Paracoccus* bekannt ist, dass eine Deletion Häm *a*-tragender Oxidasen zu lebensfähigen Klonen führt [125]. Eine erfolgreiche Deletion schien folglich trotz etablierter *screening*-Methoden nicht aussichtsreich, weshalb eine Charakterisierung von CtaA aus anderen *Paracoccus*-Deletionsstämmen unternommen wurde. Hierzu wurde ein in *Paracoccus* replizierbarer *broad-host-range* Vektor erstellt, der *ctaA*-His₆ unter Kontrolle des *cta*-Promotors exprimiert, welcher der im *P. denitrificans* *cta*-Operon natürlich vorkommende Promotor ist.

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung dienten pHA01 (siehe Abschnitt 3.3) und der *broad-host-range* Vektor pFA61 [91, 100]. Aus pHA01 wurde *ctaA*-His₆ über eine Restriktion mit XhoI, anschließendem Klenow *fill-in* der Schnittstelle sowie einem zweiten Schnitt mit NdeI herausgeholt und in den mit NdeI/SmaI verdauten Vektor pFA61 kloniert. Das neu generierte Plasmid pHA21 erlaubt folglich die

Expression von CtaA mit Histidin-*tag* in *Paracoccus* unter Kontrolle des *cta*-Promotors. Dieses Plasmid wurde mittels Triparentalen Matings in die *Paracoccus*-Stämme Pd1222, MR31, ST4 und FA3 eingebracht. Tabelle 3.4 gibt einen kurzen Überblick über die genetischen Hintergründe der verwendeten Stämme.

Tabelle 3.4: *P. denitrificans*-Stämme zur homologen Expression von *ctaA*-His₆

Stamm	Beschreibung	<i>ctaA</i> -His ₆ Expressionsstämme
Pd1222	<i>Paracoccus</i> Wildtyp (Rif ^R)	Pd1222-HA21
MR31	Doppeldeletionsstamm für <i>aa</i> ₃ UE I (<i>ctaDI</i> ::Km ^R , <i>ctaDII</i> ::Tet ^R)	MR31-HA21
ST4	Deletionsstamm für das <i>cta</i> -Operon (Δ <i>ctaCBGE</i> ::Km ^R)	ST4-HA21
FA3	Doppeldeletionsstamm für <i>surf1c</i> und <i>surf1q</i> (Δ <i>surf1c</i> ::Km ^R , Δ <i>surf1q</i> ::Gm ^R)	FA3-HA21

Die verwendeten Stämme wurden aus folgenden Gründen gewählt: dem Stamm MR31 fehlt der Hauptabnehmer für Häm *a*, nämlich die Cytochrom *c* Oxidase UE I; der Stamm ST4 ist aufgrund des Fehlens des *cta*-Operons (und damit *ctaB*) nicht in der Lage das Substrat für CtaA (Häm *o*) zu bilden; FA3 ist ein Deletionsstamm für *surf1c*, dessen Genprodukt am Häm *a* Einbau in UE I beteiligt ist und wie in Abschnitt 3.5 beschrieben mit CtaA interagiert.

3.4.1 Aufreinigung von CtaA über Histidin-Affinitäts-*tag*

Zur Kontrolle der erfolgreichen Expression von *ctaA*-His₆ (kodiert auf pHA21) in den verwendeten *Paracoccus*-Stämmen wurden Membranen im analytischen Maßstab gewonnen und mittels Western Blot auf Expression überprüft.

Hierbei zeigte sich, dass CtaA-His₆ zu vergleichbaren Mengen in den Membranen aller neu generierten Stämme exprimiert wird (Abb. 3.18). Ein Western Blot gegen die Oxidase Untereinheiten I und II (anti-BG) lieferte das erwartete Ergebnis: Der Wildtyp-Stamm (Pd1222) exprimiert wie der *surf1*-Doppeldeletionsstamm sowohl

UE I als auch UE II. Der Stamm MR31 kann nur UE II synthetisieren, während im Stamm ST4 keine der beiden Oxidase-Untereinheiten nachweisbar ist.

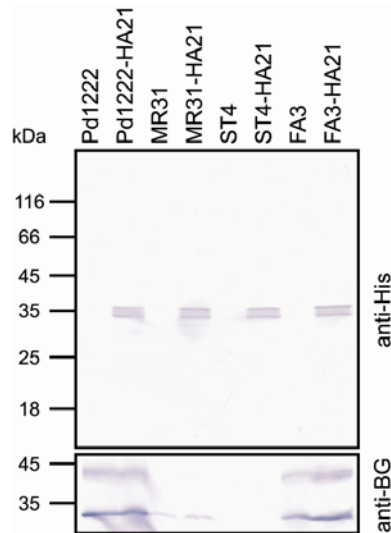


Abb. 3.18: Western Blot gegen CtaA-His₆ und Oxidase UE I/II

Anti-His Western Blot von Membranen nach 12 % SDS-PAG. Aufgetragen wurden je 100 µg Membranprotein für die neu generierten pHA21 enthaltenden Stämme, sowie Kontrollmembranen aus den Ausgangsstämmen, die das Plasmid nicht enthalten. CtaA-His₆ wird in allen verwendeten Stämmen zu gleichen Anteilen exprimiert. Ein Western Blot gegen die strukturellen Oxidase-Untereinheiten I und II (anti-BG) wurde zur Kontrolle durchgeführt. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Zu Aufreinigungszwecken wurden Membranen aus 50 Liter Kulturen gewonnen und CtaA-His₆ nach Solubilisierung mit Triton X-100 analog zum in Abschnitt 3.3 vorgestellten Aufreinigungsprotokoll mittels Metallionen-Affinitätschromatographie isoliert.

3.4.2 Analytik der Koelutionen

Nach einer ersten IMAC-Säule findet sich in der CtaA enthaltenden Elutionsfraktion (100 mM Imidazol) eine deutlich größere Anzahl zusätzlicher Proteinbanden verglichen mit einer Präparation aus dem heterologen Wirt *E. coli*. Zur Analyse der Koelutionen wurden Western Blots gegen die COX *core*-Untereinheiten I und II durchgeführt.

3.4.2.1 Western Blot-Analytik

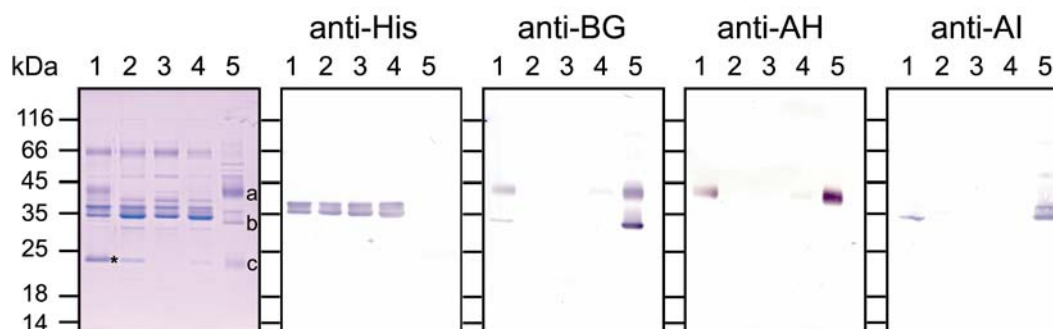


Abb. 3.19: Western Blot Analytik der CtaA-His₆ Präparationen nach IMAC

Die 100 mM Imidazol-Elutionsfraktionen bei Aufreinigungen von CtaA-His₆ aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen wurden mit Western Blots gegen CtaA (anti-His), COX UE I / II (anti-BG), COX UE I (anti-AH) und COX UE II (anti-AI) analysiert. Die Bahnbelegung der Reinigung ergibt sich zu: *Paracoccus* Wildtyp Pd1222 (Bahn 1), MR31 (Bahn 2), ST4 (Bahn 3) und FA3 (Bahn 4). Es wurden jeweils 5 µg Protein aufgetragen. In Bahn 5 sind zur Kontrolle 3 µg gereinigter COX aufgetragen (die Untereinheiten I-III sind mit a-c annotiert). Die mit Stern markierte Bande (*) wurde massenpektrometrisch näher charakterisiert. Für Details siehe Text.

Die Fraktionen der CtaA-His₆-Präparationen aus allen verwendeten *Paracoccus*-Stämmen weisen erwartungsgemäß die bereits bekannte CtaA-Doppelbande im anti-His Western Blot um 35 kDa auf (Abb. 3.19). Zusätzlich kann in den Präparationen aus dem Wildtyp (Bahn 1) und aus dem *surfI*-Doppeldelitionsstamm FA3 (Bahn 4) eindeutig COX UE I nachgewiesen werden, die bei Isolierung von CtaA aus MR31 (Bahn 2) und ST4 (Bahn 3) fehlt. In der Fraktion aus Wildtyp-Hintergrund lässt sich außerdem ein schwaches Western Blot-Signal für UE II erkennen. Die Cytochrom *c* Oxidase weist eine intrinsische Bindungsaffinität für Ni²⁺-NTA-Materialien auf. Allerdings zeigt die Coomassie-Färbung, dass UE II im Vergleich zu UE I deutlich unterrepräsentiert ist, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei der bindenden UE I um eine freie Untereinheit I handelt, die mit CtaA-His₆ aufreinigbar ist. Auch der Nachweis von UE I in der Präparation aus FA3 legt diesen Schluss nahe. Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse der durchgeführten Western Blot-Analytik abschließend zusammen.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der CtaA-His₆-Koelutionen nach IMAC

Antikörper/ Antiserum	Nachweis von	Pd1222- HA21 Bahn 1	MR31- HA21 Bahn 2	ST4- HA21 Bahn 3	FA3- HA21 Bahn 4	<i>aa</i> ₃ - Oxidase Bahn 5 ^a
Anti-His	CtaA-His ₆	+	+	+	+	-
Anti-BG	UE I	+	-	-	+	+
	UE II	+	-	-	-	+
anti-AH	UE I	+	-	-	+	+
anti-AI	UE II	+	-	-	-	+

^a Belegung der Bahnen wie in Abbildung 3.19 angegeben.

Die hier präsentierten Ergebnisse legen also nahe, dass es in *Paracoccus* eine direkte Interaktion zwischen CtaA und COX UE I geben könnte.

Die in der Coomassie-Färbung sichtbare Proteinbande bei ca. 23 kDa (Abb. 3.19) war nur bei Präparationen aus Wildtyp, MR31 und FA3 sichtbar, fehlte jedoch bei Isolierung aus ST4. In diesem Stamm ist das *cta*-Operon (Δ *cta*CBGE) deletiert, weshalb vermutet wurde, dass es sich entweder um COX UE III (*ctaE*) oder um Häm *o* Synthase (*ctaB*) handeln könnte. Zu diesem Zweck wurde die Banden nach Gelelektrophorese einer massenspektrometrischen Charakterisierung über nano-HPLC-ESI-MS/MS unterzogen (Dr. H. Heide, Molekulare Bioenergetik, Universität Frankfurt). Hierbei wurden innerhalb der Bande hauptsächlich Peptide für Surf1c und Surf1q sowie Pden_2786 (Homolog zu Tim44) nachgewiesen. Eine Interpretation der Bande als Surf1 ist allerdings problematisch, da die Bande im *surf1*-Doppeldelitionsstamm FA3 nachweisbar ist (Kreuzkontaminationen aus parallel stattfindenden Surf1-Aufreinigungen können klar ausgeschlossen werden, da sich die Proteinbande nicht in anti-His Western Blots färben lässt; vgl. Abschnitt 3.6). Tim44 ist eine zentrale Komponente des Translokase-Systems der inneren Mitochondrienmembran, indem es das Chaperon mtHsp70 an den Translokasekomplex bindet [39]. Ein Tim44-ähnliches Protein findet sich auch in bakteriellen Genomen und ist dem C-terminalen Fragment der mitochondrialen Version homolog. Allerdings ist die Rolle des Proteins im bakteriellen System unbekannt, aber eine Beteiligung an Membraninsertionsreaktionen scheint plausibel. Allerdings ist es nicht erklärbar, warum dieses Protein bei Reinigung von CtaA aus ST4 nicht

koeluiert. An dieser Stelle muss es also offen bleiben, ob es sich bei der beschriebenen Proteinbande bei 23 kDa um einen tatsächlichen Interaktionspartner von CtaA handelt und welchem Protein es entspricht.

3.4.3 Nachreinigung von CtaA über TEV-Verdau

Im Weiteren wurde auch für die aus den verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen isolierten CtaA-Fractionen eine Nachreinigung über einen Verdau mit *TEV*-Protease sowie einer zweiten Ni²⁺-NTA Säule durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.2.1).

Abbildung 3.20 fasst die Ergebnisse dieser Nachreinigung zusammen. Aus allen vier *Paracoccus*-Stämmen lässt sich CtaA sauber isolieren. Die nach der ersten IMAC-Säule vorhandenen Koelutionen lassen sich ebenso effizient abtrennen wie im Falle einer Aufreinigung aus *E. coli*.

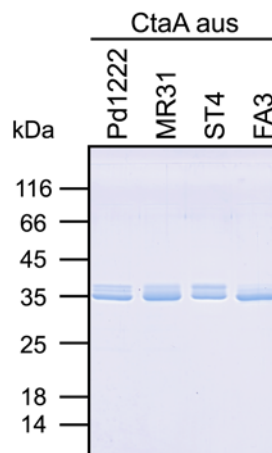


Abb. 3.20: Aufgereinigtes CtaA Protein aus unterschiedlichen *Paracoccus*- Stämmen

Coomassie gefärbtes 12 % SDS-PAG von 2,5 µg gereinigten CtaA Proteins nach Nachreinigung über *TEV*-Verdau und anschließender Metallionen-Affinitätschromatographie.

Die Ausbeuten an gereinigtem CtaA sind für die Präparationen aus MR31-HA21, FA3-HA21 und ST4-HA21 vergleichbar und ergeben sich zu durchschnittlich 1,2 mg pro Gramm eingesetzten Membranproteins. Im Falle einer Präparation aus *Paracoccus*-Wildtyp (Pd1222-HA21) ist die Ausbeute interessanterweise mit 2,7 mg CtaA/g Membranprotein mehr als doppelt so hoch.

3.4.4 Spektrale Analytik

Die sauberen CtaA-Proben wurden mittels UV/vis Spektroskopie und HPLC-Untersuchungen auf ihren Häm-Gehalt überprüft. Es wurde erwartet, dass sich je nach *Paracoccus*-Stamm unterschiedliche Häm-Typen in den CtaA-Proben nachweisen lassen und sich zusätzlich Variationen in der Häm-Stöchiometrie ergeben, die mit der Verfügbarkeit des Substrats Häm *o* (ST4-HA21) oder dem Vorhandensein potentieller Abnehmerproteine für das enzymatische Endprodukt Häm *a* (Pd1222-HA21, MR31-HA21 und FA3-HA21) verknüpft sind.

Native Redoxspektren zeigen ein Absorptionsmaximum bei 560 nm mit einer Schulter bei 556 nm für alle vier verschiedenen CtaA-Präparationen, was nahe legt, dass die CtaA Proben nur Häm *b* enthalten und Häm *a* abwesend ist (Abb. 3.21). Auch hier könnte die Aufspaltung der Häm *b*-Absorption auf verschiedene Ligandierungszustände des Kofaktors hindeuten, entweder durch Koordinierung in zwei unterschiedlichen Bindungsstellen oder durch unterschiedliche Protein-Konformere an ein und derselben Bindungsstelle wie bereits für die Isolierung aus *E. coli* beobachtet (vgl. Abb. 3.17). Auch denaturierende Pyridin-Spektren erlauben in allen Fällen nur die Detektion von Häm *b* bei 556 nm. Nur für CtaA aus FA3-HA21 lässt sich eine leichte Schulter bei 587 nm erkennen.

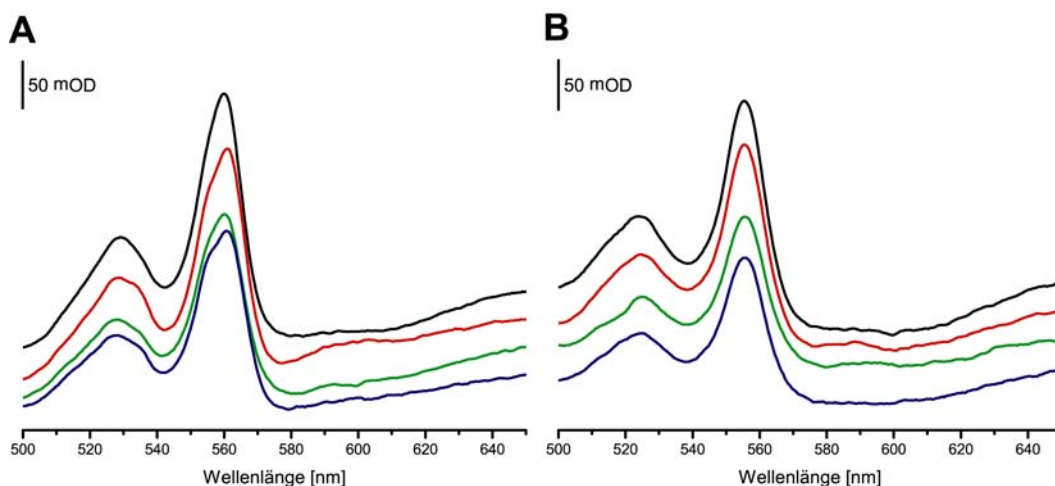


Abb. 3.21: Redox-Differenzspektren aufgereinigter CtaA Proteine aus *P. denitrificans*

Zur spektralen Untersuchung wurden die aufgereinigten CtaA-Proben vermessen. Gezeigt sind in (A) 20 µM native Redox-Spektren und in (B) 10 µM denaturierende Pyridin Redox-Spektren. CtaA aus: — Pd1222-HA21, — MR31-HA21, — FA3-HA21, — ST4-HA21. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 3.4.

Auch eine HPLC-Analytik von Häm-Extrakten, die aus 0,5-1 mg gereinigter CtaA-Proteine gewonnen wurden, weisen nahezu ausschließlich nur Häm *b* mit einer Retentionszeit von 9,5 Minuten nach (Abb. 3.22 A). Nur bei einer Vergrößerung des Bereichs von 20-28 Minuten um den Faktor 40 wird sichtbar, dass geringe Spuren von Häm *a* in den Proben aus Pd1222-HA21 und FA3-HA21 nachweisbar sind. In MR31-HA21 ist Häm *a* nahezu nicht mehr detektierbar und in ST4-HA21 wie erwartet nicht vorhanden (Abb. 3.22 B). Allerdings handelt es sich nur um geringe Spuren von Häm *a* verglichen mit der Menge an nachweisbarem Häm *b*, weshalb die CtaA Proteine faktisch ausschließlich Häm *b* enthalten.

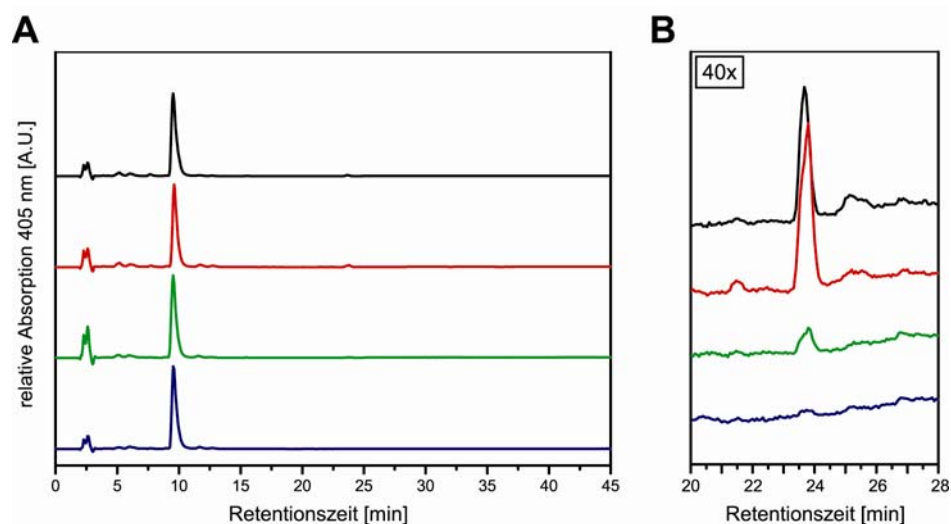


Abb. 3.22: HPLC-Analytik aufgereinigter CtaA-Proteine

0,5-1 mg aufgereinigte CtaA-Proteine wurden einer acetonsauren Häm-Extraktion unterzogen und mittels HPLC in einem Acetonitril-Gradienten (50-100%) aufgetrennt (A). CtaA aus: — Pd1222-HA21, — MR31-HA21, — FA3-HA21, — ST4-HA21. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 3.4. Zur besseren Darstellung wurde auf die jeweiligen Peakmaxima normiert. In (B) ist der Bereich um 24 min um den Faktor 40 vergrößert dargestellt. In diesem Retentionsbereich eluiert Häm *a* von der hydrophoben Säulenmatrix.

Entgegen den Erwartungen und im Gegensatz zu CtaA Präparationen aus *E. coli* (vgl. Abschnitt 3.3) lässt sich CtaA aus den verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen nur mit Häm *b* beladen isolieren. Tabelle 3.6 fasst abschließend die erhaltenen Häm-Stöchiometrien zusammen.

Tabelle 3.6: Spektrale Eigenschaften von CtaA aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen

<i>ctaA</i> -His ₆ Expressionsstämme	Absorptionsmaxima Nativspektrum [nm]	Häm <i>b</i> Gehalt [%] ^a
Pd1222-HA21	556, 560	71
MR31-HA21	556, 560	48
ST4-HA21	556, 560	46
FA3-HA21	556, 560	63

^a Häm-Gehalt bestimmt nach Pyridin Hämochromspektren mit einem Extinktionskoeffizienten von $\Delta\epsilon_{557-540} = 22,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3.5 *In vitro* Interaktion von CtaA und Surf1

Durch Koexpressionsexperimente von Surf1 mit dem Häm *a*-Biosyntheseapparat aus *Paracoccus* (CtaB und CtaA) konnte gezeigt werden, dass Surf1 Proteine in der Lage sind, *in vivo* Häm *a* zu binden [101]. Solche Koexpressionsexperimente können im heterologen Wirtssystem *E. coli* unter Verwendung eines pET-basierten Expressionsvektors für Surf1 sowie dem in Abschnitt 3.2 vorgestellten Vektor pGR52 durchgeführt werden. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass Häm *a* aufgrund seiner großen Redoxaktivität innerhalb der Zelle nur in proteingebundener Form vorliegt [126, 127]. Im heterologen *E. coli* System, welches keinen eigenen Häm *a*-Biosyntheseapparat besitzt, sollte demnach eine Interaktion zwischen Häm *a* Synthase, CtaA, und Surf1 stattfinden, bei der der Kofaktor auf Surf1 übertragen wird. Erste *in vitro* Interaktionsstudien, analysiert mit semidenaturierenden LDS-Gelsystemen und anschließender Häm-Färbung, weisen die Übertragung einer Häm-Gruppe von CtaA auf Surf1 nach [100]. Wie aber die in Abschnitt 3.3 dargestellten Ergebnisse belegen, kann CtaA in drei verschiedenen Formen aus *E. coli* isoliert werden: Häm *b*, Häm *b* und *o* sowie Häm *b* und *a* enthaltend.

Im Weiteren wurde deshalb der Versuch unternommen, den spezifischen Häm *a*-Transfer von CtaA auf Surf1c *in vitro* nachzustellen. Hierbei wurde sich zunutze gemacht, dass beide Proteine nach heterologer Expression in *E. coli* in ausreichenden Mengen und in großer Sauberkeit isolierbar sind.

Aufgereinigtes CtaA in der Häm *ba*-Form (vgl. Abschnitt 3.3) und aufgereinigtes apo-Surf1c wurden in einem molaren Verhältnis von 1 CtaA zu 2 Surf1c gemischt und eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Darauf schloss sich eine chromatographische Trennung der beiden Proteine über eine Ni²⁺-NTA Säule an. Dies ist möglich, da CtaA nach der Aufreinigung ohne *tag*, Surf1c aber mit einem N-terminalen Dekahistidin-*tag* vorliegt. Nach Inkubation der Proteine ist deren Trennung also problemlos möglich wie in Abbildung 3.23 dargestellt. Der Säulendurchlauf, ein Waschschrift mit 50 mM Imidazol sowie ein Elutionsschritt mit 250 mM Imidazol stellen eine Rückgewinnung von CtaA und Surf1c sicher. Dabei enthält der Säulendurchlauf CtaA, der Waschschrift beide Proteine in nahezu gleichem Verhältnis und der Elutionsschritt Surf1c mit einem kleinen Anteil an CtaA (ca. 10 %, densitometrisch bestimmt mit dem Programm ImageJ). Alle Fraktionen wurden gesammelt, mittels Ultrafiltration ankonzentriert und nach einer Proteinbestimmung spektral analysiert.

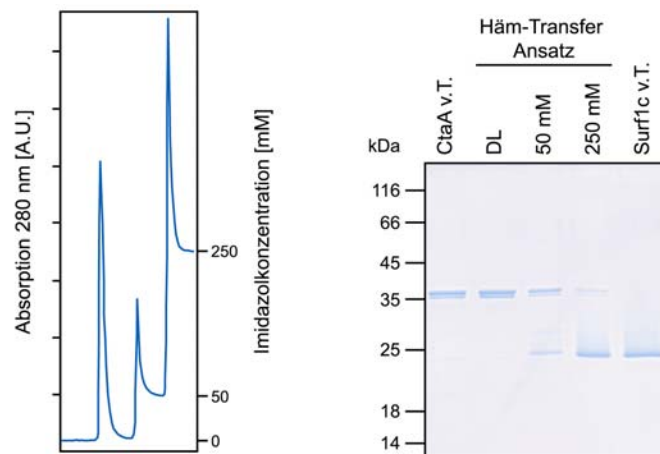


Abbildung 3.23: Trennung von CtaA und Surf1c nach einstündiger Inkubation

CtaA und apo-Surf1c wurden in einem molaren Verhältnis von 1:2 gemischt und nach einstündiger Inkubation bei 25 °C wieder über eine Ni²⁺-NTA Säule getrennt. Das Chromatogramm (links) zeigt in blau die UV-Absorption bei 280 nm für den Säulendurchlauf (0 mM Imidazol), einen Waschschrift (50 mM Imidazol) und den Elutionsschritt (250 mM Imidazol). Das dazugehörige Coomassie-gefärbte 12 % SDS-PAGE zeigt die erhaltenen Fraktionen sowie Proben beider Proteine vor der Transfer-Reaktion (v.T.). Aufgetragen wurden jeweils 1 µg Protein.

Die Aufnahme nativer Redox-Differenzspektren für CtaA und Surf1c vor bzw. nach Inkubation beider Proteine zeigt einen spezifischen Verlust von Häm *a* auf Seiten des CtaA Proteins bei 592 nm, während Häm *b* bei 560 nm unbeeinflusst bleibt. Das

übertragene Häm *a* findet sich nun in der Surf1c Fraktion (595 nm), die vor Inkubation kein Häm enthielt (Abbildung 3.24). Eine kleine zusätzliche Absorption bei 560 nm in der Surf1c Fraktion kann der anteilmäßig vernachlässigbaren Kontamination mit CtaA zugeschrieben werden. Es lässt sich also schlussfolgern, dass CtaA und apo-Surf1c *in vitro* interagieren können und dabei spezifisch Häm *a* von CtaA auf Surf1c übertragen wird.

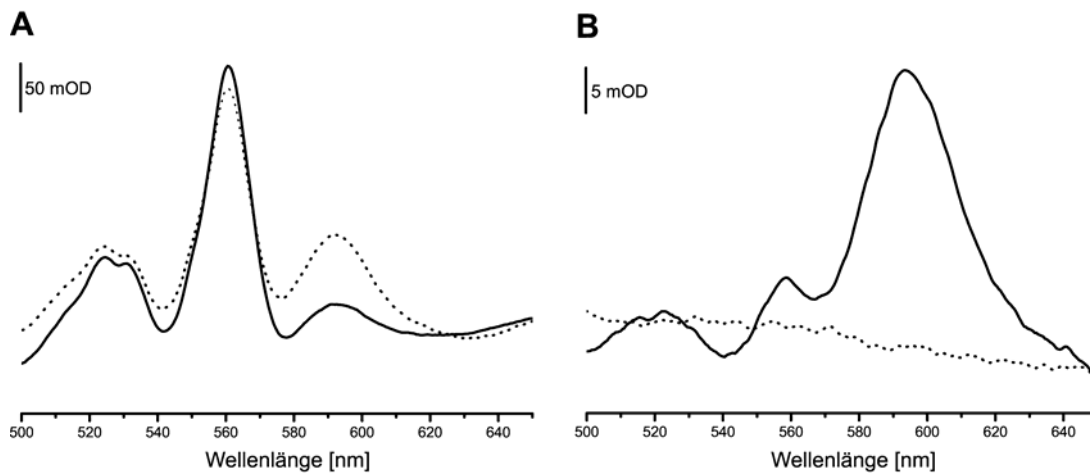


Abbildung 3.24: Native Redox-Differenzspektren für CtaA und Surf1c

20 μM Redoxspektren wurden für CtaA (**A**) und Surf1c (**B**) aufgenommen. Beide Proteine wurden für ein *in vitro* Häm-Transfer Experiment gemischt, für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend wieder säulenchromatographisch getrennt. Aufgenommene Spektren vor Inkubation (gestrichelte Linie) und nach Inkubation (durchgezogene Linie) weisen eine Übertragung von Häm nach. CtaA verliert hierbei spezifisch Häm *a*, während der Häm *b* Gehalt unbeeinflusst bleibt. Das übertragene Häm *a* befindet sich nun in der Surf1c-Fraktion.

3.6 Charakterisierung von Surf1-Mutanten

Die Koexpression von Surf1 mit den *Paracoccus* Häm *a*-Reifungsfaktoren *ctaB* und *ctaA* im heterologen *E. coli* System ergab, dass Surf1 *in vivo* ein Häm *a*-Bindeprotein ist [101]. In dieser Studie zeigte sich allerdings auch, dass unter den gewählten Expressionsbedingungen auch Spuren von Häm *o* gebunden sein können. Eine Änderung der Expressionsbedingungen zu einem autoinduktiven Medium führt aber zu spektroskopisch sauberen Surf1 Proben, die einzig Häm *a* gebunden haben [100]. Diese Expressionsbedingungen determinieren also einen eindeutigen Häm-Gehalt, der unanfällig gegenüber Variationen von einer Präparation zur nächsten ist.

Sie sind somit geeignet das Surf1 Protein durch gerichtete Mutagenese auf seine Häm *a*-Bindungseigenschaften zu untersuchen. Zusätzlich zu einer bereits für die *Paracoccus* Proteine Surf1c und Surf1q beschriebenen Histidin nach Alanin Mutation in Transmembranhelix II wurden vier weitere Reste mutiert. Diese Reste sind die einzigen, die in einem Vergleich von 61 in der KEGG Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>) eingetragenen Surf1-Sequenzen vollkommen konserviert sind. Diese Aminosäuren befinden sich alle im Transmembranbereich des Proteins und könnten an einer Bindung des Häm-Kofaktors beteiligt sein (Tabelle 7). Die Mutanten wurden entweder über eine *quik*[®] *change* Methode (Surf1c: Q25A, Y196F, W200F; Surf1q: Q26A) oder über inverse PCR (Surf1c: W24F; Surf1q: W25F, Y205F, W209F) generiert. Nach Überprüfung der Mutationen mittels DNA-Sequenzierung wurden alle Konstrukte in Testexpressionen überprüft, bevor die entsprechenden Stämme in präparativem Maßstab angezogen wurden.

Tabelle 3.7: Untersuchte Surf1-Mutanten

Surf1c	Surf1q	Lokalisation der eingeführten Mutation
Wildtyp	Wildtyp	-
W24F	W25F	Transmembranhelix I
Q25A	Q26A	Transmembranhelix I
H193A	H202A	Transmembranhelix II
Y196F	Y205F	Transmembranhelix II
W200F	W209F	Transmembranhelix II

3.6.1 Aufreinigung von Surf1 über Histidin-Affinitäts-tag

Die Surf1 Proteine wurden nach Koexpression mit den Häm *a*-Reifungsfaktoren *ctaB* und *ctaA* in Autoinduktiv-Medium mittels Metallionen-Affinitätschromatographie aus *E. coli* Membranen isoliert. Hierbei wurden jeweils 7,5 Liter Kulturen für 24 Stunden bei 32 °C angezogen und das Membranmaterial mit Triton solubilisiert. Das Aufreinigungsprotokoll umfasst wie beschrieben einen Detergenzaustausch gegen DDM, drei Waschstschritte bei 20, 50 und 80 mM Imidazol sowie eine Elution des Surf1 Proteins mit 200 mM Imidazol [100, 101]. Die Wildtyp

Proteine Surf1c und Surf1q, sowie die jeweiligen Mutanten wurden unter gleichen Bedingungen über ihren Dekahistidin-*tag* isoliert und spektral charakterisiert.

Die SDS-PAGE Analytik zeigt, dass sämtliche Mutanten in Wildtyp vergleichbarer Sauberkeit erhalten werden können (Abb. 3.25). Nur für Surf1q Q26A, sowie in geringerem Maße für die korrespondierende Surf1c Mutante Q25A, lässt sich in der Elutionsfraktion eine weitere Proteinbande bei kleinen Molekulargewichten nachweisen. Diese Bande ließ sich in einem anti-His Western Blot jedoch nicht anfärben, weshalb ungeklärt blieb, ob es sich um ein Abbauprodukt handelt, das ebenfalls eine Bindungsaffinität für das Säulenmaterial besitzt.

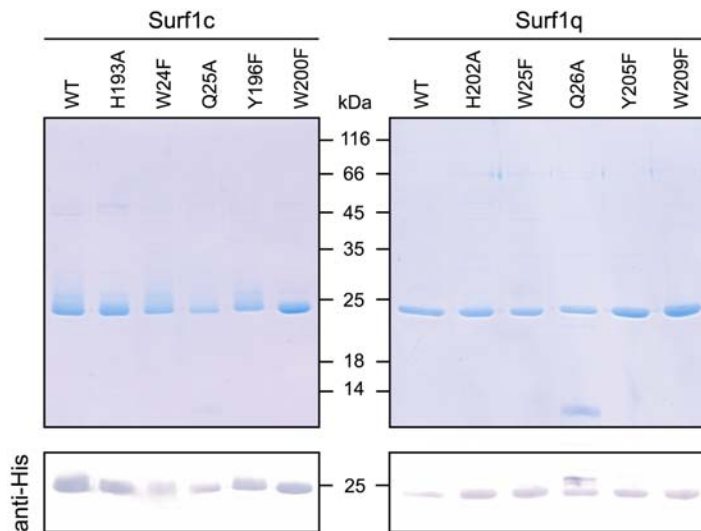


Abb. 3.25: SDS-PAGE für Wildtyp Surf1c und Surf1q sowie deren Mutanten

Coomassie gefärbtes 12 % SDS-PAGE und anti-His Western Blot für über IMAC aufgereinigte Surf1c- (links) und Surf1q-Proteine (rechts) nach Expression in Autoinduktiv-Medium in Anwesenheit von *Paracoccus* CtaB und CtaA. Pro Bahn aufgetragen wurden jeweils 2,5 µg Protein.

3.6.2 Spektrale Analytik

Native Redox-Differenzspektren erlaubten einen Vergleich der Häm-Bindungseigenschaften der Surf1-Mutanten mit den jeweiligen Wildtyp-Versionen. Aus Abbildung 3.26 geht hervor, dass sämtliche eingeführten Mutationen die Häm α -Bindung des Surf1 Proteins beeinflussen. Die Wildtyp-Proteine binden einzig Häm α , für Surf1c erkennbar an einem Absorptionsmaximum bei 595 nm und für Surf1q bei 600 nm. Die Mutanten W24F, Q25A, H193A und Y196F (Surf1c Nomenklatur)

sowie die entsprechenden Surf1q Versionen sind hierbei überhaupt nicht mehr in der Lage, Häm *a* zu binden. Im Gegensatz dazu zeigen Mutanten eines Tryptophanrestes in Transmembranhelix II (W200F in Surf1c, W209F in Surf1q) ein verschobenes Peakmaximum, für Surf1c W200F bei 558 nm mit einer Schulter bei 595 nm, für Surf1q bei 565 nm mit einer Schulter bei 600 nm.

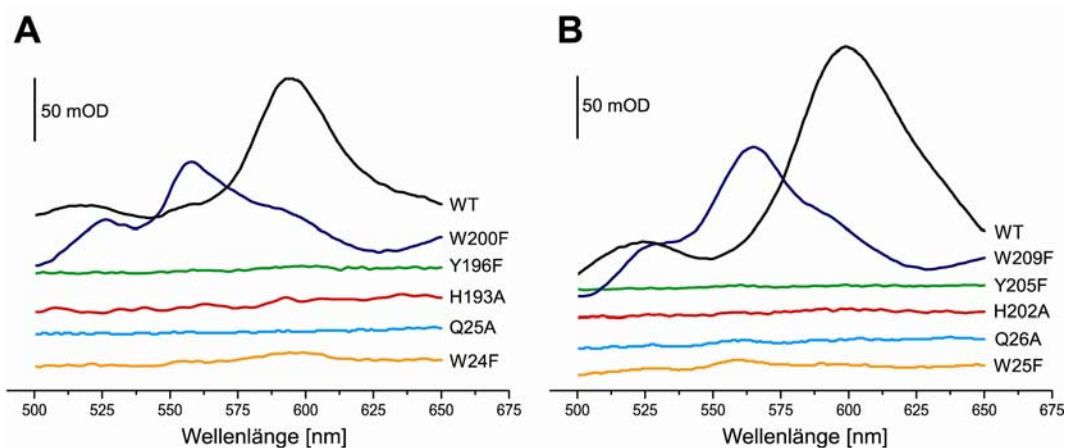


Abb. 3.26: Native Redox-Differenzspektren für aufgereinigte Surf1-Mutanten

50 μ M Redoxspektren für nach Expression in Autoinduktiv-Medium in Anwesenheit von *Paracoccus* CtaB und CtaA über IMAC aufgereinigte Surf1c-Mutanten in (A) sowie Surf1q-Mutanten in (B).

Absorptionen in nativen Redox-Differenzspektren um 560 nm können *b*- oder *o*-Typ Hämen entsprechen, weshalb zur endgültigen Klärung der Häm-Typen in Surf1c W200F und Surf1q W209F denaturierende Pyridin-Redoxspektren sowie HPLC-Untersuchungen nötig waren (Abb. 3.27).

Aus den Pyridin-Spektren (Abb. 3.27 A) geht hervor, dass die Hauptabsorption beider Mutanten bei 552 nm mit jeweils einer kleineren Schulter bei 587 nm zu finden ist, was auf die Häm-Typen *o* und *a* hinweist. Dies bestätigte sich auch in HPLC-Untersuchungen, aus denen nach Vergleich mit Häm-Standard Proben klar ersichtlich ist, dass die Mutanten Surf1c W200F und Surf1q W209F mehrheitlich Häm *o* binden (Abb. 3.27 B).

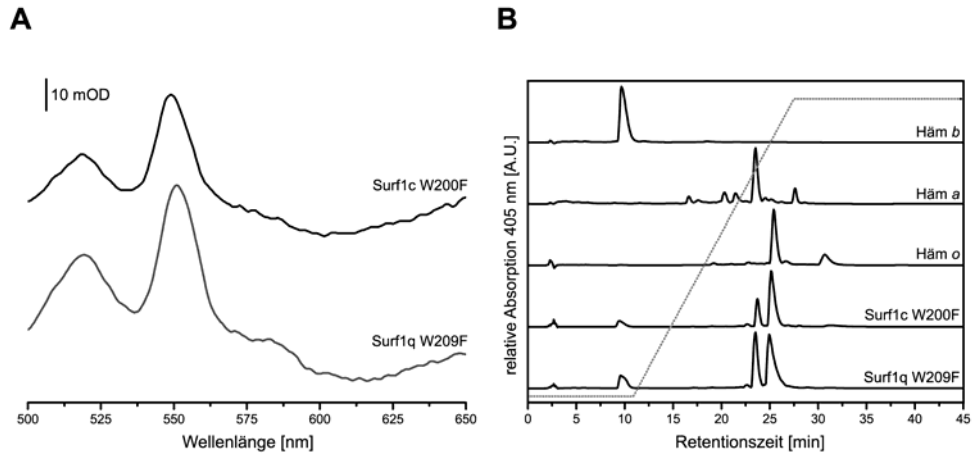


Abb. 3.27: Häm-Analytik für Surf1c W200F und Surf1q W209F

(A) Pyridin Redoxspektren für Surf1c W200F und Surf1q W209F. Die Proteinkonzentration betrug 20 μM . (B) 10 mg der aufgereinigten Mutanten-Proteine wurden einer acetonsauren Extraktion unterworfen und die Häme mittels HPLC in einem Acetonitril-Gradienten von 50-100% getrennt. Zur besseren Darstellung der HPLC-Ergebnisse wurde auf die jeweiligen Peakmaxima normiert. Beide Analysen weisen bei beiden Mutanten eine verstärkte Bindung von Häm o statt Häm a nach. Referenzproben für Häm b und o entstammen Häm-Extrakten aus *E. coli*, Häm a wurde aus aufgereinigter *P. denitrificans* Cytochrom c Oxidase gewonnen.

Nach eindeutiger Klärung der in den Mutanten W200F und W209F gebundenen Häm-Typen kann anhand der Pyridin-Spektren die Häm-Beladung der Proteine berechnet werden.

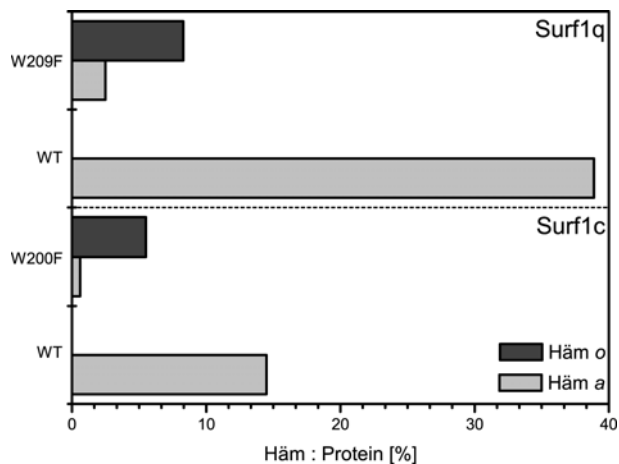


Abb. 3.28: Häm-Beladung von Surf1 Proteinen nach Koexpression mit CtaB und CtaA

Die Häm-Bindungsstöchiometrien für WT und W \rightarrow F-Mutanten lassen sich aus Pyridin-Hämochromspektren mit den Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon(\text{Häm } a)_{587-620} = 21,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\Delta\epsilon(\text{Häm } o)_{552-535} = 24,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnen.

Ergebnisse

Für Wildtyp (WT) Surf1c erhält man hierbei einen Wert von 14,5 % Häm *a*, während die W200F Mutante eine deutlich reduzierte Häm-Bindung zeigt: 0,6 % Häm *a* und 5,5 % Häm *o* (Abb. 3.28). WT Surf1q kann stärker Häm-beladen isoliert werden (38,9 % Häm *a*). Auch hier hat die Mutation des Tryptophanrestes (W209F) einen Verlust der Häm-Bindung zur Folge (2,5 % Häm *a* und 8,3 % Häm *o*).

Abschließend lässt sich also zusammenfassen, dass die Mutation der hoch konservierten Aminosäurereste innerhalb der Transmembranhelices allesamt zu einer veränderten Häm-Bindung der untersuchten Surf1-Proteine führt. Hierbei zeigen die Mutanten Surf1c W200F und Surf1q W209F einen besonderen Phänotyp, da sie mehrheitlich Häm *o* binden. Alle mutierten Reste scheinen somit an der Bindung des Häm-Kofaktors beteiligt zu sein, was die Bedeutung dieser Eigenschaft für das Surf1-Protein hervorhebt. Tabelle 3.8 fasst die gewonnenen Erkenntnisse nochmals zusammen.

Tabelle 3.8: Spektrale Eigenschaften und Häm-Beladung von Surf1-Mutanten

Surf1c	Lokalisation der eingeführten Mutation	Absorptionsmaximum im Nativspektrum [nm]	gebundener Häm-Typ
Wildtyp	-	595	<i>a</i>
W24F	Transmembranhelix I	-	-
Q25A	Transmembranhelix I	-	-
H193A	Transmembranhelix II	-	-
Y196F	Transmembranhelix II	-	-
W200F	Transmembranhelix II	558, 595	<i>o / a</i>
Surf1q			
Wildtyp	-	600	<i>a</i>
W25F	Transmembranhelix I	-	-
Q26A	Transmembranhelix I	-	-
H202A	Transmembranhelix II	-	-
Y205F	Transmembranhelix II	-	-
W209F	Transmembranhelix II	565, 600	<i>o / a</i>

3.7 Komplementationen eines *surf1*-Deletionsstamms

Die Deletion von *surf1c* in *Paracoccus denitrificans* hat einen Aktivitätsverlust der *aa₃*-Typ Cytochrom *c* Oxidase zur Folge, der durch einen Verlust von Häm *a*, insbesondere Häm *a₃* erklärbar ist [91, 100]. Trotz allem lässt sich immer noch eine Oxidase-Restaktivität von ca. 30 % bestimmen. Folglich ist die Biogenese der Häm-Kofaktoren zwar gestört, aber nicht komplett unterbunden.

Im Weiteren sollte also untersucht werden, ob sich der durch Verlust von Surf1c verursachte Oxidase-Phänotyp durch verstärkte Expression der Häm *a* Synthase, *ctaA*, reversieren lässt. Außerdem sollte der Effekt der in Abschnitt 3.6 beschriebenen Surf1c W200F Mutante auf die Oxidase-Biogenese untersucht werden.

3.7.1 Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität in Membranen

Der Einfluss einer verstärkten Expression von *ctaA* in einem *surf1c*-Deletionsstamm wurde zunächst anhand von COX-Aktivitätsmessungen an isolierten Membranen untersucht. Hierzu wurden verschiedene *Paracoccus*-Stämme in Succinat-Medium zur Gewinnung von Membranen in analytischem Maßstab angezogen. Die erhaltenen Membranen wurden nach sorgfältiger Proteinbestimmung auf ihre Oxidase-Aktivität überprüft und mit Wildtyp-Membranen aus dem Stamm Pd1222 verglichen (Abb. 3.29). Hierbei ist die Oxidase-Aktivität im *surf1c*-Deletionsstamm FA3 auf 55 % des WT-Wertes reduziert. Eine Komplementation dieses Stammes mit *surf1c* (FA3-61) kann die Aktivität wieder auf Wildtyp-Level bringen. Auch eine verstärkte Expression von *ctaA* (FA3-HA21) erhöht die Oxidase-Aktivität wieder auf 96 % verglichen mit WT-Membranen.

Die Daten legen nahe, dass eine verstärkte Expression von CtaA und damit größere Mengen des Häm *a* Kofaktors den Verlust von Surf1c kompensieren können. Dies würde bedeuten, dass die Oxidase-Biogenese wieder problemlos ablaufen kann, sobald genügend Häm *a* vorhanden ist, um in UE I der Oxidase eingebaut zu werden. Da Aktivitätsmessungen in Membranen aber sehr Fehler behaftet sind (Größe der Fehlerbalken in Abb. 3.29) und nur unter der Annahme gleicher Oxidase-Expressionslevel Vergleiche erlauben, können die ermittelten Aktivitätswerte

allerdings nur einen Trend angeben. Der Effekt auf die Oxidase lässt sich nur an gereinigtem Enzym sicher verifizieren.

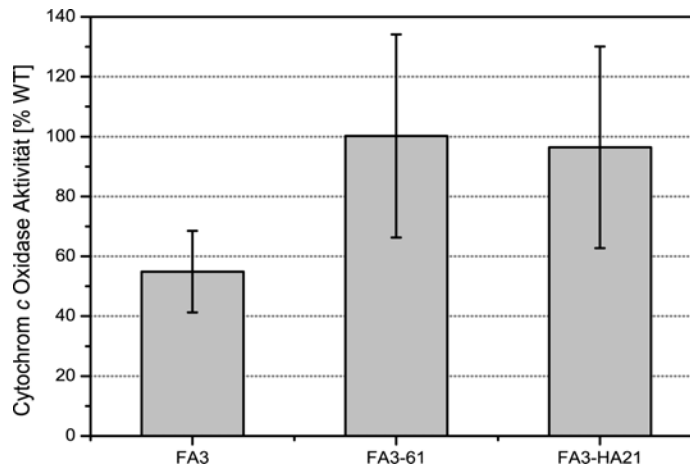


Abb. 3.29: Cytochrom c Oxidase Aktivität in *Paracoccus*-Membranen

Die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität wurde in Membranen bestimmt und ist im Vergleich zum WT (Pd1222) dargestellt. Der *surf1c*-Deletionsstamm FA3 wurde mit *surf1c* (FA3-61) sowie *ctaA* (FA3-HA21) komplementiert. Abgebildet sind die Durchschnittswerte aus drei verschiedenen Anzuchten mit den jeweiligen Standardabweichungen.

3.7.2 Cytochrom *c* Oxidase-Aufreinigungen

Zur Bestimmung des Effektes einer verstärkten Expression von *ctaA* und *surf1c* W200F in einem *surf1c*-Deletionsstamm wurde also Cytochrom *c* Oxidase mit Hilfe eines nativen Aufreinigungsprotokolls isoliert. Hierzu wurden die entsprechenden Stämme in 25 Liter Succinat-Medium für 18 h bei 32 °C angezogen und die Membran-Fraktion isoliert. Nach Solubilisierung der Membranen mit DDM konnte die Oxidase mit einem Anionenaustauscher, anschließender Gelfiltration und einem abschließenden Anionenaustauscher sauber erhalten werden. SDS-PAGE Analytik zeigt, dass die Cytochrom *c* Oxidase zu gleicher Sauberkeit und Untereinheiten-Zusammensetzung aus allen Stämmen isolierbar ist (Abb. 3.30).

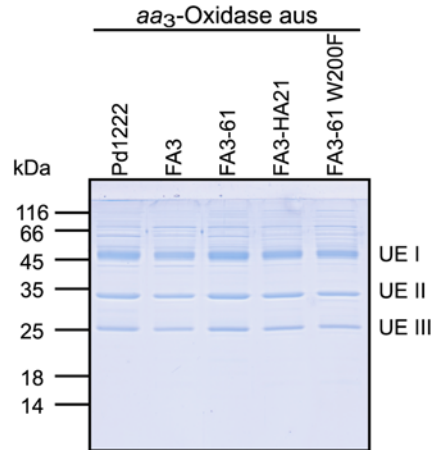


Abb. 3.30: Aufgereinigte Cytochrom c Oxidase aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen

Coomassie gefärbtes 15 % SDS-PAG von jeweils 3 µg aufgereinigter Cytochrom c Oxidase aus den *Paracoccus*-Stämmen: Wildtyp (Pd1222) und $\Delta surf1c$ (FA3) sowie den FA3-Komplementation mit *surf1c* (FA3-61), mit *ctaA* (FA3-HA21) und mit *surf1c* W200F (FA3-61 W200F). UE IV der Oxidase ist mit 5,4 kDa in diesem Gel nicht aufgelöst.

Anhand der erhaltenen Oxidase-Präparationen schlossen sich Aktivitätsmessungen und eine spektrale Analytik mit Redoxspektren an. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

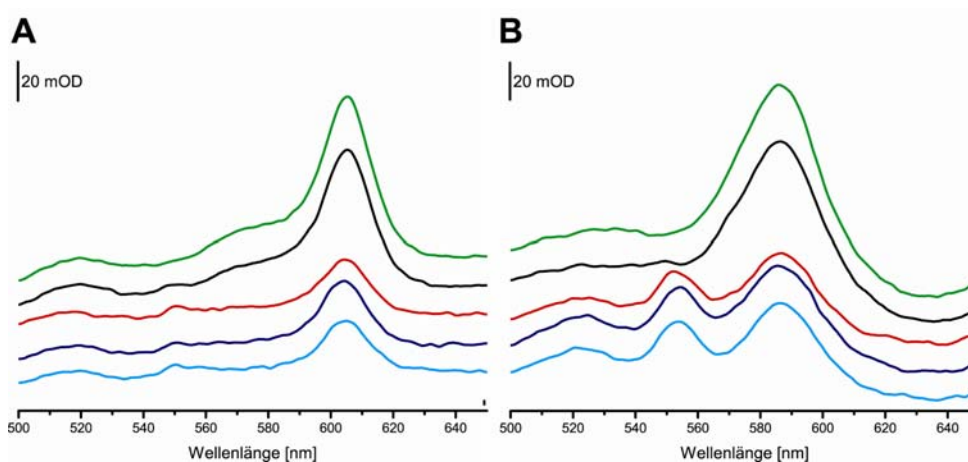
Hierbei zeigt sich, dass die Oxidase aus dem *surf1c*-Deletionsstamm (FA3) auf 28 % WT-Aktivität reduziert ist, aber durch Komplementation mit *surf1c* (FA3-61) wieder zu 85 % WT-Aktivität gelangt. Dieser Effekt wurde bereits von F.A. Bundschuh im Rahmen ihrer Doktorarbeit (AK Ludwig, Universität Frankfurt) ausführlich beschrieben [91, 100]. Interessanterweise kann eine verstärkte Expression von *ctaA* (FA3-HA21) die Aktivität der Oxidase nicht wieder herstellen (37 % WT-Aktivität). Die Messung der Oxidase-Aktivität in Membranen (vgl. Abschnitt 3.7.1) hatte nahe gelegt, dass der durch Verlust von *surf1c* hervorgerufene Oxidase-Phänotyp durch erhöhte Expression von *ctaA* umkehrbar sei. Das aufgereinigte Enzym verhält sich allerdings wie das aus dem Deletionsstamm FA3 isolierte, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass die Oxidase-Biogenese noch in gleichem Maße gestört ist. Auch eine Expression der in Abschnitt 3.6 beschriebenen *Surf1c* W200F Mutante führt zu reduzierten Oxidase-Aktivitäten (36 % WT –Aktivität) und kann den Deletions-Phänotyp nicht kompensieren.

Tabelle 3.9: Aktivität und Häm a-Gehalt aufgereinigter Cytochrom c Oxidasen

<i>aa</i> ₃ -Cytochrom c Oxidase aus	Stamm-Bezeichnung	Wechselzahl [s ⁻¹]	% WT Aktivität	Häm a Gehalt [%] ^a
Pd1222	Wildtyp	344	100	100
FA3	$\Delta surf1c$	95	28	41
FA3-61	$\Delta surf1c$ mit <i>surf1c</i> -His ₆ <i>in trans</i>	292	85	96
FA3-HA21	$\Delta surf1c$ mit <i>ctaA</i> -His ₆ <i>in trans</i>	128	37	43
FA3-61 W200F	$\Delta surf1c$ mit <i>surf1c</i> -His ₆ W200F <i>in trans</i>	123	36	43

^a Häm-Gehalt bestimmt nach Pyridin Hämochromspektren mit einem Extinktionskoeffizienten von $\Delta\epsilon_{587-620} = 21,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Angaben sind relativ zum Wildtyp-Wert (16,1 nmol Häm a / mg Protein). Die angegebenen Werte für FA3 stammen aus drei unabhängigen Oxidase-Präparationen, für FA3-HA21 und FA3-61 W209F aus jeweils zwei unabhängigen Oxidase-Präparationen.

Auch die Aufnahme von UV/vis-Spektren (Abb. 3.31) zeigt deutlich, dass die Oxidase aus dem *surf1c*-Deletionsstamm FA3 einen reduzierten Häm a-Gehalt aufweist (41 % verglichen mit WT-Oxidase). Die Komplementation mit *ctaA* und *surf1c* W200F hat keinen Einfluss auf den ermittelten Häm-Gehalt, der in beiden Fällen auf 43 % reduziert bleibt (Tabelle 3.9).

**Abb. 3.31: Redox-Differenzspektren aufgereinigter Cytochrom c Oxidasen**

Zur spektralen Untersuchung wurden 2,5 μM Lösungen aufgereinigter Cytochrom c Oxidase vermessen. Gezeigt sind in (A) native Redoxspektren und in (B) denaturierende Pyridin Redoxspektren. Die Oxidase-Präparationen entsprechen: — Pd1222, — FA3-61, — FA3, — FA3-HA21, — FA3-61 W200F. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 3.9.

Interessanterweise ist aber bei den Oxidase-Präparationen aus FA3, FA3-HA21 und FA3-61 W200F in den Pyridin-Spektren noch ein weiterer Häm-Typ bei 552-554 nm sichtbar, der in den entsprechenden Nativ-Spektren nicht zu detektieren ist. Diese Präparationen enthalten folglich noch einen zusätzlichen Häm-Typ, obwohl sie in dem WT vergleichbarer Sauberkeit isoliert werden können. Dieser zusätzliche Häm-Typ ist bisher nicht näher beschrieben worden (vgl. [91, 100]) und im Folgenden mittels HPLC-Analytik eindeutig bestimmt.

Zur näheren Untersuchung der in den Oxidase-Präparationen enthaltenen Häm-Typen wurden die gereinigten Enzyme (3-6 mg) einer Häm-Extraktion mit saurem Aceton unterzogen. Die gewonnenen Häme wurden in DMSO gelöst und anschließend auf einer μ RPC-C2/C18-Säule (GE Healthcare) in einem 50-100 % Acetonitril-Gradienten aufgetrennt (Abb. 3.32). Die Häm-Extrakte aller Oxidase-Präparationen führen hierbei, wie erwartet, zu einem Signal bei einer Retentionszeit von 23,7 min, was Häm *a* entspricht. Die Extrakte der Oxidasen aus FA3, FA3-HA21 und FA3-61 W200F besitzen zusätzlich ein Signal bei 9,7 min, was eindeutig Häm *b* entspricht.

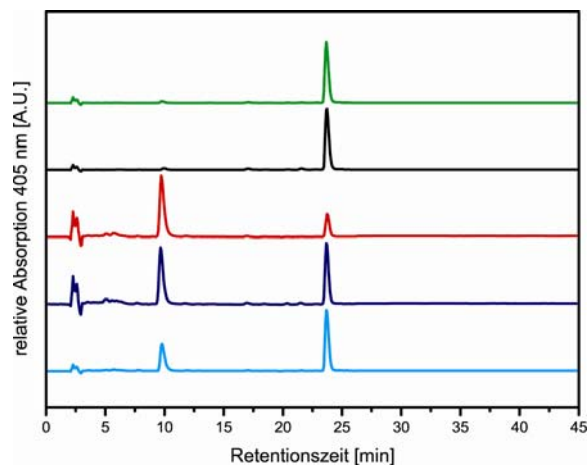


Abb. 3.32: HPLC-Analytik aufgereinigter Cytochrom c Oxidasen

3-6 mg aufgereinigte Oxidase wurden einer acetonsauren Häm-Extraktion unterzogen und mittels HPLC in einem Acetonitril-Gradienten (50-100%) aufgetrennt. Oxidasen aus den *surf1*-Deletionsstämmen weisen zusätzlich zu Häm *a* (Retentionszeit: 23,7 min) auch Häm *b* (Retentionszeit: 9,7 min) auf. Die Oxidase-Präparationen entsprechen: — Pd1222, — FA3-61, — FA3, — FA3-HA21, — FA3-61 W200F. Zur besseren Darstellung wurde auf die jeweiligen Peakmaxima normiert. Für Stammbezeichnungen siehe Tabelle 3.9.

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchung belegen zweifelsfrei, dass das in den Pyridin-Redoxspektren zusätzlich auftretende Signal bei 552-554 nm einem *b*-Typ Häm entspricht. Da die gereinigten Oxidasen in dem Wildtyp vergleichbarer Sauberkeit isoliert werden können (vgl. Abb. 3.30), muss davon ausgegangen werden, dass hier neben dem üblichen Häm *a*-Kofaktor auch Häm *b* gebunden vorliegt. Oxidase-Moleküle, die Häm *b* binden, können allerdings nicht enzymatisch aktiv sein, weshalb die Aktivitäten dieser Präparationen auf ca. ein Drittel des Wildtyp-Wertes reduziert sind.

Die spektralen Eigenschaften der gereinigten Cytochrom *c* Oxidasen aus einem *surf1c*-Deletionshintergrund sind abschließend bezüglich ihrer Häm-Stöchiometrie in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.10: Häm-Stöchiometrie aufgereinigter Cytochrom *c* Oxidasen

<i>aa</i> ₃ -Cytochrom <i>c</i> Oxidase aus	Stamm-Bezeichnung	Häm <i>a</i> : Protein ^a	Häm <i>b</i> : Protein ^b
Pd1222	Wildtyp	1,99	-
FA3	$\Delta surf1c$	0,82	0,38
FA3-61	$\Delta surf1c$ mit <i>surf1c</i> -His ₆ <i>in trans</i>	1,92	-
FA3-HA21	$\Delta surf1c$ mit <i>ctaA</i> -His ₆ <i>in trans</i>	0,86	0,32
FA3-61 W200F	$\Delta surf1c$ mit <i>surf1c</i> -His ₆ W200F <i>in trans</i>	0,86	0,33

^a Häm-Gehalt bestimmt nach Pyridin Hämochromspektren mit einem Extinktionskoeffizienten von $\Delta \epsilon_{587-620} = 21,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. ^b Häm-Gehalt bestimmt nach Pyridin Hämochromspektren mit einem Extinktionskoeffizienten von $\Delta \epsilon_{557-540} = 22,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Angaben sind relativ zur eingesetzten Proteinkonzentration von 2,5 μM . Die angegebenen Werte für FA3 stammen aus drei unabhängigen Oxidase-Präparationen, für FA3-HA21 und FA3-61 W200F aus jeweils zwei unabhängigen Oxidase-Präparationen.

Den Oxidasen aus FA3, FA3-HA21 und FA3-61 W200F fehlt also insgesamt Häm, da das theoretisch maximale Verhältnis von Häm zu Protein bei 2 liegen muss (siehe Oxidase aus Pd1222 und FA3-61), aber auch bei Addition des Häm *a*- und Häm *b*-Wertes unerreicht bleibt. Das fehlende Häm *a* ist in diesen Oxidasen folglich nicht einfach durch Häm *b* ersetzt, es müssen innerhalb der Präparation auch Oxidase-Moleküle ohne jegliche Häm-Gruppen als Subpopulation vorliegen. Eine Deletion von *surf1c* stört somit den Häm *a* Einbau in zweifachen Sinne: Es wird insgesamt zu wenig Häm *a* in die Oxidase eingebaut und zusätzlich dazu Häm *b* als nicht nativer Häm-Kofaktor, der nicht zu funktionsfähiger Oxidase führen kann.

4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die biochemische Charakterisierung der Cytochrom *c* Oxidase (COX) Biogenesefaktoren CtaA und Surf1. Die Bedeutung einer funktionierenden Oxidase-Biogenese wird ersichtlich, wenn man deren Störungen betrachtet, die zu schweren respiratorischen Mangelerscheinungen führen [62, 63]. Dabei ist insbesondere der Biogenese-Faktor Surf1 von Relevanz, dessen Fehlen beim Menschen das Leigh Syndrom hervorrufen kann [70, 71]. Die Häm *a* Synthase (CtaA) stellt den zentralen Häm-Kofaktor enzymatisch her und ist somit essenziell für die Bildung funktionsfähiger COX.

Die Forschung der vergangenen Jahre hat deutlich gemacht, dass neben der Hefe als lange studiertem Modellorganismus auch bakterielle Modelle wie *Rhodobacter sphaeroides* und *Paracoccus denitrificans* zunehmend wichtige Beiträge zu fundamentalen Biogenese-Fragen für terminale Oxidasen liefern können. Die bakteriellen Versionen der bekannten Biogenesefaktoren sind hierbei den eukaryontischen Homologen äußerst ähnlich, weshalb vergleichbare Assemblierungsmechanismen wahrscheinlich sind [43]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflüsse von CtaA und Surf1 auf die COX-Biogenese näher zu beleuchten.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit in mehreren Unterpunkten diskutiert. Zunächst wird der Ansatz einer Reifung der *Paracoccus* Oxidase im heterologen *E. coli* System näher betrachtet (Abschnitt 4.1), bevor eine detaillierte Reflexion über die Häm *a*-Synthese durch CtaA erfolgt (Abschnitt 4.2). Es schließt sich eine Diskussion über die Interaktion der COX-Biogenesefaktoren CtaA und Surf1c an (Abschnitt 4.3), gefolgt von Überlegungen zur Bindung des Häm *a*-Kofaktors an Surf1 (Abschnitt 4.4). Im letzten Teil der Diskussion werden generelle Vorstellungen zum Kofaktor-Einbau, insbesondere der Häm-Gruppen, bei der Reifung der *Paracoccus* Cytochrom *c* Oxidase dargelegt (Abschnitt 4.5).

4.1 Cytochrom *c* Oxidase Reifungsplasmide

An der Reifung der Cytochrom *c* Oxidase sind im mitochondrialen Falle über zwanzig verschiedene Assemblierungsfaktoren beteiligt, die sich allerdings bei *Paracoccus denitrificans* auf diejenigen beschränken, die direkt an der Synthese und Inkorporation der Kupfer- und Häm-Metallzentren beteiligt sind [42, 43]. Hierbei handelt es sich um die Häm *a*-Reifungsfaktoren CtaB, CtaA, Surf1c und Ferredoxin, das Kupferchaperon für UE I CtaG und die Kupferchaperone für UE II Sco1/Sco2. Für CtaB, CtaA und Ferredoxin kann argumentiert werden, dass die Proteine rein enzymatische Funktionen besitzen und folglich nicht den COX-Biogenesefaktoren zugerechnet werden sollten. Der allgemeinen Konvention folgend (siehe bspw. [44]) werden die genannten Proteine in dieser Arbeit ebenfalls der COX-Biogenese bzw. -Assemblierung zugerechnet, da der Häm *a*-Kofaktor ausschließlich in terminalen Oxidasen verwendet wird. Auch der Begriff Reifungsfaktor kann kontrovers betrachtet werden, da hiermit im Allgemeinen posttranslationale Prozessierungen in Form von proteolytischen Umwandlungen eines Präproteins in seine aktive Form gemeint sind. In Anlehnung an die seit langem intensiv erforschte Biogenese von *c*-Typ Cytochromen und daran beteiligte Protein-Faktoren (*ccm: cytochrome c maturation*, siehe [128]) wird auch hier für den Einbau des Häm *a*-Moleküls in COX UE I von einer Reifung gesprochen.

In den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Ergebnissen wurde versucht, die Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase, insbesondere der UE I, mit Hilfe der genannten Reifungsfaktoren im heterologen *E. coli* System nachzustellen. Da *E. coli* keine Cytochrom *c* Oxidase besitzt, fehlen abgesehen von einem endogen vorhandenen Ferredoxin sämtliche oben benannten Biogenesefaktoren, was dieses Wirtssystem zur Analyse von Oxidase-Biogenesereaktionen besonders attraktiv macht, da man nicht auf die zum Teil langwierige Erzeugung von Deletionsmutanten angewiesen ist. Außerdem besteht die Möglichkeit, Assemblierungsintermediate zu akkumulieren, die im nativen Wirtssystem eventuell nur transient präsent sind.

Im gewählten Ansatz wurde deshalb eine Serie von Plasmiden kloniert, die die Reifungsgene *ctaB*, *ctaA*, *surf1c*, *ctaG* und Ferredoxin (*frdx*) in verschiedenen Kombinationen enthalten. Die Analytik der generierten *E. coli* Stämme machte deutlich, dass in diesem Wirtssystem eine erfolgreiche Synthese des Häm *a*-

Kofaktors durch CtaB und CtaA nur unter stark aeroben Anzuchtbedingungen in Schikanekolben möglich war. Eine ausführliche Diskussion zur Häm *a*-Bildung in *E. coli* folgt in Abschnitt 4.2.

Mitochondrialem Ferredoxin wird eine Elektronendonator-Rolle für Häm *a* Synthase sowohl bei der Hefe als auch beim Menschen zugeschrieben [49, 50, 129]. Im Falle des verwendeten *Paracoccus* Ferredoxins (Pden_4027) ließ sich allerdings kein positiver Einfluss auf die Häm *a*-Bildung erkennen. Dies kann zum einen daran liegen, dass die entsprechende Ferredoxin-Reduktase (Pden_0658) nicht mit exprimiert wurde oder das falsche Ferredoxin-Gen Verwendung fand, da *Paracoccus* für zwei ähnliche Ferredoxine kodiert (Pden_4027 und Pden_3464). Die beiden Ferredoxin-Varianten sind sich allerdings sehr ähnlich, genau wie die entsprechende Reduktase eine hohe Sequenzidentität zu einer *E. coli* eigenen Reduktase besitzt. Aus diesen Gründen wurde nicht davon ausgegangen, dass die Expression des Ferredoxin/Reduktase-Systems die Bildung von Häm *a* im heterologen Wirtssystem bedeutend verbessern kann.

Da die Häm *a*-Synthese im nativen Wirt *Paracoccus* ohnehin strikter reguliert zu sein scheint, bietet *E. coli* also durch Wahl der Anzuchtbedingungen die Möglichkeit, den Häm-Gehalt der Zelle drastisch zu beeinflussen. Da für die *E. coli* *bo*₃-Oxidase gezeigt werden konnte, dass insbesondere der Einbau der Häm-Gruppen einen starken Einfluss auf die Faltung der UE I hat und somit die gesamte Assemblierung dieser Oxidase initiiert [130], wurde in dieser Arbeit viel Zeit darauf verwendet, die Häm *a*-Bildung in *E. coli* zu optimieren. Den Häm-Gruppen wird insgesamt eine viel wichtigere Rolle bei der Faltung der UE I zugeschrieben als dem Einbau des Cu_B-Ions [130]. Trotz Variation in den Anzuchtbedingungen oder der Kombination der verwendeten Häm-Reifungsgene (*ctaB*, *ctaA*, *surf1c* und *frdx*) ließ sich hierbei jedoch keine Verbesserung erzielen.

Ungeachtet der nicht optimalen Bedingungen wurden Koexpressions-Experimente mit der COX UE I in *E. coli* in Angriff genommen. Es ließ sich eine UE I chromatographisch aufreinigen, die Häm-Gruppen enthielt. Allerdings zeigten UV/vis-Spektren, dass neben Häm *a* auch die Häm-Typen *b* und *o* anwesend sind. Gelfiltrationsexperimente ergaben weiterhin, dass der Großteil der gereinigten UE I ungefaltet und ohne Häm vorlag (vgl. Abb. 3.10), was darauf hindeutet, dass der Einbau der Häm-Gruppen unter den gewählten Bedingungen in hohem Maße gestört

ist. Die Ergebnisse belegen aber eindeutig, dass eine kofaktorfreie UE I ungefaltet ist und zu Aggregation neigt. Höchstwahrscheinlich initiiert erst der Einbau der Häm-Gruppen eine vollständige Faltung der Untereinheit und erlaubt somit die Rekrutierung der weiteren strukturellen Untereinheiten, wie dies auch im humanen System der Fall ist [40]. Allerdings scheint es aber schon bei diesen ersten Biogenese-Schritten organismenspezifische Unterschiede zu geben, da im Fall von *Rhodobacter sphaeroides* Häm *a* nicht essenziell für die Assemblierung der strukturellen Untereinheiten ist und offensichtlich zu jedem Zeitpunkt des Assemblierungsprozesses eingebaut werden kann [131]. Der Hinweis der Autoren auf reduzierte Mengen im Vergleich zu Wildtyp-Oxidase und erhöhte Instabilität der aufgereinigten Subkomplexe ohne Häm-Gruppen unterstreicht allerdings die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung einer Fehlfaltung der apo-UE I ohne Häm-Kofaktoren. Ungeachtet der hier beschriebenen Aggregationsproblematik der exprimierten UE I konnte aber eine teilweise Häm-Beladung für UE I bei Koexpression der *Paracoccus* Biogenese-Faktoren *ctaB*, *ctaA*, *surf1c* und *ctaG* nachgewiesen werden.

Die Rolle von CtaG bei den beschriebenen Koexpressions-Experimenten konnte nicht näher analysiert werden, da die erhaltenen Mengen an UE I für entsprechende Metallionen-Analysen zu gering waren. Da CtaG aber in *E. coli* nach Expression als membranständiges Protein Kupfer gebunden hat [42], kann davon ausgegangen werden, dass es prinzipiell möglich sein sollte, bei einem erfolgreichen Einbau der Häm-Kofaktoren auch Kupfer im binuklären Zentrum der Oxidase UE I nachzuweisen. Da sich bei der Insertion der Häm-Gruppen aber wie oben beschrieben keine weiteren Erfolge erzielen ließen, wurde stattdessen der Einfluss der übrigen strukturellen Oxidase-Untereinheiten II und III auf die Reifung der UE I betrachtet.

Da eine Deletion der Oxidase UE IV in *Paracoccus* keinerlei Einfluss auf die Integrität der erhaltenen Oxidase hat, wird dieser strukturellen Untereinheit bei der Reifung der Oxidase keine entscheidende Bedeutung zugemessen [38]. Aus diesem Grund wurde sie bei der versuchten Oxidase-Reifung im *E. coli* System nicht berücksichtigt. Die Rolle der Untereinheiten II und III im Assemblierungsprozess terminaler Oxidasen ist dagegen sowohl vom Typ der betrachteten Oxidase abhängig als auch vom verwendeten Organismus. Der Zusammenbau der Untereinheiten der *E. coli* bo_3 -Oxidase ist ein sequenzieller Prozess, in dem UE III zusammen mit UE I

einen stabilen Subkomplex bildet und UE II erst danach eingebaut wird [130]. Sowohl bei *P. denitrificans* als auch bei *R. sphaeroides* bewirkt das Fehlen von UE III jedoch nur eine Verringerung der isolierbaren Zwei-Untereinheiten Oxidase bestehend aus UE I und II. Deshalb wurde der UE III eine stabilisierende Rolle während des Assemblierungsprozesses zugesprochen, möglicherweise bei späteren Assemblierungsschritten [132, 133]. Die Rolle von UE II während der Biogenese der Oxidase erscheint allerdings kontroverser. In *R. sphaeroides* ist nach Deletion der UE II eine freie UE I mit einem einzigen Häm *a* Molekül isolierbar [132]. In *P. denitrificans* ist bei einer vergleichbaren Deletion UE I nicht mehr immunologisch in Membranen nachweisbar, weshalb davon ausgegangen wird, dass in diesem Organismus eine freie UE I nicht stabil ist und folglich abgebaut wird [102]. Um allen möglichen Varianten Rechnung zu tragen, wurde deshalb bei den durchgeführten Koexpressions-Experimenten mit den Biogenesefaktoren mit Hilfe verschiedener Konstrukte gearbeitet: (i) UE I alleine, (ii) eine synthetische Operonstruktur bestehend aus UE I und II sowie (iii) ein synthetisches Operon aus UE I, II und III. Keine der genannten Varianten lieferte hierbei bessere Ergebnisse in Bezug auf den Häm-Gehalt der isolierten, mit Histidin-*tag* versehenen UE I. Außerdem blieb es unklar, ob die UE II und III mit isolierbar waren, geschweige denn effizient exprimiert wurden. Für UE III fehlte beispielsweise ein funktionierendes Antiserum zur immunologischen Detektion auf Membranebene. UE II ist in *E. coli* zwar exprimierbar, allerdings ist unklar ob eine notwendige N-terminale proteolytische Prozessierung eines 29 Aminosäuren langen Signalpeptids stattfinden kann [134]. Des Weiteren wurde auf Assemblierungsfaktoren für UE II (Sco-Proteine) verzichtet, da der Fokus dieser Arbeit auf der Biogenese der Oxidase UE I lag. Es kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass UE II unprozessiert und fehlgefaltet vorlag und deshalb nicht sicher nachweisbar war.

All diese Faktoren könnten dafür verantwortlich sein, dass der Ansatz einer Reifung der *Paracoccus* Cytochrom *c* Oxidase in *E. coli* nicht zum gewünschten Erfolg führte. Hier sind weitere Forschungen nötig, die eine stabile Expression der Oxidase UE I, II und III in *E. coli* voraussetzen, um die Effekte bestimmter Biogenesefaktoren wie Surf1 und CtaG sicher charakterisieren zu können.

4.2 Die *P. denitrificans* Häm *a* Synthase CtaA

Häm *a* ist ein essenzieller Kofaktor vieler terminaler Oxidasen und damit für die respiratorischen Funktionen eines Organismus unerlässlich. Es ist seit langem bekannt, dass hierfür ausgehend von Häm *b* zwei Enzyme verantwortlich sind: die Häm *o* Synthase (CtaB in Prokaryonten, Cox10 in Eukaryonten) und die Häm *a* Synthase (CtaA in Prokaryonten, Cox15 in Eukaryonten) [48].

Die nähere Charakterisierung der Häm *a* Synthase (CtaA) beschränkt sich derzeit hauptsächlich auf CtaA aus *Bacillus subtilis*, allerdings zeigt das im Ergebnisteil präsentierte Sequenzalignment, dass es mindestens zwei Subgruppen für dieses Enzym geben muss. So ist die CtaA-Sequenz aus *B. subtilis* und anderen gram-positiven Vertretern doch deutlich unterschiedlich im Vergleich zu Vertretern anderer Organismen-Gruppen, in die auch das humane sowie das *Paracoccus*-Homolog fallen (vgl. Abschnitt 3.1 und 4.3). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten über die *Paracoccus* Häm *a* Synthase sind meines Wissens nach die ersten ihrer Art und können folglich nur anhand der Ergebnisse des *Bacillus* Enzyms diskutiert werden.

Erste Versuche zur näheren Charakterisierung von CtaA aus *Bacillus* wurden bereits 1993 unternommen, indem die Gene *ctaB* und *ctaA* in *E. coli* zur Expression gebracht wurden [135]. Hier zeigte sich, dass CtaA ohne CtaB nicht effektiv in der Lage ist, Häm *a* zu bilden. Dies ist in klarer Übereinstimmung zu den präsentierten Daten über das in *E. coli* exprimierte *Paracoccus* CtaA Protein. Aus derselben Gruppe stammen auch die ersten Charakterisierungsversuche am aufgereinigten Enzym. Die Autoren beschreiben bei homologer Expression in *Bacillus* zwei verschiedene CtaA-Formen: eine *b*-Form und eine *ba*-Form [78]. Verschiedene CtaA-Formen konnten auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, allerdings nur bei heterologer Expression in *E. coli*: eine *b*-, eine *bo*- und eine *ba*-Form. Die Daten aus homologer Expression in *P. denitrificans* ergeben aber zweifelsfrei, dass in allen getesteten Deletionsstämmen faktisch nur die *b*-Form des Enzyms isolierbar ist (Abb. 4.1). Dies steht in direktem Widerspruch zu den aus *Bacillus* vorliegenden Erkenntnissen. In *Paracoccus* scheint die Synthese des Häm *a*-Kofaktors anscheinend anders kontrolliert zu sein. Hier wird offensichtlich dafür Sorge getragen, dass Häm *a*-Synthese und Einbau in terminale Oxidasen so geregelt sind, dass auf Ebene von CtaA kein Häm *a* akkumulieren kann und dieses auch nur dann

synthetisiert wird, wenn es direkt an seinen Bestimmungsort (COX UE I) abgegeben werden kann.

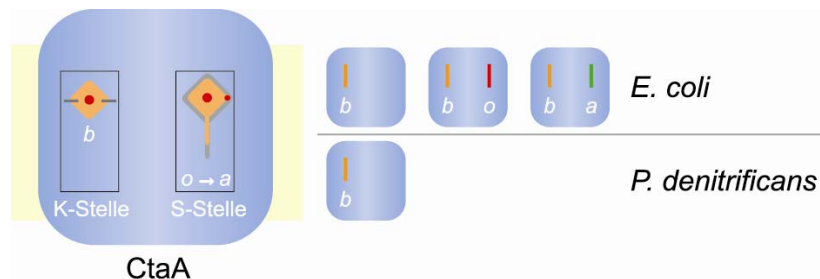


Abb. 4.1: Übersicht über isolierte Formen der *Paracoccus* Häm a Synthase CtaA

Die Häm a Synthase (CtaA) besitzt vermutlich zwei verschiedene Häm-Bindungsstellen. An der K-Stelle wird ein katalytisch wichtiges Häm b gebunden, an der S-Stelle das Substrat Häm o, das zu Häm a oxidiert wird. Nach heterologer Expression in *E. coli* konnte CtaA in drei spektroskopisch unterscheidbaren Formen isoliert werden : b-, bo- und ba-Form. Nach homologer Aufreinigung aus verschiedenen *P. denitrificans*-Deletionsstämmen konnte nur die b-Form erhalten werden, was darauf hindeutet, dass die Synthese von Häm a in *Paracoccus* strikt reguliert und an eine sofortige Abgabe im Rahmen der Oxidase-Biogenese gekoppelt ist.

Die Studien an *Bacillus* CtaA liefern bisher widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf potenzielle Bindungsstellen für Häm-Gruppen. Zuerst vorgeschlagene Modelle sehen eine Bindungsstelle für einen Häm b-Kofaktor vor (K-Stelle in Abb. 4.1), sowie eine weitere Bindungsstelle, an der Häm o zu a umgesetzt wird (S-Stelle in Abb. 4.1) [78]. Allerdings berichten andere Gruppen über zwei gebundene Häm b-Moleküle pro *Bacillus* CtaA [80]. Auch die Rolle konservierter Histidin-Reste, die als axiale Häm-Liganden vermutet werden, liefern widersprüchliche Ergebnisse für das *Bacillus* Enzym [79, 80]. Die vorgestellten Daten für das *Paracoccus* Protein könnten nahe legen, dass in der Tat zwei Häm b-Moleküle in unterschiedlichen Ligandierungszuständen gebunden sein könnten. Redox-Differenzspektren zeigen nämlich Absorptionsmaxima bei 556 und 560 nm für aus *Paracoccus* isoliertes CtaA, obwohl die Protein-Präparationen nach Pyridin-Redoxspektren und HPLC-Analytik nur Häm b enthalten (vgl. Abschnitt 3.4.4). Dasselbe gilt für die aus *E. coli* isolierte b-Form des Proteins (vgl. Abschnitt 3.3.2.3). Hierfür sind prinzipiell zwei Erklärungen möglich: Entweder wird der Häm b-Kofaktor an zwei unterschiedlichen voneinander getrennten Bindungstaschen koordiniert oder die leicht unterschiedlichen Absorptionsmaxima sind auf eine einzige Häm b-Bindungsstelle mit zwei verschiedenen Protein-Konformationszuständen zurückzuführen. Diese

Erklärung ist im Falle des *Paracoccus* Proteins die vielleicht wahrscheinlichere, da die Interaktionsstudie mit Surf1c klar belegt, dass es zwei voneinander getrennte Häm-Bindungsstellen geben muss: eine K-Stelle für einen Häm *b*-Kofaktor und eine S-Stelle, an der Häm *a* von Surf1c abgezogen werden kann (vgl. Abschnitt 4.3).

Paracoccus CtaA wies in allen isolierten Varianten eine substöchiometrische Häm-Beladung auf. Auch hier widersprechen sich die verfügbaren Daten für das *Bacillus*-Enzym. Die Gruppe um T. Mogi misst zwei Häm-Moleküle pro CtaA Protein [80], während die Gruppe um L. Hederstedt substöchiometrische Werte erhält [78, 79]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei dem hier entwickelten Aufreinigungsprotokoll für *Paracoccus* CtaA Häm-Kofaktoren während der Aufreinigung verloren gehen. Allerdings sind die isolierten Proteine in Gelfiltrationsexperimenten monodispers und es zeigen sich dabei im Elutionsprofil keine niedermolekularen oder Häm/Detergenz-Micellen zuordenbaren Absorptionen. Obwohl also ein Verlust von Häm-Gruppen während der Aufreinigung nicht voll auszuschließen ist, erscheint diese Erklärung doch recht unwahrscheinlich. Es könnte folglich sein, dass es neben *b*, *bo* oder *ba*-Formen auch eine apo-Form des Proteins gibt, die keinerlei Häm-Gruppen trägt. Inwieweit eine solche apo-Form physiologisch bedeutsam ist, muss an dieser Stelle offen bleiben.

Im Falle einer Expression von CtaA in *E. coli* zeigt sich eine strikte Sauerstoff-Abhängigkeit für eine erfolgreiche Häm *a*-Synthese. Dies wird ebenfalls für *Bacillus* CtaA berichtet, wo Häm *a* ebenfalls nur bei hohen Belüftungsraten gebildet wird [76]. Entgegen den Erwartungen belegen Markierungsexperimente mit ¹⁸O, dass das Sauerstoff-Atom der Häm *a*-Formylgruppe aber nicht aus molekularem Sauerstoff stammt, sondern aus Wasser [77]. Wie auch immer der genaue enzymatische Mechanismus aussehen mag, lassen sich zwei Kernpunkte festhalten: Auch *Paracoccus* CtaA kann in *E. coli* nur bei hohen Belüftungsraten enzymatisch aktiv sein. Dagegen ist die Bildung des Kofaktors im nativen Wirtssystem nicht so streng belüftungsabhängig, da hier Häm *a* auch in ausreichenden Mengen bei Anzucht der Zellen in Normalkolben gebildet wird. Dies ist wenig überraschend, da *P. denitrificans* als Bodenbakterium mit limitierten Sauerstoffniveaus umzugehen weiß. Barros *et al.* berichten von der Notwendigkeit eines Ferredoxin/Ferredoxin-Reduktase-Komplexes zur Bildung von Häm *a* in Hefe [49, 50]. Dieses System könnte auch bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken eine erfolgreiche Synthese von Häm *a* gewährleisten. In *E. coli* wird ein Fehlen eines solchen Systems

möglicherweise durch striktere Abhängigkeit von hohen Belüftungsraten kompensiert. In welcher Form dies aber geschieht, muss ebenfalls an dieser Stelle offen bleiben und bedarf weiterer Forschung.

Unter physiologischen Bedingungen ist offensichtlich ein Häm *a*-Biosynthese-Komplex aus CtaB und CtaA bedeutsam, da beide Proteine miteinander aufgereinigt werden können [75]. Eine Koreinigung von *Paracoccus* CtaB mit CtaA konnte im Falle einer Expression in *E. coli* nicht beobachtet werden. Dies liegt allerdings höchstwahrscheinlich an stringenteren Aufreinigungsbedingungen, die unter anderem eine Solubilisierung der Membranen mit Triton X-100 in einem Verhältnis von Protein zu Detergenz von 1 zu 5 vorsehen. Im Gegensatz hierzu scheint bei Isolierung von CtaA aus *Paracoccus* eine Koreinigung von COX UE I möglich (vgl. Abschnitt 3.4.2). Eine Interaktion beider Proteine könnte erklären, warum bei Deletion von *surf1* in allen bisher untersuchten Organismen, Oxidase-Restaktivität messbar ist. Nichtsdestotrotz sollten die in dieser Arbeit präsentierten Koelutionsergebnisse nur als Hinweise auf mögliche Interaktionen gedeutet werden, die in Zukunft einer verstärkten Betrachtung unterzogen werden sollten.

Zusammenfassend lässt sich nochmals festhalten, dass die *Paracoccus* Häm *a*-Synthase CtaA aus *E. coli* in drei spektroskopisch unterscheidbaren Formen sauber aufreinigbar war: *b*-, *bo*- und *ba*-Form. Die Daten legen nahe, dass das Protein zwei getrennte Häm-Bindungsstellen besitzt (K- und S-Stelle, Abb. 4.1). Aufreinigungen aus dem homologen Wirtssystem *Paracoccus* liefern ausschließlich eine *b*-Form, so dass hier dafür Sorge getragen wird, dass CtaA weder Häm *o* noch Häm *a* akkumuliert, sondern die Synthese von Häm *a* und damit die Bindung des Substrats Häm *o* an eine sofortige Verwertung im Rahmen der Oxidase-Biogenese gekoppelt sind. An dieser Stelle zeigt sich aber auch die Nützlichkeit des heterologen *E. coli* Systems. Offensichtlich können hier Assemblierungsintermediate analysiert werden, die im homologen System aufgrund strikterer Regulationen nicht akkumulierbar sind, aber physiologisch bedeutsame Zwischenstufen darstellen.

4.3 Interaktion von CtaA und Surf1

Die in dieser Arbeit charakterisierte Häm *a* Synthase (CtaA) aus *Paracoccus denitrificans* kann nach Expression in *E. coli* wie bereits diskutiert in verschiedenen

Häm-Beladungszuständen isoliert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das heterologe Wirtssystem keine Häm *a*-verwertenden Abnehmerproteine besitzt.

Allerdings lässt sich in Expressionsstudien von Surf1 mit dem Häm *a*-Biosyntheseapparat aus *Paracoccus*, CtaB und CtaA, feststellen, dass aufgereinigte Surf1 Proteine unter diesen Bedingungen Häm *a* binden können [100, 101]. Dies ist ebenfalls der Fall nach homologer Expression in *Paracoccus*: Auch hier lässt sich im aufgereinigten Surf1 Häm *a* nachweisen [100]. Dies setzt einen spezifischen Häm *a*-Transfer von CtaA auf Surf1 voraus, da im Allgemeinen davon ausgegangen werden muss, dass sich in der Zelle kein freies Häm *a* findet [126, 127].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kofaktor-Transport von CtaA auf Surf1c *in vitro* nach verfolgt. Hinweise darauf, dass beide Proteine miteinander wechselwirken, konnten bereits in Hefe gesammelt werden. In einer Koelution nach antikörpervermittelter Aufreinigung des Surf1-Homologs Shy1p konnte unter anderem auch Cox15 massenspektrometrisch nachgewiesen werden [90]. Allerdings diskutierten die Autoren der Studie diese Beobachtung nicht näher.

Die in Abschnitt 3.5 dargestellten Ergebnisse belegen nun einen direkten und spezifischen Transfer von Häm *a* ausgehend von CtaA auf Surf1c. Der Häm *b* Kofaktor der Häm *a* Synthase ist hiervon unbeeinflusst. Dies kann als wichtiger Hinweis darauf gewertet werden, dass das Enzym, wie bereits diskutiert, zwei voneinander getrennte Häm-Bindungsstellen besitzt. Das unter den *in vitro* Bedingungen spezifisch Häm *a* auf Surf1c übertragen werden kann, ist von entscheidender Bedeutung bei der Beurteilung der chromatographischen Aufreinigungen für die beiden Proteine CtaA und Surf1. Beide Proteine müssen folglich ihre native Struktur trotz zum Teil aufwendiger Reinigungsverfahren erhalten haben, ansonsten erschiene ein spezifischer Transfer von Häm *a* unwahrscheinlich. Für Surf1 lässt sich weiter folgern, dass auch die apo-Form des Proteins eine stabile Faltung besitzen muss, da das Protein in dieser Form mit CtaA wechselwirken kann. Der hier vorgestellte *in vitro* Häm-Transfer liefert keine kinetischen Parameter, zeigt allerdings deutlich, dass die beiden Proteine nur transient miteinander wechselwirken, da sie anschließend wieder über konventionelle Chromatographie voneinander trennbar sind. Der Assay zeigt ebenfalls, dass auch bei einem zweifachen molaren Überschuss von Surf1c gegenüber CtaA keine vollständige Übertragung der Häm-Gruppe stattfindet. Dies könnte bedeuten, dass

nicht jedes Interaktionsereignis auch zwangsläufig eine Übertragung der Häm-Gruppe zur Folge haben muss. Es lässt sich spekulieren, dass das Gleichgewicht der Übertragungsreaktion des Häm *a*-Moleküls von CtaA auf Surf1 insgesamt auf Seiten von Surf1 liegt und eine Rückübertragung des Kofaktors folglich nicht favorisiert ist, besonders vor dem Hintergrund einer Diskussion von Surf1 als physiologisch bedeutsamen Häm *a*-Pool innerhalb der Zellmembran [100, 101]. Ein spektroskopisches Verfolgen der Übertragung des Häm-Kofaktors erscheint schwierig, da sich die Absorption des Häm *a* in CtaA (592 nm) und Surf1c (595 nm) nur um drei Nanometer unterscheiden und die Absorptionsbanden sehr breit sind. Zukünftig ist eine Charakterisierung dieser Interaktion dringend mit geeigneten biophysikalischen Methoden notwendig. Vorstellbar wären hierfür Isotherme Titrationskalorimetrie oder Surface Plasmon Resonanz. Es kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden, in welcher Form die beiden Proteine miteinander wechselwirken. Man kann sich vorstellen, dass Surf1 in seiner apo-Form eine gewisse Affinität zu CtaA besitzt. Wenn der Kofaktor übertragen wird, hat dies höchst wahrscheinlich strukturelle Änderungen sowohl auf Seiten der Häm *a* Synthese als auch auf Seiten von Surf1 zur Folge, die zu einer Herabsetzung der gegenseitigen Affinität führen. Dabei kann sowohl der Verlust der Häm-Gruppe durch CtaA als auch das Binden des Kofaktors an Surf1 der auslösende Faktor zur Dissoziation der beiden Proteine sein (Abb. 4.2).

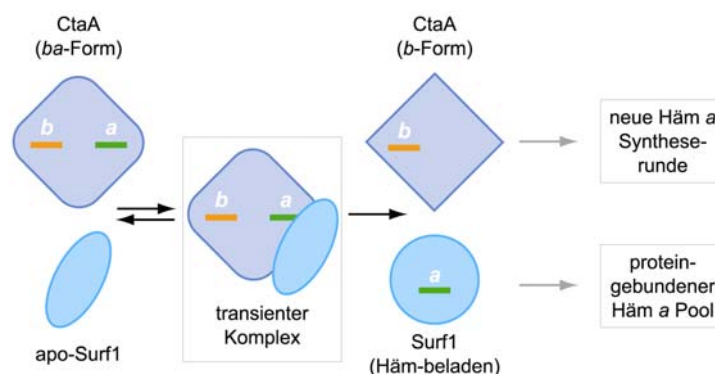


Abb. 4.2: Modell der Interaktion zwischen CtaA und Surf1

CtaA (in der *ba*-Form) und apo-Surf1 können miteinander unter Übertragung der Häm *a*-Gruppe wechselwirken. Zunächst können beide Proteine vermutlich reversibel aneinander binden. Kommt es zur Übertragung der Häm-Gruppe, könnten strukturelle Rearrangements eine Dissoziation bewirken und den transienten Komplex wieder auflösen. CtaA (in der *b*-Form) stünde nun für eine weitere Synthese-Runde zur Verfügung, während Surf1 in seiner Häm-beladenen Form zum Aufbau eines protein-gebundenen Häm *a*-Pools innerhalb der Membran beitragen würde, wie bereits von Bundschuh *et al.* postuliert [100, 101].

Das beschriebene Szenario setzt allerdings klar definierte Bindungsbereiche für Surf1 an CtaA voraus. Die in Abschnitt 3.1 aufgezeigten Sequenzanalysen für verschiedene CtaA/Cox15 Proteine könnten einen Hinweis hierauf liefern. Vergleicht man nämlich die CtaA-Sequenzen aus Organismen, die ein Surf1-Homolog besitzen (bspw. *P. denitrificans*), mit CtaA-Sequenzen aus Organismen, die kein Surf1 Homolog besitzen (bspw. *B. subtilis*), lassen sich klare gruppenspezifische Unterschiede erkennen. In Abbildung 4.3 sind die gravierendsten gruppenweisen Unterschiede, die sich aus einem Sequenzalignment ergeben, dargestellt. Besonders ausgeprägte Sequenzunterschiede zeigen sich in den *loop*-Regionen zwischen den Transmembranhelices I und II sowie zwischen III und IV, während die katalytisch aktiven Aminosäure-Reste innerhalb der Transmembranhelices unbeeinflusst sind. Überträgt man diese Unterschiede auf ein von T. Mogi erarbeitetes Strukturmodell für die *Bacillus* Häm *a* Synthase [80], lässt sich eine potenzielle Kontaktfläche für Proteinfaktoren (wie Surf1) postulieren, die mit CtaA im Falle von *Paracoccus* interagieren können (Abb. 4.3 C).

Die diskutierten CtaA-Sequenzunterschiede und die daraus erarbeitete Hypothese einer spezifischen Interaktionsfläche für Surf1 sollten allerdings als rein spekulativ betrachtet werden. Dass sich aber solche Sequenzunterschiede aufzeigen lassen, könnte erklären, warum in manchen Organismen trotz *a*-Typ Häm tragender terminaler Oxidasen kein Surf1-Homolog nachweisbar ist. Häm *a* Synthasen vom *Paracoccus*-Typ (Alignment-Gruppe A in Abschnitt 3.1) haben sich in der Evolution möglicherweise so verändert, dass zur Weitergabe ihres enzymatischen Endprodukts (Häm *a*) zusätzliche Proteinfaktoren wie Surf1 nötig wurden. Dies würde der Zelle allerdings auch vollkommen neue regulatorische Möglichkeiten eröffnen, die es erlauben, flexibel auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren.

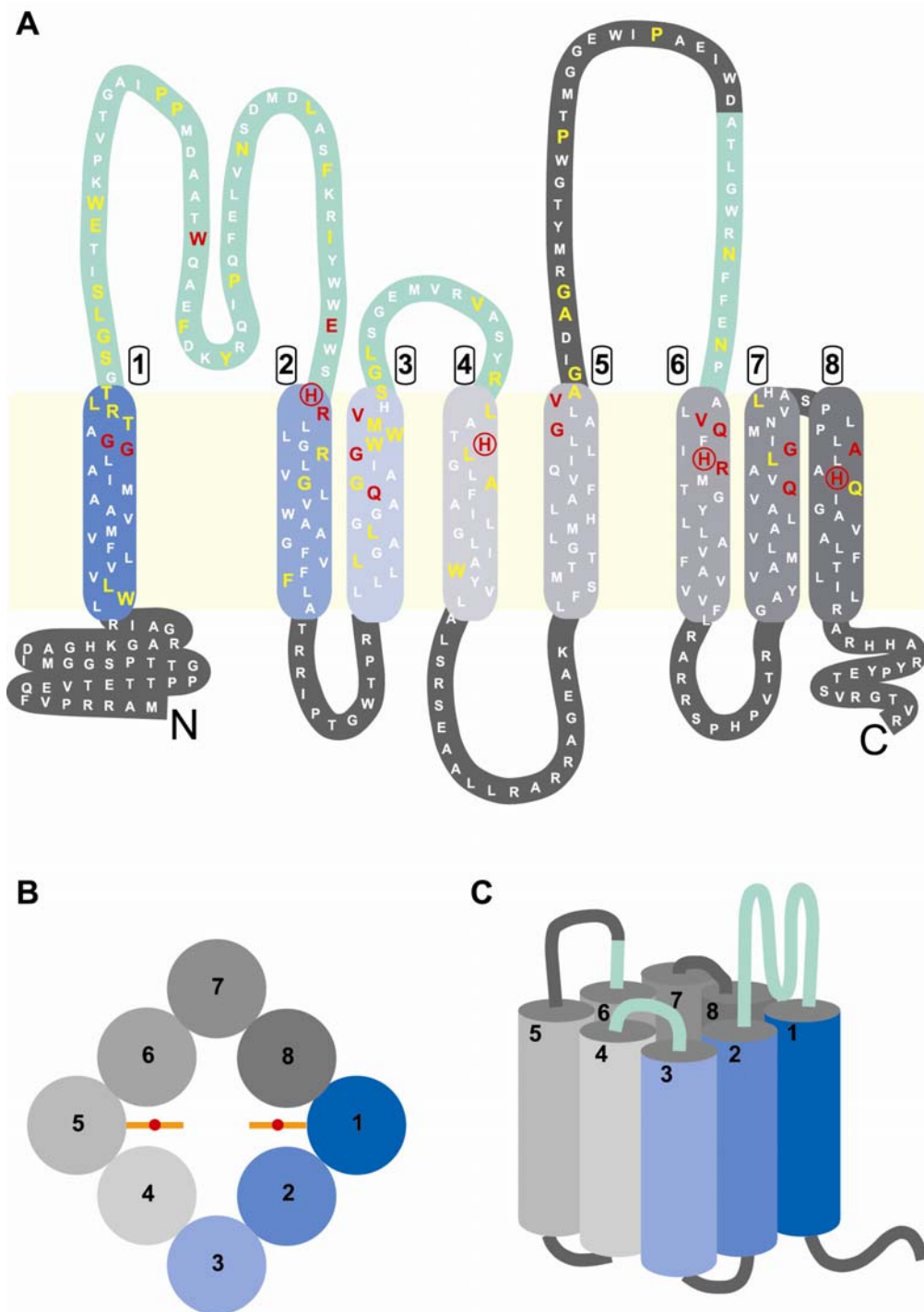


Abb. 4.3: Potenzielle Interaktionsflächen für Surf1 an CtaA

(A) Topologie-Modell der *Paracoccus* Häm a Synthase, CtaA. Die Transmembranhelix-Bereiche sind als Zylinder dargestellt und mit 1 bis 8 annotiert. Konservierte Aminosäure-Reste, die sich in allen betrachteten CtaA-Sequenzen finden, sind in rot dargestellt, wobei Histidin-Reste, die Häm-Gruppen ligandieren, zusätzlich umkreist sind. Aminosäure-Reste, die nur in CtaA-Sequenzen konserviert sind, die aus Organismen stammen, deren Genom zusätzlich für ein *surf1*-Homolog kodiert, sind in gelb dargestellt. Die in dieser Organismengruppe zusätzlichen oder stark veränderten *loop*-Bereiche sind mintfarben abgebildet. (B) Aufsicht auf ein Topologie-Modell für CtaA nach T. Mogi [80]. (C) Kombination der Topologie-Modelle aus A und B, in dem die potenziellen Interaktionsbereiche von Surf1 mintfarben koloriert sind.

4.4 Häm *a* Binding an Surf1

Dem Surf1 Protein werden in der Literatur eine Vielzahl biologischer Funktionen zugeschrieben, die von der Stabilisierung von COX UE I über eine Beteiligung an der Kupferhomöostase bis zur Anwesenheit in Superkomplexen bestehend aus dem bc_1 -Komplex und der Cytochrom *c* Oxidase reichen [90, 136, 137]. Die Analytik bakterieller Homologe beschränkt sich derzeit auf die Surf1 Proteine aus *Rhodobacter sphaeroides* und *Paracoccus denitrificans* [91, 92, 100, 101]. Deletionsstudien der bakteriellen Varianten zeigten, dass die Cytochrom *c* Oxidase in diesen Fällen einen verringerten Häm *a*-Gehalt aufweist, was den Schluss nahe legt, dass das Protein an der Insertion der Häm-Gruppen in die Untereinheit I der Oxidase beteiligt ist. Spätere Studien an Hefe ergaben ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins an der Bildung des Häm a_3 -Zentrums [93]. Die beiden *Paracoccus* Surf1-Proteine sind derzeit die einzigen Homologe, die proteinbiochemisch aufgereinigt und charakterisiert wurden [100, 101]. In diesen Studien zeigte sich überraschenderweise, dass die Proteine sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Häm *a* binden können. Die Bindungsaffinitäten, bestimmt über Isotherme Titrationskalorimetrie, liegen hierbei im hohen nanomolaren Bereich [100, 101].

Erste Schritte zur Charakterisierung der Häm-Bindung an Surf1 beinhalteten die Mutation eines konservierten Histidin-Restes am N-terminalen Ende der vorhergesagten Transmembranhelix II. Histidin-Reste sind mit Abstand die häufigsten axialen Liganden für das Eisen-Zentralatom von Häm-Gruppen [138]. In der Tat hatte die Mutation des angesprochenen Histidin-Restes zu Alanin eine Reduktion der Bindungsaffinitäten für beide *Paracoccus* Surf1-Proteine zur Folge und spektrale Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass dieser Rest ein axialer Ligand des Eisen-Zentralatoms sein könnte [100, 101].

Zur näheren Charakterisierung der Häm-Bindungseigenschaften wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vier weitere konservierte Aminosäure-Reste innerhalb der Transmembranhelices mutiert und die Proteine nach chromatographischer Aufreinigung auf ihren Häm-Gehalt überprüft (siehe Abschnitt 3.6). Die ausgewählten Reste (TMH I: W24, Q25; TMH II: Y196, W200; Surf1c Nomenklatur) sind die einzigen, die volle Konservierung in einem Alignment von 61 Surf1-Sequenzen zeigen. Die Mutanten-Proteine wurden in *E. coli* mit Hilfe eines

Autoinduktionsmediums und in Anwesenheit der *Paracoccus* Häm *a*-Reifungsproteine CtaB und CtaA exprimiert.

Die gewählten Expressionsbedingungen ergeben für die Wildtyp-Versionen Häm *a*-Bindungsstöchiometrien von ca. 15 % für Surf1c und 39 % für Surf1q. Alle hier charakterisierten Mutanten sind hierbei in ihrer Häm-Bindung gestört, wobei Mutationen der Reste W24, Q25, H193 und Y196 (Surf1c Nomenklatur) in beiden *Paracoccus* Surf1-Varianten einen vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit des Kofaktors zur Folge haben. Beim Design der Mutanten wurde darauf geachtet, dass die Aminosäure-Austausche strikt konservativ sind und dem Protein nur die Möglichkeit zur Ausbildung potentieller Wasserstoffbrücken genommen wird, vermutlich ohne dabei die Gesamtstruktur zu beeinträchtigen. Trotzdem verlieren die mutierten Proteine die Fähigkeit die Häm-Gruppe unter *in vivo* Bedingungen zu binden. Für das konservierte Tyrosin in Transmembranhelix II (Surf1c Y196) ist beim Menschen eine Punktmutation (Y274D) beschrieben, die zum Leigh-Syndrom führt [139]. Hierbei ist zu vermuten, dass das Einführen einer negativen Ladung innerhalb des Transmembranbereiches eine Bindung von Häm *a* vollkommen unmöglich macht, was die Rolle des Surf1-Proteins bei der Reifung der Cytochrom *c* Oxidase nachhaltig stören würde. Bisher wurden zwei unabhängige Studien zur Nachahmung dieser klinisch bedeutsamen Mutation am Hefe-Homolog Shy1p vorgelegt [140, 141]. Es zeigte sich, dass die entsprechenden Shy1p Y344D exprimierenden Zellen keine Beeinträchtigung in ihrem Wachstum auf nicht-fermentierbarem Medium aufweisen [140]. Das mutierte Protein ist stabil und wird nicht aufgrund von Fehlfaltung vorzeitig abgebaut, allerdings wird die COX-Biogenese auf Ebene eines 200 kDa-Assemblierungsintermediates gestoppt und kann nicht weiter ablaufen [141]. Auch der angesprochene Histidin-Rest wurde im Hefe-Homolog Shy1p (H341) untersucht und es konnten nur leichte Beeinträchtigungen beim Wachstum auf nicht-fermentierbarem Medium festgestellt werden [140]. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Mutation der innerhalb des Transmembranbereiches konservierten Reste die Bindungseigenschaften für den Häm *a* Kofaktor nachhaltig stören, was die physiologische Bedeutung dieser Proteineigenschaft unterstreicht. Ob allerdings eukaryontische Surf1-Homologe ebenfalls Häm *a* binden können, ist derzeit nicht bekannt. Der hohe Grad an Sequenzkonservierung von Surf1-Proteinen zwischen Pro- und Eukaryonten macht dies allerdings sehr wahrscheinlich.

Ein Sonderstellung unter den charakterisierten Mutanten nimmt der Tryptophan-Rest in TMH II ein (W200 in Surf1c und W209 in Surf1q). Eine Mutation dieses Restes zu Phenylalanin reduziert insgesamt die Häm-Bindungseigenschaft des Proteins und hat darüber hinaus eine verstärkte Bindung von Häm *o* zur Folge. Häm *o* ist das Zwischenprodukt im Biosyntheseweg von Häm *a* und unterscheidet sich von diesem nur durch Anwesenheit einer Methyl- statt einer Formyl-Gruppe in Ring A des Häm-Porphyringerüsts. Dass eine Mutation von W200 in Surf1c bzw. W209 in Surf1q eine gesteigerte Bindung von Häm *o* bedingt, kann als Hinweis gewertet werden, dass dieser Rest an der Erkennung der Formyl-Gruppe des Häm *a* beteiligt ist und damit die Unterscheidung beider Häm-Typen ermöglicht. Dieser Rest erfüllt somit eine Art „Torwächter“-Funktion, da er für die spezifische Erkennung des richtigen Häm-Typs wichtig ist und auf diese Weise dafür Sorge trägt, dass ausschließlich der physiologisch bedeutsame Häm-Typ (Häm *a*) an die Oxidase weitergegeben wird. Ob die Interaktion des Tryptophan-Restes mit der Formyl-Gruppe direkt oder über Wasser vermittelt indirekt stattfindet, kann hier nicht abschließend erörtert werden und muss zukünftig durch weitere experimentelle Daten geklärt werden.

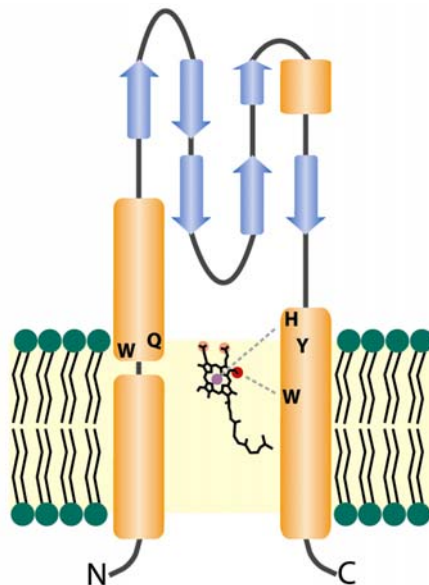


Abb. 4.4: Schematisches Model der Häm *a*-Bindung an Surf1

Die in dieser Arbeit näher charakterisierten Aminosäure-Reste in den Transmembranhelix-Bereichen sind im Einbuchstaben-Code angegeben. Die Sekundärstrukturelemente sind nach Vorhersagen des Programms SABLE zugeordnet [96]. Das Eisen-Zentralatom (magentafarbene Kugel) ist durch ein Histidin koordiniert, die Bindung der Formyl-Gruppe (rote Kugel) wird durch ein Tryptophan vermittelt. Die Orientierung der Häm-Gruppe innerhalb der Membran-Doppelschicht erlaubt somit eine optimale Inkorporation in Oxidase Untereinheit I.

In Abbildung 4.4 sind die gewonnenen Erkenntnisse in einem Bindungsmodell schematisch zusammengefasst. Der Häm *a*-Kofaktor ist hierbei wie in der Cytochrom *c* Oxidase auch zu ca. einem Drittel in der Membran-Doppelschicht verborgen. Der konservierte Histidin-Rest (H193) der TMH II ist als axialer Ligand für die Koordinierung des Eisen-Zentralatoms zuständig, während W200 die Formyl-Gruppe am Porphyrinring A erkennt. Eine solche Anordnung würde den Kofaktor so innerhalb der Membran positionieren, dass er für eine spätere Inkorporation in die Untereinheit I der Oxidase zur Verfügung steht.

Eine Beteiligung weiterer Aminosäure-Reste an der Bindung der Häm *a*-Gruppe kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Da Häm *a*, im Gegensatz zu anderen Häm-Typen wie *b* und *c*, nur in terminalen Oxidasen zu finden ist, sind durch Strukturdaten untermauerte Bindungsmodi für diesen Kofaktor sehr begrenzt. In der Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus* ist die Formyl-Gruppe des Häm *a*₃ beispielsweise über ein Arginin gebunden, die Propionate über einen Arginin- und einen Tryptophan-Rest [35]. Eine systematische Analyse der Bindungscharakteristika von Häm-Kofaktoren (überwiegend vom *b* und *c*-Typ) an ihr umgebendes Proteingerüst hebt neben Histidinen und Methioninen als axiale Liganden die Bedeutung der aromatischen Aminosäure-Reste Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan hervor. Die aromatischen Reste stabilisieren die Häm-Gruppe hierbei durch elektrostatische Wechselwirkungen (π -stacking) [138, 142]. Die Propionate von Häm-Gruppen werden überwiegend, so auch im Falle der Cytochrom *c* Oxidase, über Arginine (oft auch Lysine) gebunden. Ein konserviertes Arginin findet sich im Falle der Surf1-Proteine in der periplasmatischen *loop*-Region zwischen den beiden Transmembranhelices. Ob dieser Arginin-Rest ebenfalls durch Wechselwirkung mit den Propionat-Seitengruppen zur Bindung der Häm-Gruppe beiträgt, bleibt rein spekulativ. Da für Surf1 im Sinne einer Biogenese-Funktion für die Cytochrom *c* Oxidase eine transiente Bindung des Kofaktors postuliert werden muss, müssen sowohl die apo- als auch die holo-Form des Proteins stabile Faltungsstrukturen aufweisen, um proteolytischen Abbau aufgrund ungefalteter Proteinbereiche zu vermeiden. Eine stabile Faltung für apo- und holo-Form wird für viele Häm-Proteine beobachtet, die den Kofaktor nur transient binden und an andere Proteine weitergeben [138]. Ein weiterer Hinweis auf die transiente Natur der Kofaktor-Bindung an Surf1 ist die Koordinierung des Eisen-Zentralatoms mit nur fünf Liganden, wie aus Ligandenbindungsspektren mit Kohlenmonoxid hervorgeht.

Sequenzvergleiche ergeben nur einen einzigen konservierten Histidin-Rest (H193 Surf1c Nomenklatur), der wie bereits erwähnt der einzige ligandierende Aminosäurerest zu sein scheint [100].

Die in dieser Arbeit vorgelegte Mutationsstudie zweier bakterieller Surf1-Homologe hebt die physiologische Bedeutung der Bindung eines *a*-Typ Häms an das Protein hervor. Die Rolle eines konservierten Tryptophans in TMH II als diskriminierender Faktor zwischen den verschiedenen Häm-Typen (*o* und *a*) erhärtet die These, dass Surf1 direkt an der Insertion der Häm-Gruppen in die Cytochrom *c* Oxidase beteiligt ist.

4.5 Häm-Einbau in die *Paracoccus* Cytochrom *c* Oxidase

Ein zentraler Schritt in der frühen Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase ist der Einbau der beiden Häm *a*-Gruppen in UE I. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Prozess an einem *Paracoccus denitrificans surf1c*-Deletionsstamm (FA3) näher betrachtet.

Wie bereits diskutiert, scheint die Aktivität der Häm *a* Synthase in *Paracoccus* auf Ebene des Vorläufermoleküls Häm *b* reguliert zu sein, so dass Synthese von Häm *a* und dessen Abgabe an die Oxidase gekoppelt sind. Für Hefe konnte gezeigt werden, dass der Häm *a*-Biosyntheseweg in der Tat streng reguliert ist. Hierbei stellte sich sogar heraus, dass das Gen für die Häm *a* Synthase (Cox15 im eukaryontischen Fall) durch einen Häm *b* kontrollierten Transkriptionsfaktor positiv beeinflusst wird [82]. Inwiefern die Transkription des *ctaA*-Gens in *Paracoccus* ebenfalls Häm-gesteuert ist, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht, aber die Charakterisierung von CtaA aus unterschiedlichen Deletionsstämmen (vgl. Abschnitt 3.4) legt nahe, dass die Synthese des Kofaktors an die Verfügbarkeit eines Abnehmers in Form terminaler Oxidasen gekoppelt ist. Dies könnte auch erklären, warum die Surf1-Proteine nach Reinigung aus einem Deletionsstamm für beide Häm *a*-enthaltenden terminalen Oxidasen (TSP24: Δba_3 - und Δaa_3 -Oxidase) einen reduzierten Häm-Gehalt im Vergleich zu Reinigungen aus Oxidase-Wildtyp Stämmen aufweisen [100]:

Tabelle 4.1: Häm-Gehalt von Surf1 nach Expression in verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen^a

Stamm	anwesende Oxidase	exprimiertes Surf1	Häm <i>a</i> : Surf1 ^b
FA3-61	<i>aa</i> ₃ und <i>ba</i> ₃	Surf1c	0,47
FA3-62	<i>aa</i> ₃ und <i>ba</i> ₃	Surf1q	0,77
TSP24-61	Δ <i>aa</i> ₃ und Δ <i>ba</i> ₃	Surf1c	0,14
TSP24-62	Δ <i>aa</i> ₃ und Δ <i>ba</i> ₃	Surf1q	0,10

^a die Tabelle wurde in modifizierter Form Referenz [100] entnommen.

^b der Häm : Surf1-Gehalt wurde aus Pyridin-Hämochromspektren bestimmt.

Der Oxidase-Phänotyp nach Deletion des *surf1*-Gens wurde bisher an *R. sphaeroides* und *P. denitrificans* näher untersucht [91, 92, 100]. In beiden Fällen ist der Häm *a*-Gehalt der erhaltenen Oxidase deutlich reduziert, insbesondere das Häm *a*₃. Surf1 scheint folglich direkt an der Inkorporation der Häm *a*-Gruppen in die Oxidase beteiligt zu sein.

Für Hefe ist gezeigt worden, dass die Häm *o* Synthase (Cox10) in einem Deletionsstamm für das Hefe *surf1*-Homolog *shy1* als schwacher Supressor wirkt und die Oxidase-Biogenese folglich teilweise wieder herstellen kann [143, 144]. Ein erster Schritt in der Analyse des durch Deletion von *surf1c* bedingten Oxidase-Phänotyps in *Paracoccus* war deshalb die verstärkte Expression von *ctaA* in einem Δ *surf1c*-Stamm. Die Idee war, dass eine verstärkte Bildung von Häm *a* den durch Verlust von *surf1c* bedingten Oxidase-Phänotyp reversieren kann. Dies konnte auch durch Messung der Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität in Membranen bestätigt werden, indem ein vergleichbar kompensierender Effekt in Δ *surf1c*-Zellen nach Komplementation mit *surf1c* und *ctaA* gemessen werden konnte (vgl. Abschnitt 3.7.1).

In einem nächsten Schritt wurde versucht, diesen kompensierenden Effekt auch auf Ebene aufgereinigter Oxidase nachzuvollziehen. Überraschenderweise ergab sich aber, dass die Oxidase immer noch im selben Maße geringere Häm-Level und Aktivitäten wie nach Präparation aus dem Δ *surf1c*-Stamm aufwies. Eine Komplementation von Δ *surf1c*-Zellen mit *ctaA* reversiert den Oxidase-Phänotyp folglich nur insofern, als dass insgesamt mehr Oxidase gebildet werden kann, die aber auf molekularer Ebene noch genauso gestört ist wie in einem Δ *surf1c*-Stamm.

Auch die Expression der Surf1c Mutante W200F, die verstärkt das Häm *a*-Vorläufermolekül Häm *o* bindet (vgl. Abschnitt 3.6 und 4.4) konnte den $\Delta surf1c$ -Oxidase Phänotyp nicht kompensieren. Dies war nur mit Wildtyp *surf1c* möglich. Es ist wenig überraschend, dass die W200F-Mutante keinen positiven Einfluss auf die Oxidase-Reifung hat, da sie nach Expression in *E. coli* einen falschen Häm-Typ (Häm *o*) bindet, der im homologen Wirtssystem *P. denitrificans* nur in sehr geringen Mengen nachweisbar ist [23] und wie oben diskutiert auf Ebene der Häm *a* Synthese nicht detektierbar ist. Da aber Surf1 die Häm-Gruppe direkt von CtaA übernimmt (vgl. Abschnitt 3.5 und 4.3), verwundert es nicht, dass die W200F-Mutante nicht-funktional ist.

Bei der spektralen Analytik der Oxidase-Präparationen aus dem $\Delta surf1c$ -Stamm FA3 zeigte sich, dass ein zusätzlicher Häm-Typ in der Oxidase vorliegt, der in Redox-Differenzspektren unter nativen Bedingungen nicht nachweisbar und folglich in früheren Untersuchungen nicht beschrieben ist [91, 100]. Erst Pyridin-Redoxspektren zeigten eine zusätzliche spektrale Absorption, die in HPLC-Analysen eindeutig als Häm *b* identifiziert werden konnte. Die Cytochrom *c* Oxidase aus dem $\Delta surf1c$ -Stamm FA3 enthält also zusätzlich zum normalen Häm *a* auch Häm *b*. Die Tatsache, dass dieser unphysiologische Häm-Typ in nativen Redoxspektren nicht nachweisbar ist, zeigt, dass die Koordination in der Häm-Bindungstasche der Oxidase UE I gestört ist. Folglich kann die Häm *b*-tragende Oxidase auch nicht funktionsfähig sein, was sich in verminderter Enzymaktivität auswirkt. Dass unphysiologische Häm-Typen in terminalen Oxidasen die Funktionalität negativ beeinflussen, ist lange bekannt. Beispiele hierfür sind eine *bb*₃-Variante der *E. coli* Ubichinol-Oxidase oder eine *ao*₃-Version der *P. denitrificans* Cytochrom *c* Oxidase [145, 146]. Ob der Häm *b*-Kofaktor hierbei in der *low*- oder *high-spin site* in UE I gebunden wird, konnte nicht geklärt werden. Eine Bestimmung über Liganden-Bindungsspektren mit Kohlenmonoxid oder Cyanid scheidet hierbei aus, da das Häm unter nativen Bedingungen wie bereits diskutiert nicht nachzuweisen ist (siehe auch [91, 100]).

Über die Herkunft des Häm *b*-Moleküls kann nur spekuliert werden. UE I der Oxidase könnte aufgrund ihrer postulierten hohen Affinität gegenüber Häm-Gruppen bei Mangel von Häm *a* unspezifisch Häm *b* aus der zellulären Umgebung binden. Da Häme innerhalb der Zelle aufgrund ihrer Redox-Aktivität vermutlich aber zu jeden Zeitpunkt proteingebunden vorliegen, erscheint diese Erklärung nicht zufrieden stellend, zumal der Ferrochelatase als letztem Enzym innerhalb des Häm *b*-

Biosynthesewegs im Falle von *Paracoccus* und anderen Prokaryonten eine cytoplasmatische Lokalisation vorausgesagt wird. Damit scheint eine Interaktion mit der zu jeden Zeitpunkt membrangebundenen Oxidase UE I mehr als unwahrscheinlich. Auch die Häm-Transportkomponenten des Cytochrom *c*-Biogenese Apparats (CcmABCD) scheinen hierfür ungeeignet, da ihre Aktivität spezifisch auf das Beladen des Häm-Chaperons CcmE ausgerichtet ist. CcmE wiederum bindet Häm *b* an einer seiner Vinyl-Gruppen kovalent über einen konservierten Histidin-Rest und scheidet als Quelle für das Häm *b* in UE I folglich ebenfalls aus. Eine Übersicht über das Cytochrom *c*-Biogenesesystem findet sich in Referenz [147].

Man kann sich allerdings folgendes Szenario vorstellen. Surf1 vermittelt im Normalfall eine koordinierte Interaktion zwischen dem Häm *a*-Biosynthesekomplex aus CtaB und CtaA mit der Oxidase UE I (Abb. 4.5). Surf1 abstrahiert hierbei das Häm *a*-Molekül von der S-Stelle des CtaA-Enzyms und gibt es direkt an UE I weiter. Surf1 wirkt hierbei zum einen als Filter zum Einbau des richtigen Häm-Typs, zum andern erleichtert es die Inkorporation in UE I („Filter“- und „Vermittler“-Funktion). Diese vermittelnde Funktion von Surf1 beim Häm-Einbau in die *Paracoccus* Oxidase wurde bereits von F.A. Bundschuh im Rahmen ihrer Doktorarbeit postuliert [100] und kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit um eine „Filter“-Funktion für Surf1 erweitert werden. Da in CtaA-Präparationen aus *Paracoccus* auch UE I nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass CtaA auch ohne Surf1 mit UE I wechselwirken kann. Allerdings scheint in diesem Fall die Interaktion so gestört zu sein, dass zum einen insgesamt weniger Häm *a* in UE I gelangt, zum anderen aber auch in Gestalt von Häm *b* ein falscher Häm-Typ. Dies ist erklärbar, wenn man sich die Häm-Affinitäten der beteiligten Proteine vergegenwärtigt. Für die Surf-Proteine liegen sie im hohen nanomolaren Bereich, für Protein-Maquettes, die die Oxidase-Struktur nachahmen im niedrigen nanomolaren Bereich [101, 126, 127]. Die Zunahme an Affinität gegenüber Häm *a* erlaubt vermutlich den koordinierten Fluss des Kofaktors an seine Bestimmungsstelle innerhalb der COX UE I. Fehlt die vermittelnde Rolle von Surf1, könnte die UE I folglich aufgrund ihrer hohen Affinität Häm *b* direkt vom Häm *a*-Biosynthese-Komplex CtaB/CtaA beziehen. Dieses Szenario erscheint plausibel, da wie oben diskutiert, die Häm *a*-Biosynthese in *Paracoccus* auf Ebene des Häm *b* reguliert zu sein scheint.

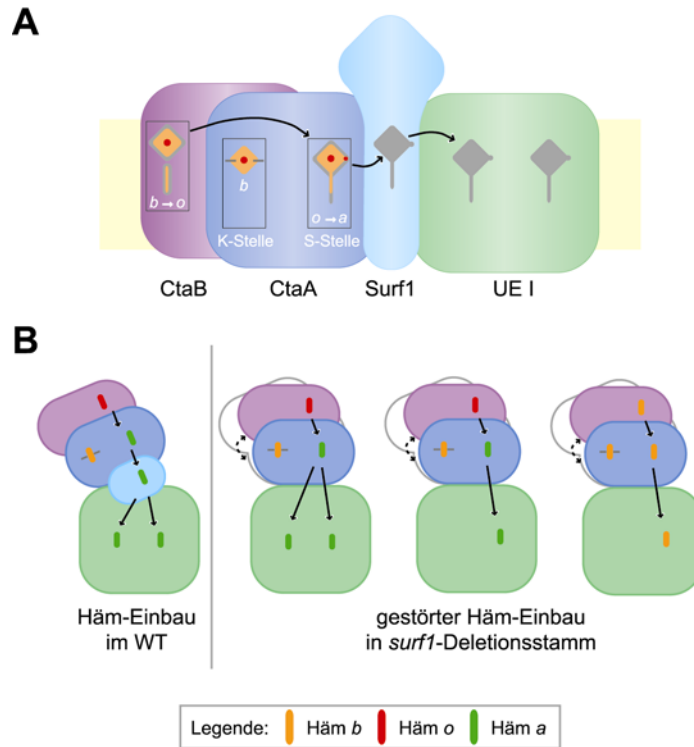


Abb. 4.5: Häm *a*-Einbau in die *Paracoccus* Cytochrom *c* Oxidase

(A) Unter normalen Bedingungen vermittelt Surf1 den koordinierten Fluss von Häm *a* ausgehend von CtaA zu UE I und sorgt als molekularer Filter für die Weitergabe des richtigen Häm-Typs. (B) Aufsicht von oben auf die Vorgänge während des Häm-Einbaus in die Oxidase. In der Wildtyp-Situation kontrolliert Surf1 die Interaktion von CtaB/CtaA mit UE I. Fehlt Surf1, ist diese Interaktion gestört und infolgedessen nicht mehr präzise (gestrichelter Pfeil). So kann funktionsfähige Oxidase nur noch zu ca. 30 % gebildet werden und es ergeben sich Subpopulationen, die kein Häm, nur ein Häm *a* oder Häm *b* enthalten.

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten erhärten sich die für Surf1 postulierten Funktionen [100, 101]:

- (i) Surf1 moduliert die Aktivität von CtaA, indem es Häm *a* aus deren aktivem Zentrum abzieht.
- (ii) Surf1 generiert so einen geschützten, aber dennoch zu jeder Zeit verfügbaren proteingebundenen Häm *a*-Pool.
- (iii) Surf1 vermittelt den Einbau von Häm *a* in die Oxidase UE I

Zusätzlich kann dem Surf1-Protein nun noch eine vierte Funktion innerhalb der bakteriellen Oxidase-Biogenese zugeordnet werden:

- (iv) Surf1 wirkt als molekularer Filter, der dafür Sorge trägt, dass nur das physiologisch bedeutsame Häm *a* an die Oxidase weitergegeben wird.

5 Zusammenfassung

Die Atmungskette ist für aerob lebende Organismen die wichtigste Quelle zur Erzeugung von Energie. Der Cytochrom *c* Oxidase (COX) kommt hierbei als letztem Enzym innerhalb der Elektronentransportkette eine besondere Bedeutung zu. Im mitochondrialen Fall besteht die Oxidase aus bis zu 13 Untereinheiten, deren Assemblierung in einem gerichteten und strikt regulierten Prozess von statten geht. Defekte innerhalb des Assemblierungsprozesses führen zu schweren respiratorischen Defiziten, die die Ursache für neurodegenerative und myopathische Erkrankungen sind. Der Assemblierungsprozess wird bei der Hefe von mehr als 30 verschiedenen Proteinfaktoren begleitet, die sich letztlich nicht als Untereinheiten im COX-Holoenzym finden.

Die Cytochrom *c* Oxidase des Bodenbakteriums *Paracoccus denitrificans* weist nicht nur eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Haupt-Untereinheiten I-III der mitochondrialen Oxidase auf, sondern das Bakterium kodiert ebenfalls für eine Reihe von Assemblierungsfaktoren, die am Einbau der Häm *a*- und Kupfer-Kofaktoren beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die Biogenesefaktoren Häm *a* Synthase (CtaA) und die Surf1-Proteine (Surf1c und Surf1q), deren biochemische Charakterisierung das vorrangige Ziel dieser Arbeit war.

In diesem Sinne wurden für CtaA Expressions- und Aufreinigungsprotokolle entwickelt, die es erlaubten, das Enzym in drei spektroskopisch unterscheidbaren, mit verschiedenen Häm-Typen beladenen Formen zu isolieren.

Mit Hilfe einer Mutationsstudie konnten sowohl für Surf1c als auch für Surf1q an einer Häm *a*-Bindung beteiligte Aminosäurereste identifiziert werden. Hierbei erlaubte insbesondere die Charakterisierung eines konservierten Tryptophanrestes die Entwicklung eines Bindungsmodells von Häm *a* an Surf1.

Die Etablierung eines *in vitro* Häm-Transfer Assays wies zum ersten Mal eine direkte Interaktion zwischen CtaA und Surf1 nach, in deren Verlauf spezifisch Häm *a* von CtaA auf Surf1 übertragen wird.

Expressionsstudien von CtaA in *Paracoccus* zeigten zweifelsfrei, dass die Synthese von Häm *a* auf Ebene des Vorläufermoleküls Häm *b* reguliert ist und eine Synthese

des Kofaktors an eine Abgabe an Untereinheit I im Rahmen der COX-Biogenese gekoppelt ist.

Eine nähere Charakterisierung der durch Deletion von *surf1c* hervorgerufenen Defekte der COX erwies, dass die Oxidase neben einer bereits beschriebenen Reduktion des Häm *a*-Gehalts überraschenderweise auch in Form von Häm *b* einen unphysiologischen Häm-Typ bindet.

Zusammengenommen erhärten die gewonnen Erkenntnisse die These, dass Surf1 direkt an der Inkorporation der Häm *a*-Kofaktoren in die Untereinheit I der Oxidase beteiligt ist. Dabei wirkt das Protein möglicherweise als molekularer Filter, der für den Einbau des physiologisch bedeutsamen Häm-Typs (Häm *a*) verantwortlich ist. Darüber hinaus stabilisiert es als vermittelnder Faktor die Interaktion von CtaA und Untereinheit I und sorgt somit für einen erleichterten und koordinierten Einbau des Häms in die Oxidase.

Die in dieser Arbeit am bakteriellen Modellsystem gewonnen Erkenntnisse sollten aufgrund der hohen Ähnlichkeit sowohl der Cytochrom *c* Oxidase als auch der beteiligten Biogenesefaktoren direkte Rückschlüsse auf die Geschehnisse im humanen System erlauben.

6 Literaturverzeichnis

1. Olson JM (2006) Photosynthesis in the Archean era. *Photosynth Res* **88**, 109-117.
2. Karp G (1996) *Cell and Molecular Biology - Concepts and Experiments (4th edition)* John Wiley & Sons, Inc., West Sussex, UK.
3. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
4. Brandt U (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* **75**, 69-92.
5. Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J & Walker JE (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem* **281**, 32724-32727.
6. Grigorieff N (1998) Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol* **277**, 1033-1046.
7. Efremov RG, Baradaran R & Sazanov LA The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**, 441-445.
8. Hunte C, Zickermann V & Brandt U Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* **329**, 448-451.
9. Sazanov LA & Hinchliffe P (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-1436.
10. Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G & Iwata S (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**, 700-704.
11. Mitchell P (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* **59**, 137-139.
12. Crofts AR (2004) The cytochrome bc₁ complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* **66**, 689-733.
13. Hunte C, Palsdottir H & Trumpower BL (2003) Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc₁ complex. *FEBS Lett* **545**, 39-46.
14. Garcia-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J & Gennis RB (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* **176**, 5587-5600.
15. Devenish RJ, Prescott M & Rodgers AJ (2008) The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**, 1-58.
16. Schagger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 154-159.
17. Fernandez-Vizarra E, Tiranti V & Zeviani M (2009) Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 200-211.

18. Beijerinck M (1910) Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II* **25**, 30–63.
19. Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
20. John P & Whatley FR (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* **254**, 495-498.
21. Cavalier-Smith T (2006) Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. *Proc Biol Sci* **273**, 1943-1952.
22. Baker SC, Ferguson SJ, Ludwig B, Page MD, Richter OM & van Spanning RJ (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1046-1078.
23. de Gier JW, Lubben M, Reijnders WN, Tipker CA, Slotboom DJ, van Spanning RJ, Stouthamer AH & van der Oost J (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol Microbiol* **13**, 183-196.
24. Friedrich CG, Mitrenga G. (1981) Oxidation of thiosulfate by *Paracoccus denitrificans* and other hydrogen bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **10**, 209-212.
25. Harms N & van Spanning RJ (1991) C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*: genetics of *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr* **23**, 187-210.
26. Haddock BA & Jones CW (1977) Bacterial respiration. *Bacteriol Rev* **41**, 47-99.
27. van Verseveld HW & Bosma G (1987) The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Microbiol Sci* **4**, 329-333.
28. Richter OM & Ludwig B (2009) Electron transfer and energy transduction in the terminal part of the respiratory chain - lessons from bacterial model systems. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 626-634.
29. Gorbikova EA, Belevich I, Wikstrom M & Verkhovsky MI (2008) The proton donor for O-O bond scission by cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10733-10737.
30. Gorbikova EA, Wikstrom M & Verkhovsky MI (2008) The protonation state of the cross-linked tyrosine during the catalytic cycle of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **283**, 34907-34912.
31. Pfitzner U, Odenwald A, Ostermann T, Weingard L, Ludwig B & Richter OM (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.
32. Richter OM & Ludwig B (2003) Cytochrome c oxidase - structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **147**, 47-74.
33. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R & Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-1144.

34. Durr KL, Koepke J, Hellwig P, Muller H, Angerer H, Peng G, Olkhova E, Richter OM, Ludwig B & Michel H (2008) A D-pathway mutation decouples the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase by altering the side-chain orientation of a distant conserved glutamate. *J Mol Biol* **384**, 865-877.
35. Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B & Michel H (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669.
36. Malmstrom BG & Aasa R (1993) The nature of the CuA center in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* **325**, 49-52.
37. Bratton MR, Pressler MA & Hosler JP (1999) Suicide inactivation of cytochrome c oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site. *Biochemistry* **38**, 16236-16245.
38. Witt H & Ludwig B (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.
39. Schmidt O, Pfanner N & Meisinger C Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 655-667.
40. Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D & Van den Bogert C (1998) Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem* **254**, 389-394.
41. Schagger H (2001) Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* **52**, 119-128.
42. Greiner P (2009) *CtaG- Kupferchaperon und Assemblierungsfaktor für die Biogenese der Cytochrom c Oxidase* Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
43. Greiner P, Hannappel A, Werner C & Ludwig B (2008) Biogenesis of cytochrome c oxidase -- in vitro approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1777**, 904-911.
44. Zee JM & Glerum DM (2006) Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochem Cell Biol* **84**, 859-869.
45. Naithani S, Saracco SA, Butler CA & Fox TD (2003) Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 324-333.
46. Kuhn A, Stuart R, Henry R & Dalbey RE (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol* **13**, 510-516.
47. Carr HS & Winge DR (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res* **36**, 309-316.
48. Mogi T, Saiki K & Anraku Y (1994) Biosynthesis and functional role of haem O and haem A. *Mol Microbiol* **14**, 391-398.
49. Barros MH, Carlson CG, Glerum DM & Tzagoloff A (2001) Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett* **492**, 133-138.

50. Barros MH, Nobrega FG & Tzagoloff A (2002) Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 9997-10002.
51. Hiser L, Di Valentin M, Hamer AG & Hosler JP (2000) Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **275**, 619-623.
52. Banting GS & Glerum DM (2006) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p. *Eukaryot Cell* **5**, 568-578.
53. Carr HS, George GN & Winge DR (2002) Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem* **277**, 31237-31242.
54. Thompson AK, Smith D, Gray J, Carr HS, Liu A, Winge DR & Hosler JP Mutagenic analysis of Cox11 of *Rhodobacter sphaeroides*: insights into the assembly of Cu(B) of cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **49**, 5651-5661.
55. Carr HS, Maxfield AB, Horng YC & Winge DR (2005) Functional analysis of the domains in Cox11. *J Biol Chem* **280**, 22664-22669.
56. Beers J, Glerum DM & Tzagoloff A (1997) Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem* **272**, 33191-33196.
57. Horng YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS & Winge DR (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* **279**, 35334-35340.
58. Hell K, Tzagoloff A, Neupert W & Stuart RA (2000) Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J Biol Chem* **275**, 4571-4578.
59. Lode A, Kuschel M, Paret C & Rodel G (2000) Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p. *FEBS Lett* **485**, 19-24.
60. Leary SC, Sasarman F, Nishimura T & Shoubridge EA (2009) Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum Mol Genet* **18**, 2230-2240.
61. Schon EA (2000) Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci* **25**, 555-560.
62. Robinson BH (2000) Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr Res* **48**, 581-585.
63. Shoubridge EA (2001) Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* **106**, 46-52.
64. Diaz F Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 100-110.
65. Leigh D (1951) Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **14**, 216-221.
66. Van Coster R, Lombres A, De Vivo DC, Chi TL, Dodson WE, Rothman S, Orrechio EJ, Grover W, Berry GT, Schwartz JF & et al. (1991) Cytochrome c

- oxidase-associated Leigh syndrome: phenotypic features and pathogenetic speculations. *J Neurol Sci* **104**, 97-111.
67. Dahl HH (1998) Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* **63**, 1594-1597.
68. DiMauro S & De Vivo DC (1996) Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Ann Neurol* **40**, 5-7.
69. Lombes A, Nakase H, Tritschler HJ, Kadenbach B, Bonilla E, DeVivo DC, Schon EA & DiMauro S (1991) Biochemical and molecular analysis of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. *Neurology* **41**, 491-498.
70. Tiranti V, Hoertnagel K, Carozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez JA, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T & Zeviani M (1998) Mutations of *SURF-1* in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* **63**, 1609-1621.
71. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM & Shoubridge EA (1998) *SURF1*, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* **20**, 337-343.
72. Bugiani M, Tiranti V, Farina L, Uziel G & Zeviani M (2005) Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet* **42**, e28.
73. Oquendo CE, Antonicka H, Shoubridge EA, Reardon W & Brown GK (2004) Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet* **41**, 540-544.
74. Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, Seeger J, Schrank B, Kolesar JE, Lochmuller H, Chevrette M, Kaufman BA, Horvath R & Shoubridge EA (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet* **41**, 833-837.
75. Brown BM, Wang Z, Brown KR, Cricco JA & Hegg EL (2004) Heme O synthase and heme A synthase from *Bacillus subtilis* and *Rhodobacter sphaeroides* interact in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**, 13541-13548.
76. Brown KR, Allan BM, Do P & Hegg EL (2002) Identification of novel hemes generated by heme A synthase: evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry* **41**, 10906-10913.
77. Brown KR, Brown BM, Hoagland E, Mayne CL & Hegg EL (2004) Heme A synthase does not incorporate molecular oxygen into the formyl group of heme A. *Biochemistry* **43**, 8616-8624.
78. Svensson B, Andersson KK & Hederstedt L (1996) Low-spin heme A in the heme A biosynthetic protein CtaA from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **238**, 287-295.
79. Hederstedt L, Lewin A & Throne-Holst M (2005) Heme A synthase enzyme functions dissected by mutagenesis of *Bacillus subtilis* CtaA. *J Bacteriol* **187**, 8361-8369.

80. Mogi T (2009) Probing structure of heme A synthase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis. *J Biochem* **145**, 625-633.
81. Lewin A & Hederstedt L (2006) Compact archaeal variant of heme A synthase. *FEBS Lett* **580**, 5351-5356.
82. Wang Z, Wang Y & Hegg EL (2009) Regulation of the heme A biosynthetic pathway: differential regulation of heme A synthase and heme O synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**, 839-847.
83. Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J & Houstek J (2004) Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res* **53 Suppl 1**, S213-223.
84. Duhig T, Ruhrberg C, Mor O & Fried M (1998) The human Surfeit locus. *Genomics* **52**, 72-78.
85. Poyau A, Buchet K & Godinot C (1999) Sequence conservation from human to prokaryotes of *Surf1*, a protein involved in cytochrome c oxidase assembly, deficient in Leigh syndrome. *FEBS Lett* **462**, 416-420.
86. Stiburek L, Vesela K, Hansikova H, Pecina P, Tesarova M, Cerna L, Houstek J & Zeman J (2005) Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem J* **392**, 625-632.
87. Tiranti V, Jaksch M, Hofmann S, Galimberti C, Hoertnagel K, Lulli L, Freisinger P, Bindoff L, Gerbitz KD, Comi GP, Uziel G, Zeviani M & Meitinger T (1999) Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* **46**, 161-166.
88. Williams SL, Valnot I, Rustin P & Taanman JW (2004) Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem* **279**, 7462-7469.
89. Yao J & Shoubridge EA (1999) Expression and functional analysis of *SURF1* in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* **8**, 2541-2549.
90. Mick DU, Wagner K, van der Laan M, Frazier AE, Perschil I, Pawlas M, Meyer HE, Warscheid B & Rehling P (2007) Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* **26**, 4347-4358.
91. Bundschuh FA, Hoffmeier K & Ludwig B (2008) Two variants of the assembly factor Surf1 target specific terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1336-1343.
92. Smith D, Gray J, Mitchell L, Antholine WE & Hosler JP (2005) Assembly of cytochrome-c oxidase in the absence of assembly protein Surf1p leads to loss of the active site heme. *J Biol Chem* **280**, 17652-17656.
93. Khalimonchuk O, Bestwick M, Meunier B, Watts TC & Winge DR (2004) Formation of the redox cofactor centers during Cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase. *Mol Cell Biol* **30**, 1004-1017.
94. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.

95. Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
96. Adamczak R, Porollo A & Meller J (2005) Combining prediction of secondary structure and solvent accessibility in proteins. *Proteins* **59**, 467-475.
97. Krogh A, Larsson B, von Heijne G & Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
98. Humphrey W, Dalke A & Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-38, 27-38.
99. Arslan E, Schulz H, Zufferey R, Kunzler P & Thony-Meyer L (1998) Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 744-747.
100. Bundschuh FA (2009) *Untersuchung zur Funktion des Oxidase-Biogenesefaktors Surf1 aus Paracoccus denitrificans* Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
101. Bundschuh FA, Hannappel A, Anderka O & Ludwig B (2009) Surf1, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis. *J Biol Chem* **284**, 25735-25741.
102. Steinrücke P, Gerhus E & Ludwig B (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.
103. Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
104. Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
105. Hanahan D & Meselson M (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**, 333-342.
106. Hedges RW & Jacob AE (1974) Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol Gen Genet* **132**, 31-40.
107. Miroux B & Walker JE (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**, 289-298.
108. DeVries GE, Harms N, Hoogendijk J & Stouthamer AH (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.
109. Steinrücke P (1991) *Molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen einer prokaryontischen Cytochrom c Oxidase am Beispiel des Bodenbakteriums Paracoccus denitrificans* Medizinische Universität Lübeck, Lübeck.
110. Sambrook J, Russell, D. (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

111. Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-234.
112. Ludwig B (1986) Cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Methods Enzymol* **126**, 153-159.
113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
114. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL & Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**, 206-210.
115. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
116. Delepelaire P & Chua NH (1979) Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4 degrees C: Characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 111-115.
117. Thomas PE, Ryan D & Levin W (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **75**, 168-176.
118. Weinstein JD & Beale SI (1983) Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **258**, 6799-6807.
119. Ludwig B & Schatz G (1980) A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa₃) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 196-200.
120. Williams JN, Jr. (1964) A Method for the Simultaneous Quantitative Estimation of Cytochromes a, B, C1, and C in Mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **107**, 537-543.
121. Puustinen A, Finel M, Haltia T, Gennis RB & Wikstrom M (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**, 3936-3942.
122. von Heijne G (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**, 487-494.
123. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM & Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* **36**, W465-469.
124. Bhairi SM (1997) *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry* Calbiochem-Novabiochem Corporation.
125. Schröter T (2000) *Charakterisierung der ba₃ Chinoloxidase aus Paracoccus denitrificans* Johann-Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.
126. Gibney BR, Isogai Y, Rabanal F, Reddy KS, Grosset AM, Moser CC & Dutton PL (2000) Self-assembly of heme A and heme B in a designed four-helix bundle: implications for a cytochrome c oxidase maquette. *Biochemistry* **39**, 11041-11049.
127. Zhuang J, Reddi AR, Wang Z, Khodaverdian B, Hegg EL & Gibney BR (2006) Evaluating the roles of the heme a side chains in cytochrome c oxidase using designed heme proteins. *Biochemistry* **45**, 12530-12538.

128. Thony-Meyer L (2002) Cytochrome c maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans* **30**, 633-638.
129. Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R & Lill R Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11775-11780.
130. Stenberg F, von Heijne G & Daley DO (2007) Assembly of the cytochrome *bo*₃ complex. *J Mol Biol* **371**, 765-773.
131. Hiser L & Hosler JP (2001) Heme A is not essential for assembly of the subunits of cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem* **276**, 45403-45407.
132. Bratton MR, Hiser L, Antholine WE, Hoganson C & Hosler JP (2000) Identification of the structural subunits required for formation of the metal centers in subunit I of cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **39**, 12989-12995.
133. Haltia T, Finel M, Harms N, Nakari T, Raitio M, Wikstrom M & Saraste M (1989) Deletion of the gene for subunit III leads to defective assembly of bacterial cytochrome oxidase. *EMBO J* **8**, 3571-3579.
134. Alles M (2009) *Einfluss der Sco-Homologe auf die Biogenese der Cytochrom c Oxidase Untereinheit II in Paracoccus denitrificans* Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
135. Svensson B, Lubben M & Hederstedt L (1993) *Bacillus subtilis* CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis. *Mol Microbiol* **10**, 193-201.
136. Barrientos A, Gouget K, Horn D, Soto IC & Fontanesi F (2009) Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 97-107.
137. Stiburek L, Vesela K, Hansikova H, Hulkova H & Zeman J (2009) Loss of function of Sco1 and its interaction with cytochrome *c* oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1218-1226.
138. Smith LJ, Kahraman A & Thornton JM Heme proteins--diversity in structural characteristics, function, and folding. *Proteins* **78**, 2349-2368.
139. Teraoka M, Yokoyama Y, Ninomiya S, Inoue C, Yamashita S & Seino Y (1999) Two novel mutations of SURF1 in Leigh syndrome with cytochrome *c* oxidase deficiency. *Hum Genet* **105**, 560-563.
140. Bestwick M, Jeong MY, Khalimonchuk O, Kim H & Winge DR Analysis of Leigh syndrome mutations in the yeast SURF1 homolog reveals a new member of the cytochrome oxidase assembly factor family. *Mol Cell Biol* **30**, 4480-4491.
141. Reinhold R, Bareth B, Balleininger M, Wissel M, Rehling P & Mick DU Mimicking a SURF1 allele reveals uncoupling of cytochrome *c* oxidase assembly from translational regulation in yeast. *Hum Mol Genet*.
142. Reedy CJ & Gibney BR (2004) Heme protein assemblies. *Chem Rev* **104**, 617-649.

143. Bestwick M, Khalimonchuk O, Pierrel F & Winge DR The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. *Mol Cell Biol* **30**, 172-185.
144. Pierrel F, Bestwick ML, Cobine PA, Khalimonchuk O, Cricco JA & Winge DR (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J* **26**, 4335-4346.
145. Kannt A, Pfitzner U, Ruitenbergh M, Hellwig P, Ludwig B, Mantele W, Fendler K & Michel H (1999) Mutation of Arg-54 strongly influences heme composition and rate and directionality of electron transfer in *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem* **274**, 37974-37981.
146. Saiki K, Mogi T, Hori H, Tsubaki M & Anraku Y (1993) Identification of the functional domains in heme O synthase. Site-directed mutagenesis studies on the *cyoE* gene of the cytochrome *bo* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**, 26927-26934.
147. Sanders C, Turkarlan S, Lee DW & Daldal F Cytochrome *c* biogenesis: the Ccm system. *Trends Microbiol* **18**, 266-274.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAP	Protein A/Alkalische-Phosphatase-Konjugat
ADP	Adenosin-Diphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
COX	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
DEAE	Diethylaminoethyl-
DL	Durchlauf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD/FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid

Anhang

G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
Gm	Gentamycin
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMAC	<i>immobilised metal ion affinity chromatography</i>
IMS	Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ISP	Rieske Eisen-Schwefel Protein
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani-Medium
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
mV	Millivolt
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

Anhang

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNK	Polynukleotid-Kinase
Q/QH ₂	Ubichinon/Ubichinol
RBS	Ribosomen-Bindestelle
Rif	Rifampicin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Spc	Spectinomycin
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
TMBZ	3-3'-5-5'-Tetramethylbenzidin
TMH	Transmembranhelix
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Trypton-Yeast-Extrakt
U	Unit
UE	Untereinheit
UZ	Ultrazentrifuge

Verwendete Sequenzen

In den COX-Reifungsplasmiden wurden folgende Sequenzen verwendet:

ctaB: Pden_4320

ctaA: Pden_3699

surfIc: Pden_4316

ctaG: Pden_4318

frdx: Pden_4027

CtaA-Aminosäuresequenz:

(MASMTGGQQMGRGS)MSRPIEKEADMARRPVFQEVTETTPPGTTPSGGMID
AGHKGARGAIRLWLVVLFVMVAAMIALGGATRLTGSGLSITWKPVTGAIP
PMDAATWQAEFDKYRQIPQFELVNSDMDLASFKRIYWWEWSHRLLGRLVG
LVWAAGFVFFLATRRIPTGWTPRLLLLGALGGAQGAIGWWMVHSGLSGEM
VRVASYRLATHLGLAFAILGLIAWYVLALSSEAALLRARRAGEAKLFSMTT
GLMHAFVQILLGALVAGIDAGRMYTGWPTMGGEWIPAEIWDATLGWRNF
FENPALVQFIHRMTGYLLAVFAVVVFLRARRSPHPVTRGAYVAMLVALAVQ
VALGIMNVLHASPLPLALAHQIGAVLFTLILRARHHARYPYETSVRGTVRG
PGPGENLYFQGHHHHHH

in Klammern: *t7-tag*; grau: Glycin-Prolin-Linker; kursiv: TEV-Protease Schnittstelle;
unterstrichen: Hexahistidin *tag*

Publikationen

Hannappel, A., Bundschuh, F. A., and Ludwig, B., *Characterization of heme binding properties of Paracoccus denitrificans Surf1 proteins*, FEBS Journal, 2011. **278**: p. 1769-1778

Hannappel, A., Bundschuh, F. A., Greiner, P., Alles, M., Werner, C., Richter, OM., and Ludwig, B., *Bacterial model systems for cytochrome c oxidase biogenesis*, Indian Journal of Chemistry, 2011. **50A**: p. 374-382

Bundschuh, F. A., Hannappel, A., Anderka, O., and Ludwig, B., *Surf1, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis*, J Biol Chem, 2009. **284**: p. 25725-25741

Greiner, P., Hannappel, A., Werner, C., and Ludwig, B., *Biogenesis of cytochrome c oxidase -- in vitro approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics, 2008. **1777**: p. 904-911.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Achim Hannappel
Geburtstag und -ort	15.09.1981, Diez
Wohnort:	Nieder Kirchweg 7 65934 Frankfurt am Main



Berufserfahrung

06.2007 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Goethe-Universität, Frankfurt am Main Institut für Biochemie, Molekulare Genetik
-----------------	---

Ausbildung

06.2007 – heute	Promotionsstudium in Biochemie Goethe-Universität, Frankfurt am Main bei Prof. Dr. Bernd Ludwig Thema: Biogenese einer bakteriellen Cytochrom <i>c</i> Oxidase
05.2007	Diplomarbeit in Biochemie, Note: sehr gut mit Auszeichnung Goethe-Universität, Frankfurt am Main bei Prof. Dr. Bernd Ludwig Institut für Biochemie, Molekulare Genetik Titel: Biogenesis of <i>Paracoccus denitrificans</i> Cytochrome <i>c</i> Oxidase: A Cell-free Expression Approach
08.2004-05.2007	Studium der Biochemie im Hauptstudium (Diplom)

Anhang

	Goethe-Universität, Frankfurt am Main
03.2006-06.2006	Forschungspraktikum University of Edinburgh, Schottland/Großbritannien School of Biological Sciences, Institute of Structural and Molecular Biology, bei Prof. Dr. Graeme Reid
08.2005	Praktikum im Bereich Toxikologie Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz Institut für Rechtsmedizin
04.2002-07.2004	Studium der Biochemie im Grundstudium (Vordiplom) Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
1992-2001	Mons-Tabor-Gymnasium, Montabaur (Abitur, Note: 1,1)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Achim Hannappel, geboren am 15.09.1981, die hier vorgelegte Dissertation „Biochemische Charakterisierung der Cytochrom *c* Oxidase Biogenesefaktoren CtaA und Surf1“ selbständig und nur unter zu Hilfenahme der hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht und weder diese noch eine andere Arbeit vorgelegt.

Frankfurt am Main

Achim Hannappel

Danksagung

Die Anfertigung dieser Arbeit war nur dank zahlreicher Unterstützung vieler Seiten möglich.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können, seine stete Bereitschaft zur Diskussion und sein nicht selbstverständliches Engagement während der Betreuung meiner Promotion.

Prof. Dr. Andreas Reichert danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Heinrich Heide möchte ich für die massenspektrometrische Bestimmung von Gelbanden danken.

Werner Müller und Andrea Herrmann danke ich für ihre vielgestaltige Hilfe durch die Jahre hindurch sowie die vielen unzähligen Schwätzpausen, die das Arbeiten mit ihnen einfach unbezahlbar gemacht haben.

Allen meinen Praktikanten möchte ich für den großen Enthusiasmus und ihren Einsatz in den von mir betreuten Projekten Dank sagen. Es war zwar oft anstrengend, aber ich möchte die mit ihnen gemachten Erfahrungen nicht missen.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Peter Greiner und Dr. Carolin Werner für eine schöne gemeinsame Zeit im Labor 1.22, Dr. Thomas Kleinschroth und Michela Castellani für heitere Zeiten innerhalb und außerhalb des Labors, Dr. Oliver Richter und Edith Ruthenberg für das Übernehmen vieler unangenehmer organisatorischer Aufgaben innerhalb des Arbeitskreises.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Molekulare Genetik für eine gute Arbeitsatmosphäre trotz mancher Schwierigkeiten.

Ich danke meiner Familie, die mir durch all die Jahre ein fester Halt gewesen ist und auf die ich mich in allen Lebenslagen verlassen kann.

Mein besonderer Dank gilt Alena, nicht nur für jeden Rat und deine unbeschreibliche Geduld während der Schreibzeit, sondern vor allem für unser gemeinsames Leben und eine tolle Zukunft.