

Cytochrom bc_1

**Eine Studie zum Elektronentransfer der bc_1 -Komplexe
des Bakteriums *Paracoccus denitrificans* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*
mittels elektrochemisch induzierter Differenzspektroskopie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Michaela Ritter
aus Gotha

Frankfurt 2004

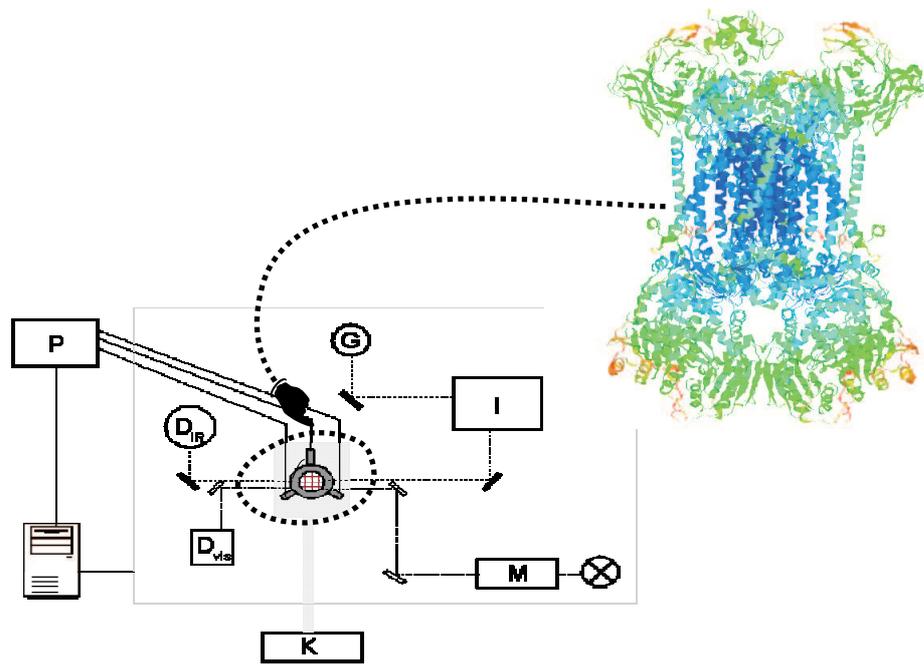
(D F 1)¹

vom Fachbereich Physik der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Horst Schmidt-Böcking

Gutachter: Prof. Dr. Werner Mäntele
Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 26. April 2004



I	INHALTSVERZEICHNIS	i
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	iii
III	TABELLENVERZEICHNIS	vi
IV	ABKÜRZUNGEN	vii
V	BIOCHEMISCHES GLOSSAR	viii
VI	AMINOSÄUREKODIERUNG UND -STRUKTUR	xi
VII	PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	xiii

1 EINLEITUNG	1
1.1 Einführung	1
1.2 Zielstellung der Arbeit	2
2 GRUNDLAGEN	4
2.1 Biologische Grundlagen	4
2.1.1 Die Atmungskette	4
2.1.2 Der Elektronenüberträger Ubichinon	6
2.1.3 Struktur des bc_1 -Komplexes	7
2.1.3.1 Der bc_1 -Komplex aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	7
2.1.3.2 Der bc_1 -Komplex aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.1.4 Funktion des bc_1 -Komplexes	15
2.1.4.1 Der Q-Zyklus	15
2.1.4.2 Hemmung der katalytischen Funktion durch Inhibitoren	18
2.1.5 Verwandte Proteine	20
2.1.5.1 Der b_6f -Komplex	20
2.2 Elektrochemie	22
2.3 Spektroskopie	25
2.3.1 UV/VIS - Spektroskopie	25
2.3.2 Infrarotspektroskopie	26
2.3.3 FTIR-Spektroskopie	28
2.3.4 Differenzspektroskopie	30
2.3.5 Spektroskopie an Biomolekülen	31
3 MATERIAL & METHODEN	40
3.1 Elektrochemie	40
3.1.1 Die elektrochemische Dünnschichtzelle	40
3.1.2 Modifizierung der Arbeitselektrode	41
3.1.3 Mediatoren	42
3.1.4 Die Referenzelektrode	44
3.2 Aufbau der Meßapparatur	45
3.3 Probenvorbereitung	46
3.3.1 Proteinreinigung	46
3.3.1.1 Der bc_1 -Komplex aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	46
3.3.1.2 Der bc_1 -Komplex aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
3.3.2 Vorbereitung der Proben	48

3.4 Aufnahme der Spektren	50
4 ERGEBNISSE & DISKUSSION	52
4.1 Spektren des <i>bc</i>₁-Komplexes aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	52
4.1.1 Elektrochemisch induzierte UV/VIS-Differenzspektren	52
4.1.1.1 Potentialtitrationen	54
4.1.1.2 Separation der Kofaktoren	60
4.1.2 Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren	63
4.1.2.1 Vorversuche	63
4.1.2.2 FTIR-Differenzspektren des Wildtyps	64
4.1.2.3 Trennung der Beiträge der Kofaktoren des Komplexes durch selektive Potentialschritte	74
4.1.2.4 Spektren der wasserlöslichen Fragmente des Rieske-Proteins und der Cytochrom <i>c</i> ₁ -Untereinheit	96
4.1.2.5 Eigenschaften der gebundenen Chinone	106
4.1.2.6 Bindung von Inhibitoren	121
4.2 Spektren des <i>bc</i>₁-Komplexes aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	131
4.2.1 Elektrochemisch induzierte UV/VIS-Differenzspektren und Potentialtitrationen	131
4.2.2 Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren	134
4.2.2.1 Vorversuche	134
4.2.2.2 FTIR-Differenzspektren des Wildtyps	135
4.2.2.3 Bindung von Inhibitoren	140
4.3 Vergleich der Meßergebnisse und Ausblick	164
5 ZUSAMMENFASSUNG	167
6 LITERATUR	169
7 ANHANG	185
7.1 Aminosäuresequenzen der <i>bc</i>₁-Komplexe aus <i>P. denitrificans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	185
7.2 FTIR-Differenzspektren ausgewählter Inhibitoren	187
7.3 FTIR-Differenzspektren der Mutanten E295Q, E295D und E295A	188
7.4 FTIR-Differenzspektrum des <i>b₆f</i>-Komplexes	190
7.5 Anhang zu Material und Methoden	191
7.5.1 Chemikalien	191
7.5.2 Geräte/Materialien	192

Abb. 2-1	Mitochondriale Atmungskette	4
Abb. 2-2	Elektronentransferwege in <i>P. denitrificans</i>	6
Abb. 2-3	Redoxreaktionen des Ubichinons-n	6
Abb. 2-4	Schematische Darstellung der Struktur des Häm <i>b</i> -Porphyringerüsts	8
Abb. 2-5	Schematische Darstellung der Struktur des Häm <i>c</i> -Porphyringerüsts	9
Abb. 2-6	Schematische Darstellung der Struktur des [2Fe-2S]-Zentrums des Rieske-Proteins	10
Abb. 2-7	Strukturmodell des dimeren <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	11
Abb. 2-8	Anordnung der Transmembranelices der Cytochrom <i>b</i> -Untereinheit	12
Abb. 2-9	Lage der katalytischen Untereinheiten und Kofaktoren des <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	14
Abb. 2-10	Q-Zyklus	16
Abb. 2-11	Reaktionen des Fe ²⁺ /Fe ³⁺ -Redoxpaares an einer Metallelektrode	22
Abb. 2-12	Drei-Elektrodenanordnung	24
Abb. 2-13	Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers	28
Abb. 2-14	Peptidbindung	31
Abb. 2-15	Lage und Intensität der IR-Banden ausgewählter Aminosäuren	34
Abb. 2-16	Bezeichnung charakteristischer Gerüstschwingungen des Häm-Gerüsts	36
Abb. 2-17	Struktur des Ubichinon-n	38
Abb. 3-1	Elektrochemische Dünnschichtzelle	40
Abb. 3-2	Strukturen verwendeter Modifier	42
Abb. 3-3	Ag/AgCl/3M KCl-Elektrode	44
Abb. 3-4	Schematischer Aufbau der Meßapparatur	45
Abb. 4-1	Elektrochemisch induzierte VIS-Differenzspektren des <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>P. denitrificans</i>	53
Abb. 4-2	3D-Darstellung einer oxidativen Potentialtitration	56
Abb. 4-3	Nernstkurve einer Potentialtitration der α -Bande	56
Abb. 4-4	Potentialtitration des isolierten Cytochrom <i>c</i> ₁ -Fragments aus <i>P. denitrificans</i>	59
Abb. 4-5	VIS-Differenzspektren für ausgewählte Potentialschritte	61
Abb. 4-6	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>P. denitrificans</i>	65
Abb. 4-7	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des <i>bc</i> ₁ -Komplexes aus <i>P. denitrificans</i> in D ₂ O-Puffer	67
Abb. 4-8	Beiträge der einzelnen Proteinbestandteile zum Gesamtspektrum	72
Abb. 4-9	Kontrollspektrum der α -Bande des Häm <i>b</i> _L im Spektralbereich von 500 bis 600 nm	74
Abb. 4-10	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des Häm <i>b</i> _L in H ₂ O und D ₂ O	75
Abb. 4-11	Kontrollspektrum der α -Bande des Häm <i>b</i> _H im Spektralbereich von 500 bis 600 nm	82
Abb. 4-12	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des Häm <i>b</i> _H in H ₂ O und D ₂ O	84
Abb. 4-13	Elektrochemisch induziertes Differenzspektrum des Häm <i>b</i> _H im Bereich von 1685 bis 1560 cm ⁻¹	87
Abb. 4-14	Kontrollspektrum der α -Bande des Häm <i>c</i> ₁ im Spektralbereich von 500 bis 600 nm	90

Abb. 4-15	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des Häm c_1 und des Rieske-Proteins in H_2O und D_2O	91
Abb. 4-16	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des wasserlöslichen Fragmentes des Rieske-Proteins	96
Abb. 4-17	Struktur des wasserlöslichen Fragmentes des Rieske-Proteins aus Rinderherz-Mitochondrien	97
Abb. 4-18	Modellierte Umgebung des [2Fe-2S]-Zentrums des Rieske-Proteins aus <i>P. denitrificans</i>	99
Abb. 4-19	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des wasserlöslichen Cytochrom c_1 -Fragmentes	102
Abb. 4-20	Möglicher Elektronentransferweg vom [2Fe-2S]-Zentrum über Cyt c_1 zum Cyt c	103
Abb. 4-21	Struktur des Häm c -Porphyringerüsts mit Bezeichnung der Hämschwingungen	105
Abb. 4-22	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes und des UQ_2 in Lösung	107
Abb. 4-23	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der Absorptionsbande der Chinon-Methoxygruppen	112
Abb. 4-24	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des <i>P. denitrificans</i> -Proteins mit unterschiedlichem Chinongehalt	113
Abb. 4-25	Vergrößerte Darstellung des Spektralbereiches von 1770 bis 1710 cm^{-1} aus Abb. 4-24	116
Abb. 4-26	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des <i>P. denitrificans</i> -Proteins mit unterschiedlichen pH-Werten	119
Abb. 4-27	Vergrößerte Darstellung des Spektralbereiches von 1770 bis 1710 cm^{-1} aus Abb. 4-26	120
Abb. 4-28	Struktur des Antimycins A	121
Abb. 4-29	Rotverschiebung der α -Bande des Häm b_H durch Bindung von Antimycin A	122
Abb. 4-30	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit Antimycin A inhibierten <i>P. denitrificans</i> - bc_1 -Komplexes	123
Abb. 4-31	Struktur des Stigmatellin A	125
Abb. 4-32	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit einem Überschuß an Stigmatellin A inhibierten <i>P. denitrificans</i> - bc_1 -Komplexes	126
Abb. 4-33	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit Stigmatellin A inhibierten <i>P. denitrificans</i> - bc_1 -Komplexes	127
Abb. 4-34	Vergrößerte Darstellung des Spektralbereiches von 1760 bis 1720 cm^{-1} aus Abb. 4-33	128
Abb. 4-35	Doppeldifferenzspektrum des <i>P. denitrificans</i> - bc_1 -Komplexes mit Auswirkungen der Stigmatellinbindung	129
Abb. 4-36	Elektrochemisch induzierte VIS-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	131
Abb. 4-37	Vergrößerte Darstellung der α -Bande im Spektralbereich von 530 bis 580 nm	132
Abb. 4-38	Beispiele für Nernstkurven	133
Abb. 4-39	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i> in H_2O und D_2O	135
Abb. 4-40	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit Antimycin A inhibierten <i>S. cerevisiae</i> - bc_1 -Komplexes	141

Abb. 4-41	Strukturmodell der Häm b_H -Umgebung und der Q_i -Bindestelle des Hefe- bc_1 -Komplexes	142
Abb. 4-42	Chemisches Struktur des UK-2	144
Abb. 4-43	Verzögerte Ausprägung der α -Bande des Hefe-Komplexes nach Inhibierung mit UK-2	144
Abb. 4-44	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit UK-2 inhibierten Hefe- bc_1 -Komplexes	145
Abb. 4-45	Strukturen der Q_o -Inhibitoren MOA-Stilben, des Fungizids SSF-129 und MIA	147
Abb. 4-46	Beeinflussung der α -Bande des Hefe-Komplexes durch Bindung von MIA	147
Abb. 4-47	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des mit MIA/ ^{13}C -MIA inhibierten Hefe-Komplexes	148
Abb. 4-48	Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des mit MIA inhibierten Hefe-Komplexes im Spektralbereich von 1780 bis 1500 cm^{-1}	149
Abb. 4-49	Strukturen der Q_o -Inhibitoren Stigmatellin und HHDBT als Strukturanaloga zum SQ und SQ-Anion	151
Abb. 4-50	Q_o -Bindestelle des bc_1 -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i> mit gebundenen Inhibitoren	152
Abb. 4-51	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit einem Überschuß an Stigmatellin A inhibierten <i>S. cerevisiae</i> - bc_1 -Komplexes	153
Abb. 4-52	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit Stigmatellin A inhibierten <i>S. cerevisiae</i> - bc_1 -Komplexes	154
Abb. 4-53	Struktur des Stigmatellin-Derivates UST/ ^{13}C -UST	155
Abb. 4-54	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit UST und ^{13}C -UST inhibierten <i>S. cerevisiae</i> - bc_1 -Komplexes	156
Abb. 4-55	Doppeldifferenzspektrum des <i>P.d.</i> - bc_1 -Komplexes mit Auswirkungen der UST-Bindung	157
Abb. 4-56	Schematische Darstellung des Bereiches der Q_o -Bindestelle nach Stigmatellin-Bindung	158
Abb. 4-57	Doppeldifferenzspektrum des <i>P. denitrificans</i> - bc_1 -Komplexes mit Auswirkungen der Isotopenmarkierung	159
Abb. 4-58	Schematische Darstellung der Umgebung der Q_o -Bindestelle nach HHDBT-Bindung	160
Abb. 4-59	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit einem Überschuß an HHDBT inhibierten <i>S. cerevisiae</i> - bc_1 -Komplexes	161
Abb. 4-60	Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des mit HDBT inhibierten <i>S. cerevisiae</i> - bc_1 -Komplexes	162
Abb. 4-61	Vergrößerte Darstellung des Spektrums aus Abb. 4-59 im Bereich von 1760 bis 1730 cm^{-1}	163
Abb. 4-62	Lage von Glu66 in der Kristallstruktur	163
Abb. 4-63	Vergleich der FTIR-Differenzspektren der bc_1 -Komplexe aus <i>P. denitrificans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	164

Tabellen:

Tab. 2-1	Positionen der α -Bande der Hämgruppen der reduzierten Cytochrome des bc_1 -Komplexes	26
Tab. 2-2	Absorptionsbereiche verschiedener Sekundärstrukturelemente	33
Tab. 2-3	Schwingungsfrequenzen ausgewählter Aminosäureseitenketten	35
Tab. 2-4	Absorptionsbanden des Porphyringerüsts der Häm b -Modellsubstanz Bis-Imidazol-Fe-Protoporphyrin IX	37
Tab. 2-5	Absorptionsbanden der Vinylsubstituenten der Häm b -Modellsubstanz Bis-Imidazol-Fe-Protoporphyrin IX	37
Tab. 3-1	Zusammenstellung der verwendeten Mediatoren	43
Tab. 4-1	Mittelpunktpotentiale der Kofaktoren des bc_1 -Komplexes aus <i>P. denitrificans</i>	60
Tab. 4-2	Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des bc_1 -Komplexes aus <i>P. denitrificans</i>	73
Tab. 4-3	Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des Häm b_L aus dem <i>P. denitrificans</i> -Komplex	81
Tab. 4-4	Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des Häm b_H aus dem <i>P. denitrificans</i> -Komplex	89
Tab. 4-5	Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des Häm c_1 und des Rieske-Proteins	95
Tab. 4-6	Vorläufige Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des wasserlöslichen Rieske-Fragmentes aus dem <i>P. denitrificans</i> -Komplex	101
Tab. 4-7	Vorläufige Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des wasserlöslichen Cytochrom c_1 -Fragmentes aus dem <i>P. denitrificans</i> -Komplex	106
Tab. 4-8	Vorläufige Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des gebundenen Chinone im Gesamtspektrum des <i>P. denitrificans</i> -Komplexes	110
Tab. 4-9	Vorläufige Zuordnung der FTIR-Differenzbanden des bc_1 -Komplexes aus <i>S. cerevisiae</i>	139
Tab. 4-10	Vergleich der vorläufigen Bandenzuordnungen in den elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren der bc_1 -Komplexe aus <i>P. denitrificans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	165

Gleichungen:

Gl. 2-1	Nettoreaktion des bc_1 -Komplexes	16
Gl. 2-2	Nernstsche Gleichung zur Beschreibung des Redoxpotentials einer Halbzelle	23
Gl. 2-3	Zusammenhang zwischen Energie, Wellenlänge und Frequenz elektromagnetischer Strahlung	25
Gl. 2-4	Lambert-Beersches Gesetz	26
Gl. 2-5	Abhängigkeit der Schwingungsfrequenz von der Kraftkonstante und der reduzierten Masse	27
Gl. 2-6	Fourier-Integral	30
Gl. 2-7	Berechnung eines Differenzspektrums aus Absorptionsspektren	31
Gl. 3-1	Abhängigkeit der Absorptionsänderung einer redoxaktiven Komponente vom angelegten Potential	51

IV ABKÜRZUNGEN

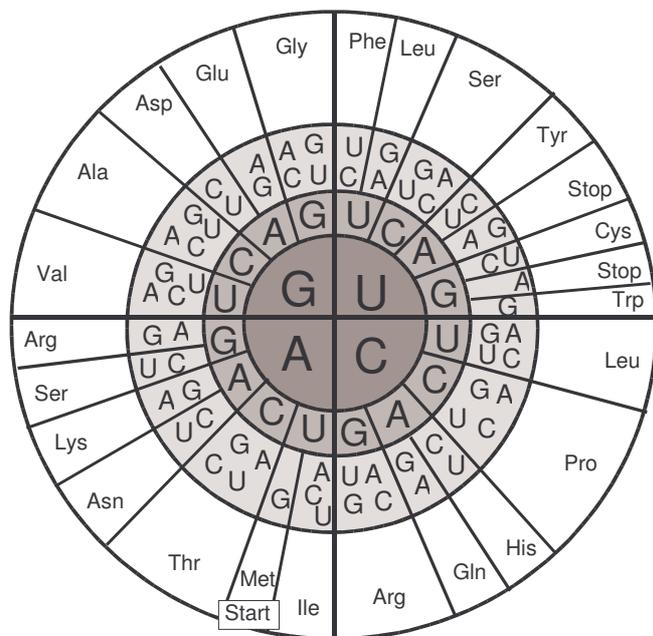
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Cyt	Cytochrom
DEAE	Diethylaminoethyl
DDM	Dodecylmaltosid
E_m	Mittelpunktpotential
FTIR	Fouriertransform-Infrarot
HDBT	Hydroxydioxobenzothiazol
HeNe	Helium-Neon
HCl	Salzsäure
HHDBT	5-n-Heptyl-6-Hydroxy-4,7-Dioxobenzothiazol
HPLC	high-performance liquid chromatography
KCl	Kaliumchlorid
MIA	Methoxyiminoacetamid
mM/mmol	millimolar (Einheit der Proteinkonzentration Mol pro Liter = Molar)
MOA	Methoxyacryl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NHE	Normalwasserstoffelektrode
ox	oxidiert
Q	Chinon
QCR _x	bezeichnet verschiedene Untereinheiten <i>x</i> des Hefe <i>bc</i> ₁ -Komplexes
QH ₂	Chinol
red	reduziert
SQ	Semichinon
UHDBT	5-n-Undecyl-6-Hydroxy-4,7-Dioxobenzothiazol
UM	Undecylmaltosid
UQ	Ubichinon
UST	Undecanyl-Stigmatellin
UV/VIS	Ultraviolett/visible: ultraviolett/sichtbarer Spektralbereich

Aminosäure	Grundbaustein eines Proteins bestehend aus einem zentralen Kohlenstoffatom und daran gebundener Amino- und Carboxygruppe sowie charakterischen Seitenketten. Man unterscheidet saure, basische, aliphatische (offenkettig), aromatische (ringförmig geschlossen), polare und unpolare Seitenketten. In Proteinen kommen 20 verschiedene Aminosäuren vor.
Aminosäuresequenz	Abfolge der Aminosäuren eines Proteins, auch Primärstruktur genannt
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat Molekül, das als universelle Energiewährung aller Organismen eingesetzt wird
anaerob/aerob	in Abwesenheit/in Gegenwart von Sauerstoff
Assemblierung	Zusammenbau eines Proteins in der Zelle
Atmungskette	letzter Abschnitt des oxidativen Stoffwechsels lebender Organismen, dient der Bereitstellung von Energie zur ATP-Synthese
Chinon/Chinol	oxidierte/reduzierte Form einer universellen redoxaktiven Verbindung, die den Elektronentransfer zwischen und durch einzelne Proteinkomplexe der Atmungskette vermittelt
Cytochrom <i>x</i>	Protein, das als prosthetische Gruppe ein Häm <i>x</i> enthält. Kann in Proteinkomplexen der Atmungskette als Kofaktor gebunden sein oder frei dazwischen diffundieren kann, dient als Elektronenüberträger.
Cytoplasma	Inneres einer Bakterienzelle
Detergenz	Seife; Substanz, um isolierte, hydrophobe Membranproteine in Lösung zu bringen (Solubilisierung) und zu stabilisieren, z.B. Dodecylmaltosid
Domäne	funktionell zusammengehörender Teil eines Proteins
DNS	Desoxyribonukleinsäure. Träger der genetischen Information eines Organismus. Das DNS-Molekül stellt eine Aneinanderreihung von Nukleotiden dar, die aus jeweils aus einem Zuckermolekül (Desoxyribose) bestehen, an das ein Phosphatrest und je eine der Basen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin gebunden sind. Je drei aufeinanderfolgende Basen bilden ein Triplet (auch Codon) und kodieren für eine bestimmte Aminosäure (siehe Code-Sonne in Kap. VI).
Enzym	Biokatalysator, beschleunigt eine biochemische Reaktion und setzt deren Aktivierungsenergie herab
Eukaryont	Organismus, dessen Zellen einen Zellkern besitzen, in dem sich die Erbsubstanz DNS befindet
Expression/Expriemieren	Umsetzung der in der DNS kodierten genetischen Information durch Transkription und Translation in eine für die Zelle nutzbare Genprodukt, i.A. ein Protein

Gen	DNS-Abschnitt, der Informationen zur Herstellung eines Proteins trägt. Durch die Abfolge der Basen der DNS ist die Aminosäuresequenz des Proteins festgelegt
Gensequenz	Abfolge der Basen in der DNS
Häm	prothetische Gruppe eines Cytochroms, enthält ein zentrales Eisenatom, das in einem Porphyrinring eingebunden ist
hydrophob	wasserabweisend
Inhibitor	Substanz, um die Reaktion eines Proteins zu unterbinden
Intermembranraum	Raum zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran
Kofaktor	für die Wirkung eines Enzyms benötigtes Molekül, kann fest an das Enzym gebunden sein oder nur für die Reaktion binden
Matrix	innerer Bereich eines Mitochondriums
Mitochondrium	Ort des oxidativen Stoffwechsels bei Eukaryonten ("Kraftwerke der Zelle")
Mutagenese	Veränderung der Aminosäuresequenz eines Organismus durch Austausch einzelner Aminosäuren
Operon	Begriff aus der Bakteriengenetik, bezeichnet gemeinsam oder koordiniert exprimierte Gene
Oxidation	Reaktion, bei der Elektronen abgegeben werden
<i>P.d.</i> <i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i> , Bodenbakterium
Peptid	aus Aminosäuren aufgebaute Substanz, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind
Periplasma	Bereich außerhalb der Plasmamembran eines Bakteriums
Phosphorylierung	Anlagerung von Phosphatsäureresten an organische Verbindung, z.B. Bildung von ATP aus ADP und P _i
Plasmid	ringförmiges Molekül, das sich in Bakterien befindet, wird häufig verwendet, um Erbinformationen in einen Organismus einzuschleusen
Porphyrinring	struktureller Bestandteil eines Häm-Moleküls

Prokaryont	Organismus, dessen Zellen keinen Zellkern besitzen (Bakterien, Blaualgen), Erbsubstanz befindet sich im Cytoplasma
prosthetische Gruppe	dauerhaft im Protein gebundener Kofaktor
Protein	auch Polypeptid, Eiweiß; Grundbaustein lebender Organismen, besteht aus einer charakteristischen Abfolge von Aminosäuren, häufig sind Kofaktoren im Protein gebunden
Proteolyse	Proteinspaltung mit Hilfe von Proteasen
Reduktion	Reaktion, bei der Elektronen aufgenommen werden
<i>S.c.</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Hefepilz, Bäcker- und Bierhefe
Sequenzhomologie	Übereinstimmung von Teilbereichen der Aminosäuresequenzen einer oder mehrerer Organismen
Solubilisieren	Ein Membranprotein mit Hilfe von Detergentien in Lösung bringen
Translation	Synthese von Proteinprimärstrukturen durch Aneinanderreihung von Aminosäuren, wobei vorher transkribierte RNS-Stränge als Matrize dienen
Transkription	Ablesen der DNS und Synthese verschiedener RNS-Stränge (Ribonukleinsäure), erster Schritt der Proteinsynthese
Ultrafiltration	Methode zur Konzentrierung und Reinigung von Proteinlösungen, Lösung wird unter Druck durch eine semipermeable Membran gepreßt, z. B. durch Zentrifugation

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparaginsäure/Aspartat	Asp	D
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure/Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V



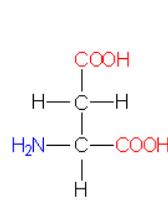
Die nebenstehende sogenannte **Code-Sonne** liefert den Schlüssel zur Übersetzung des genetischen Codes der DNS in eine Aminosäuresequenz. Ein Basentriplett kodiert für eine Aminosäure. Der genetische Code ist entartet, d.h. für viele Aminosäuren existieren mehrere Triplets. Die Triplets UAA, UAG, UGA dienen als Stoppsignale, AUG bezeichnet neben der Aminosäure Methionin auch den Beginn eines Gens (Start-Codon).

Bezeichnungen:

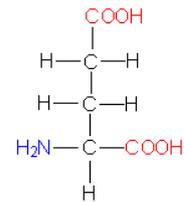
U-Uracil (wird bei Synthese der RNS während der Transkription anstelle der Base Thymin eingesetzt), A-Adenin, G-Guanin, C-Cytosin. Die Code-Sonne wird von innen nach außen gelesen, d.h. der innere Kreis steht für die erste Base des Triplets, der äußere graue Ring für die dritte Base.

Beispiel: Glu \equiv GAG und GAA

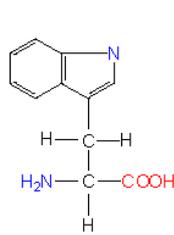
Chemische Struktur der Aminosäuren



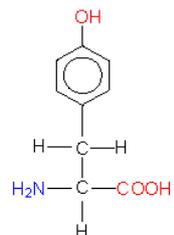
Asparaginsäure
(Asp; D)



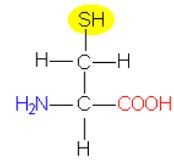
Glutaminsäure
(Glu; E)



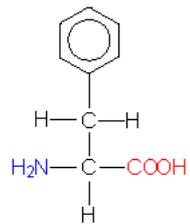
Tryptophan
(Trp; W)



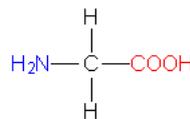
Tyrosin
(Tyr; O)



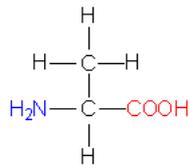
Cystein
(Cys; C)



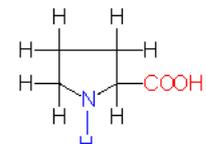
Phenylalanin
(Phe; F)



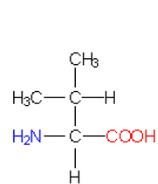
Glycin
(Gly; G)



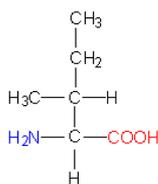
Alanin
(Ala; A)



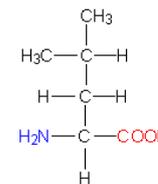
Prolin
(Pro; P)



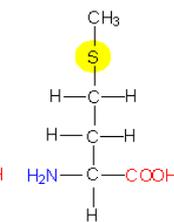
Valin
(Val; V)



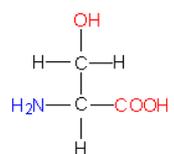
Isoleucin
(Ile; I)



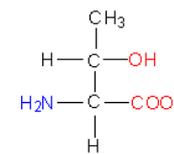
Leucin
(Leu; L)



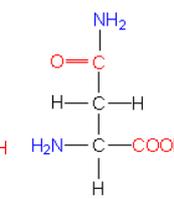
Methionin
(Met; M)



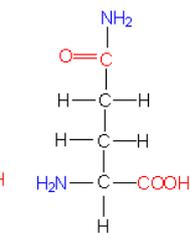
Serin
(Ser; S)



Threonin
(Thr; T)



Asparagin
(Asn; N)



Glutamin
(Gln; Q)

Tagungsbeiträge:

M. Ritter, O. Anderka, B. Ludwig, P. Hellwig, W. Mäntele. Characterization of the Quinone Binding Sites of the Cytochrome *bc*₁ Complex from *Paracoccus denitrificans* by Electrochemically Induced FTIR Difference Spectroscopy and Specific Inhibitors.

9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, September 2001, Prag, ISBN 80-238-7356-3

M. Ritter, O. Anderka, H. Palsdottir, C. Hunte, B. Ludwig, P. Hellwig, W. Mäntele. Characterization of the Quinone Binding Sites of the Cytochrome *bc*₁ Complex from *Paracoccus denitrificans* and *Saccharomyces cerevisiae* by Electrochemically Induced FTIR Difference Spectroscopy and Specific Inhibitors. *BBA Short Reports* Vol. **12**, 2002

12th European Bioenergetics Conference, September 2002, Arcachon

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

a) aus dieser Arbeit:

M. Ritter, O. Anderka, B. Ludwig, W. Mäntele, P. Hellwig (2003) Electrochemical and FTIR Spectroscopic Characterization of the Cytochrome *bc*₁ Complex from *Paracoccus denitrificans*: Evidence for protonation reactions coupled to quinone binding. *Biochemistry* **42**, 12391-12399

M. Ritter, H. Palsdottir, M. Abe, W. Mäntele, C. Hunte, H. Miyoshi, P. Hellwig (2004) Direct evidence for the interaction of stigmatellin with a protonated acidic group in the *bc*₁ complex from *S. cerevisiae* as monitored by FTIR difference spectroscopy and ¹³C specific labeling. *Eingereicht*.

b) weitere:

C.R. Lancaster, R. Gorss, A. Haas, M. Ritter, W. Mäntele, J. Simon, A. Kröger (2000) Essential role of Glu C66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(24), 13051-13056

W. Mäntele, P. Hellwig, U. Pfitzner, A. Böhm, M. Ritter, O. Klein (2002) Infrarotspektroskopie zur Charakterisierung biologischer Energiewandlung. *BIOforum* **4**, 230-233

G. Wille, M. Ritter, R. Friedemann, W. Mäntele, G. Hübner (2003) Redox triggered FTIR difference spectra of FAD in aqueous solution and bound to flavoproteins. *Biochemistry* **42**, 14814-14821

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Proteine gehören zu den wichtigsten Bausteinen des Lebens. Sie organisieren den Stoffwechsel eines Organismus, sind Bestandteil des Zellgerüsts oder agieren als Transporter und Botenstoffe. Proteine sind Polypeptide, die durch Aneinanderreihung von Aminosäuren entstehen. Diese sogenannte Aminosäuresequenz ist charakteristisch für das jeweilige Protein und führt durch Faltungsprozesse zu einer immer gleichen, für das Protein spezifischen dreidimensionalen Struktur. Diese wiederum ist entscheidend für die Funktion des Proteins. Fehler in der Struktur führen häufig zu Störungen der Proteinfunktion. Falsch gefaltete Eiweißmoleküle (sogenannte Prionen) beispielsweise werden für die Creutzfeld-Jakob-Krankheit verantwortlich gemacht, die zu einer Degeneration des menschlichen Gehirns führt.

Die biophysikalische Forschung beschäftigt sich u.a. mit der Aufklärung des Zusammenhanges von Struktur und Funktion von Proteinen. Mit Hilfe der Röntgenkristallographie wurden bereits zahlreiche Proteinstrukturen aufgelöst. Diese Strukturmodelle stellen eine Momentaufnahme des Proteins in einem fixierten Zustand dar. Noch aktive Proteine können mit spektroskopischen Methoden wie der Elektronenspinresonanz-, UV/VIS- oder auch Kernspinresonanz-Spektroskopie untersucht werden. Um Konformationsänderungen und Reaktionswege innerhalb des Proteins zu analysieren, eignet sich besonders die FTIR-Differenzspektroskopie. Mit ihrer Hilfe können Konformationsänderungen, Protonentransferwege und sogar einzelne an der Proteinreaktion beteiligte Aminosäuren identifiziert werden.

Für alle Lebensprozesse und die daran gebundenen chemischen Reaktionen muß Energie bereitgestellt werden. Dafür werden energiereiche Verbindungen über die Nahrung aufgenommen, in den Zellen umgewandelt und als Energie nutzbar gemacht. Ein besonders interessantes Forschungsgebiet stellt hierbei die Atmungskette dar. Sie ist der letzte Abschnitt des oxidativen Stoffwechsels aller Organismen und besteht aus mehreren Proteinkomplexen. Eine zentrale Rolle nimmt der dritte Komplex, der bc_1 -Komplex, ein. Medizinische Bedeutung hat er z.B. in der Malaria-Therapie. Diese Krankheit wird von Parasiten

(Plasmodien) hervorgerufen. Ihre Bekämpfung erfolgt mit chemischen Hemmstoffen, die am Plasmodien- bc_1 -Komplex binden und seine Reaktion blockieren. Auch andere bc_1 -Inhibitoren werden als Fungizide oder Antibiotika eingesetzt. Doch obwohl Struktur und Funktion des bc_1 -Komplexes prinzipiell bekannt sind, gibt es auf molekularer Ebene noch viele offene Fragen.

1.2 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der bc_1 -Komplexe aus dem Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit einer Kombination von elektrochemischen und IR-spektroskopischen Methoden. Dabei sollte die Proteinreaktion elektrochemisch induziert und gleichzeitig spektroskopisch erfaßt werden. Die aufgenommenen IR-Differenzspektren können Konformationsänderungen und die Beteiligung einzelner Aminosäuren an der Reaktion des Proteins aufzeigen. Weiterhin sollten die Beiträge der einzelnen Untereinheiten und der darin enthaltenen Kofaktoren identifiziert und voneinander getrennt werden. Um diese separieren zu können, muß das Mittelpunktspotential der Kofaktoren bekannt sein, das durch Potentialtitrationen ermittelt wurde. Die Gesamtheit der erhaltenen Spektren soll Einblicke in die Funktionsweise des Proteins auf molekularer Ebene liefern.

Von besonderem Interesse war die Charakterisierung der im Komplex gebundenen Chinone, da sie entscheidend für das Verständnis des Reaktionsmechanismus des Proteins sind. In diesem Zusammenhang sollten verschiedene Inhibitoren (Hemmstoffe) eingesetzt werden, die chinonähnliche Strukturen und Bindedomänen besitzen.

Der bc_1 -Komplex ist Bestandteil der Atmungskette der meisten Organismen. Seine Funktionsweise ist prinzipiell bekannt und für alle Organismen identisch. Trotzdem existieren Unterschiede im strukturellen Aufbau. Als besonders gute Untersuchungsobjekte haben sich hierbei das Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erwiesen. Aufgrund ihrer überschaubaren Größe und Genstruktur sind beide Organismen leicht handhabbar. Die Aufzucht der Organismen und die Isolierung der bc_1 -Komplexes mit

biochemischen Methoden ist einfach und verläuft sehr ähnlich. Der bakterielle *P. denitrificans*-Komplex besteht aus drei katalytisch aktiven Untereinheiten. Der mitochondriale Hefe-Komplex hat ein wesentlich höheres Molekulargewicht und besteht aus zehn Untereinheiten. Seine Röntgenkristallstruktur ist im Gegensatz zu der des *P. denitrificans*-Komplexes bereits bekannt. Die Untersuchung beider *bc*₁-Komplexe sollte Informationen über grundlegende Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Organismen liefern.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Biologische Grundlagen

2.1.1 Die Atmungskette

Lebende Organismen nutzen zur Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen das Molekül ATP (Adenosintriphosphat) als universellen Energieträger. Es wird unter Aufwendung von Energie durch oxidative Phosphorylierung aus ADP (Adenosindiphosphat) gebildet. Eukaryonten und Bakterien, die keine Photosynthese betreiben, beziehen diese Energie aus einem Protonengradienten, der durch enzymatische Redoxreaktionen in der Atmungskette aufgebaut wird.

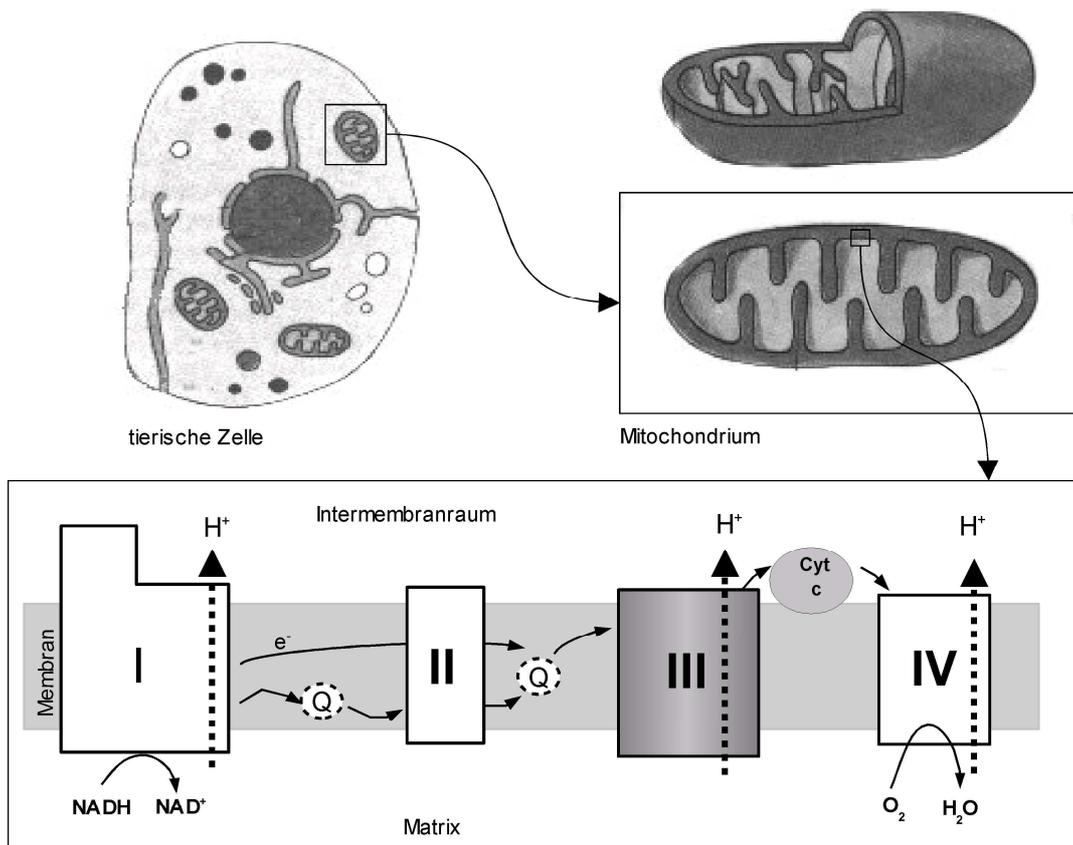


Abbildung 2-1

Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette am Beispiel einer tierischen Zelle. Durchgezogene Pfeile markieren den Elektronentransferweg, durchbrochene Pfeile den generierten Protonengradient (Zelle und Mitochondrium nach *Diedrich et al. 1979*). Beschreibung siehe Text.

Die Atmungskette besteht aus strukturell und funktionell unterschiedlichen Enzymkomplexen mit aufsteigendem Redoxpotential, durch die in gekoppelten Redoxreaktionen stufenweise Elektronen übertragen werden. In eukaryontischen Organismen (Abb. 2-1) finden sich im allgemeinen vier Komplexe, die in die innere Mitochondrienmembran eingebettet sind. Der Elektronentransfer erfolgt von der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) und der Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II, wird offiziell nicht zur Atmungskette gezählt) zum Ubichinon. Von dort wird das Elektron durch die Ubichinol: Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (Komplex III, *bc*₁-Komplex) auf Cytochrom *c* und zur abschließenden Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV) transferiert. Die Elektronen dienen hier zur Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Die Elektronenübertragung innerhalb der Proteinkomplexe wird durch redoxaktive prosthetische Gruppen katalysiert. Zwischen den Komplexen vermitteln zwei bewegliche, ebenfalls redoxaktive Transportermoleküle die Weitergabe der Elektronen, das in der Membran gelöste Ubichinon (Q) und das membranassoziierte Cytochrom *c* (Cyt *c*). Gekoppelt an den Elektronentransfer ist ein Protonentransfer, der zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran führt. Mit Ausnahme von Komplex II tragen alle Enzyme zum Aufbau des Gradienten bei. Das erzeugte elektrochemische Potential wird vom Enzym ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ATP verwendet.

Die Atmungsketten der beiden in dieser Arbeit untersuchten Organismen *Paracoccus denitrificans* und *Saccharomyces cerevisiae* weichen in einigen Details von dem in Abb. 2-1 gezeigten Schema ab. Die Hefe *S. cerevisiae* enthält keinen Komplex I. Stattdessen übernehmen mehrere externe NADH-Dehydrogenasen die NADH-Oxidation. Die Kopplung dieser Reaktion an den Prozeß der Phosphorylierung geht dadurch allerdings verloren (*de Vries & Marres 1987*). Atmungsketten wie die des Bodenbakteriums *P. denitrificans* befinden sich in der Plasmamembran. Sie enthalten häufig zahlreiche Verzweigungsmöglichkeiten, die eine Anpassung an unterschiedlichste Lebens- und Umweltbedingungen der Bakterien ermöglichen. *P. denitrificans* kann unter anaeroben Bedingungen eine Nitratatmung (Denitrifikation) durchführen, bei der Nitrat über mehrere Zwischenstufen zu Stickstoff reduziert wird. Unter aeroben Bedingungen wird jedoch eine Atmungskette exprimiert, die der mitochondrialen Atmungskette stark ähnelt (Abb. 2-2). Die katalytischen Untereinheiten des in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen *bc*₁-Komplexes sind weitgehend homolog zu ihrem mitochondrialen Pendant. Die große Ähnlichkeit und die einfache genetische Zugänglichkeit

sind ein Vorteil dieses bakteriellen Systems, so daß *P. denitrificans* häufig als Modellorganismus für die mitochondriale Atmungskette eingesetzt wird.

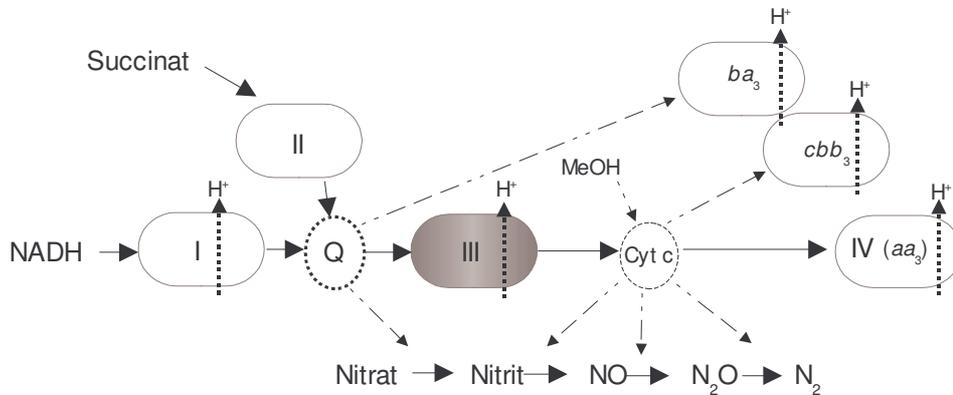


Abbildung 2-2

Aerobe und anaerobe Elektronentransferwege in *P. denitrificans*. Der zur mitochondrialen Atmungskette identische Weg ist mit durchgezogenen Pfeilen markiert, unterbrochene Pfeile beschreiben mögliche Alternativwege (Schema nach Pfitzner 2000, Trumppower 1990).

2.1.2 Der Elektronenüberträger Ubichinon

Der Elektronentransfer zwischen den Komplexen der Atmungskette wird von redoxaktiven Molekülen gewährleistet. Besonders wichtig für den bc_1 -Komplex ist in diesem Zusammenhang das Ubichinon (kurz Chinon). Es wird wegen seines ubiquitären, d.h. allgegenwärtigen Vorkommens in vielen Organismen so genannt. Im Laufe seiner Redoxreaktion wechselt das Ubichinon durch Aufnahme bzw. Abgabe von Elektronen und Protonen vom reduzierten Zustand (Ubichinol) in den oxidierten und zurück. Die Reaktion erfolgt über Semichinonformen und ist in Abb. 2-3 ersichtlich.

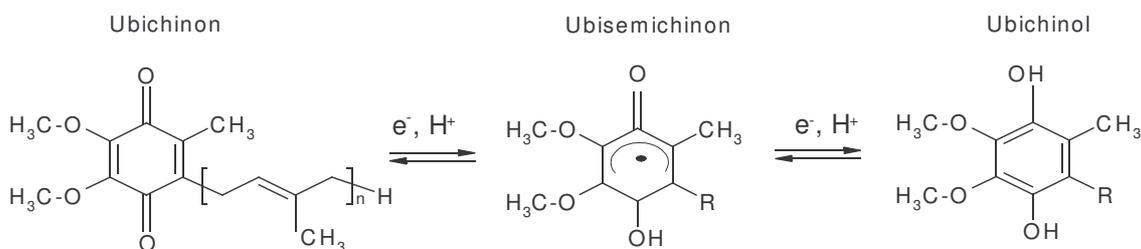


Abbildung 2-3

Redoxreaktion des Ubichinons-n. → Reduktion, ← Oxidation (nach Voet & Voet 1994).

2.1.3 Struktur des bc_1 -Komplexes

In diesem Kapitel wird der Aufbau der in dieser Arbeit untersuchten bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* und der Hefe *S. cerevisiae* beschrieben. Für den Komplex aus *S. cerevisiae* liegt eine Kristallstruktur vor. Aufgrund der Sequenzhomologien der katalytischen Domänen beider Organismen kann davon ausgegangen werden, daß sich diese strukturell ähneln. Die Aminosäuresequenzen beider bc_1 -Komplexe sind im Anhang 7.1 zu finden.

2.1.3.1 Der bc_1 -Komplex aus *Paracoccus denitrificans*

Der bc_1 -Komplex aus *P. denitrificans* besteht aus drei Untereinheiten, Cytochrom *b*, Cytochrom c_1 und dem Rieske-Eisen-Schwefel-Protein, die jeweils redoxaktive Kofaktoren tragen und katalytische Funktionen besitzen. Er zählt damit neben dem *Rhodobacter capsulatus*-Komplex zu den kleinsten bekannten bc_1 -Komplexen. Seine Aufreinigung wurde erstmals 1986 von Yang (*Yang & Trumppower 1986*) beschrieben. Die Gensequenz des Komplexes ist seit 1987 bekannt (*Kurowski & Ludwig 1987*). Sie ist auf dem sogenannten *fbc*-Operon organisiert. Jede Untereinheit kodiert auf einem eigenen Strukturgen, die in der Abfolge Rieske-Protein, Cyt *b* und Cyt c_1 auf dem Operon liegen und durch jeweils 10-12 Nukleotide voneinander getrennt sind.

Die Cytochrom *b*-Untereinheit besteht aus 440 Aminosäuren und durchspannt die Plasmamembran. Das Molekulargewicht beträgt 50 kDa (*Kurowski & Ludwig 1987*). Die gesamte Untereinheit ist stark hydrophob. Im Hydrophobizitätsdiagramm des Enzyms wurden mehr als zehn verschiedene Domänen identifiziert, die darauf hinweisen, daß mehrere α -Helices die Membran durchspannen. Die Kristallstrukturen mitochondrialer Systeme konnten dies bestätigen (siehe Kapitel 2.1.2.2). Das redoxaktive Zentrum des Cytochrom *b* besteht aus zwei nichtkovalent gebundenen *b*-Typ-Hämen. Abb. 2-4 zeigt die Struktur des planaren Porphyringerüsts eines solchen Hämes. Die Planarität kann durch den Einbau im Protein gestört sein. Das Gerüst besteht aus vier Pyrrolringen, die über Methinbrücken miteinander verknüpft sind. An den Pyrrolringen sind je zwei Propionat- und Vinylgruppen sowie vier Methylgruppen gebunden. Das zentrale Eisenatom wird axial von zwei konservierten

Histidinresten ligandiert. Vergleiche mit der Sequenz des Hefe-*bc*₁-Komplexes (Hunte *et al.* 2000) lassen vermuten, daß dies His97 und His198 für Häm *b*_L bzw. His111 und His212 für Häm *b*_H sind. Die beiden Häme des Cytochrom *b* sind chemisch identisch, unterscheiden sich aber in ihren optischen Eigenschaften und ihrem Redoxpotential. Für die Häme existieren verschiedene Bezeichnungen je nach Mittelpunktspotential sowie spektralen Eigenschaften. Dabei entspricht das Hochpotentialhäm *b*_H dem Häm, das im optischen Spektrum eine Bande bei 559-560 nm (*b*₅₆₀) zeigt (vgl. Kapitel 2.3.1). Das Häm mit dem niedrigeren Redoxpotential, *b*_L, zeigt eine geteilte Bande bei 559 und 566 nm und wird auch als Häm *b*₅₆₆ bezeichnet.

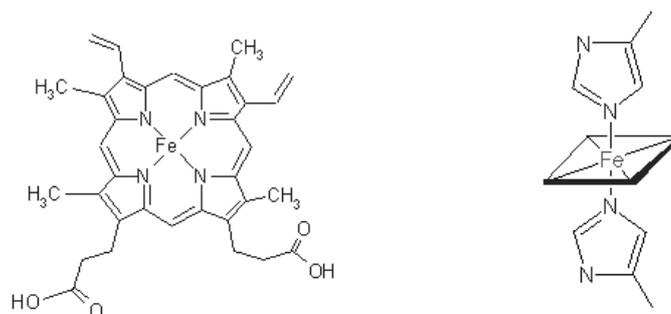


Abbildung 2-4

Struktur des Häm *b*-Porphyringerüsts und die Ligandierung des zentralen Eisenatoms durch Histidinseitenketten (Quelle: PROMISE-Datenbank, Universitäts Leeds).

Ebenfalls in der Cytochrom *b*-Untereinheit lokalisiert sind Bindestellen für den Elektronenüberträger Ubichinon. Das natürliche Substrat von *P. denitrificans* ist Ubichinon-10. In anderen Organismen können andere Ubichinon-Typen vorkommen, die sich in der Länge der Isopren-Seitenkette voneinander unterscheiden (Struktur Abb. 2-17). Durch Inhibitorstudien (Kapitel 2.1.3.2) konnten zwei an gegenüberliegenden Seiten der Membran liegende Bindestellen identifiziert werden. Eine befindet sich nahe dem Häm *b*_L an der periplasmatischen Seite der Membran und wird mit Q_o bezeichnet. Eine zweite Bindestelle, Q_i, wurde nahe Häm *b*_H im Transmembranbereich lokalisiert.

Die Cytochrom *c*₁-Untereinheit besteht aus 450 Aminosäuren. Das Molekulargewicht wird in der Literatur mit 39 kDa bzw. 60-68 kDa (Yang & Trumpower 1986, Kurowski & Ludwig

1987) angegeben. Damit ist das Polypeptid größer als sein mitochondriales Gegenstück. Am Beginn der Aminosäuresequenz (Position 46-197) befinden sich Aminosäuren mit ausschließlich sauren Seitenketten, für die es keine entsprechende mitochondriale Sequenz gibt. Sie dienen möglicherweise der Anpassung an den Elektronenakzeptor, der das Elektron von Komplex III zu Komplex IV weitertransportiert. Im Falle von *P. denitrificans* ist dies Cytochrom c_{552} , das sich mit seinem isoelektrischen Punkt deutlich von mitochondrialen Cytochromen c unterscheidet (Scholes *et al.* 1971).

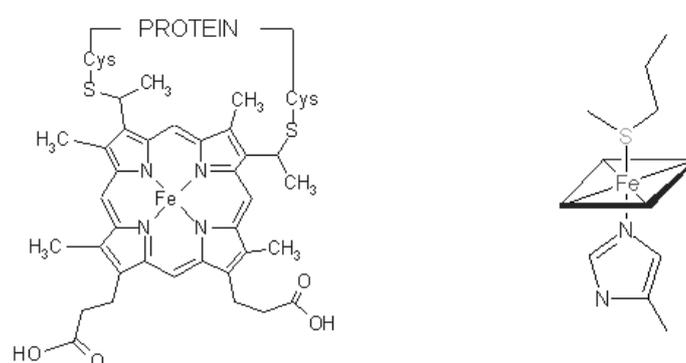


Abbildung 2-5

Schematische Darstellung der Häm *c*-Struktur und Ligandierung des Eisen-Zentralatoms durch Methionin- und Histidinseitenketten (Quelle: PROMISE-Datenbank, Universität Leeds).

Cytochrom c_1 enthält als prosthetische Gruppe ein kovalent gebundenes *c*-Typ-Häm. Dazu bilden die Vinylgruppen des Häm-Porphyringerüsts Thioetherbindungen mit Cysteinresten des Proteins aus (Abb. 2-5). Basierend auf der Cyt c_1 -Sequenz mit dem für *c*-Typ-Cytochrome charakteristischen Bindemotiv CxxCH wurden die Cysteine 245 und 248 als mögliche Bindungspartner vorgeschlagen (Ludwig *et al.* 1983). Die axialen Liganden des zentralen Eisenatoms beim *c*-Häm sind Histidin und Methionin. Im *P. denitrificans*-Komplex kommen hierfür His249 und Met373 in Frage.

Die zum größten Teil im Periplasma liegende Cyt c_1 -Untereinheit wird durch eine α -Helix in der Membran verankert (Kurowski & Ludwig 1987).

Die kleinste Untereinheit ist mit 20 kDa das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Yang & Trumppower 1986). Es besteht aus einer außerhalb der Plasmamembran befindlichen kompakten Domäne, die über eine Transmembranhelix an den Komplex gebunden ist. Die extrinsische Domäne trägt als katalytische Gruppe ein sogenanntes Eisen-Schwefel-[2Fe-2S]-

Zentrum. Es wurde postuliert, daß sie sich im Laufe der Elektronentransferreaktion zwischen den beiden Untereinheiten Cyt *b* und Cyt *c*₁ bewegt (Zhang *et al.* 1998, Xiao *et al.* 2000). Darauf wird im nächsten Kapitel noch ausführlich eingegangen.

Die aus 190 Aminosäuren bestehende Primärstruktur des Rieske-Proteins ist bis auf zwei Ausnahmen wenig hydrophob. Ein kleiner Bereich mit hydrophoben Aminosäureseitenketten um Position 30 wird als mögliche Domäne zur Bildung des Membranankers diskutiert (Kurowski & Ludwig 1987). Das zweite Gebiet mit hydrophoben Aminosäureseitenketten findet sich im Bereich ab Position 130 der Aminosäuresequenz. Es zeigt die größte Homologie zu anderen Organismen und weist die Abfolge CxH...CxxH auf. Sie wurde durch den Vergleich der Rieske-Proteine unterschiedlicher Organismen als Bindemotiv für das Eisen-Schwefel-Zentrum identifiziert. Die Sequenz des Rieske-Protein enthält mehrere in Frage kommende konservierte Cystein- und Histidinreste (Kurowski & Ludwig 1987). Schröter *et al.* (1998) bestimmten anhand von Homologien zur Rinderherz-Struktur die Cysteine 132 und 152 sowie die Histidine 134 und 155 als Liganden. Abb. 2-6 zeigt eine schematische Darstellung des Zentrums und seine Koordinierung durch Cystein- und Histidinreste.

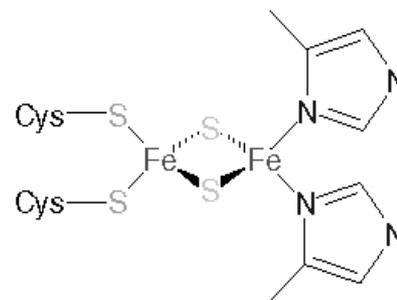


Abbildung 2-6

Schematische Darstellung des [2Fe-2S]-Zentrums des Rieske-Proteins und seine Koordinierung durch Cystein- und Histidinreste.

(Quelle: PROMISE-Datenbank)

Die katalytischen Untereinheiten Cytochrom *b*, Cytochrom *c*₁ und das Rieske-Protein bilden zusammen einen Monomer mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Zahlreiche Studien (vgl. de Vries 1986 und Ref. darin) und alle bekannten Kristallstrukturen (Xia *et al.* 1997, Iwata *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1998, Hunte *et al.* 2000) lassen den Schluß zu, daß zwei dieser Monomere in der Membran einen strukturellen und funktionellen Dimer bilden.

2.1.3.2 Der bc_1 -Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*

Der bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* gleicht in Aussehen, Aufbau und Dimensionen den bereits bekannten Strukturen mitochondrialer bc_1 -Komplexe (Xia et al. 1997, Iwata et al. 1998, Zhang et al. 1998). Seine Röntgenkristallstruktur wurde im Jahr 2000 mit einer Auflösung von 2.3 Å bestimmt (Hunte et al. 2000). Zwei gleichartige, miteinander verschlungene Monomere bilden einen strukturellen und funktionellen Dimer, der in die innere Mitochondrienmembran eingebettet ist (Abb. 2-7). Xia et al. (1997) bestimmten für den bc_1 -Komplex aus Rinderherz eine 42 Å breite Transmembranregion. Der Komplex ragt 75 Å in den Matrixraum und 38 Å in den Intermembranraum hinein. Basierend auf der Kristallstruktur werden im folgenden die Untereinheiten eines Monomers beschrieben. Sein Molekulargewicht beträgt 233.4 kDa. Der Monomer besteht aus zehn Untereinheiten (die Kristallstruktur zeigt nur neun), von denen nur die drei aus dem *P. denitrificans*-Komplex bekannten Cyt *b*, Cyt *c*₁ und Rieske-Protein katalytische Funktionen aufweisen. Die restlichen sieben Untereinheiten scheinen nicht an der Elektronen- und Protonenübertragung beteiligt zu sein, sind aber notwendig für die Assemblierung bzw. strukturelle Integrität der mitochondrialen Komplexe (de Vries & Marres 1987).

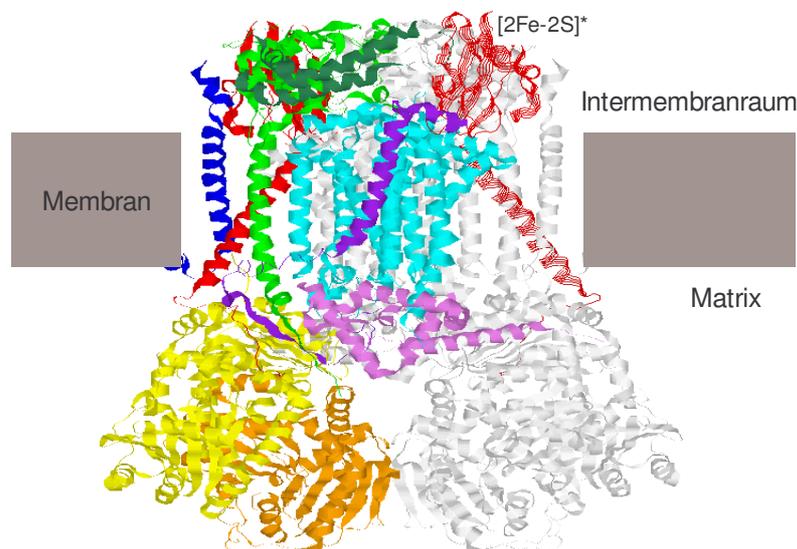


Abbildung 2-7

Strukturmodell des dimeren bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* basierend auf Strukturdaten (PDB-Eintrag 1KY0). Die Untereinheiten eines Monomers sind farblich hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms RASMOL (Biocomputing Research Unit der Universität Edinburgh & BioMolecular Structure Department, Glaxo Research and Development, Greenford, UK) erstellt.

Cytochrom *b* (Abb. 2-9, blau) bildet das katalytische Herz des Hefe bc_1 -Komplexes. Es wird als einzige Untereinheit mitochondrial kodiert, hat ein Molekulargewicht von 43.6 kDa und besteht aus 385 Aminosäuren.

Acht Transmembranhelices mit der Bezeichnung *A-H* durchspannen die Membran (Abb. 2-8). Sie bilden zwei räumlich getrennte Helixbündel, von denen eines aus den Helices *A-E* besteht und im Inneren des Dimers an der Kontaktstelle der beiden Monomere liegt. Das zweite bestehend aus den drei Helices *F-H* befindet sich an der Peripherie des Komplexes. Vor und zwischen den Helices befinden sich Linker-Bereiche (bezeichnet mit *a*, *ab*, *cd1*, *cd2*, *de*, *ef*), die sich aus kurzen Schleifen und Helices zusammensetzen.

Die beiden Häme sind zwischen den α -Helices *A*, *D*, *B* und *C* gebunden. Als

Liganden des Eisen in Häm b_L wurden His82 und His183 identifiziert. Für Häm b_H sind dies His96 und His197. Die Eisenatome der beiden Häme eines Monomers haben einen Abstand von 20.9 Å, die Porphyrinebenen stehen in einem Winkel von 45° zueinander (Berry *et al.* 2000a). Der geringste Abstand beider Häme besteht zwischen den Vinylgruppen gegenüberliegender Pyrrolringe. Die Propionatgruppen der Häme zeigen in entgegengesetzte Richtungen, die des Häm b_L zum Intermembranraum, die des Häm b_H zur Matrixseite.

In der Cytochrom *b*-Untereinheit sind die beiden Chinonbindestellen Q_0 und Q_i lokalisiert. Das natürliche Substrat im *S. cerevisiae*-Enzym ist Ubichinon-6. Die Q_i -Bindestelle hat die Form einer Tasche und befindet sich an der Matrixseite der Transmembranregion. Sie wird von Teilen der Helices *A*, *D*, *E* und der transversalen Helix *a* gebildet und ist zur Membran hin offen. Dies ermöglicht den Austausch des Substrats über Wechselwirkung mit dem in der Membran befindlichen Chinonpool nach der Reaktion. Die Kopfgruppe des Chinons ist nahe

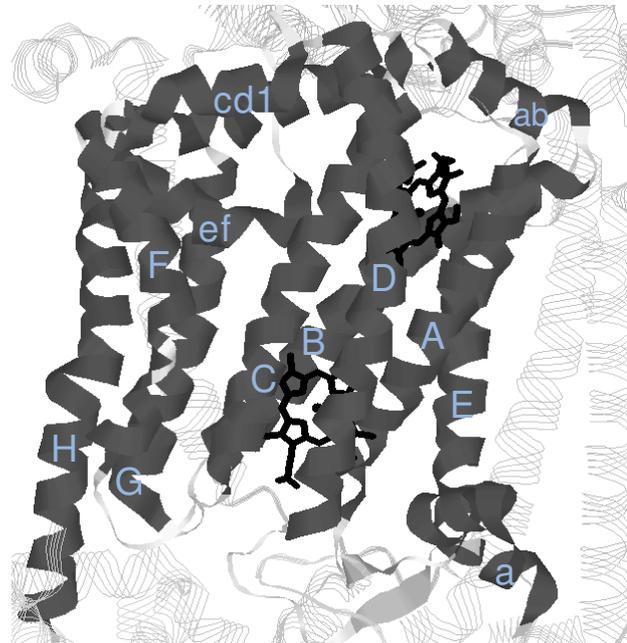


Abbildung 2-8

Anordnung und Bezeichnung der Transmembranhelices der Cytochrom *b*-Untereinheit. Die Häme b_L und b_H sind schwarz eingezeichnet (nach Hunte *et al.* 2000, PDB-Eintrag 1EZV).

Häm b_H gebunden. Ihre Stabilisierung erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Met221 und dem Propionat A (vgl. Abb. 2-16) des Häm b_H und polare Wechselwirkungen der Carbonylgruppen mit His202, Asp229 und Ser206 (*Hunte 2001*). Die Ebenen von Chinon- und Häm b_H -Phorphyrinring bilden einen Winkel von ca. 90° zueinander.

Die Q_o -Bindestelle ist weniger gut charakterisiert, da in keiner der bekannten Kristallstrukturen gebundenes Ubichinol gefunden werden konnte. Die Informationen über die Q_o -Bindestelle resultieren aus Studien mit gebundenen Inhibitoren (*Kim et al. 1998, Zhang et al. 1998, Hunte et al. 2000*). Danach befindet sie sich an der Kontaktstelle zwischen Cytochrom b und dem Rieske-Protein und wird aus dem C-terminalen Ende der Helix C , Teilen der Linker-Regionen $cd1$ und ef sowie Bereichen vom Ende der Helices E und F gebildet. Diese Elemente bilden eine Tasche, die eine gegabelte Struktur aufweist. Es entstehen dadurch zwei Domänen, in denen Inhibitoren verschiedener Klassen spezifisch binden können (Kapitel 2.1.3.2). Eine proximale Domäne ist in der Nähe des Häm b_L lokalisiert, die distale Domäne zeigt in Richtung des Eisen-Schwefel-Zentrums. Durch Mutagenese-Studien wurden Aminosäurereste identifiziert, die in die Ubichinol-Oxidation bzw. -Bindung involviert sind. Der ef -Loop scheint dabei eine besondere Bedeutung zu haben. Er enthält an den Positionen 271-274 die in allen mitochondrialen und vielen bakteriellen Systemen konservierte Aminosäuresequenz PEWY. Eine Zusammenstellung untersuchter Mutanten der Cyt b -Untereinheit findet sich bei Degli-Esposti et al (1993).

Direkter Nachbar des Cytochrom b ist das Rieske-Protein (Abb. 2-9, rot markiert). Diese Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 20.1 kDa und besteht aus 185 Aminosäuren. Eine kompakte extrinsische Domäne befindet sich im Intermembranraum. Sie besteht aus drei Schichten antiparalleler β -Faltblätter, die eine relativ starre Sandwichstruktur bilden. Das Eisen-Schwefel-Zentrum befindet sich an der Peripherie der Untereinheit und wird von den Aminosäuren Cys159, His161, Cys178 und His181 koordiniert. Weitere zwei Cysteine, Cys164 und Cys180, bilden Disulfid-Brücken zur Stabilisierung. Ein flexibler Linkerbereich verbindet die extrinsische Domäne mit einer Transmembranhelix, die als Anker dient. Das Eisen-Schwefel-Protein $[2Fe-2S]^*$ des einen Monomers (vgl. Abb. 2-7) ist assoziiert mit Cytochrom b und c_1 des zweiten Monomers (*Hunte 2001*). Ohne die Dimerisierung des Komplexes ist das Protein nicht funktionsfähig (*de Vries 1986*).

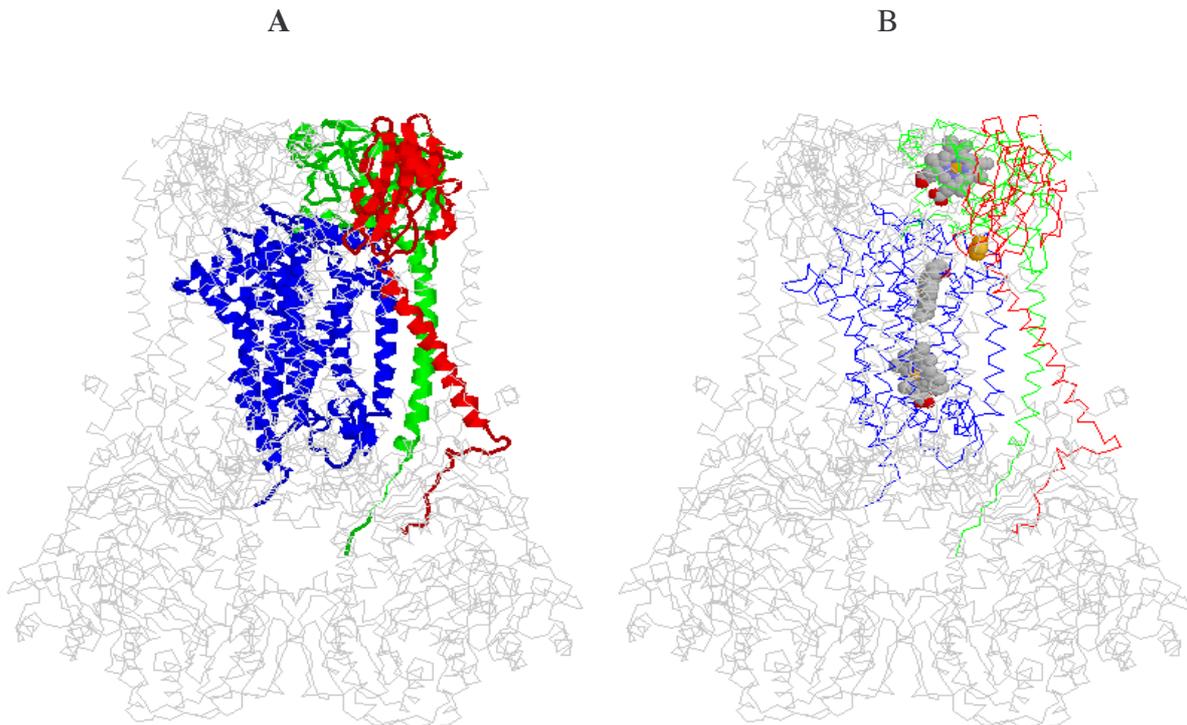


Abbildung 2-9

Lage der katalytischen Untereinheiten und Kofaktoren eines Monomers des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* (Abbildung erstellt mit RASMOL, PDB-Eintrag 1KYO). A: Lage der katalytischen Untereinheiten Cytochrom b (blau), Cytochrom c_1 (grün), Rieske-Protein (rot). B: Lage der Kofaktoren: Häm c , [2Fe-2S]-Zentrum (gelb), Häm b_L , Häm b_H (von oben nach unten).

In Kristallstrukturen von bc_1 -Komplexen, die unter unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen erhalten wurden, zeigen sich verschiedene Extrempositionen der extrinsischen Domäne. Während in nativen Kristallen häufig eine Cytochrom c_1 -nahe sogenannte c -Position auftritt, zeigen mit Stigmatellin inhibierte Komplexe ein Rieske-Protein, das an Cytochrom b fixiert ist (b -Position). In c -Position ist ein schneller Elektronentransfer zum Cyt c_1 möglich, während der Abstand des [2Fe-2S]-Zentrums zum Eisenatom des Häm b_L dafür zu groß wäre. In b -Position ist ein Transfer von b_L zum Rieske-Protein dagegen denkbar (Crofts *et al.* 1999*b,c*). Zhang *et al.* (1998) postulierten daher, daß sich die Domäne während des katalytischen Zyklusses zwischen beiden Extrempositionen bewegt.

Die Cytochrom c_1 -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 27.8Å und besteht aus 249 Aminosäuren. Die Sekundärstruktur (Abb. 2-9, grün markiert) setzt sich zusammen aus sieben α -Helices und zwei β -Faltblättern. Auch diese Untereinheit befindet sich im Intermembranraum und ist durch eine α -Helix in der Membran fixiert. Das Häm c ist über

Thioetherbrücken mit Cys101 und Cys104 kovalent an das Protein gebunden. Axiale Liganden des Eisens sind His105 und Met225. An Cytochrom c_1 bindet der Elektronencarrier Cytochrom c (Lange *et al.* 2002), der die durch den bc_1 -Komplex transferierten Elektronen übernimmt und an Komplex IV der Atmungskette, die Cytochrom c Oxidase (siehe Kapitel 2.1.1), weitergibt.

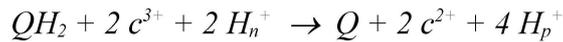
Die übrigen sieben Untereinheiten des Hefe bc_1 -Komplexes tragen nicht zur katalytischen Funktion bei und sollen nur kurz erwähnt werden. Die größten dieser Untereinheiten sind die sogenannten Core-Proteine COR1 und QCR2 mit 47.4 und 38.7 kDa Molekulargewicht. Sie befinden sich außerhalb der Membran in der mitochondrialen Matrix. Sie bestehen aus einer Reihe von β -Faltblättern, die umgeben von α -Helices sind. Untereinheit QCR6 hat ein Molekulargewicht von 14.5 kDa und befindet sich an der Intermembranseite des Proteins. Sie dient wahrscheinlich der Verbesserung der Bindung von Cytochrom c an Cytochrom c_1 (Hunte *et al.* 2000, Lange *et al.* 2002). Untereinheit QCR7 mit einer Größe von 14.4 kDa liegt an der Matrixseite des bc_1 -Komplexes. Wie die Untereinheit QCR6 besteht sie hauptsächlich aus α -Helices. Über die Untereinheiten QCR8 und QCR9 ist wenig bekannt. Sie haben ein Molekulargewicht von 10.8 bzw. 7.3 kDa und verfügen über je eine Transmembranhelix. Die Untereinheit QCR10 fehlt in der Kristallstruktur und hat eine Molekularmasse von 8.8 kDa. Die homologe Untereinheit aus dem Rinderherz- bc_1 -Komplex formt eine Transmembranhelix, die an der Außenseite des Komplexes an die Helices des Rieske-Proteins und Untereinheit 10 (homolog zu QCR9) gebunden ist (Iwata *et al.* 1998).

2.1.4 Funktion des bc_1 -Komplexes

2.1.4.1 Der Q-Zyklus

Eine der Aufgaben des bc_1 -Komplexes in der Atmungskette ist die Weitergabe von Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c . Wie in der chemiosmotischen Hypothese (Mitchell 1961) postuliert, ist der Elektronentransfer gekoppelt an den Aufbau eines Protonengradienten über die Membran.

Die katalysierte Nettoreaktion des bc_1 -Komplexes wird durch Gleichung 2-1 beschrieben. QH_2 steht für Ubichinol, Q für Ubichinon, $c^{3+/2+}$ für Cytochrom c in oxidiert bzw. reduzierter Form und H^+ für Protonen. Die Indices n und p weisen auf die Lokalisation der Protonen hin (n : negative Membranseite (Matrix bzw. Cytoplasma), p : positive Membranseite (Intermembranraum bzw. Periplasma)).



Gleichung 2-1

Katalysierte Nettoreaktion des bc_1 -Komplexes

Die katalytische Reaktion des bc_1 -Komplexes wird durch den sogenannten Q-Zyklus beschrieben, der erstmals von Mitchell (*Mitchell 1975, 1976-Review Brandt 1994*) postuliert wurde. Er gilt sowohl für mitochondriale als auch bakterielle Komplexe (*Yang et al. 1988, Brandt 1994*). Der Q-Zyklus setzt die Existenz zweier unterschiedlicher Chinonbindestellen, Q_o und Q_i , voraus. Abb. 2-10 zeigt ein Schema des Q-Zyklus. Zur besseren Veranschaulichung ist die Lage der Kofaktoren in der Hefe-Struktur dargestellt. Das Rieseprotein befindet sich in b -Position zur Übernahme des Elektrons vom Ubichinol an der Q_o -Bindestelle.

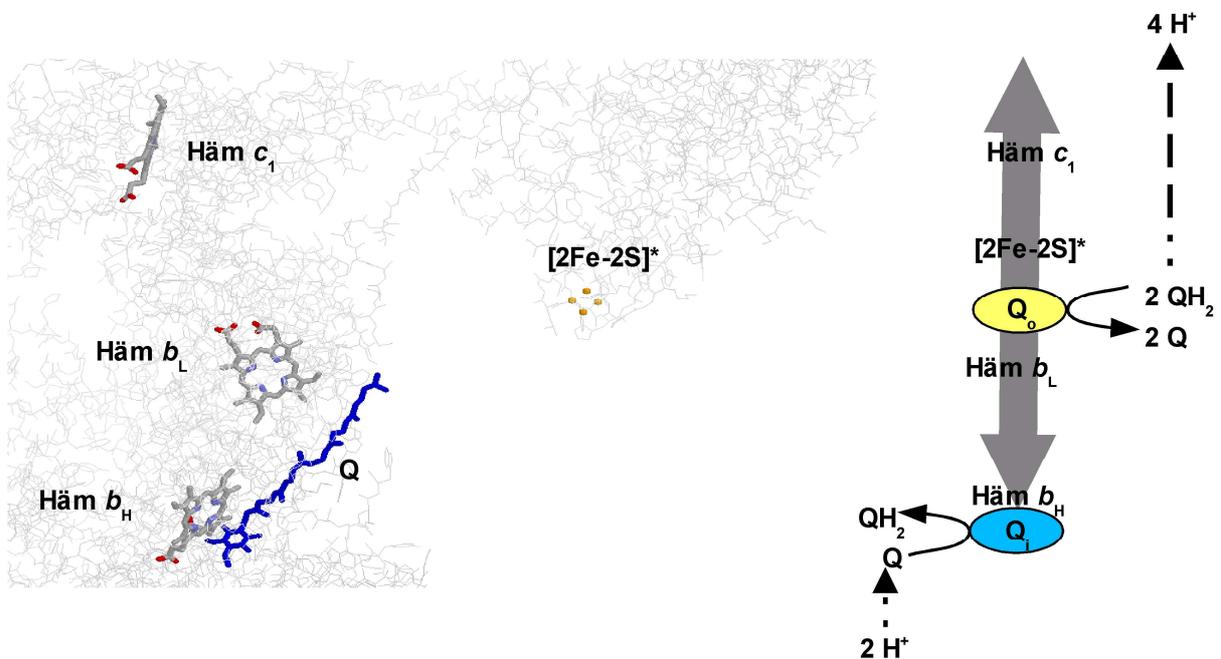


Abbildung 2-10

Q-Zyklus. Links: Lage der Kofaktoren im Enzym (PDB-Eintrag: 1EZV). Rechts: Gegabelter Elektronentransferweg (graue Pfeile). Ausgehend von der Q_o -Bindestelle wird ein Elektron über die Hochpotentialkette bestehend aus $[2Fe-2S]^*$ -Zentrum und Cyt c_1 zum Cyt c sowie ein Elektron über die Niedrigpotentialkette bestehend aus den beiden b -Hämen zum an der Q_i -Bindestelle gebundenen Ubichinon Q transferiert.

Ausgangspunkt der Elektronentransferreaktion ist ein an der Q_o -Bindestelle gebundenes Ubichinol (QH_2). Dieses wird unter Abgabe von zwei Protonen und zwei Elektronen zu Ubichinon (Q) oxidiert. Der Weg der beiden Elektronen gabelt sich. Ein Elektron wird über die sogenannte Hochpotentialkette¹ bestehend aus Eisen-Schwefel-Zentrum und Cytochrom c_1 transferiert und zur Reduktion von Cytochrom c verwendet. Das zweite Elektron gelangt über die Niedrigpotentialkette bestehend aus Häm b_L und Häm b_H zum Ubichinon an der Q_i -Bindestelle und reduziert dieses zu Ubisemichinon. In einem zweiten Durchlauf der Reaktion wird ein zweites Ubichinol an Q_o oxidiert. Das Ubisemichinon an Q_i wird dabei zu Ubichinol reduziert. Ubichinon und Ubichinol verlassen nach der Reaktion ihre Bindestellen in Richtung Chinonpool in der Membran.

Insgesamt werden zwei Cytochrom c -Moleküle reduziert, die die Elektronen an die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) weitergeben. Durch die Ubichinol-Oxidation werden vier Protonen in den Intermembranraum abgegeben, zwei Protonen werden zur Reduktion des Ubichinons aus der Matrix aufgenommen. Daraus resultiert die Ausbildung eines Protonengradienten über die Membran, der die ATP-Synthese und Transportprozesse in der Zelle antreibt.

Neben Fragen zur Energiekonservierung wird vor allem die Besetzung der Q_o -Bindestelle kontrovers diskutiert. Hauptstreitpunkt dabei ist, wieviele Moleküle dort gleichzeitig gebunden sind. Zwei unterschiedliche Modelle bilden die Grundlage für alle bisher vorgeschlagenen Mechanismen (*Crofts & Wang 1989; Brandt & v. Jagow 1991; Ding et al. 1992, Brandt 1996; Link 1997*). Das *single-occupancy*-Modell (*Crofts & Wang 1989*) geht von einem einzelnen Ubichinol-Molekül aus, das in der distalen Domäne der Q_o -Bindestelle andockt. Auch der *proton-gated affinity change*-Mechanismus (*Link 1997*) erklärt die Chinoloxidation mit nur einem an Q_o gebundenen Molekül und geht dabei von der Bildung eines stabilen Ubisemichinons aus. Dessen Existenz konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (*Crofts & Wang 1989, Jünemann et al. 1998*). Das *double-occupancy*-Modell (*Ding et al. 1992*) postuliert zwei gebundene Chinole, die nacheinander oxidiert werden. Das in der distalen Domäne befindliche Molekül soll dabei stärker gebunden sein als das in der proximalen Domäne. Das schwach gebundene Chinol ist leicht austauschbar und könnte der Kopplung an den Chinonpool dienen. Darauf aufbauend wurde das *proton-gated charge*

1 Die Bezeichnung orientiert sich am Redoxpotential der prosthetischen Gruppen.

transfer-Modell (Brandt 1996) entwickelt. Es beinhaltet die Bildung eines Doppelsemichinons nach Elektronentransfer zwischen beiden Molekülen und anschließender Symproportion des Chinonpaares. Obwohl neuere Studien (Bartoschek et al. 2001) die spezifische Bindung von drei Ubichinon-Molekülen bestätigen, ist noch umstritten, wieviele Ubichinon-Moleküle tatsächlich während der katalytischen Reaktion am Komplex gebunden sind und welches der Modelle Gültigkeit besitzt.

2.1.4.2 Hemmung der katalytischen Funktion durch Inhibitoren

Grundlage zur Aufstellung und Bestätigung des Q-Zyklus-Modells waren Inhibitorstudien (Zusammenfassungen in Brandt & Trumpower 1994, Crofts et al. 1999a und Berry et al. 2000a). Abgeleitet von den beiden Chinonbindestellen unterscheidet man Q_o - und Q_i -Inhibitoren. Die Eigenschaften einiger für diese Arbeit bedeutsamer Inhibitoren sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

Antimycin A ist ein Q_i -Inhibitor, der in der Nähe des Häm b_H bindet (Berden & Slater 1972, Slater 1973), wobei die Bindestellen von Inhibitor und Chinon stark überlappen, aber nicht identisch sind. Die Antimycinbindung führt abgesehen von kleineren lokalen Verschiebungen nicht zu Veränderungen der Gesamtstruktur des Komplexes (Kim et al. 1998). Seine inhibitorische Wirkung entsteht durch Blockade des Elektronentransfers von Häm b_H zum Ubichinon. Die Komponenten der Niedrigpotentialkette werden dabei reduziert und stehen nicht mehr als Akzeptor für das Elektron des zweiten Ubichinols zur Verfügung. Die b -Häme der Hochpotentialkette dagegen bleiben oxidiert, obwohl sie in der Lage wären Elektronen aufzunehmen. Dieser Effekt lieferte erste Hinweise auf einen gegabelten Elektronentransferweg und zeigt, daß dieser obligatorisch ist. Die Blockade nur eines Teilweges führt dazu, daß der Q-Zyklus nicht vollständig durchlaufen werden kann. Antimycin hemmt die Reoxidation des Häm b_H (Yang & Trumpower 1988) und verstärkt damit die Reduktion des Cytochrom b . Diese Reaktion ist bekannt als sogenannte *oxidant induced reduction* (Wikström & Berden 1972) und besagt, daß die Cytochrom b -Reduktion durch Zugabe eines Oxidationsmittels ausgelöst werden kann. Ihre Beobachtung war ein weiterer wichtiger Schritt zur Formulierung des Q-Zyklus.

Verschiedene Studien zeigten, daß es unterschiedliche Wege zur Cytochrom *b*-Reduktion gibt (vgl. Brandt 1994). Unter bestimmten experimentellen Bedingungen läßt sich Cytochrom *b* trotz der Zugabe von Antimycin reduzieren. Um dies zu verhindern, ist ein weiterer Inhibitor notwendig, der die Q_o-Bindestelle blockiert (*double kill*-Experiment). Q_o-Inhibitoren unterbinden den Elektronentransfer von Ubichinol zum Rieske-Protein und verhindern damit auch die Reduktion von Cytochrom *c*₁. Sie lassen sich anhand von Struktur- und Bindemerkmale unterteilen in Träger von: (1) Methoxyacrylat-Gruppen (MOA-Stilben, Myxothiazol), (2) Hydroxychinongruppen (HDBT, Hydroxydioxobenzothiazol und Derivate) und (3) Chromongruppen (Stigmatellin). Die Klasse der MOA-Typ-Inhibitoren bindet in der proximalen Domäne der gegabelten Q_o-Bindetasche des Häm *b*_L. Das Rieske-Protein wird nur wenig beeinflußt und befindet sich in einer der nativen Struktur ähnlichen Position nahe des Cytochrom *c*₁ (Xia et al. 1997). Die Abkömmlinge des HDBT dagegen binden in der distalen Domäne der Q_o-Bindetasche, wodurch es zu Strukturveränderung im Komplex kommt. Das Rieske-Protein wird in *b*-Position in unmittelbarer Nähe der Cytochrom *b*-Untereinheit fixiert (Zhang et al. 1998, Kim et al. 1998) und sein Mittelpunktspotential stark erhöht (Ohnishi et al. 1988, von Jagow & Ohnishi 1985). Ähnliche Effekte zieht die Bindung von Stigmatellin nach sich, allerdings überlappt seine Bindedomäne sowohl mit Teilen des distalen als auch des proximalen Teils der Q_o-Bindestelle (Kim et al. 1998), wobei die Kopfgruppe im distalen Bereich lokalisiert ist.

Neben den bereits bekannten Inhibitoren konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere, neue Inhibitoren eingesetzt werden, das Antibiotikum UK-2 und Methoxyiminoacetamid (MIA). UK-2 wurde erstmals von Ueki et al. (1996) isoliert und wird als Struktur analogon zum Q_i-Inhibitor Antimycin beschrieben. MIA wurde von einem in der Landwirtschaft eingesetzten Fungizid abgeleitet (H. Miyoshi, Universität Kyoto, persönliche Mitteilung) und soll MOA-Stilben-ähnliche Eigenschaften besitzen. Auf beide Substanzen wird in Kapitel 4 näher eingegangen.

2.1.5 Verwandte Proteine

2.1.5.1 Der b_6f -Komplex

Der b_6f -Komplex findet sich in der Thylakoidmembran von Chloroplasten und Cyanobakterien und bildet das Gegenstück zum bc_1 -Komplex in der photosynthetischen Elektronentransportkette. In ihr werden Elektronen vom Photosystem II über den b_6f -Komplex zum Photosystem I transferiert. Statt Ubichinol wird dabei Plastochinol als mobiler Elektronencarrier verwendet. An die Stelle des Cytochrom c tritt Plastocyanin. Auch hier ist der Elektronentransfer gekoppelt an eine Protonentranslokation über die Membran. Der b_6f -Komplex arbeitet nach dem Q-Zyklus-Prinzip, unterscheidet sich aber teilweise in Art und Aufbau seiner Untereinheiten vom bc_1 -Komplex. Er besteht aus drei katalytischen Untereinheiten (Cytochrom b_6 , Cytochrom f , Rieske-Protein), enthält zwei zusätzliche prosthetische Gruppen (Chlorophyll A und β -Karotin) und je nach Organismus weitere nichtkatalytische Untereinheiten (*Details und Ref. in Soriano et al. 1999 und Breyton 2000*).

Die Cytochrom b_6 -Untereinheit besteht aus zwei Polypeptiden, von denen eine vier Transmembranhelices (A-D) enthält. Im Helixbündel sind zwei b -Häme gebunden. Sie unterscheiden sich spektroskopisch nicht so stark voneinander wie die des bc_1 -Komplexes (*Degli-Espost et al. 1993*). Das zweite Polypeptid ist ein sekundäres Genprodukt des Cyt b -Gens und enthält die Helices E-G. Die Aminosäuresequenz von Cyt b_6 ist wesentlich kürzer als die entsprechenden Cyt b -Sequenz des bc_1 -Komplexes. Trotzdem finden sich besonders im Bereich der Helices und der Q_0 -Bindestelle Homologien. Die Q_0 -Bindestelle kann mit Stigmatellin oder MOA-Stilben blockiert werden, während für Antimycin an der Q_I -Bindestelle keine inhibitorische Wirkung gefunden werden konnte.

Vergleiche der Kristallstrukturen der Rieske-Proteine aus Rinderherz-Mitochondrien und Spinat-Chloroplasten (*Carrell et al. 1997*) zeigen große Übereinstimmungen. Die extrinsische Domäne des b_6f -Rieske-Proteins ist wahrscheinlich auch beweglich (*Breyton 2000*).

Die einzige katalytische Untereinheit, die weder große Sequenz- noch Strukturhomologien zum bc_1 -Komplex aufweist, ist das Cytochrom f . Nur das Bindemotiv CXXCH für das c -Typ

Häm ist identisch, während sich die Ligandierung des Häms unterscheidet. Die Kristallstruktur des Cytochrom *f* (Martinez et al. 1994) zeigt statt des Liganden Methionin in Cytochrom *c*₁ einen Stickstoffliganden. Meist ist dies ein Tyrosinrest, der sich am N-terminalen Ende des Proteins befindet (vgl. Soriano et al. 1999).

Aus Pflanzen und Algen wird der *b₆f*-Komplex als aktiver Dimer isoliert, während aus Cyanobakterien Monomere bekannt sind. Diese sind aber inaktiv und besitzen weder Rieske-Protein noch das Chlorophyll-Molekül. Bisher existieren nur die Kristallstrukturen der wasserlöslichen Fragmente der Cytochrom *f*-Untereinheit aus Steckrüben und *Phormidium laminosum* (Martinez et al. 1994, Carrell et al. 1999) und des Rieske-Proteins aus Spinat-Chloroplasten (Carrell et al. 1997). Die Struktur des Gesamtkomplexes wurde mittels zweidimensionaler Kristalle aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Breyton 2000) untersucht. 3D-Strukturen existieren noch nicht.

2.2 Elektrochemie

Methoden, die auf der klassischen Elektrochemie basieren, können auch zur Untersuchung redoxaktiver Proteine eingesetzt werden. Zur Charakterisierung der verschiedenen Redoxzustände eines Proteins muß es dazu in den entsprechenden Zustand versetzt werden. Dies ist u.a. möglich, indem man elektrochemisch ein Potential aufprägt. Durch Veränderung des angelegten Potentials kann ein Wechsel des Redoxzustandes des gesamten Proteins oder einzelner Kofaktoren erzwungen werden. Die durch die Redoxreaktion auftretenden Veränderungen im Protein können spektroskopisch verfolgt werden und lassen Rückschlüsse auf dessen Funktionsmechanismus zu.

Ausgangspunkt der klassischen Elektrochemie ist eine Elektrolytlösung, die freibewegliche Ionen enthält. Wird eine Metall-Elektrode in die Lösung getaucht, erhält man ein Redoxsystem. Durch Eintauchen einer zweiten Elektrode in die Elektrolytlösung, erhält man eine sogenannte elektrochemische Halbzelle. Beim Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden fließt ein Strom in der Lösung. Der Ladungstransport innerhalb der Elektrolytlösung wird durch Ionen bewerkstelligt, während im Elektrodeninneren Elektronen dafür verantwortlich sind.

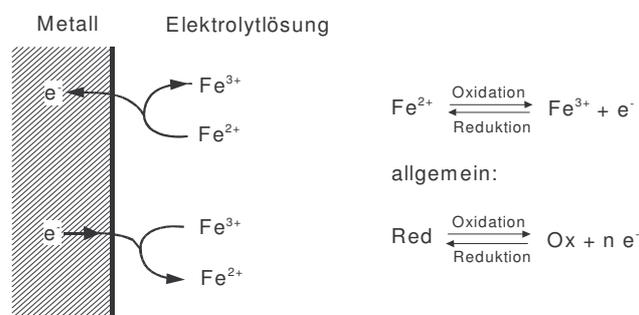


Abbildung 2-11

Reaktionen des Fe^{2+}/Fe^{3+} -Redoxpaares an einer Metallelektrode (nach Adam et al. 1995)

An der Grenzfläche Elektrode/Lösung erfolgt durch Reduktion bzw. Oxidation der Ionen in der Elektrolytlösung der Übergang vom elektronischen zum ionischen Leitungsmechanismus. Abb. 2-11 zeigt die Vorgänge an einer Elektrode am Beispiel des Redoxpaares Fe^{2+}/Fe^{3+} , das in Cytochromen vorkommt.

An besagter Grenzfläche zwischen Elektrode und Lösung tritt das sogenannte Halbzellenpotential oder Redoxpotential auf. Es wird durch die Nernstsche Gleichung beschrieben und ist charakteristisch für die verwendete Metall/Elektrolytkombination.

Gleichung 2-2

$$E_h = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{oxidiert}}}{a_{\text{reduziert}}}$$

Nernstsche Gleichung zur Beschreibung des Redoxpotentials einer Halbzelle. E_h : Redoxpotential, E^0 : Standardpotential, T: Temperatur
R: allgemeine Gaskonstante, z: Anzahl der übertragenen Elektronen,
F: Faraday-Konstante, a_{oxidiert} , $a_{\text{reduziert}}$: Aktivität der oxidierten bzw. reduzierten Spezies

Das Standardpotential E^0 (auch Mittelpunktspotential) einer redoxaktiven Spezies erhält man, wenn die Aktivitäten der reduzierten und oxidierten Spezies gleich sind und die Reaktion unter Standardbedingungen (T=298K, p=1hPa) abläuft.

Das Redoxpotential einer Halbzelle kann nur im Vergleich mit einer zweiten Halbzelle bestimmt werden. Man mißt dazu die Potentialdifferenz zwischen den beiden Halbzellen und setzt das Potential der zweiten Zelle per Definition auf Null (Referenzelektrode). Als Bezugssystem wurde die Normalwasserstoffelektrode (NHE) festgelegt. Sie besteht aus Platinblech, das in eine ein-molare Säurelösung getaucht und mit Wasserstoff unter Normaldruck umspült wird. Da die NHE korrosiv und explosiv wirkt, wird sie in der Praxis kaum eingesetzt. Stattdessen werden Referenzelektroden wie die Silber/Silberchlorid- oder die Kalomel-Elektrode verwendet, deren Potential gegenüber der Normalwasserstoffelektrode bekannt ist. Durch Addition des gemessenen zum Referenzpotential erhält man das Potential des untersuchten Redoxpaares gegenüber NHE.

Eine elektrochemische Zelle kann wie oben beschrieben zur Bestimmung des Potentials eines Redoxpaares genutzt werden. Umgekehrt ist es aber auch denkbar, dem Redoxpaar der Halbzelle ein externes Potential aufzuprägen. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen ist es so möglich, ein Protein von außen zu oxidieren oder zu reduzieren: Dies bringt einen großen Vorteil gegenüber der chemischen Oxidation bzw. Reduktion. Zum einen ist die Einstellung von Zwischenzuständen möglich, zum anderen ist die Reaktion reversibel. Dazu ist es erforderlich, daß zwischen der Referenz- und der sogenannten Arbeitselektrode keine oder nur sehr kleine Ströme fließen. Ansonsten kommt es zur Ausbildung einer Überspannung an der

Gegenelektrode. Hohe Ströme können außerdem die Referenzelektrode zerstören und zu einem Ohmschen Spannungsabfall (resultierend aus dem Widerstand der Elektrolytlösung) in der Zelle führen. Beide Effekte verfälschen das Meßergebnis. Das Problem kann durch die Einführung einer dritten Elektrode, der Gegenelektrode, gelöst werden und führt zur Drei-Elektrodenanordnung in Abb. 2-12 (Heinze 1984). Strom $I(t)$ fließt nur zwischen Arbeits- und Gegenelektrode. Das Potential in der Elektrolytlösung $E(t)$ kann zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode nahezu stromlos bestimmt werden, da diese einen hohen Innenwiderstand besitzt.

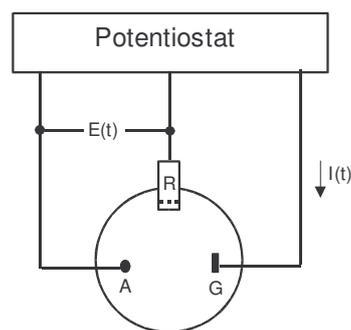


Abbildung 2-12

Drei-Elektrodenanordnung. Gegenelektrode (G), Arbeitselektrode (A), Referenzelektrode (R)

Wie bereits erwähnt, lassen sich auch Proteine mit redoxaktiven Gruppen elektrochemisch untersuchen. Hierbei ergeben sich einige Probleme. Proteine adsorbieren in der Regel an den Metalloberflächen der Elektroden und denaturieren dadurch. Eine reversible Elektrodenreaktion ist dann nicht mehr gewährleistet. Um einen direkten Kontakt des Proteins mit der Arbeitselektrode zu vermeiden, wird diese deshalb mit einer "Schutzschicht" belegt. Es werden Substanzen verwendet, die am Metall adsorbieren und gleichzeitig einen Kontakt mit dem Protein eingehen können. Sie werden „Modifier“ genannt und müssen spezifisch an das zu untersuchende Protein angepaßt werden (siehe Kapitel 3.2.2).

Ein weiteres Problem ist die Größe der Proteine. Der Ladungstransfer zwischen Elektrode und Protein verläuft mit zunehmender Größe immer langsamer. Oft liegen die redoxaktiven Kofaktoren auch im Inneren des Proteins und sind somit schlecht erreichbar. Beide Probleme können durch den Einsatz von Mediatoren gelöst werden. Das sind kleine, redoxaktive Moleküle. Sie diffundieren in Bindungsstellen und Einbuchtungen des Proteins und ermöglichen so einen schnellen Elektronentransfer zu den Kofaktoren. Im allgemeinen verwendet man mehrere Mediatoren in einer Mischung (Kapitel 3.2.3)

2.3 Spektroskopie

2.3.1 UV/VIS-Spektroskopie

Elektromagnetische Strahlung wird von Materie absorbiert und löst dort unterschiedliche Reaktionen aus. Die Art der Reaktion ist abhängig von der Energie der elektromagnetischen Strahlung, die über Gleichung 2-3 an Wellenlänge und Frequenz gekoppelt ist.

$$E = h \frac{c}{\lambda} = h \cdot \nu$$

Gleichung 2-3

Zusammenhang zwischen Energie E , Wellenlänge λ und Frequenz ν elektromagnetischer Strahlung; h : Plancksches Wirkungsquantum, c : Lichtgeschwindigkeit

Untersuchungsbereich der UV/VIS-Spektroskopie ist der Spektralbereich von 180 bis 800 nm. Strahlung dieses Spektralbereiches führt zur Anregung elektronischer Übergänge zwischen den Energieniveaus des bestrahlten Moleküls. Dabei werden Elektronen vom Grundzustand in angeregte Zustände angehoben. Die Energie des absorbierten Lichtquants entspricht der Energiedifferenz zwischen den am Übergang beteiligten Energieniveaus. Die Klassifizierung der Übergänge erfolgt nach den beteiligten Molekülorbitalen. Man unterscheidet im Grundzustand bindende σ - und π -Orbitale sowie nichtbindende, mit freien Elektronenpaaren besetzte n -Orbitale. Der Übergang erfolgt in leere antibindende σ^* - und π^* -Orbitale. Bei Biomolekülen sind vor allem $\pi \rightarrow \pi^*$ - und $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge von Interesse, die Hämgruppen der Cytochrome zeigen charakteristische $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge zwischen den Orbitalen des Porphyringerüsts.

Eine weitere mögliche Klassifizierung der Übergänge erfolgt anhand der Spinorientierung der Elektronen. Im Grundzustand liegen Elektronen in bindenden Orbitalen gepaart mit antiparalleler Spinorientierung vor. Dies wird als Singulett S_0 -Zustand bezeichnet. Während des Absorptionsprozesses kann die Spinorientierung erhalten bleiben (S_1, S_2, \dots), es kann aber auch zur Spinumkehr kommen. Man erhält dann einen Triplettzustand (T_1, T_2, \dots).

Für diese Arbeit bedeutsam sind die Absorptionen der Hämgruppen. Reduzierte Cytochrome gehen bei Anregung vom Grundzustand S_0 in die Zustände S_1, S_2 und S_3 über, was zu drei

typischen Absorptionsbanden führt: der Soretbande ($S_0 \rightarrow S_3$), $\beta(S_0 \rightarrow S_2)$ - und der α -Bande ($S_0 \rightarrow S_1$). Die Position der α -Bande ist charakteristisch für den Häm-Typ des jeweiligen Cytochroms. Tabelle 2-1 zeigt eine Zusammenstellung der Positionen der α -Bande der Hämgruppen im bc_1 -Komplex.

Häm	Positionen der α -Bande	Tabelle 2-1 Positionen der α -Bande der Hämgruppen der reduzierten Cytochrome des bc_1 -Komplexes
c_1	553 nm	
b_H	559-560 nm	
b_L	559-560 und 566 nm	

Zur spektroskopischen Untersuchung von Proteinen werden diese in eine geeignete Meßzelle gebracht und bei einer festgelegten Wellenlänge vermessen. Das Protein absorbiert dabei charakteristisch einen bestimmten Anteil des eingestrahnten Lichtes. Das Absorptionsverhalten wird durch die Extinktion ausgedrückt, die durch das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 2-4) beschrieben wird. Sie ist abhängig von der Proteinkonzentration, der Schichtdicke der Meßzelle und einer wellenlängenabhängigen, substanzspezifischen Konstante, dem Extinktionskoeffizienten ϵ .

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2-4

Lambert-Beersches Gesetz. E: Extinktion, I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes, I: Intensität des austretenden Lichtes, c: Konzentration [mol/l], ϵ : Extinktionskoeffizient [l/mol cm], d: Schichtdicke [cm]

Das Absorptionsspektrum erhält man durch die Bestimmung der Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen über einen zusammenhängenden Wellenlängenbereich.

2.3.2 Infrarotspektroskopie

An den sichtbaren Spektralbereich schließt sich der Bereich des Infraroten an. Er umfaßt Wellenlängen von 800 bis 50000 nm, die sich in nahes (800-2500 nm), mittleres (2500-40000 nm) und fernes Infrarot (40000-50000 nm) unterteilen lassen. Statt der Wellenlänge λ wird zur Beschreibung der IR-Strahlung häufig die zur Frequenz proportionale Wellenzahl $\tilde{\nu}$ benutzt, die als Reziprokwert von ν definiert ist und in der Einheit cm^{-1} angegeben wird.

Durch Infrarotstrahlung werden Moleküle und Molekülgruppen zum Schwingen angeregt. Die Absorption der IR-Strahlung erfolgt über Wechselwirkungen mit dem sich ändernden Dipolmoment der Schwingung. Im Spektrum wird die Absorption als Bande sichtbar, die charakterisiert ist durch Wellenzahl und Intensität. Die Wellenzahl bzw. Schwingungsfrequenz einer Normalschwingung (Übergang vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand) ist abhängig von der Stärke der Bindung der Schwingungspartner und deren effektiver Masse (Gleichung 2-5). Die Bindungsstärke kann durch Wechselwirkungen mit benachbarten Atomen oder Gruppen verändert werden. Auf diese Weise lassen sich u.a. veränderte Wasserstoffbrückenbindungen detektieren. Die Abhängigkeit der Frequenz von der effektiven Masse der schwingenden Atome wird bei Isotopen-Experimenten (H/D-Austausch) ausgenutzt. Großen Einfluß auf die Frequenzverschiebung haben auch die lokale Umgebung der beteiligten Atome und Kopplungen mit anderen Molekülschwingungen, die zu starken Abweichungen von der berechneten Frequenz führen können.

$$\nu \sim \tilde{\nu} \sim \sqrt{\frac{f}{\mu}} \quad \text{mit} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{(m_1 + m_2)}$$

Gleichung 2-5

Abhängigkeit der Schwingungsfrequenz ν und der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ einer Schwingung von der Kraftkonstante f der Bindung und der reduzierten Masse μ , berechnet aus den Massen m_1 und m_2 der schwingenden Atome

Die Intensität einer Absorptionsbande ist proportional zum Quadrat der Dipolmomentsänderung im Gleichgewichtszustand. Das bedeutet auch, daß eine Schwingung nur dann IR-aktiv ist, wenn sich das Dipolmoment des Moleküls während der Schwingung periodisch ändert.

Die Klassifizierung von Normalschwingungen erfolgt in zwei Untergruppen. Nach der Schwingungsform unterscheidet man Valenz- oder Streckerschwingungen (ν), bei denen sich die Bindungslänge ändert und Deformations-(Beuge)schwingungen (δ), bei denen der Bindungswinkel variiert. Nach dem Symmetrieverhalten werden symmetrische, antisymmetrische und entartete Schwingungen unterschieden.

Daneben existieren noch Oberschwingungen, die beim Übergang in höhere Energieniveaus auftreten. Weisen eine Oberschwingung und eine Normalschwingung aus unterschiedlichen Schwingungen zufällig die gleiche Frequenz auf (Entartung), kommt es zur Fermi-Resonanz.

Die Bande spaltet auf und bildet ein charakteristisches Dublett. Oberschwingungen zeigen meist nur geringe Intensitäten.

2.3.3 FTIR-Spektroskopie

Für Experimente an biologischen Proben sind Aufnahmegeschwindigkeit und Auflösungsvermögen dispersiver Spektrometer oft nicht ausreichend. Abhilfe kann hier der Einsatz eines Fourier-Transform-IR-Spektrometers (FTIR-Spektrometer) schaffen. Anstelle eines Monochromators steht das Interferometer als wichtigste optische Komponente. Am gebräuchlichsten sind sogenannte Michelson-Interferometer, deren schematischer Aufbau in Abb. 2-13 dargestellt ist. Hauptbestandteile sind ein feststehender, ein beweglicher Spiegel und ein halbdurchlässiger Strahlteiler.

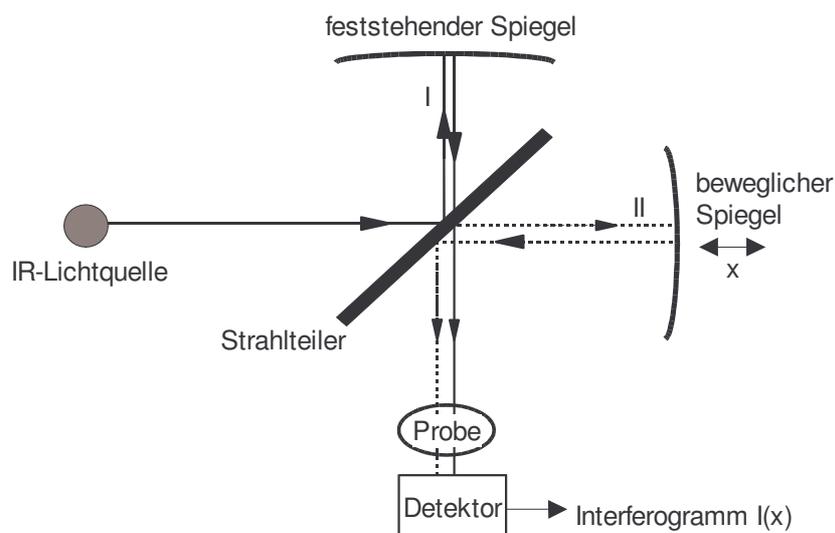


Abbildung 2-13

Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers

Das gesamte polychromatische Licht der Infrarotquelle wird beim Auftreffen auf den Strahlteiler in zwei Teilstrahlen (I, II) gleicher Intensität aufgespaltet. Der reflektierte Teilstrahl (I) trifft auf den feststehenden Spiegel und wird von dort zurückreflektiert in Richtung Strahlteiler und Detektor (durchgezogene Linie, siehe Abbildung). Teilstrahl II tritt durch den Strahlteiler und trifft auf den beweglichen Spiegel (gestrichelte Linie). Beim

Zurückreflektieren erhält er durch die Bewegung des Spiegels eine Phasenverschiebung gegenüber dem ersten Teilstrahl. Am Strahlteiler vereinigen sich die beiden Teilstrahlen wieder und interferieren miteinander (zur besseren Veranschaulichung der beiden Teilstrahlen sind diese in Abb. 2-13 getrennt gezeichnet). Die resultierende Strahlintensität wird in Abhängigkeit von der Spiegelposition des beweglichen Spiegels vom Detektor registriert und liefert das sogenannte Interferogramm. Die Spiegelposition kann mit Hilfe eines HeNe-Lasers sehr genau bestimmt werden. Seine monochromatische Strahlung ($\lambda = 633 \text{ nm}$) wird parallel zur IR-Strahlung in das Interferometer eingekoppelt und liefert ein kosinusförmiges Interferogramm. Aus seinen Nulldurchgängen läßt sich die Spiegelposition berechnen. Ein IR-Interferogramm läßt sich aufgrund des begrenzten Spiegelweges nicht kontinuierlich aufnehmen, die Signalintensität muß punktuell abgetastet werden. Als Triggersignal für die Datenaufnahme können die Nulldurchgänge des Laserinterferogramms verwendet werden. In älteren Spektrometern wird die Aufnahme des IR-Interferogramms über ein sogenanntes Weißlichtsignal gesteuert. Ein vorgelagertes Weißlichtinterferogramm legt den Meßbeginn auf den Zeitpunkt fest, an dem der optische Weg der beiden Interferometerspiegel gleich lang ist (Weißlichtposition). Dadurch sind die Teilstrahlen phasengleich und interferieren positiv, die Interferogramm-Intensität wird maximal.

Jeder Meßpunkt eines Interferogramms enthält Informationen über alle Frequenzen des vermessenen Spektralbereichs. Im IR-Spektrum dagegen interessiert die Abhängigkeit der Signalintensität von jeder einzelnen Frequenz. Dazu wird das Interferogramm einer Fouriertransformation unterzogen. Das Integral in Gleichung 2-6 liefert die mathematische Grundlage. Es zeigt auch, daß die Theorie der Fouriertransformation unendliche Spiegelwege voraussetzt. Da dies technisch nicht realisierbar ist, treten bei Umkehr der Spiegelbewegung Artefakte im berechneten IR-Spektrum auf. Sie können durch Multiplikation (Faltung) des Interferogramms mit einer sogenannten Apodisationsfunktion verringert werden. Gleichzeitig nimmt aber die Halbwertsbreite der berechneten Signale zu, während die spektrale Auflösung sinkt. Eine Verbesserung der Auflösung wird durch lange Spiegelwege und eine rechnerische Verlängerung des Interferogramms (Anfügen von Nullen - *zero filling*) erreicht.

$$I(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cdot \cos(2\pi \nu x) dx$$

Gleichung 2-6

Fourier-Integral zur Umwandlung der positionsabhängigen Signalintensität $I(x)$ des Interferogramms in die frequenzabhängige Signalintensität eines IR-Spektrums $I(\tilde{\nu})$; x Spiegelposition.

Gegenüber der dispersiven IR-Spektroskopie zeichnet sich die FTIR-Spektroskopie vor allem in drei Punkten aus: Der gesamte Spektralbereich kann gleichzeitig detektiert werden (*Multiplex-* oder *Fellget-Vorteil*), wodurch sich die Meßgeschwindigkeit erhöht. Der Lichtdurchsatz in einem FTIR-Spektrometer ist wesentlich höher als in dispersiven Spektrometern, da statt der strahllimitierenden Spalte kreisrunde "Jaquinot"-Blenden verwendet werden (*Durchsatz-* oder *Jaquinot-Vorteil*). Beide Effekte führen zur Verbesserung der Meßempfindlichkeit aufgrund eines besseren Signal/Rausch-Verhältnisses. Durch den Einsatz des HeNe-Lasers zur Bestimmung der Spiegelposition läßt sich eine hohe Wellenzahlgenauigkeit der FTIR-Spektrometer in der Größenordnung von besser als $0,1 \text{ cm}^{-1}$ erreichen (*Connes-Vorteil*).

2.3.4 Differenzspektroskopie

Absorptionsspektren enthalten eine große Anzahl überlappender Banden und werden für Proteine hauptsächlich zur Analyse der Sekundärstrukturanteile verwendet, indem die Region der Amid I-Bande analysiert wird (s.u.). Beiträge einzelner Molekülbestandteile oder durch Reaktionen im Molekül induzierte Absorptionsänderungen sind im Vergleich zur Gesamtintensität des Absorptionsspektrum zu gering, um noch detektierbar zu sein. Ausweg bietet die Differenzspektroskopie. Mit ihr ist es möglich, auch kleine Absorptionsänderungen zu verfolgen. Hintergrundabsorptionen sowie Beiträge von nicht an der Reaktion beteiligten Proteinbestandteilen, Puffern und Detergentien werden eliminiert.

In der Differenzspektroskopie werden zwei Absorptionsspektren unter Beachtung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 2-7) voneinander abgezogen. Bei der einfachsten Form eines Differenzspektrums wird das Spektrum eines Lösungsmittels vom Spektrum einer in dem Lösungsmittel gelösten Substanz subtrahiert. Man erhält so die Beiträge, die ausschließlich der Substanz zuzuordnen sind. Auch Proteine können untersucht werden,

indem man sie in unterschiedlichen Zuständen präpariert. Bei dieser Methode ist entscheidend, daß Meßparameter wie Schichtdicke der Probe, Probenkonzentration und Temperatur möglichst identisch sind.

$$\Delta E = E_1 - E_2 = \log \frac{I_0}{I_1} - \log \frac{I_0}{I_2} = \log \frac{I_2}{I_1}$$

Gleichung 2-7

Berechnung eines Differenzspektrums aus Absorptionsspektren, die unterschiedliche Zustände 1 und 2 einer Substanz repräsentieren

Komfortabler und exakter ist die reaktionsinduzierte Differenzspektroskopie. Die Proteinreaktion wird hierbei direkt in der Meßzelle ausgelöst, ohne daß die Probe ausgetauscht werden muß. Das Problem unterschiedlicher Meßparameter ist somit ausgeschaltet. Das Differenzspektrum zeigt nur Absorptionsbanden, die auf die Zustandsänderung des Proteins selbst zurückzuführen sind. Die Reaktion kann z.B. elektrochemisch oder durch Lichteinstrahlung von außen induziert werden. Elektrochemisch induzierte Differenzspektren erhält man, indem die Probe abwechselnd über Elektroden reduziert bzw. oxidiert wird. Die für beide Redoxzustände aufgenommenen Absorptionsspektren werden miteinander verrechnet. Diese Methode wird in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

2.3.5 Spektroskopie an Biomolekülen

Spektroskopie an Biomolekülen ist nicht nur hinsichtlich der technischen Umsetzung eine komplexe Aufgabe. Aufgrund der oft sehr großen Anzahl von Atomen in einem Protein ist die Interpretation der Spektren eine nicht triviale Herausforderung.

Jedes Protein besteht aus einer Abfolge von Aminosäuren, die jeweils eine Carboxy- und eine Aminogruppe und zusätzliche Seitenketten besitzen. Die Carboxylgruppe einer Aminosäure wird über eine Peptidbindung mit der

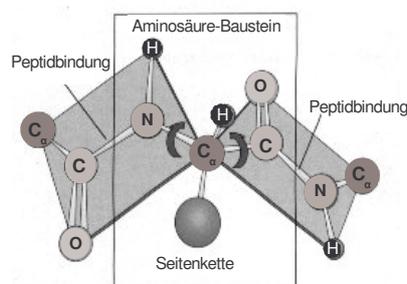


Abbildung 2-14 Peptidbindung (nach Knippers 1997)

Aminogruppe der nachfolgenden Aminosäure verbunden (siehe Abb. 2-14). Diese Abfolge bildet das Polypeptidrückgrat des Proteins. Die Atome des Polypeptidrückgrates koppeln über einen großen Molekülbereich miteinander. Charakteristische Gerüstschwingungen sind die Folge, die Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins liefern (siehe unten). Die Aminosäureseitenketten oder Teile davon können sogenannte Gruppenschwingungen ausführen. Ihre Schwingungsfrequenz ist relativ unabhängig vom Rest des Proteins, so daß die Gruppe als Ganzes eine Bande im IR-Spektrum zeigt, die ihre Zuordnung zu einer Aminosäure ermöglicht. Auch die Kofaktoren des Proteins wie z.B. Häme und Chinone lassen sich anhand typischer Banden identifizieren. Im folgenden soll das Absorptionsverhalten im bc_1 -Komplex vorhandener Proteinbestandteile beschrieben werden.

Absorptionen der Amid-Gruppen

Das Absorptionsspektrum eines Proteins wird von Gerüstschwingungen dominiert. Im infraroten Spektralbereich von 1800 bis 1400 cm^{-1} finden sich zwei starke Banden, die als Amid I und Amid II bezeichnet werden.

Amid I-Schwingungen absorbieren im Bereich von 1690 bis 1610 cm^{-1} und bestehen zu etwa 80% aus der C=O-Streckschwingung der Peptidcarbonyle, die schwach mit der C-N-Streck- und der N-H-Biegeschwingung der Aminogruppen gekoppelt ist (*Arrondo et al. 1993*). Die Frequenz der Amid I-Bande ist abhängig von der Sekundärstruktur der absorbierenden Proteindomäne (Tabelle 2-2) und wird zur Sekundärstrukturanalyse herangezogen, wobei die starke Überlappung der Bereiche häufig eine eindeutige Zuordnung verhindert. Man schließt mit Methoden der Bandenzerlegung (Dekonvolution) auf die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente. Deren Ergebnisse sind jedoch nur unter Vorbehalt zu betrachten, da verschiedene Aspekte nicht in die Berechnung einfließen. Beiträge der Aminosäureseitenketten und Kofaktoren werden nicht berücksichtigt. Auch Verunreinigungen der Probe oder Wasserdampfabsorptionen, die im gleichen spektralen Bereich auftreten, gehen nicht in die Berechnung ein.

Strukturelement	Lage der Absorptionsbanden in cm^{-1} in	
	H_2O	D_2O
α -Helix	1648-1657	1642-1660
β -Faltblatt	1623-1641	1615-1638
	1674-1695	1672-1694
Schleifen	1662-1686	1653-1691
ungeordnete Bereiche	1642-1657	1639-1654

Tabelle 2-2

Absorptionsbereiche verschiedener Sekundärstrukturelemente (nach Goormaghtigh et al. 1994)

Tabelle 2-2 zeigt, daß ein Austausch der Wasserstoffatome gegen Deuterium geringen Einfluß auf die Frequenz der Amid I-Bande hat. Kleine Verschiebungen von 2-12 cm^{-1} lassen sich auf die Aufhebung der Kopplung mit der ND-Schwingung zurückführen. Die Größe der Verschiebung ist abhängig von der Sekundärstruktur des Proteins (Arrondo et al. 1993, Haris & Chapman 1994), wobei α -helikale Strukturen am wenigsten beeinflußt werden.

Die Amid II-Bande läßt sich zwischen 1575 und 1480 cm^{-1} lokalisieren. Sie entsteht durch Kopplung der C-N-Streck- mit der N-H-Biegeschwingung sowie schwächeren Beiträgen der C-C-Streck-, C-O-Biege und N-C-Streckschwingungen. Die Lage der Amid II-Bande wird wenig von der Sekundärstruktur des Proteins beeinflußt. Eine Deuterierung des Proteins dagegen führt zu einer Entkopplung der C-N-Streck und der N-D-Biegeschwingung wobei die $\nu(\text{C-N})$ -Schwingung der Amid II'-Bande im Bereich von 1490-1460 cm^{-1} auftritt sowie eine Bande der N-D-Biegeschwingung unterhalb von 1100 cm^{-1} entsteht. Aus dem Verhältnis von Amid II zu Amid II'-Bande im Absorptionsspektrum läßt sich der Grad des H/D-Austauschs im Protein ermitteln.

Absorptionen der Aminosäureseitenketten

Die Seitenketten der Aminosäuren oder Teile davon führen Gruppenschwingungen aus, die in charakteristischen Banden im IR-Spektrum resultieren. Um ihre Schwingungsfrequenzen zu ermitteln, wurden zahlreiche Versuche mit Aminosäuren wäßriger Lösung durchgeführt (Chirgadze et al. 1973, Venyaminov & Kalnin 1990, ausführlicher Review Barth 2001). Die Kenntnis der Bandenlage erleichtert die Zuordnung von Aminosäuren im Proteinspektrum.

Lage und Intensität der Banden können sich allerdings durch Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung (z.B. Wasserstoffbrücken) verändern, so daß die Werte nur als Anhaltspunkte zu verstehen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente im Spektralbereich von 2000 bis 1000 cm^{-1} durchgeführt. In diesem Bereich absorbieren 11 Aminosäuren mit nennenswerten Beiträgen: Asparaginsäure und Glutaminsäure mit sauren Seitenketten, Lysin, Arginin und Histidin mit basischen Seitenketten, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan mit aromatischen Seitenketten sowie Asparagin, Glutamin (polare Seitenketten) und Prolin (unpolare Seitenkette). Abb. 2-15 veranschaulicht die Lage und Intensität der Absorptionsbanden dieser Aminosäuren. In Tabelle 2-3 sind einige aus Modellstudien verfügbare Literaturwerte zusammengestellt.

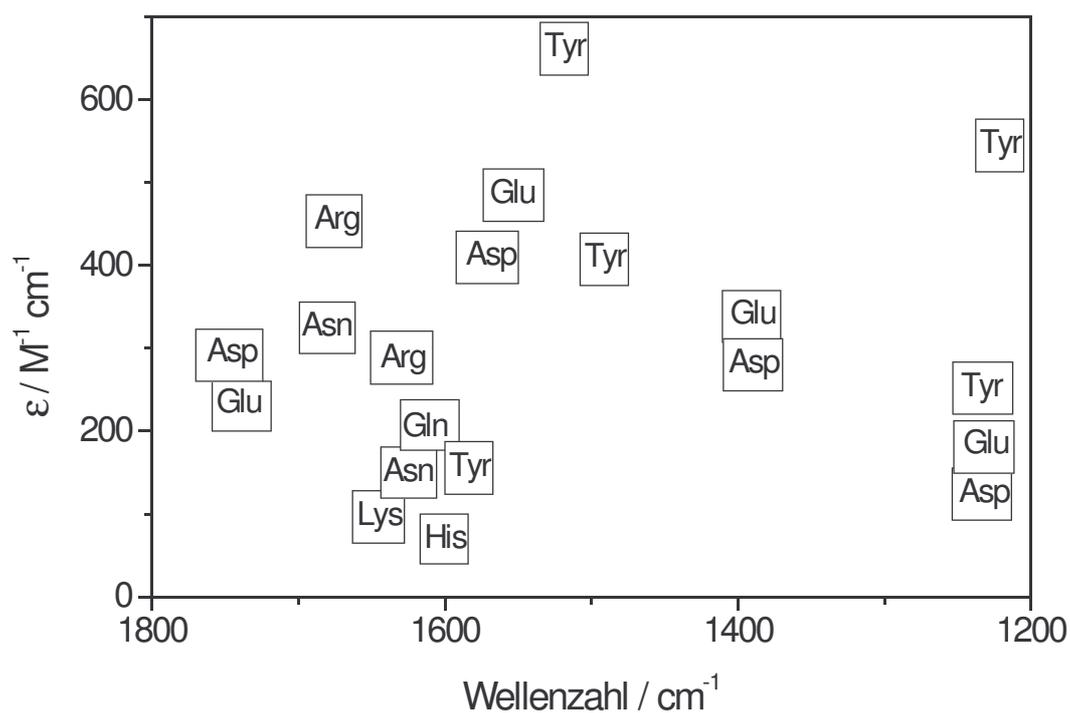


Abbildung 2-15

Lage und Intensität der Banden ausgewählter Aminosäureseitenketten (*Quellenangaben siehe Tabelle 2-2*)

Aminosäure	Schwingung	H ₂ O		D ₂ O	
		$\nu_{\max} / \text{cm}^{-1}$	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\nu_{\max} / \text{cm}^{-1}$	$\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Asparaginsäure	-COOH ^(v)	1716	280	1713	290
	-COO ^{-(v, as)}	1574	380	1584	820
	-COO ^{-(v, sym)}	1402	256		
		1250	100-200		
Glutaminsäure	-COOH ^(v)	1712	220	1706	280
	-COO ^{-(v, as)}	1560	470	1567	830
	-COO ^{-(v, sym)}	1404	316		
		1250	100-200		
Lysin	-NH ₃ ^{+(def, as)}	1629	130		
	-NH ₃ ^{+(def, sym)}	1526	100		
Arginin	-CN ₃ H ₅ ^(v, as)	1673	420	1608	460
	-CN ₃ H ₅ ^(v, sym)	1633	300	1586	500
Histidin	Ring	1596	70	1623	16
				1600	35
Phenylalanin	Ring	1494	80	1596	10
				1607	10
Tyrosin	Ring, Tyr-OH	1612*		1615	160
	ν_{19} (CC)-Ring, Tyr-OH	1518	430	1515	500
	δ (COH)	1245	200		
	Ring, Tyr-O ⁻	1602	160	1603	350
	ν_{19} (CC)-Ring, Tyr-O ⁻	1498	700	1500	650
	ν_{7a} (C-O ⁻)	1269	580		
Tryptophan		1455*		1545	10
		1334*			
Asparagin	-C=O ^(v)	1678	310	1648	570
	-NH ₂ ^(def)	1622	160		
Glutamin	-C=O ^(v)	1670	360	1636	550
		1687 [§]		1654 [§]	
	-NH ₂ ^(def)	1610	220		
		1590 [§]		1163 [§]	
Prolin	Ring-N	1424 [#]			
	H-Ring-N	1456 [#]			

Tabelle 2-3

Schwingungsfrequenzen ν_{\max} von Seitenketten ausgewählter Aminosäuren und ihre Extinktionskoeffizienten ϵ in wässriger Lösung mit ν :-Valenzschwingung, def:-Deformationsschwingung, as: asymmetrische und sym: symmetrische Schwingung (Studien von *Venyaminov & Kalnin 1990* und *Chirgadze 1975* sowie **Fabian 1994*, *#Rothschild 1989*, *§Dhamelincoourt 1993*, nach *Baymann 1995* und *Hellwig 1998*)

Absorptionen der Häm

Häm spielen eine entscheidende Rolle in der katalytischen Funktion des bc_1 -Komplexes. Die Kenntnis ihres Absorptionsverhalten ist somit essentiell für die Interpretation der IR-Spektren. Die Untersuchungen von Modellsubstanzen lieferten hierbei wertvolle Informationen. So sind Lage und Intensität der Banden abhängig sind vom Oxidations- und Spinzustand des zentralen Eisenatoms (Li et al. 1990), von der Verdrillung des Porphyringerüsts und seinen Substituenten (Spiro et al.1979).

Infrarotaktive Gerüstschwingungen werden nach verschiedenen Symmetriefformen unterteilt, wobei die Hauptschwingungen miteinander und auch mit Schwingungen der Gerüstsubstituenten koppeln können. Im Bereich von 1700 bis 1000 cm^{-1} werden sie mit ν_{37} bis ν_{44} bezeichnet (Abe et al. 1978). Abb. 2-16 zeigt Lage und Bezeichnung der Atome, die an Schwingungen des Porphyringerüsts und der Vinylsubstituenten beteiligt sind. Berthomieu et al. (1992) und Choi et al. (1982) identifizierten in ihren Studien Schwingungsbanden des Porphyringerüsts und der Vinylgruppen des Bis-Imidazol-Eisen-Protoporphyrin IX ($(\text{IM})_2\text{Fe}^{\text{III}}\text{PP}$). Es wurde als Modell für Häm *b* herangezogen. In Tabelle 2-4 sind die Absorptionsbanden der Gerüstschwingungen zusammengefaßt.

Durch Untersuchungen mittels Ramanspektroskopie konnten ähnliche Werte auch für das Cytochrom *c*-Gerüst gefunden werden (Desbois 1994, Hu et al. 1993). Die Schwingungsfrequenzen der Vinylgruppen finden sich in Tabelle 2-5. Ihr Absorptionsverhalten ist relativ unabhängig von der Umgebung und ähnelt sich deshalb bei verschiedenen Proteinen (Choi et al. 1982). Beim Häm *c* sind keine Beiträge der Vinele zu erwarten, da sie über Cysteinseitenketten direkt an das Protein gebunden sind.

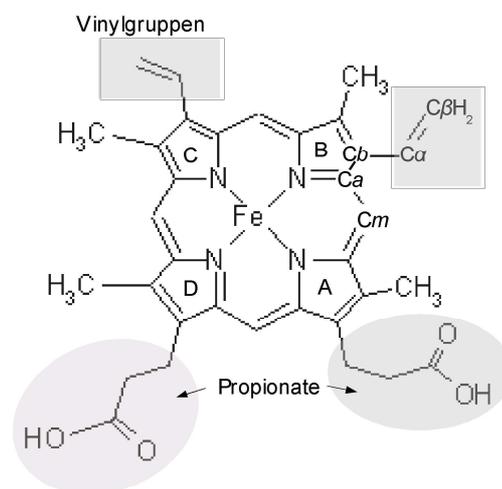


Abbildung 2-16

Struktur des Häm-Porphyringerüsts mit Bezeichnung der an charakteristischen Gerüstschwingungen beteiligten Atome $C\alpha$, $C\beta$ und $C\gamma$ sowie den an Schwingungen beteiligten Atome $C\alpha$ und $C\beta$ der Vinylgruppen (nach Ogoshi et al. 1972)

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Hämgerüsts sind die beiden Propionate. Ihre Schwingungseigenschaften werden beeinflusst durch Konformationsänderungen des Häms und Protonierungsreaktionen, die mit der Redoxreaktion einhergehen. Ihre Schwingungsfrequenzen sind abhängig vom Protonierungszustand der Carboxylgruppe. In FTIR-Studien an Cytochrom *c* wurden Signale im Bereich um 1710 cm⁻¹ protonierten Propionatgruppen zugeordnet (Moss *et al.* 1990, Tonge *et al.* 1989). Wasserstoffverbrückungen verschieben die Bande zu niedrigeren Wellenzahlen. Beiträge der deprotonierten Propionatgruppen werden bei 1570 cm⁻¹ (antisymmetrische Streckschwingung) und 1390 cm⁻¹ (symmetrische Streckschwingung) erwartet (Colthup 1990). Experimente mit isotopenmarkierten Propionaten der Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans*, bei denen das C-Atom der Carboxylgruppe ¹³C-markiert wurde, konnten diese Werte für Proteine bestätigen (Behr *et al.* 1998). Beiträge der protonierten COOH-Gruppe wurden aufgrund einer Wasserstoffverbrückung bei 1676 cm⁻¹ identifiziert. Der antisymmetrischen Streckschwingung der COO⁻-Gruppe werden Signale bei 1570 und 1538 cm⁻¹ zugeordnet, während die Bande der symmetrischen COO⁻-Streckschwingung bei 1390 cm⁻¹ zu finden ist.

Hauptschwingung	gekoppelte Schwingung	Bezeichnung	(IM) ₂ FE ^{III} PP / cm ⁻¹	(IM) ₂ FE ^{II} PP / cm ⁻¹
$\nu(\text{CaCm})$	$\delta(\text{CaCmH})$ oder $\delta(\text{CmX})$	ν_{37}	1553	1571
$\nu(\text{CbCb})$	$\nu(\text{CaCm}), \nu(\text{NCa}), \nu(\text{CbX}), \delta(\text{CbX})$	ν_{38}	1553, 1535	1604
$\nu(\text{CaCm})^{\text{sym}}$	$\nu(\text{NCa}), \nu(\text{CbCb}), \nu(\text{CaCm})$	ν_{39}	1478	1455
$\nu(\text{CaCb})$	$\delta(\text{CbX}), \nu(\text{NCa}), \delta(\text{CaCbCb})$	ν_{40}		1455
$\nu(\text{CaN})$	$\nu(\text{CaCb}), \delta(\text{CbX}), \delta(\text{CaCbCb})$	ν_{41}		1415, 1337
$\delta(\text{CmH})$	$\delta(\text{CbX}), \nu(\text{CaN}), \nu(\text{CaCb})$	ν_{42}		1239

Tabelle 2-4

Absorptionsbanden des Porphyringerüsts der Häm *b*-Modellsubstanz Bis-Imidazol-Eisen-Protoporphyrin IX; X: Substituent des Porphyringerüsts; ν : Streckschwingung, δ : Beugeschwingung (nach Berthomieu *et al.* 1992)

Schwingung	Bandenlage / cm ⁻¹
$\nu(\text{C}\alpha=\text{C}\beta)$	1620*, 1626#, 1613#
$\delta(\text{=CH}_2)^{\text{sym}}$	1345*, 1337#
$\nu(\text{CbCa})$	1118*
$\delta(\text{=CH}_2)^{\text{as}}$	1080*

Tabelle 2-5

Lage der Absorptionsbanden der Vinylsubstituenten der Häm *b*-Modellsubstanz Bis-Imidazol-Eisen-Protoporphyrin IX; ν : Streckschwingung, δ : Beugeschwingung (nach *Choi 1982 und #Berthomieu 1992)

Absorptionen der Chinone

Im Spektralbereich von 1700 bis 1000 cm^{-1} treten zahlreiche charakteristische Chinonbanden auf, die erstmals in photosynthetischen Reaktionszentren beschrieben wurden (z.B. *Buchanan et al. 1992, Mäntele 1993, Breton et al. 1994*). Sie lassen sich durch Vergleich mit Spektren von Chinonen in wäßriger Lösung und verschiedenen Lösungsmitteln (*Bauscher & Mäntele 1992, Hellwig 1995, Hellwig et al. 1999b*) zuordnen.

Absorptionsspektren unterschiedlicher Chinontypen wie Naphto-, Mena-, Benzo -oder Ubichinon weisen zwei intensive Signale oberhalb von 1560 cm^{-1} auf. Zur ersten Bande im Bereich von 1616 bis 1692 cm^{-1} tragen die

beiden C=O-Streckschwingungen des Chinonrings bei. Ihre Absorptionen werden spektral nicht vollständig getrennt (*Bauscher & Mäntele 1992*), so daß eine Hauptbande mit Schulterstruktur bei höheren Wellenzahlen entsteht. Sie wird intensiver, je länger die Isopren-Seitenkette ist (*Hellwig et al. 1999b*). Die zweite der intensiven Banden ist

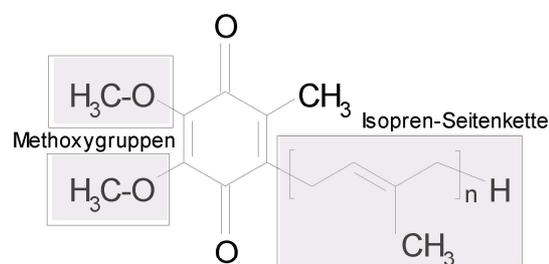


Abbildung 2-17
Struktur des Ubichinon-n

unstrukturiert und resultiert aus den C=C-Schwingungen. Sie tritt im Bereich von 1566 bis 1638 cm^{-1} auf. Im Absorptionsspektrum von Ubichinonen (vgl. Abb. 2-17) konnten die C=O-Schwingungen bei 1650 und die C=C-Schwingungen bei 1610 cm^{-1} identifiziert werden. Die Position der Banden ist unabhängig von der Länge der Isopren-Seitenkette (*Bauscher & Mäntele 1992*).

Im Bereich von 1454 bis 1382 cm^{-1} treten Schwingungen der CH_3 -Methylgruppe des Chinonrings, der CH_2 - und CH_3 -Gruppen der Isopren-Seitenkette sowie der beiden Methoxygruppen auf (*Hellwig et al. 1999b*). Die C-OCH₃-Schwingung der Methoxygruppen zeigt zudem charakteristische Banden bei 1288, 1268 und 1204 cm^{-1} (*Bauscher & Mäntele 1992, Baymann 1995 und Referenzen darin, Hellwig et al. 1999b*). Ihre Intensität ist abhängig von der Orientierung der Gruppe im Molekül (*Burie et al. 1997, Nonella et al. 1996*).

Im Differenzspektrum, das die Veränderungen des Ubichinons zum Ubichinol beschreibt, finden sich die Banden der C=O- und C=C-Schwingungen und die Beiträge der Methoxygruppen wider. Die Signale des bei der Reaktion entstehenden UQH₂ treten zwischen 1490 und 1388 cm⁻¹ auf und werden der Reorganisation des Chinonrings zugeordnet (*Hellwig et al. 1999b*). Im Rahmen der Diskussion (Kapitel 4) wird noch ausführlich auf die Differenzsignale der Chinone eingegangen.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Elektrochemie

3.1.1 Die elektrochemische Dünnschichtzelle

Alle in dieser Arbeit gezeigten elektrochemisch induzierten Differenzspektren wurden mit einer im Arbeitskreis entwickelten Dünnschichtzelle aufgenommen (*Moss et al. 1990*), die in Abb. 3-1 gezeigt ist.

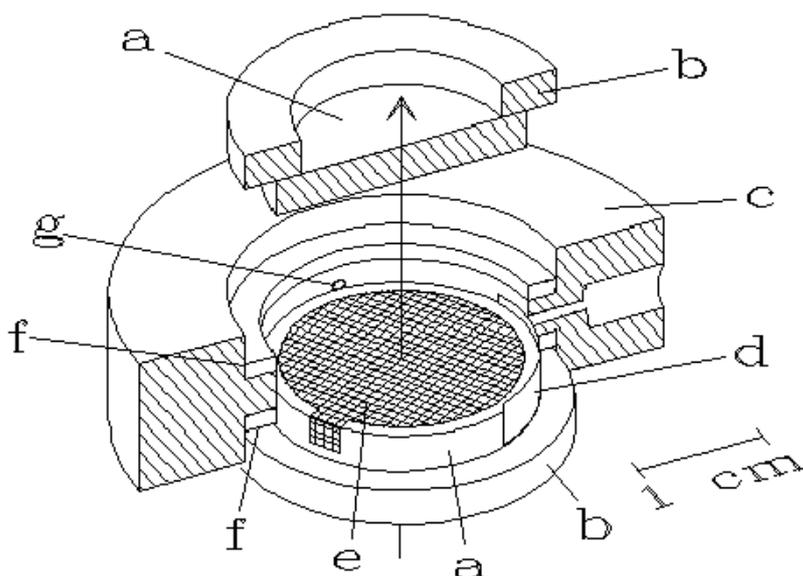


Abbildung 3-1

Elektrochemische Dünnschichtzelle zur Aufnahme von Differenzspektren im Infrarot- und UV/VIS-Bereich (*nach Moss et al. 1990*); a: CaF_2 -Fenster, b: Plexiglasring, c: Zellkörper, d: Platin-Gegenelektrode, e: Gold-Arbeitslektrode, f: Silikondichtungsring, g: Zuleitung für die Referenzelektrode. Der Pfeil beschreibt die Durchtrittsrichtung der optischen Strahlung.

In der Zelle ist die in Kapitel 2.2 beschriebene Drei-Elektrodenanordnung realisiert. Als Arbeitselektrode dient ein Goldnetz (e) mit einer Maschenweite von $30 \times 30 \mu\text{m}$ und einer optischen Transparenz von 55%. Als Gegenelektrode wird ein Platinblech (d) verwendet. Die

Zelle selbst besteht aus einem PVC-Körper mit vier Öffnungen. In zwei von ihnen werden Elektrodenzuleitungen für Gegen- und Arbeitselektrode eingeschraubt (nicht abgebildet), eine dient zur Aufnahme der Referenzelektrode. Über die vierte Öffnung kann Pufferlösung eingefüllt werden. In den Körper eingepaßt sind zwei CaF_2 -Fenster (a), die jeweils auf einen Plexiglasring (b) aufgeklebt sind. Zur Abdichtung der Zelle werden zwischen den Plexiglasringen und Zellkörper Silikondichtungsringe eingefügt.

Zum Befüllen der Zelle wird diese bis auf das obere CaF_2 -Fenster vollständig zusammengebaut. Etwa 7-8 μl der vorbereiteten Proteinlösung werden auf das Fenster gegeben, welches dann so in die Zelle eingepaßt wird, daß sich ein dünner Probenfilm ausbildet. Dieser muß blasenfrei sein und die gesamte Fensterfläche bedecken. Danach wird die Zelle zwischen zwei zusammenschraubbaren Metallplatten fixiert. Über die Stärke des Zusammenpressens der Platten kann die Schichtdicke des Films auf 5-10 μm reguliert werden. Erst die geringe Schichtdicke ermöglicht die Aufnahme der IR-Differenzspektren. Durch sie wird die Absorption des in der Probe enthaltenen Wassers auf einen Wert (unter 1 OD) reduziert, so daß der Detektor ein ausreichend großes Signal registrieren kann.

Um den Kontakt zwischen den Elektroden und der Proteinlösung herzustellen, wird der Zellkörper über die dafür vorgesehene Öffnung mit Puffer aufgefüllt. Abschließend wird die Referenzelektrode eingeschraubt, die über eine Salzbrücke mit dem Zellinneren verbunden ist.

3.1.2 Modifizierung der Arbeitselektrode

Um eine Adsorption des Proteins und seine damit verbundene Denaturierung an der Metalloberfläche der Arbeitselektrode zu verhindern, muß diese mit einer Schutzschicht, einem sogenannten Modifier, überzogen werden. Diese Modifiersubstanzen enthalten üblicherweise zwei verschiedene funktionale Gruppen, von denen eine in Kontakt mit der Metalloberfläche ist und die andere mit dem Protein wechselwirkt. Häufig kommen schwefelhaltige Substanzen zum Einsatz, deren freie Elektronenpaare an der Oberfläche der Goldelektrode kovalent binden und so eine monomolekulare Schicht ausbilden. Die Bindung des Proteins an den Modifier ist reversibel und erfolgt nur, so lange der Elektronentransfer

stattfindet. Der Modifier muß an das zu untersuchende Protein angepaßt werden. Für die in dieser Arbeit untersuchten bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* und *S. cerevisiae* wurden in Vorversuchen zwei geeignete Modifier ermittelt. Für den *P. denitrificans*-Komplex wurde eine 2 mM Mercaptoethylaminlösung (Cysteamin) verwendet. Für den Hefe-Komplex erwies sich eine 1:1-Mischung aus Mercaptoethylamin und Mercaptopropionsäure (2 mM) als geeignet. Die Strukturen der beiden Substanzen sind in Abbildung 3-2 gezeigt.



Abbildung 3-2

Strukturen der verwendeten Modifier. Links: Mercaptoethylamin; rechts: Mercaptopropionsäure.

Die Goldnetz-Arbeits Elektrode wurde modifiziert, indem das saubere Netz für eine Stunde in die entsprechende Lösung eingelegt wurde. Anschließend wurde das Netz mehrfach mit deionisiertem Wasser abgespült, auf ein CaF₂-Fenster gelegt und an der Luft getrocknet. Ein so modifiziertes Goldnetz kann für 4-5 Messungen verwendet werden. Danach läßt die Reversibilität der elektrochemisch induzierten Redoxspektren nach und das Netz muß ausgetauscht werden.

3.1.3 Mediatoren

Mediatoren sind kleine redoxaktive Substanzen. Sie werden bei großen Proteinkomplexen eingesetzt, um die Zeit zur Gleichgewichtseinstellung zu verkürzen (*Dutton 1978, Baymann 1995*). Dies ist bei großen, langsam diffundierenden Proteinen und tief liegenden Kofaktoren notwendig. Mediatoren sind in der Lage, in Bindungsstellen und Einbuchtungen des Proteins zu diffundieren und können somit als Elektronenüberträger zwischen Elektrode und Protein fungieren. Dadurch wird es möglich, auch im Inneren des Proteins gelegene Kofaktoren zu erreichen.

Eine effektive Elektronenübertragung ist dann gewährleistet, wenn das Mittelpunktspotential des Kofaktors im gleichen Bereich wie der des Mediators liegt. Wird eine Mischung aus Mediatoren, deren Mittelpunktspotential über und unter dem Potential des Kofaktors liegt, zugegeben, beschleunigt sich die Reaktion zusätzlich (*Hellwig 1998*). Da der bc_1 -Komplex mehrere Kofaktoren mit unterschiedlichen Potentialen enthält, wurde ein Mediator-Mix verwendet, der den gesamten untersuchbaren Potentialbereich abdeckt. Er wurde von Baymann (1995) entwickelt und mehrfach modifiziert (*Hellwig 1998, Hellwig et al. 2000*). Tabelle 3-1 zeigt seine aktuelle Zusammensetzung und einige Eigenschaften der verwendeten Substanzen.

Mediator	molare Masse / g/mol	E_m / mV	Lösungsmittel
Ferrocenylmethyltrimethylammoniumjodid	385,08	607	Ethanol
1,1'-Ferrocendicarbonsäure	274,1	436	Ethanol
Kaliumhexacyanoferrat-II-Trihydrat	422,41	212	Wasser
1,1'-Dimethylferrocen	214,1	133	Ethanol
Tetrachloro-p-Benzochinon (p-Chloranil)	245,9	72	Diethylether
Quinhydrin	218,2	70	Ethanol
Tetramethyl-p-Phenylendiamin-Dihydrochlorid	237	62	Ethanol
2,6-Dichloroindophenol-Natriumsalz-Hydrat	290,1	9	Ethanol
Ruthenium (II)-Hexaminchlorid	274,2	-8	Wasser
1,4-Naphtochinon-Hydrat	158,16	-63	Ethanol
Trimethylhydrochinon	152,19	-108	Ethanol
2-Methyl-1,4-Naphtochinon (Menadion)	172,2	-220	Aceton
2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon	174,16	-333	Ethanol
Anthrachinon-2-Sulfonsäure-Natriumhydrat	328,3	-433	Ethanol
Neutralrot	288,78	-515	Ethanol
Benzylviologen	409,4	-568	Wasser
Methylviologen	257,2	-628	Wasser

Tabelle 3-1

Zusammenstellung der verwendeten Mediatoren und ihrer Eigenschaften

Auf das Prinzip der Herstellung der Mischung sowie die Eigenschaften der einzelnen Mediatoren soll nicht näher eingegangen werden. Beides wurde bereits ausführlich beschrieben (*Baymann 1995, Hellwig 1998*). Die fertige Mediator-Mischung wurde aliquotiert in Eppendorff-Hütchen eingetrocknet und bei -28°C gelagert.

Mediatoren sollen neben dem Elektronentransfer keine weiteren Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen oder eigene Redoxsignale im Spektrum hinterlassen. Ihre Konzentration wird deshalb im Vergleich zum Protein sehr niedrig gewählt. Nach Aufnahme der Mediatormischung mit 7-8 μl der Proteinlösung ergibt sich eine Konzentration von 40 μM pro Mediator.

3.1.4 Die Referenzelektrode

Als Referenzelektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode ($\text{Ag}/\text{AgCl}/3 \text{ M KCl}$) verwendet. Sie hat gegenüber der Normalwasserstoffelektrode ein Potential von 208 mV und besteht aus einem Plexiglaskörper, der mit einer 3M KCl-Lösung gefüllt ist. In die Lösung ist ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht eingetaucht (Abb. 3-3). Die Elektrode ist mit einem Keramikdiaphragma verschlossen, über das eine Salzbrücke zum Elektrolyt der Pufferlösung in der Meßzelle aufgebaut wird.



Abbildung 3-3

$\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M}$
KCl-Elektrode

Die elektrochemische Beschichtung des Silberdrahtes mit AgCl muß in regelmäßigen Abständen erneuert werden. Sie entsteht durch Elektrolyse, bei der der saubere Silberdraht als Arbeitselektrode und zwei Platindrähte als Referenz- bzw. Gegenelektrode in Form einer Drei-Elektrodenanordnung geschaltet und dabei in eine 1 N HCl -Lösung getaucht wurden. Nach Anlegen einer Spannung von 1,3 V bildet sich unter H_2 -Entstehung auf dem Ag-Draht die weißlich-graue AgCl -Schicht.

Nach jeder Beschichtung wird die Referenzelektrode überprüft und neu geeicht. Dazu verwendet man ein Redoxpaar mit bekanntem Mittelpunktspotential, in diesem Fall $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ mit einem Potential von 245 mV vs. Ag/AgCl . Die zu prüfende Referenzelektrode wird mit einer Platin-Gegenelektrode und einer Arbeitselektrode aus Gold in eine Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat(III) getaucht, die zusätzlich 100 mM KCl als Leitsalz und 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 enthält. An den Elektroden liegt eine Dreiecksspannung an, die mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit zwischen zwei

Maximalwerten variiert wird. Der Stromverlauf in der Lösung wird in Abhängigkeit der Spannung aufgenommen. Man erhält ein sogenanntes Cyclovoltamogramm mit einem Spannungsmaximum und einem Spannungsminimum. Das Mittelpunktspotential ergibt sich aus dem Mittelwert dieser beiden Extremwerte und sollte den Literaturwert von 245 mV (pH 7) ergeben.

3.2 Aufbau der Meßapparatur

Die Aufnahme der elektrochemisch induzierten UV/VIS- und FTIR-Differenzspektren erfolgte in einer Kombination eines FTIR-Spektrometers (Bruker IFS 25) mit einem zusätzlich eingebauten UV/VIS-Spektrometer (Werkstatt der Universität Freiburg), die die Aufnahme beider Spektren ohne Positionsveränderung der Meßzelle ermöglicht. Abb. 3-4 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Meßapparatur.

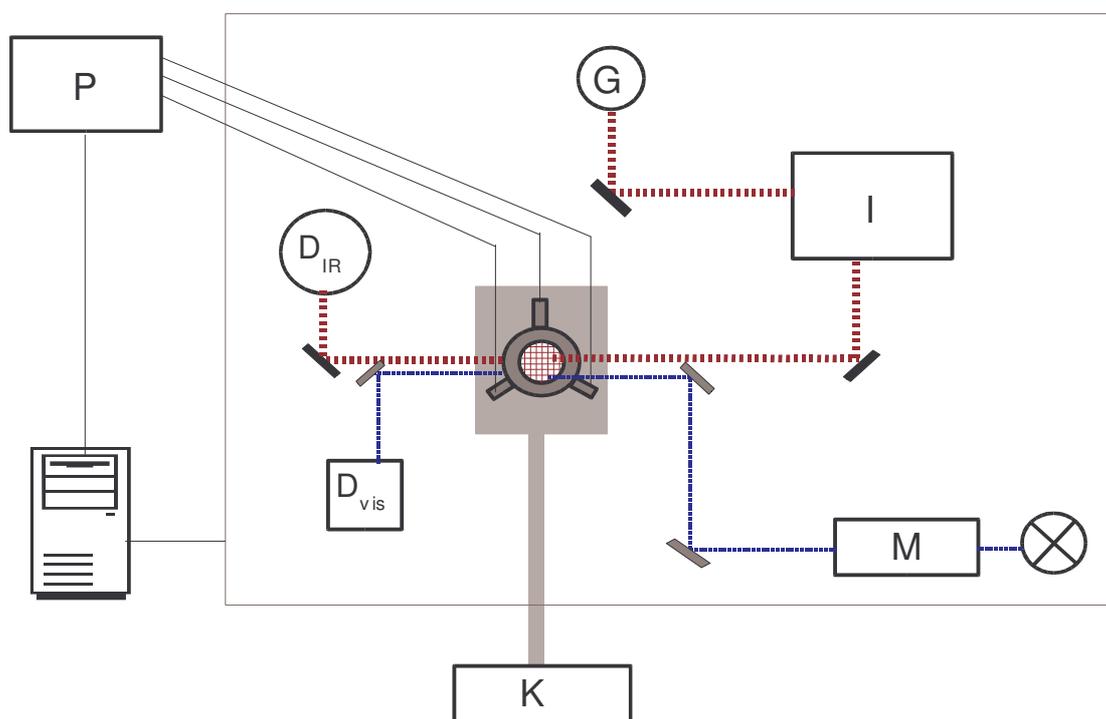


Abbildung 3-4

Schematischer Aufbau der Meßapparatur. G: Global, I: Interferometer, D_{IR}: IR-Detektor, M: Monochromator, D_{vis}: UV/VIS-Detektor, P: Potentiostat, K: Thermostat, graue Linie: Gehäuse des Spektrometers. Durchgezogene blaue Linie: UV/VIS-Strahlengang, gepunktete, rote Linie: IR-Strahlengang

In der mit Trockenluft gespülten Probenkammer wird die bereits beschriebene Dünnschichtzelle in einer Halterung fixiert. Sie kann über den Thermostat (K) auf eine gleichbleibende Meßtemperatur von 5-15°C temperiert werden. Alle Messungen dieser Arbeit wurden bei 5°C durchgeführt. Die Elektroden der Zelle werden an einen externen Potentiostaten (P) angeschlossen, über den ein beliebiges Potential an die Probe angelegt werden kann. Die computergestützte Steuerung der Spektrometer und des Potentiostaten erfolgt mit der von D.A. Moss und S. Grzybek entwickelten Software MSPEK.

Der UV/VIS-Strahlengang führt ausgehend von der Lichtquelle über den Monochromator durch die Meßzelle auf den Detektor (D_{vis}), eine Si-Photodiode mit Strom-Spannungswandler und -verstärker. Der IR-Strahlengang geht vom Globar (G) aus, führt durch das Michelson-Interferometer (I) und die Meßzelle zu einem rauscharmen HgCdTe-Detektor (D_{IR}).

3.3 Probenvorbereitung

3.3.1 Proteinreinigung

3.3.1.1 Der bc_1 -Komplex aus *Paracoccus denitrificans*

Die Aufzucht der Bakterien und die Isolierung des bc_1 -Komplexes wurden von Oliver Anderka im Arbeitskreis von Prof. Bernd Ludwig (Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik, J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main) durchgeführt. Dazu wurde das *fbc*-Operon, das den bc_1 -Komplex kodiert, in einen Plasmid-Vektor kloniert (*Pfitzner et al. 1998*). Das Plasmid wurde in eine *fbc*-defiziente Mutante (*Korn 1994*) eingebracht. Dadurch konnte eine Überexpression des bc_1 -Komplexes erreicht werden. Die Bakterienzellen wuchsen auf Succinat-Medium. Die Membranen wurden nach dem Aufschluß der Zellen mittels Dodecylmaltosid (DDM) solubilisiert. Die Abtrennung des bc_1 -Komplexes erfolgte anschließend durch Anionenaustausch-Chromatographie (*Schröter et al. 1998*). Der Komplex bindet dabei bei geringen Salzkonzentrationen an Diethylaminoethyl (DEAE)-Sephrose und kann anschließend mittels einer hohen Salzkonzentration eluiert werden. Der gereinigte bc_1 -

Komplex wurde abschließend durch Gelfiltration in den FTIR-Meßpuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 150 mM KCl, 0,02% DDM) überführt, aufkonzentriert und in Aliquots zu je 50 µl bei -80°C gelagert.

Das wasserlösliche Fragment des Rieske-Proteins wurde ebenfalls von Oliver Anderka im Institut für Biochemie aufgereinigt. Das ursprünglich in der Literatur beschriebene Protokoll (*Link et al. 1996, de Vries et al. 1998*) wurde teilweise verändert und an die gegebenen Bedingungen angepaßt. Ausgehend vom aufgereinigten bc_1 -Komplex wurde das Fragment durch Proteolyse im Bereich des Membranankers vom Proteinkomplex getrennt. Die hydrophoben Proteinbestandteile konnten durch Hydroxyapatit-Chromatographie entfernt werden. Das abgetrennte Rieske-Fragment wurde über mehrere Waschschriffe weiter gereinigt und anschließend in den Meßpuffer überführt (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 150 mM KCl) und aufkonzentriert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

Ein lösliches Fragment der Cytochrom c_1 -Untereinheit stand ebenfalls zur Verfügung. Es enthält nur die Domäne, die das Häm c trägt. Die in Kapitel 2.1.2.1 beschriebene Gensequenz mit vorwiegend sauren Aminosäureresten im Cytochrom c_1 ist ebenso entfernt worden wie der Membrananker, mit dem das Fragment im Komplex gebunden ist. Die Präparation wurde von Anna Eichhorn, ebenfalls im Institut für Biochemie, durchgeführt. Im Gegensatz zum Rieske-Fragment, das aus dem Gesamtkomplex abgetrennt wurde, wurde das Genom des Cytochrom c_1 -Fragments durch Transformation in ein Plasmid eingebracht und im Bakterium *Escherichia coli* heterolog exprimiert. Im Periplasma der Wirtszellen findet sich das Genprodukt und kann ähnlich wie oben beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration isoliert werden (*Details siehe Eichhorn 2003*). Die Cyt c_1 -Fragmente lagen schließlich in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8 mit 150 mM NaCl vor und wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.1.1.2 Der bc_1 -Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*

Der bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* wurde von Hildur Pálsdóttir im Arbeitskreis von Dr. Carola Hunte (Abteilung Molekulare Membranbiologie des Max-Planck-Institutes für Biophysik/Frankfurt) präpariert. Die Isolierung des Proteins ähnelt der des *P. dentrificans*-

Komplexes. Nach Aufzucht und Aufschluß der Zellen werden die Membranen in Dodecylmaltosid solubilisiert. Die Aufreinigung erfolgt über zwei Anionenaustausch-Chromatographie-Schritte (*Pálsdóttir & Hunte 2002*). Zur Vorreinigung wurde eine DEAE Sepharose *fast-flow* Säule eingesetzt. Anschließend kam eine DEAE *ceramic* HyperD¹-Säule zum Einsatz, die besonders für HPLC²-Aufreinigungen geeignet ist. Das isolierte Protein wurde durch Ultrafiltration in Mikro-Konzentrationszellen aufkonzentriert. Die Proben lagen in Phosphatpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,9; 150 mM NaCl, 0.015% Undecylmaltosid) vor und wurden sofort vermessen. Ein Einfrieren der Proben war nicht möglich. Durch Aufbewahrung bei 4°C konnte das Protein jedoch etwa 3-4 Tage ohne Aktivitäts- und Stabilitätsverlust vermessen werden.

3.3.2 Vorbereitung der Proben

Der gereinigte bc_1 -Komplex wurde unter unterschiedlichen Bedingungen vermessen. Dazu zählen Experimente bei verschiedenen pH-Werten, nach H/D-Austausch und Inhibierung mit verschiedenen Substanzen. Die Probe wurde direkt vor dem Experiment in die gewünschte Reaktionsumgebung überführt. Alle Bearbeitungsschritte wurden bei 5°C durchgeführt, da der bc_1 -Komplex bei Raumtemperatur schon nach kurzer Zeit zerfällt.

Für ein Standardexperiment wurde ein Aliquot der gefrorenen (*P. denitrificans*) bzw. frischen (*S. cerevisiae*) Probe benutzt. Das Protein wurde mit 200 µl Puffer versetzt und bis zu einem Endvolumen von ca. 15 µl in einer Zentrifuge mittels Mikro-Konzentrationszellen (Microcon) aufkonzentriert. Die Endkonzentration betrug etwa 0.5 mM. Anschließend wurde die Proben für ca. 20 min im vorbereiteten Mediator-Mix äquilibriert und danach direkt in die Meßzelle gegeben und vermessen.

Änderung des pH-Wertes

Für Messungen bei verschiedenen pH-Werten wurde die Probe aus *P. denitrificans* mit mindestens 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt und anschließend durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Für Messungen bei pH 5,5 wurde 200 mM Cacodylatpuffer, bei pH 6

1 hyper diffusion

2 high-performance liquid chromatography

100 mM Phosphatpuffer sowie 200 mM Boratpuffer für pH 8 verwendet. Alle Puffer enthielten zusätzlich 100 mM KCl als Leitsalz und 0.02 % DDM als Detergenz. Proben aus *S. cerevisiae* wurden aufgrund des besseren Austauschergebnisses direkt während der Präparation in den Meßpuffer überführt.

H/D-Austausch

Durch den H/D-Austausch sollen die dem Lösungsmittel zugänglichen Wasserstoffatome im Protein durch Deuterium-Atome ersetzt werden. Um einen hohen Austauschgrad zu erreichen, wurde die Probe einen Tag vor Beginn des Experiments mit mindestens 1 ml D₂O-Puffer verdünnt und erneut aufkonzentriert. Danach wurde nochmals D₂O zugegeben und im Stickstoffstrom wieder abgeblasen. Dieses Verfahren führt zu einem guten Austauschergebnis und wurde bereits bei anderen Proteinen angewendet (*Hellwig 1998*). Über Nacht wurde die Probe in einem Überschuß des D₂O-haltigen Puffers gelöst. Direkt vor der Messung wurde das Protein mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Der Grad des H/D-Austausches wurde anhand der Abnahme der Amid II-Bande im IR-Absorptionsspektrum überprüft und betrug durchschnittlich etwa 80%.

Inhibierung

Für die Inhibierung des *bc*₁-Komplexes aus *P. denitrificans* mit Stigmatellin und Antimycin wurden zunächst Stammlösungen der Inhibitoren mit einer Konzentration von 2 mM hergestellt. Die ethanolhaltigen Lösungen wurden in Eppendorff-Hütchen gegeben. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff abgeblasen, so daß ein Film des Inhibitors am Grund des Hütchens zurückblieb. Die konzentrierte Probenlösung wurde zu den so vorbereiteten Inhibitoren gegeben und etwa eine Stunde äquilibriert. Der Hefe-*bc*₁-Komplex konnte aufgrund seiner Größe nicht auf diesem Weg inhibiert werden. Hier wurden die Inhibitoren während des letzten Präparationsschrittes zugegeben.

Vorbereitung der isolierten Untereinheiten

Das wasserlösliche Rieske-Fragment lag bereits im Meßpuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 150 mM KCl) vor. Es wurde vor der Messung nach dem oben

beschriebenen Verfahren aufkonzentriert. Das Cytochrom c_1 -Fragment wurde durch einen Pufferaustausch nach dem Beispiel der pH-Wert-Änderung in den Meßpuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 150 mM KCl) überführt. Der H/D-Austausch erfolgte für beide Fragmente auf dem oben beschriebenen Weg.

3.4 Aufnahme der Spektren

Elektrochemisch induzierte Differenzspektren

Um ein elektrochemisch induziertes IR-Differenzspektrum zu erhalten, wurden Einstrahlspektren des Proteins in zwei verschiedenen Redoxzuständen (Potentialen) aufgenommen und gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 2-8) miteinander verrechnet. Dabei wird der Probe zunächst ein Potential aufgeprägt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Potentialbereich von -0.5 bis 0.5 V untersucht. Nach einer vor dem eigentlichen Experiment zu bestimmenden Äquilibrierungszeit befindet sich das Protein mit dem äußeren Potential im Gleichgewicht, die eigentliche Spektrenaufnahme kann beginnen. Dazu werden im Bereich von 2000 bis 1000 cm^{-1} 128 Interferogramme mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Als Parameter für die Fouriertransformation wurden eine triangulare Apodisationsfunktion und ein *zero filling factor* von 2 gewählt. Die Interferogramme werden zu einem Einstrahlspektrum verrechnet. Anschließend wird ein zweites Potential angelegt und nach Ablauf der Äquilibrierung ein zweites Einstrahlspektrum aufgenommen. Aus beiden Einstrahlspektren wird das Differenzspektrum berechnet. Um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen, wurden 10-15 Differenzspektren gemittelt. Nach dem gleichen Verfahren wurden UV/VIS-Differenzspektren im Bereich von 400 bis 700 nm aufgenommen und berechnet.

Zur Abschätzung der Schichtdicke der Proteinlösung wurde vor jeder Messung ein IR-Absorptionsspektrum aufgenommen. Als Referenz diente die leere Probenkammer. Eine Absorption von 1 bei 1643 cm^{-1} (OH-Deformationsschwingung des Wassers) entspricht dabei etwa einer Schichtdicke von 10 μm .

Potentialtitrationen

Potentialtitrationen im sichtbaren Spektralbereich (400-700 nm) wurden im Anschluß an fast jede Messung durchgeführt. Sie dienen der Bestimmung der Mittelpunktpotentiale der einzelnen Kofaktoren. Dazu wurde beginnend beim vollständig reduzierten Protein (-0.5 V) in 50 mV-Schritten das Potential gesteigert. Endpunkt war das vollständig oxidierte Protein (0.5 V). Bei jedem Potential wurde ein Einstrahlspektrum aufgenommen. Die Äquilibrationszeiten zwischen den einzelnen Potentialschritten waren unterschiedlich lang und betragen bis zu 60 min. Aus allen Spektren wird eine Schar von Differenzspektren berechnet, wobei das Spektrum der vollständig reduzierten Form jeweils als Referenz dient. Diese Spektrenschar wurde mit Hilfe des Programms E_h -TIT von D.A. Moss und S. Grzybek ausgewertet. Dieses Programm trägt die Amplituden der Spektren als Funktion des Potentials auf. Man erhält eine Schar von Punkten, die durch Gleichung 3-1 beschrieben wird und an die interaktiv Nernstkurven (vgl. Gleichung 2-2) angepaßt werden können. Das Potential und die Anzahl übertragener Elektronen können vom Benutzer variiert werden, bis eine gute Anpassung der berechneten Kurve an die Daten erreicht ist.

Gleichung 3-1

$$A(p) = \frac{A_{max}}{1 + e^{\frac{(p - E_m)nF}{RT}}}$$

Abhängigkeit der Absorptionsänderung einer redoxaktiven Komponente vom angelegten Potential. A_{max} : maximale Absorptionsänderung, p : Potential, E_m : Mittelpunktpotential der Komponente, n : Anzahl übertragener Elektronen, F : Faradaykonstante, T : Temperatur, R : Gaskonstante

Nach Abschluß der Titration in oxidativer Richtung wurde das gleiche Verfahren beginnend beim oxidierten Zustand des Proteins in reduktiver Richtung durchgeführt.

4 ERGEBNISSE & DISKUSSION

4.1 Spektren des bc_1 -Komplexes aus *Paracoccus denitrificans*

4.1.1 Elektrochemisch induzierte UV/VIS-Differenzspektren

Differenzspektren im ultravioletten bis sichtbaren Spektralbereich zeigen vor allem die Beiträge der im Protein enthaltenen Cytochrome. Sie werden, wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben, durch $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge zwischen dem bindenden π -Orbital und dem antibindenden π^* -Orbital des Porphyringerüsts der einzelnen Hämgruppen verursacht. Das Differenzspektrum zeigt dabei nur Veränderungen im Protein, die aus der Änderung des Potentialzustandes der Cytochrome resultieren. Abb. 4-1 zeigt das elektrochemisch induzierte Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans*. Der Potentialbereich von -0.5 bis +0.5 V (gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode) wurde so gewählt, daß die Mittelpunktspotentiale aller Kofaktoren erfaßt werden. Bei Anlegen eines Potentials von +0.5 V liegen alle Kofaktoren vollständig oxidiert vor, bei -0.5 V vollständig reduziert. Die Mittelpunktspotentiale der Cytochrome *b* und c_1 wurden im Rahmen dieser Arbeit ermittelt bzw. für das Rieske-Protein der Literatur entnommen (siehe Kapitel 4.1.1.1).

In Abb. 4-1A sind die Differenzspektren des bc_1 -Komplexes für den Übergang vom vollständig reduziertem zum oxidierten (*ox-minus-red*, durchgezogene Linie) bzw. vom oxidierten zum reduzierten (*red-minus-ox*, gepunktet) Zustand im Spektralbereich von 400 bis 650 nm dargestellt. Beide Spektren sind spiegelsymmetrisch, was auf den Ablauf einer vollständig reversiblen Redoxreaktion hinweist. Positive Bandenstrukturen korrespondieren in der Darstellung jeweils mit dem neu entstandenen Redoxzustand, negative mit dem Ausgangszustand des Proteins.

Es lassen sich zwei Hauptbanden unterscheiden. Im Bereich um 420 nm findet sich die sogenannte Soretbande, die einen $S_0 \rightarrow S_3$ -Übergang darstellt. Die Bandenposition ist abhängig vom Redoxzustand des zentralen Eisenatoms des Häms. Die Bande der reduzierten Form tritt aufgrund der geringeren Elektronegativität des Zentralatoms bei niedrigeren Wellenlängen auf

als die der oxidierten. Als Differenz ergibt sich daraus ein dominantes Signal bei 426 nm, das Beiträge der beiden *b*-Häme sowie des *c*-Häms enthält. Wesentlichen Anteil am Entstehen der Bande haben die *b*-Häme. Beiträge des Cytochrom *c*₁ erscheinen als Schulterstruktur bei 418 nm. Sie zeigt sich deutlicher in einer vergrößerten Darstellung der Soretbande im Spektralbereich von 400 bis 450 nm (Abb. 4-1B). Sie zeigt sich deutlicher in einer vergrößerten Darstellung der Soretbande im Spektralbereich von 400 bis 450 nm (Abb. 4-1B).

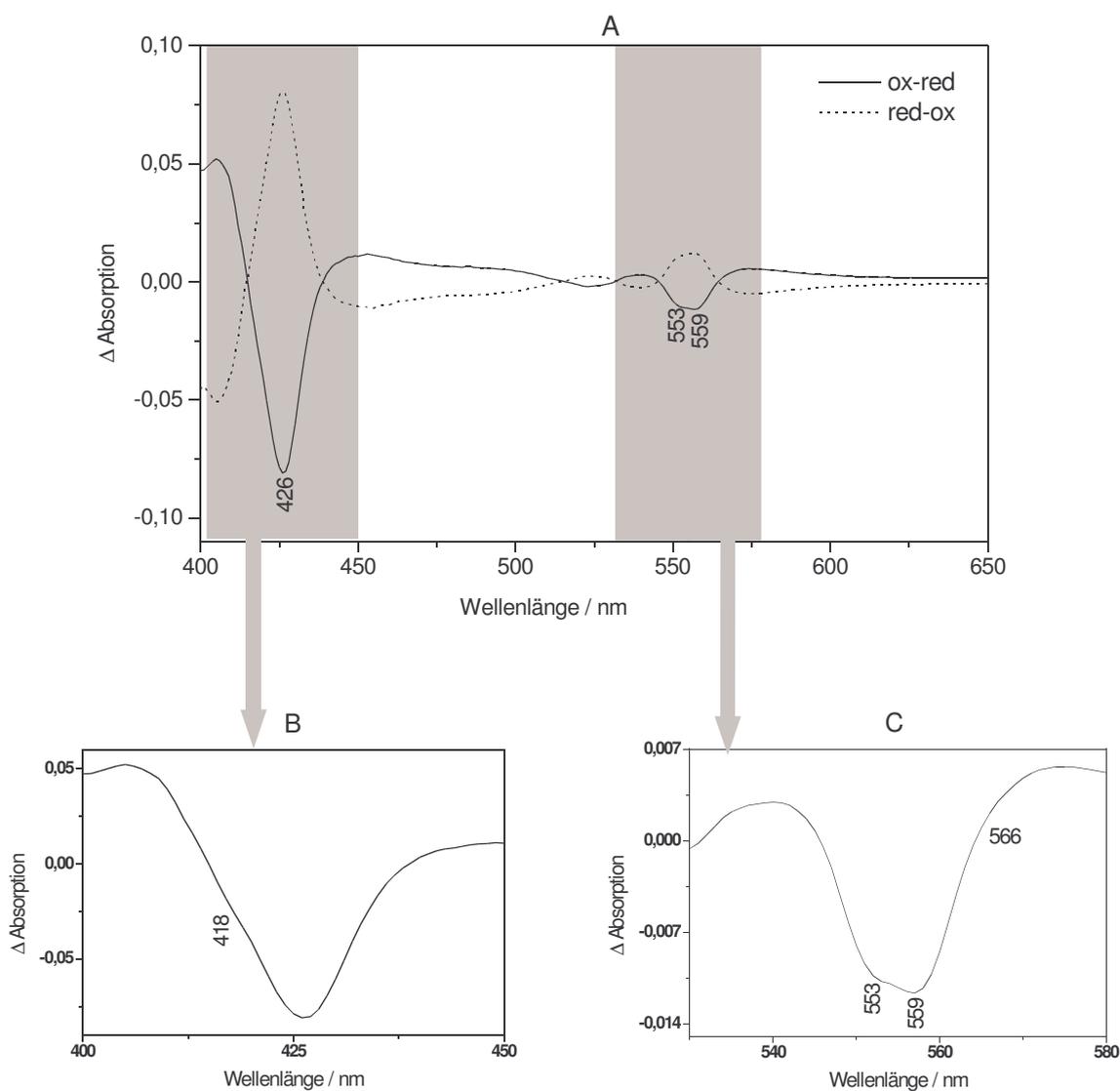


Abbildung 4-1

Elektrochemisch induzierte Differenzspektren des *bc*₁-Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialsprung von -0,5 (reduziert) auf +0,5 V (oxidiert) und zurück. A: Im Spektralbereich von 400 bis 700 nm, durchgezogene Linie: Übergang vom reduzierten zum oxidierten Zustand (ox-minus-red), gepunktet: Übergang vom oxidierten zum reduzierten Zustand (red-minus-ox). B: Vergrößerte Darstellung der Soretbande im Bereich von 400 bis 450 nm (ox-red). C: Vergrößerte Darstellung der α -Bande im Bereich von 530 bis 580 nm (ox-red).

Als zweiter charakteristischer Bereich des Spektrums fällt bei etwa 550 nm die sogenannte α -Bande auf. Sie stellt einen $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang dar und tritt nur bei reduzierten Cytochromen auf (oxidierte Cytochrome zeigen eine breite, wenig ausgeprägte Bande in diesem Bereich). Ihre Lage ist charakteristisch für den jeweiligen Hämtyp und wird von den Substituenten des Hämgerüsts beeinflusst. Für c -Typ-Cytochrome liegt die α -Bande bei etwa 550 nm, während bei Cytochromen mit b -Typ Hämen ein Maximum bei 560 nm erwartet wird (Moore & Pettigrew 1990). Abb. 4-1C zeigt eine vergrößerte Darstellung des bc_1 -Spektrums aus *P. denitrificans* für den Spektralbereich von 530 bis 580 nm. Die strukturierte α -Bande weist Beiträge des Cytochrom c_1 bei 553 nm auf. Das größere Signal bei 559 nm setzt sich aus Beiträgen der beiden Häme des Cytochrom b zusammen. Eine leichte Schulter bei 566 nm kann ebenfalls dem Cytochrom b zugeordnet werden (siehe unten). Diese Bandenstruktur ist charakteristisch für den bc_1 -Komplex und wurde bereits für die Komplexe anderer Organismen beschrieben (Yu et al. 1974, Siedow et al. 1978, Ljundahl et al. 1987, Yang & Trumpower 1986, Salerno et al. 1989, Berry et al. 1991, Baymann 1995). Auch die Positionen der Soret- bzw. α -Bande sind bis auf geringe Verschiebungen von 1-2 nm für alle Organismen identisch.

Die Differenzspektren in Abb. 4-1 beschreiben die spektroskopischen Eigenschaften des gesamten bc_1 -Komplexes in einem Potentialbereich, in dem alle Kofaktoren entweder oxidiert oder reduziert sind. Diese Spektren stellen eine Überlagerung aller Beiträge dar. Da die Kofaktoren unterschiedliche Mittelpunktpotentiale besitzen, lassen sie sich jedoch durch Wahl geeigneter Potentialschritte voneinander trennen. Zur Ermittlung der Mittelpunktpotentiale bieten sich Potentialtitrationen an.

4.1.1.1 Potentialtitrationen

Potentialtitrationen bieten die Möglichkeit, die Mittelpunktpotentiale der einzelnen Kofaktoren des bc_1 -Komplexes zu bestimmen. Diese lassen sich in der in dieser Arbeit verwendeten elektrochemischen Dünnschichtzelle besonders einfach durchführen. Dazu werden elektrochemisch induzierte Differenzspektren bei verschiedenen Potentialen aufgenommen. Aus der erhaltenen Kurvenschar lassen sich mehrstufige Nernstkurven

berechnen, aus denen die Mittelpunktspotentiale der Kofaktoren bestimmbar sind (vgl. Kapitel 3.4). Im sichtbaren Spektralbereich lassen sich jedoch nur die drei Häme charakterisieren. Rieske-Protein und im Komplex gebundene Chinone tragen aufgrund ihrer geringen Extinktionskoeffizienten nur unwesentlich zum Spektrum bei.

Als Ausgangszustand wurde ein Potential von -0.5 V gewählt, bei dem alle Kofaktoren vollständig reduziert vorliegen. In Schritten von jeweils 50 mV wurde das Protein bis zu einem Endpotential von 0.5 V stufenweise oxidiert (alle Angaben vs. Ag/AgCl). Für jedes Potential wurde ein Differenzspektrum berechnet, wobei jeweils das Spektrum des reduzierten Proteins als Referenz diente. Zwischen den Potentialschritten wurde die Probe äquilibriert, um die Einstellung eines Reaktionsgleichgewichts zu erreichen. Für den Gesamtschritt von -0.5 bis 0.5 V betrug sie im allgemeinen weniger als 3 min. Diese Äquilibrierungszeit verlängerte sich jedoch dramatisch für einzelne Zwischenschritte. Im Extremfall betrug sie 40-50 min. Deshalb dauerten die Potentialtitrationen zwischen 8 und 16 Stunden. Aus diesem Grund waren auch keine Titrationen im infraroten Spektralbereich möglich. Die Spektrenaufnahme stellt hier hohe Anforderungen an die Stabilität des Detektors und des gesamten Spektrometers, so daß zwischen den Messungen maximal 10-15 min liegen dürfen. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde die Redox Titration bei allen Proben auch in reduktiver Richtung durchgeführt, wobei hierbei das Spektrum der voll oxidierten Probe als Referenz diente. Während der langen Meßzeiten kam es jedoch zur Denaturierung der Probe, so daß nur die oxidative Titration ausgewertet werden konnte.

Abb. 4-2 zeigt den typischen Verlauf einer oxidativen Redox Titration im Spektralbereich von 400 bis 700 nm. Die Absorptionsänderung ist dabei als Funktion der Wellenlänge und des angelegten Potentials dargestellt. Anhand der Entwicklung der α -Bande läßt sich eine erste Klassifizierung der Mittelpunktspotentiale der drei Häme des bc_1 -Komplexes geben. Im Potentialbereich von -0.5 bis -0.2 V entstehen zuerst die Banden des Häm b_L . Bei höherem Potential folgen die des Häm b_H , ab einem Potential von 0 V zeigen sich auch Beiträge des zum Cytochrom c_1 gehörenden Häm c . Diese grobe Abschätzung bestätigt sich nach Auswertung der zur Kurvenschar gehörenden Nernstkurven. Sie wurden mit dem Programm E_h -TIT erstellt und ausgewertet (vgl. Kapitel 3.4). Ein typisches Beispiel ist in Abb. 4-3 dargestellt. Sie stammt aus der Auswertung der α -Bande im Verlauf einer oxidativen Titration.

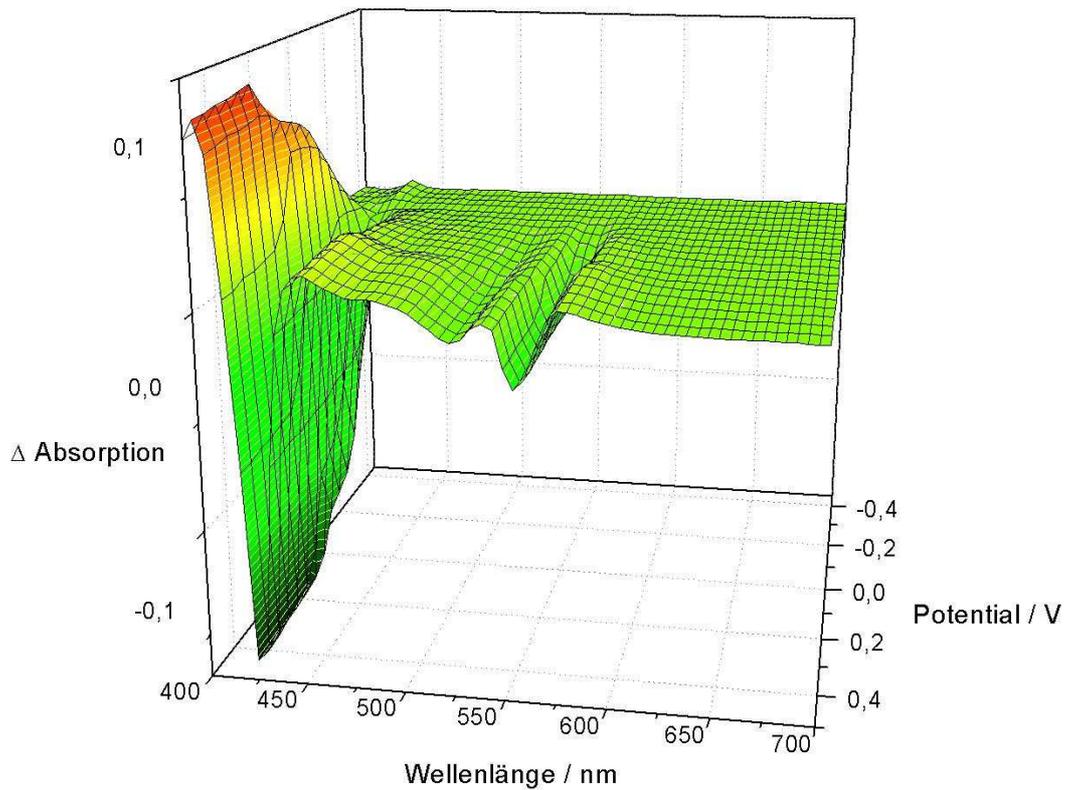


Abbildung 4-2

3D-Darstellung einer oxidativen Redox titration des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* von -0,5 nach 0,5 V in 50 mV-Teilschritten im Spektralbereich von 400 bis 700 nm.

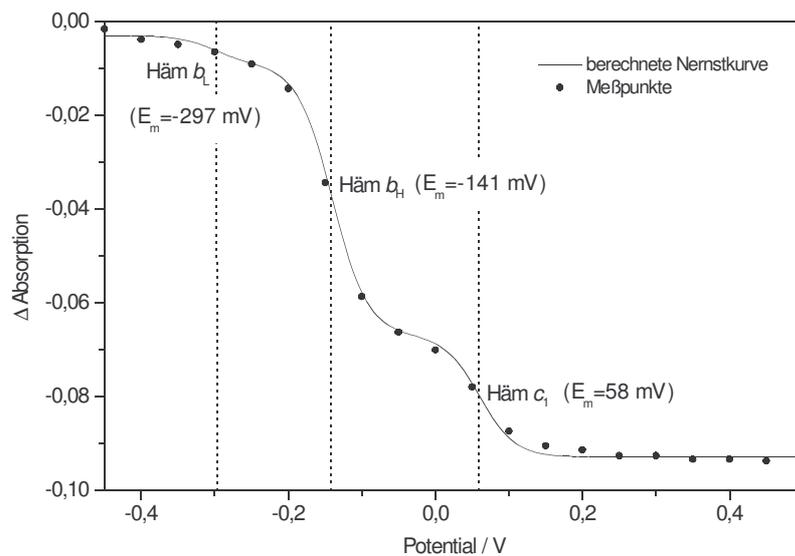


Abbildung 4-3

Nernstkurve einer typischen Potentialtitration der α -Bande im Potentialbereich von -0,5 bis 0,5 V. Die Punkte stellen die Meßwerte dar. Sie ergeben sich aus der Absorptionsänderung beim angelegten Potential im Vergleich zum Referenzspektrum. Die durchgezogene Linie entspricht der vom Programm E_h -TIT berechneten theoretischen Nernstkurve ($n=1$).

Bei ausreichender Äquilibrierungszeit sollte sich für die in umgekehrter Richtung ablaufende reduktive Titration der gleiche Kurvenverlauf ergeben. Dies war häufig nicht der Fall, da die Einstellung des Reaktionsgleichgewichts zum Teil noch länger dauerte als in oxidativer Richtung. Eine vollständige Äquilibrierung wurde nicht abgewartet, um eine Denaturierung des Proteins zu vermeiden. In den Nernstkurven zeigt sich dadurch ein Hystereseverhalten. In den meisten reduktiven Titrationsen wurden trotzdem Denaturierungseffekte beobachtet, die sich durch das Abflachen der Nernstkurve und das Auftreten eines zusätzlichen Potentials zwischen -400 und -450 mV zeigen. Die Potentiale der Häm e verschieben sich oder sind nicht mehr bestimmbar. Salerno et al. (1989) berichten von einem ähnlichen Effekt im mitochondrialen bc_1 -Komplex. Im Differenzspektrum für den gesamten Potentialschritt ist zudem eine Abnahme der maximalen Absorptionsänderung zu beobachten. Zur Bestimmung der Mittelpunktspotentiale wurden deshalb nur oxidative Redox titrationen verwendet. Die folgenden Werte setzten sich aus den Ergebnissen von 9 Titrationsen zusammen.

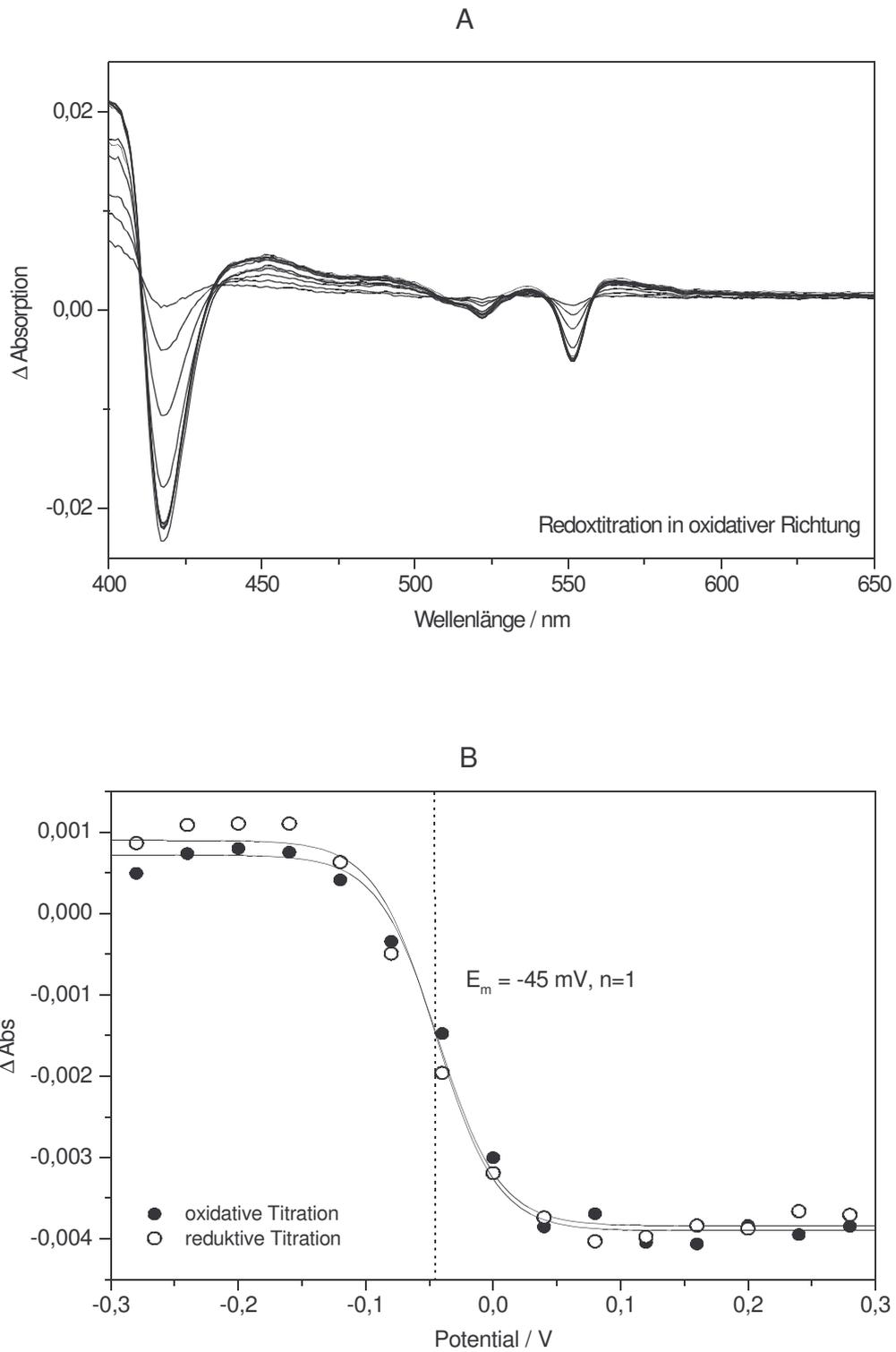
Für Häm b_L wurde ein Mittelpunktspotential von -292 ± 11 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode ermittelt. Dies entspricht in etwa dem aus der Literatur bekannten Wert von -303 mV (Trumppower 1990). Die Abweichungen lassen sich auf unterschiedliche Meßbedingungen und Meßverfahren zurückführen. Von ihnen ist bekannt, daß sie ebenso wie präparative Unterschiede Einfluß auf das Potential haben (Salerno et al. 1989). Diese Parameter lassen sich für die Literaturdaten nicht genau spezifizieren, so daß ein Vergleich immer unter Vorbehalt erfolgen sollte. Weiteren Einfluß auf die Genauigkeit des Ergebnisses hat die Qualität aufgenommen Spektren selbst. Ein ungünstiges Signal/Rausch-Verhältnis, besonders bei geringen Amplituden, sowie Basislinienverschiebungen aufgrund der langen Äquilibrierungszeiten können das Ergebnis verfälschen.

Häm b_H hat ein Mittelpunktspotential von -144 ± 12 mV. In einigen Titrationsen wurde abweichend davon ein Potential von -49 ± 9 mV gefunden. Dieses Phänomen wurde schon mehrfach beschrieben (Rich et al. 1990, Baymann 1995) und wird durch die Wechselwirkung des Häm b_H mit dem Semichinon der Q_i -Bindestelle erklärt. Sie führt zu einer zusätzlichen Potentialkomponente im Bereich von -50 mV. Im Gegensatz zu den genannten Veröffentlichungen konnte jedoch kein gleichzeitiges Auftreten der beiden Potentiale beobachtet werden. Möglicherweise steht im *P. denitrificans*-Komplex ein größerer Anteil b_H -Häm e unter dem Einfluß des Semichinons als bei anderen Organismen, so daß dieser bei der

Aufnahme der Spektren überwiegt. Hier macht sich u.U. der höhere Chinongehalt des *P. denitrificans*-Komplexes im Vergleich zu anderen Komplexen bemerkbar. Er liegt bei 3.5 Chinonen pro Komplex und damit 3-4 fach höher als üblich (*Yang & Trumpower 1986, Trumpower 1991*) und könnte das Mittelpunktspotential beeinflussen (*Salerno et al. 1989*). In der Literatur existiert nur eine Angabe zum Potential dieses Häms. Trumpower (1990, 1991) beschreibt ein biphasisches Titrationsverhalten mit E_m -Werten von -178 und -88 mV. Das Auftreten zweier Potentiale wird mit der Bindung von Ubichinon und seiner Reduktion assoziiert (*de Vries 1986, Salerno 1989*). Der in dieser Arbeit ermittelte Wert liegt etwa in der Mitte zwischen beiden Potentialen. Möglicherweise handelt es sich um eine Mischform, die aufgrund der großen Schrittweite von 50 mV während der Titration nicht weiter spektroskopisch aufgelöst werden konnte. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Probe nicht ausreichend äquilibriert war.

Für das c-Häm des Cytochrom c_1 wurde ein Mittelpunktspotential von $+89 \pm 32$ mV gefunden. Die Streuung ist hier wesentlich größer als bei den Werten der *b*-Häme. Der Grund hierfür ist unbekannt. Ähnliches wurde jedoch auch in mitochondrialen Komplexen beobachtet (*Salerno et al. 1989, vgl. auch Baymann 1995*). Als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann eine zu kurze Äquilibrierungszeit, da für Cytochrom c_1 sowohl Meßwerte aus oxidativen wie reduktiven Titrationsen zur Verfügung standen. Der ermittelte Wert weicht erheblich vom einzig publizierten ab (*Yang & Trumpower 1988*), der mit $E_m = -28$ mV angegeben wird. In einigen Redox-titrationsen wurde ein außergewöhnlich hohes Potential im Bereich von +180 mV ermittelt, das bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt wurde. Interessanterweise trat es häufig, aber nicht ausschließlich dann auf, wenn für das Häm b_H die Komponente mit einem Potential von -50 mV beobachtet wurde.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein wasserlösliches Fragment des Cytochrom c_1 untersucht. Es zeigt im sichtbaren Spektralbereich die gleichen spektroskopischen Eigenschaften wie die im Komplex gebundene Cyt c_1 -Untereinheit (Abb. 4-2C). Auch mit diesem Fragment wurden Potentialtitrationen durchgeführt, deren Ergebnis ein Potential von $E_m = -45$ mV war. Durch die Interaktion der Untereinheit mit dem Gesamtkomplex kommt es offensichtlich zu einer Verschiebung des Häm-potentials.

**Abbildung 4-4**

Potentialtitration des isolierten Cytochrom c_1 -Fragmentes aus dem bc_1 -Komplex von *P. denitrificans*. Details siehe Text.

Abb. 4-4A zeigt die elektrochemisch induzierten Differenzspektren des isolierten Cytochrom c_1 in einem Potentialbereich von -300 bis 300 mV aufgenommen in 50 mV-Schritten (oxidative Titration). In Abb. 4-4B ist die daraus berechnete Nernstkurve dargestellt (gefüllte Kreise), zum Vergleich ist auch die Nernstkurve der reduktiven Titration (leere Kreise) eingezeichnet.

In Tabelle 4-1 sind alle im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Mittelpunktspotentiale zusammengefaßt. Sie gelten für pH 7 und eine Meßtemperatur von 5°C. Zum Vergleich ist das Potential des Rieske-Proteins bei gleichen Bedingungen angegeben (*Schröter et al. 1998*), das unter den gegebenen technischen Voraussetzungen nicht selber bestimmt werden konnte. Angegeben ist auch die Zahl der übertragenden Elektronen, die sich aus der Auswertung der Nernstkurven ergibt (vgl. Kapitel 2.2 und 3.4).

Kofaktor	Mittelpunktspotential / mV	n
Häm b_L	-292±11	1
Häm b_H	-144±12	0.9
Häm c_1	+89±32	1
Häm c_1 (isoliert)	-45±2	1
Rieske-Protein (<i>Schröter et al. 1998</i>)	+105	1

Tabelle 4-1

Mittelpunktspotentiale der Kofaktoren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* (pH 7, T=5°C) bestimmt aus Potentialtitrationen im Spektralbereich von 400 bis 700 nm

4.1.1.2 Separation der Beiträge der Kofaktoren

Anhand der Mittelpunktspotentiale können die Beiträge der Häme separiert werden. Obwohl die beiden b -Häme die gleiche chemische Struktur besitzen, unterscheiden sie sich in ihrem Mittelpunktspotential (s.o.). Grund dafür ist die unterschiedliche Einbettung im Protein. Zur spektroskopischen Trennung der b -Häme wurden die Potentialschritte von 0.5 bis -0,23 V (b_L) bzw. -0.23 bis 0 V (b_H) gewählt. Die VIS-Differenzspektren unterscheiden sich sowohl im Bereich der Soret- als auch der α -Bande. Die Soretbande des Häm b_L liegt bei 431 nm, seine α -Bande ist zweigeteilt und zeigt Maxima bei 559 und 566 nm (Abb. 4-5A). Die entsprechenden Banden des Häm b_H liegen bei 427 nm bzw. 559 nm (Abb. 4-5B). Die Gesamtintensität der Häm b_L -Signale ist etwa um Faktor 5 geringer als die des Häm b_H .

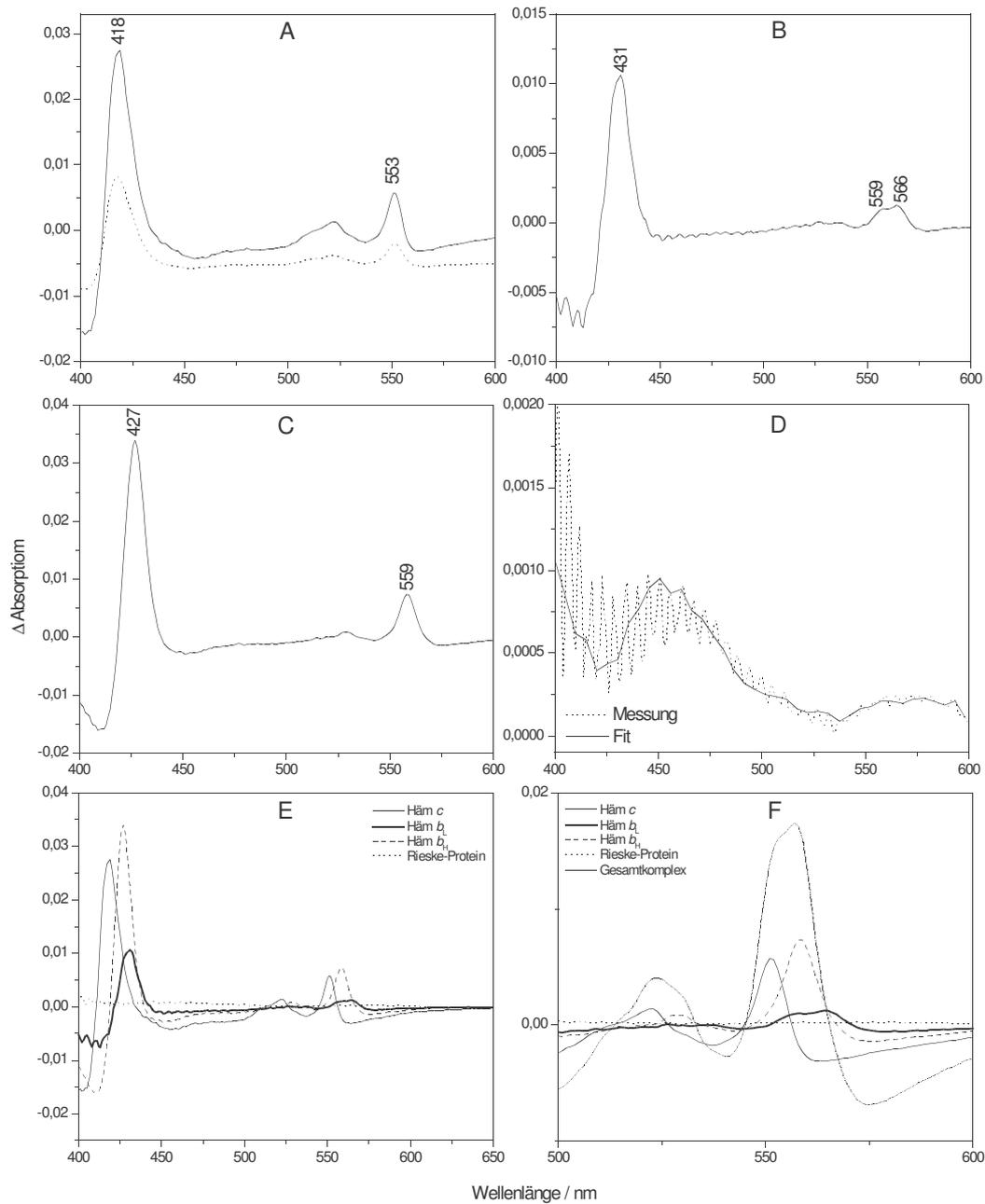


Abbildung 4-5

Elektrochemisch induzierte oxidiert-minus-reduziert-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* für ausgewählte Potentialschritte zur spektroskopischen Trennung der Kofaktoren. A: Potentialschritt von -0.5 nach -0.23 V (Häm b_L , Cytochrom b); B: Potentialschritt von -0.23 nach 0 V (Häm b_H , Cytochrom b); C: Potentialschritt von 0 nach 0.5 V (Häm c , Cytochrom c_1 +Rieske-Protein), gepunktet: Spektrum des isolierten Cytochrom c_1 ; D: Potentialschritt von 0 nach 0,5 V (isoliertes Rieske-Protein). E,F: Überlagerung der Spektren aus A-D. Details siehe Text.

Abb. 4-5C zeigt das Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes für einen Potentialschritt von 0 nach 0.5 V (durchgezogene Linie). In diesem Potentialbereich werden Beiträge des Cytochrom c_1 sowie des Rieske-Proteins erwartet. Da der Extinktionskoeffizient des Eisen-Schwefel-Zentrums um etwa Faktor 5 kleiner ist als der des Cytochroms (*Link 1999*), werden seine Signale überlagert. Die Abbildung spiegelt somit im Wesentlichen die Beiträge des Häm c wider. Dessen Soretbande liegt wie bereits erwähnt bei 418 nm, die α -Bande bei 553 nm. Diese Positionen konnten ebenfalls für die untersuchte isolierte Cytochrom c_1 -Untereinheit gefunden werden. Das entsprechende Spektrum ist in Abb. 4-5C gepunktet dargestellt.

Um Informationen über das Spektrum des Rieske-Proteins zu erhalten, wurde dieses vom Gesamtkomplex proteolytisch abgetrennt und isoliert vermessen. Das Spektrum für einen Potentialschritt von 0 bis 0.5 V ist in Abb. 4-5D dargestellt. Trotz des relativ schlechten Signal/Rausch-verhältnisses lassen sich verschiedene breite Bandenstrukturen identifizieren, die typisch für Eisen-Schwefel-Proteine sind. Sie entstehen durch Überlagerung verschiedener Banden, die vorwiegend aus $S \rightarrow Fe^{III}$ -Ladungstransfer-Übergängen herrühren. In der Literatur (*de Vries et al. 1998, Link 1999*) werden für das oxidierte Protein Maxima im Bereich von 450 bis 460 nm und ca. 580 nm beschrieben. Für das reduzierte Protein liegen diese in den Bereichen um 420-430 nm und 520-550 nm. Das in Abb. 4-5D gezeigte Spektrum weist Maxima an Positionen auf, die dem oxidierten Protein zuzuordnen sind. Die erwarteten Signale der reduzierten Form erscheinen als Minima. Auch sie stimmen weitestgehend mit den Literaturwerten überein.

Abbildungen 4-5E und F zeigen die Überlagerung der in A-D dargestellten Spektren im gesamten untersuchten Spektralbereich (E) und im Bereich der α -Bande (F).

4.1.2 Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren

4.1.2.1 Vorversuche

Die Aufnahme qualitativ hochwertiger FTIR-Differenzspektren stellt hohe Anforderungen an die Meßanordnung. Puffersystem, Mediatorenmischung und Modifizierung der Arbeitselektrode (vgl. Kapitel 3.1 und 3.3) müssen individuell auf das zu untersuchende Protein abgestimmt werden.

In Kontrollversuchen wurde die optimale Elektrodenmodifizierung ermittelt. Verschiedene Modifier wie Cysteamin, Mercaptopropionsäure und PATS-3, die die Adsorption des Proteins an der Goldelektrode verhindern sollen, wurden getestet. Als besonders geeignet erwies sich für den *P. denitrificans*- bc_1 -Komplex eine 2 mM Cysteamin-Lösung. Mit dieser Modifizierung konnte eine gute Reversibilität der elektrochemischen Reaktion und damit eine gute Reproduzierbarkeit der Spektren erreicht werden.

Als Mediatorenmischung konnte auf eine im Institut bewährte Zusammenstellung zurückgegriffen werden, die für die Untersuchung anderer Proteinkomplexe der Atmungskette entwickelt wurde (*Baymann 1995, Hellwig 1998, Hellwig et al. 2000*, siehe Kapitel 3.1.3). Sie erwies sich auch für den bc_1 -Komplex als geeignet und gewährleistet die zur Aufnahme von FTIR-Differenzspektren benötigten kurzen Äquilibrierungszeiten (2-4 min für eine vollständige Redoxreaktion).

Da Mediatoren redoxaktive Substanzen sind, muß sichergestellt sein, daß sie keine eigenen Beiträge zum IR-Spektrum liefern. Dies wurde bereits in früheren Arbeiten überprüft. Die Mediatoren wurden dazu einzeln (*Baymann 1995*) und als Gesamtmischung in Pufferlösung bei unterschiedlichen Konzentrationen (*Hellwig 1998*) vermessen. Es zeigte sich, daß in der für die Proteinmessung verwendeten Konzentration (40 μ M) keine zusätzlichen Signale der Mediatoren im Spektrum sichtbar sind.

Der in der Arbeit verwendete Phosphatpuffer trägt durch elektrochemisch induzierten Protonentransfer charakteristisch zu den FTIR-Differenzspektren bei. Die Pufferbanden können gleichzeitig als Indikator für die Qualität der gewählten Modifizierung genutzt

werden. Bei geeigneter Modifizierung zeigen sie eine gute Reversibilität. Sind die Banden nicht reversibel, ist entweder die Modifizierung des Goldnetzes fehlerhaft oder die Modifiersubstanz ungeeignet.

4.1.2.2 FTIR-Differenzspektren des Wildtypes

Abb. 4-6 zeigt das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V und zurück aufgenommen im Spektralbereich von 1800 bis 1000 cm^{-1} in Kaliumphosphatpuffer (pH 7). Das Spektrum mit durchgezogener Linie stellt dabei den Übergang vom reduzierten zum oxidierten Zustand dar, die gepunktete Linie den umgekehrten Weg vom oxidierten zum reduzierten Protein. Die einzelnen Banden liegen spiegelbildlich zueinander. Dies spricht für den Ablauf einer vollständig reversiblen Redoxreaktion des Proteins an der Arbeitselektrode. Geringe Qualitätsverluste ergeben sich nur im Bereich der Wasserbande um 1650 cm^{-1} , bei der durch starke Absorptionen der $\delta(\text{OH})$ -Schwingung des Wassers eine Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses zu beobachten ist.

Elektrochemisch induzierte Differenzspektren enthalten nur Signale, die auf die Veränderung des Redoxzustandes zurückzuführen sind. Im infraroten Spektralbereich werden Beiträge durch die Redoxreaktionen der Kofaktoren und der Chinone erwartet. Ebenso im Spektrum nachweisbar sind Konformationsänderungen der Proteinumgebung der Kofaktoren, insbesondere des Proteinerückgrates sowie Beiträge einzelner an der Reaktion beteiligter Aminosäureseitenketten. Im Folgenden werden die Banden des oxidiert-*minus*-reduziert-Differenzspektrums aus Abb. 4-6 kurz beschrieben und erläutert. Für einen Großteil der auftretenden Differenzbanden werden Zuordnungen vorgeschlagen. Sie ergeben sich durch Vergleich mit Untersuchungen an Modellsubstanzen und isolierten Proteinbestandteilen sowie bc_1 -Komplexen anderer Organismen. Weitere Zuordnungen beruhen auf Experimenten, bei denen die Beiträge der einzelnen Untereinheiten des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* elektrochemisch voneinander getrennt wurden. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert. Eine Zusammenfassung der folgenden Ergebnisse findet sich ebenfalls in *Ritter et al. 2003*.

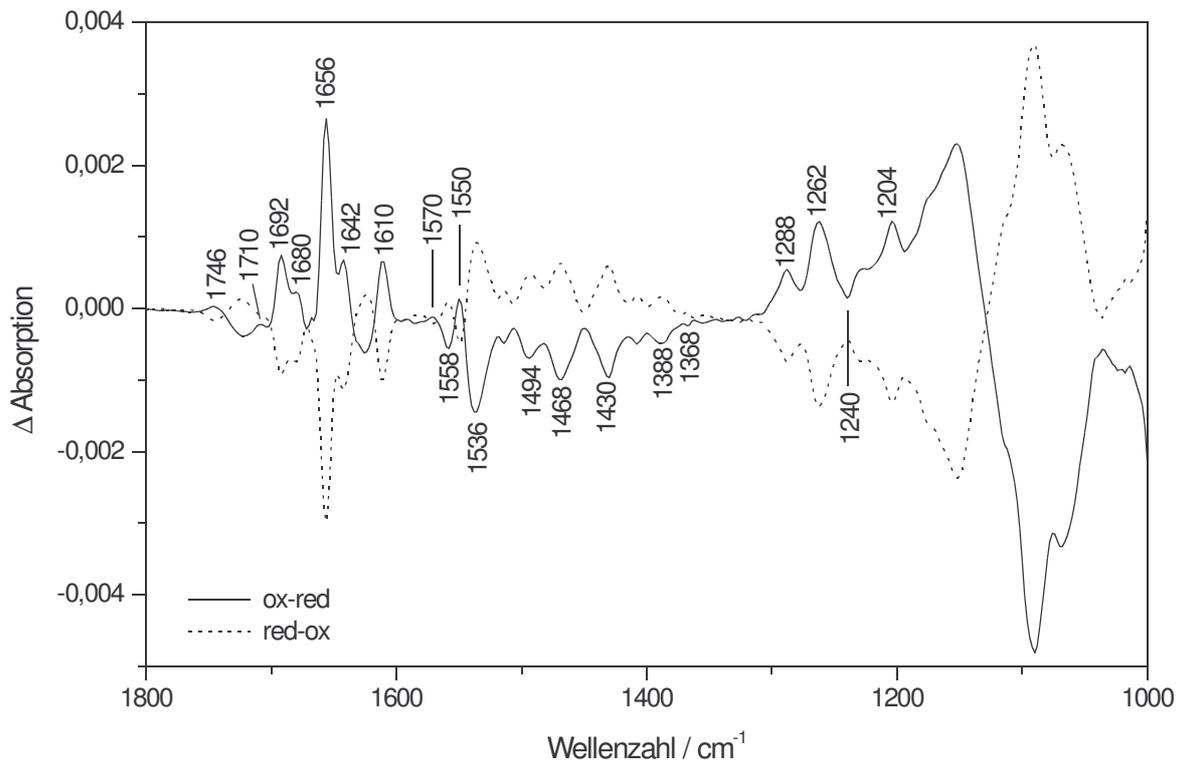


Abbildung 4-6

Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V (ox-minus-red, durchgezogene Linie) und zurück (red-minus-ox, gepunktete Linie) aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) im Spektralbereich von 1800 bis 1000 cm^{-1} .

IR-Differenzbanden des Proteinrückgrates

Wie bereits in Kapitel 2.3.5 erläutert, führt die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren eines Proteins zur Ausbildung eines Polypeptidrückgrates, das das Grundgerüst des Proteins darstellt. Diese Amidbindungen des Rückgrates führen zur Entstehung der Amid I- und Amid II-Bande.

Die Amid I-Bande tritt im Bereich von 1690 bis 1610 cm^{-1} auf. Ca. 80% der potentiellen Energie der Schwingungen, die der Amid I-Mode zugeordnet werden können, sind in der C=O-Streckschwingung der Peptidcarbonyle lokalisiert. Sie ist schwach mit der C-N-Streck- und der N-H-Biegeschwingung der Aminogruppe gekoppelt (Arrondo *et al.* 1993, vgl. Abb. 2-14). Abhängig von der Sekundärstruktur des Proteins besitzen die Schwingungen

unterschiedliche Übergangsdipolmomente, wodurch es zu einer Aufspaltung der Amid I-Bande kommt. In zahlreichen Studien wurden die Positionen dieser Banden untersucht (Goormaghtigh *et al.* 1994). Eine Zusammenfassung findet sich in Tabelle 2-2.

Im Bereich der Amid I-Bande im Spektrum in Abb. 4-6 finden sich positive Signale bei 1692, 1680, 1656 und eine Schulterstruktur bei 1630 cm^{-1} , die von Gerüstschwingungen herrühren könnten. Zu beachten ist jedoch, daß die meisten dieser Banden durch Überlagerungen mit Beiträgen anderer Proteinbestandteile, besonders der Häme und Chinone, entstehen. Eine endgültige Zuordnung ist somit nur schwer möglich.

Das markanteste Signal im Amid I-Bereich findet sich bei 1656 cm^{-1} . Es kann auf die vorwiegend α -helikale Sekundärstruktur der Cytochrom *b*-Untereinheit zurückgeführt werden, die das katalytische Herz des Komplexes darstellt (Kapitel 2.1.3.1). Eine analoge Bande wurde auch im *ox-minus-red*-Spektrum des Rinderherz-*bc*₁-Komplexes bei 1651 cm^{-1} gefunden (Iwaki *et al.* 2003). Für den zweiten infrarotspektroskopisch untersuchten *bc*₁-Komplex aus *Rhodobacter capsulatus* (Baymann 1995, Baymann *et al.* 1999) ist ein direkter Vergleich nicht möglich, da kein Spektrum des Gesamtkomplexes publiziert ist. Die berechneten Spektren der beiden *b*-Häme der Cytochrom *b*-Untereinheit zeigen jedoch vergleichbare Amid I-Signale im Spektralbereich von 1646 bis 1660 cm^{-1} .

Wahrscheinlich tragen auch α -helikale Strukturen der Cytochrom *c*₁-Untereinheit zum Signal bei 1656 cm^{-1} bei. In den *bc*₁-Komplexen aus *Rhodobacter capsulatus* und Rinderherz-Mitochondrien wurden entsprechende Banden bei 1654 bzw. 1657 cm^{-1} dem Cytochrom *c*₁ zugeordnet (Baymann 1995, Iwaki *et al.* 2003). Nach H/D-Austausch sollte sich die Bandenlage für α -helikale Strukturen kaum verändern (Haris & Capman 1994). Abb. 4-7 zeigt, daß dies der Fall ist. Allerdings verringert sich die Intensität der Bande sehr stark (die Spektren wurden anhand der α -Bande im sichtbaren Spektralbereich normiert). Dieser Effekt ergibt sich durch Überlagerungen mit Beiträgen des Chinons, das während des H/D-Austausches teilweise verloren geht (vgl. Kapitel 4.1.2.5).

Von den Beiträgen α -helikaler Strukturen kaum unterscheidbar sind Signale, die von Bereichen in der Proteinstruktur ohne definierte Sekundärstruktur herrühren und im gleichen Spektralbereich erwartet werden. Ein Anteil am Signal bei 1656 cm^{-1} kann somit auch von diesen Sekundärstrukturbestandteilen herrühren.

Ein weiteres intensives Signal im Amid I-Bereich liegt bei 1692 cm^{-1} . Diese Bandenposition ist typisch für β -Faltblattstrukturen, wie sie im Rieske-Protein auftreten, und konnte auch in FTIR-Differenzspektren anderer bc_1 -Komplexe identifiziert werden (Baymann 1995, Iwaki et al. 2003). Überlagerungen mit Beiträgen der C=O-Schwingung der Hämpropionate sind hier jedoch möglich (siehe unten). Nach H/D-Austausch verringert sich die Signalintensität geringfügig. Dies ist in Einklang mit früheren Studien, in denen der Extinktionskoeffizient der Amid I-Schwingungen der β -Faltblattstrukturen in D_2O kleiner ist als in H_2O -Lösungen (Übersicht in Baymann 1995).

Ebenfalls in Bereichen, in denen β -Faltblattsignale erwartet werden, liegt die Schulterstruktur bei 1630 cm^{-1} . Eine exakte Zuordnung ist jedoch nur schwer möglich, da die breite negative Bande, in der die Schulter liegt, durch komplexe Überlagerungen mit Signalen anderer Proteinbestandteile entsteht.

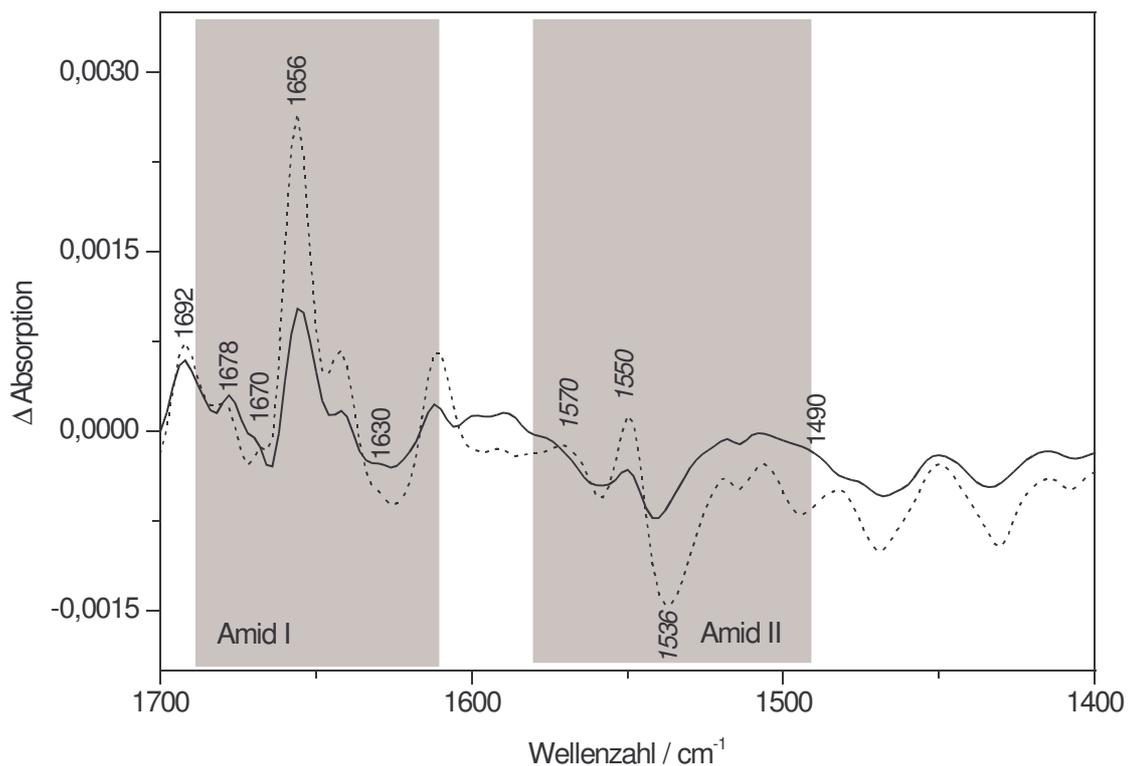


Abbildung 4-7

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialschritt von -0.5 nach $+0.5$ V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pD 7, durchgezogene Linie) im Spektralbereich von 1700 bis 1400 cm^{-1} . Zum Vergleich ist das entsprechende Spektrum in H_2O -Puffer (pH 7, gepunktet) eingezeichnet.

Die Bande bei 1680 cm^{-1} (Abb. 4-6) läßt sich zum überwiegenden Teil auf Signale der protonierten Hämpropionate zurückführen (s.u.). Trotzdem sind auch Anteile von Sekundärstrukturelementen möglich. Im angegebenen Bereich werden Beiträge von Schleifenstrukturen (Loops) erwartet. Sie treten im Rieske-Protein auf (*Link 1999*), werden aber auch in der Cytochrom c_1 -Untereinheit gefunden.

Nach H/D-Austausch verschiebt sich die Bande nach 1678 cm^{-1} . Eine zusätzliche Schulterstruktur entsteht bei 1670 cm^{-1} . Sie kann aber auch zum Teil der Verschiebung von Hämpropionat-Anteilen der Bande zugerechnet werden. Auf diese Zuordnungen wird noch im Einzelnen bei der Besprechung der Signale der Untereinheiten eingegangen.

Die Amid II-Bande im Bereich von 1575 bis 1480 cm^{-1} entsteht im Wesentlichen durch Kopplung der C-N-Streckschwingung mit der N-H-Biegeschwingung (Abb. 2-14). Im Gegensatz zur Amid I-Bande ist ihre Lage wenig von der Sekundärstruktur des Proteins beeinflusst. Als Zuordnungskriterium kann die starke Empfindlichkeit gegenüber H/D-Austausch genutzt werden. Sie ist auf die Entkopplung von C-N- und N-D-Schwingung zurückzuführen.

In Abb. 4-6 lassen sich zwei positive Banden bei 1570 und 1550 cm^{-1} sowie eine negative Bande bei 1536 cm^{-1} finden. Kleinere Signale liegen bei 1558 , 1518 und 1506 cm^{-1} . Zumindest die drei Erstgenannten sind stark empfindlich gegenüber H/D-Austausch. In Abb. 4-7 (kursiv beschriftet) zeigt sich eine deutliche Abnahme der Signalintensität, so daß ein Beitrag der Amid II-Schwingung zu diesen Banden vermutet werden kann. Die breite positive Bande im Bereich von 1490 cm^{-1} läßt sich möglicherweise auf die Entstehung der Amid II'-Bande zurückführen (vgl. Kapitel 2.3.5).

Die Beiträge des Peptidrückgrates lassen sich nur schwer abschließend zuordnen. Sie werden in einem relativ ausgedehnten Spektralbereich erwartet und zeigen oft sehr breite Bandenstrukturen. Diese sind häufig überlagert von Signalen anderer Proteinbestandteile. Insbesondere die Spektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* werden dominiert von den Signalen der gebundenen Chinone. Ebenso finden sich Banden der drei Häme und einzelner Aminosäureseitenketten. Deren Beiträge zum Spektrum in Abb. 4-6 werden im Folgenden kurz beschrieben.

IR-Differenzbanden der Häm

Bei der Zuordnung der Häm-Beiträge im IR-Differenzspektrum lassen sich Schwingungen des Porphyringrundgerüsts, der Propionatgruppen sowie der Vinylsubstituenten unterscheiden (Abb. 2-16). Zur Identifikation der Banden lassen sich Studien von Häm-Modellsystemen heranziehen. Sie stehen für *b*- und *c*-Typ-Häme zur Verfügung (*Berthomieu et al. 1992, Desbois 1994, Hu et al. 1993*, vgl. Tabelle 2-4, 2-5).

Im elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum in Abb. 4-6 werden bei folgenden Banden Beiträge der Porphyriengerüste der Häm vermutet: 1642 (ν_{37} Häm c_1), 1570 (ν_{37} Häm b_L , ν_{38} Häm c_1), 1550 (ν_{38} Häm b_H), 1262 (ν_{42} Häm c_1) und 1240 cm^{-1} (ν_{42} Häm b_H , ν_{42} Häm c_1). Diese Zuordnungen beruhen auf den Spektren der durch selektive Potentialschritte voneinander getrennten Kofaktoren und werden dort im Einzelnen besprochen.

Die Hämpropionate sind direkt involviert in den Elektronentransfer durch das Protein (*Zhang et al. 1998*). Sie sollten demzufolge ebenfalls zum Spektrum beitragen. Aus Studien mit isotope markierten Hämpropionaten der Cytochrom *c* Oxidase (*Behr et al. 1998*) sowie Experimenten an verschiedenen Cytochromen (*Moss et al. 1990, Tonge et al. 1989*) sind vom Protonierungszustand abhängige Schwingungsfrequenzen bekannt. Während Beiträge protonierter Propionate im Bereich von 1710 bis 1670 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ der COOH-Gruppe) erwartet werden, liegen die Signale der deprotonierten Form zwischen 1570 und 1538 cm^{-1} ($\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$) bzw. 1390 cm^{-1} ($\nu(\text{COO}^-)^{\text{sym}}$). Im Spektrum in Abb. 4-6 tragen protonierte Propionate vermutlich zu den Banden bei 1692 und 1680 cm^{-1} bei. Die korrespondierenden Schwingungen der deprotonierten Propionate könnten an der Entstehung der Signale bei 1558, 1536 und 1368 cm^{-1} beteiligt sein. Zuordnungen zu den einzelnen Hämen des Komplexes werden bei deren Diskussion näher erläutert.

Beiträge der Vinylsubstituenten der *b*-Häm könnten ebenfalls im Spektrum vertreten sein. Sie werden im Wesentlichen bei etwa 1620 cm^{-1} erwartet (*Choi et al. 1982*). Dieser Bereich ist, wie bereits erwähnt, geprägt durch zahlreiche sich überlagernde Beiträge, die zu einer breiten, undifferenzierten Bandenstruktur führen. Eine Zuordnung ist hier im Gesamtspektrum nicht möglich. Die Spektren der separierten Kofaktoren zeigen jedoch Banden, die von Vinylsubstituenten stammen könnten. Sie werden an entsprechender Stelle diskutiert.

IR-Differenzbanden der Chinone

Beiträge der Chinone sind in jedem Fall zu erwarten, da sie Hauptfunktionsträger der Redoxreaktion des bc_1 -Komplexes sind. Das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* wird beherrscht von den Signalen der gebundenen Chinone. Es unterscheidet sich damit von allen bisher publizierten bc_1 -Spektren, bei denen die Chinonbanden weniger dominant erscheinen (Baymann 1995, Baymann et al. 1999, Iwaki et al. 2003). Dies läßt sich auf den präparativ bedingten höheren Chinongehalt der *P. denitrificans*-Proben zurückführen (vgl. Kapitel 4.1.2.5). Er liegt nach Literaturangaben bei 3.5 Molekülen Chinon pro Komplex (Yang & Trumpower 1986), während in anderen Komplexen aus präparativen Gründen häufig nur ein bis zwei vorhanden sind (Baymann 1995, Hunte et al. 2000, Iwaki et al. 2003).

Die Chinonbanden in Abb. 4-6 lassen sich leicht durch Vergleich des Proteinspektrums mit Spektren in Wasser oder Lösungsmittel gelöster Chinone ermitteln (Bauscher & Mäntele 1992, Hellwig et al. 1999b). Durch die Bindung des Chinons verändert sich die Position der Signale nur um wenige Wellenzahlen. Die Banden der beiden C=O-Streckschwingungen (Abb. 2-17), die in Lösungsmittelspektren spektral nicht getrennt werden, spalten durch die Bindung im Protein auf. Sie liegen bei 1656 und 1642 cm^{-1} . Die C=C-Streckschwingung ist für das Signal bei 1610 cm^{-1} verantwortlich. Aus der Umorganisation des Chinonringes während der Redoxreaktion resultieren wahrscheinlich die negativen Banden zwischen 1494 und 1388 cm^{-1} (Hellwig et al. 1999b). Zwei weitere typische Signale finden sich bei 1288 und 1262 cm^{-1} . Sie werden den Methoxygruppen des Chinons zugeordnet (Bauscher & Mäntele 1992, Baymann et al. 1999, Hellwig et al. 1999b). Eine weiterführende Beschreibung und Diskussion der Chinoneigenschaften findet sich in Kapitel 4.1.2.5.

IR-Differenzbanden der Aminosäureseitenketten

Zur Identifikation einzelner an der Redoxreaktion des Proteins beteiligter Aminosäuren können Vergleiche mit bekannten Bandenmustern isolierter Aminosäuren herangezogen werden (Venjaminov & Kalnin 1990). Sie liefern jedoch nur Anhaltspunkte, da sich die Bandenpositionen durch Einbindung der Aminosäure in eine Proteinumgebung die Positionen

verändern können. Aufgrund geringer Extinktionskoeffizienten (Tabelle 2-3) und Überlagerungen mit anderen Signalen lassen sich im untersuchten Spektralbereich nur wenige Aminosäuren direkt zuordnen. Im wesentlichen sind dies Asparagin- und Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Arginin und Tyrosin.

Im Spektrum in Abb. 4-6 lassen sich Beiträge verschiedener Aminosäure-Seitenketten vermuten. Ein auffälliges Signal bei 1746 cm^{-1} stammt wahrscheinlich von einer oder mehreren Asparagin- oder Glutaminsäureseitenketten. Es ist gekoppelt an den Chinongehalt der jeweils untersuchten Probe und wird später noch ausführlich diskutiert. Weitere Beiträge von Asparagin- und Glutaminsäureseitenketten sowie Arginin-Seitenketten zu den Banden bei 1710 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung) bzw. 1680 cm^{-1} ($\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{\text{as}}$ -Schwingung) sind möglich. Die korrespondierenden Banden der reduzierten Seitenketten ($\nu(\text{COO}^-)^{\text{as/sym}}$) sowie die entsprechende symmetrische Streckschwingung der Arg-Seitenkette ($\nu(\text{CH}_3\text{H}_5)^{\text{sym}}$) können ebenfalls im Gesamtspektrum nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 4-2). Sie sind mit der Redoxreaktion des Cytochrom *b* assoziiert und werden dort besprochen.

IR-Differenzbanden des Kaliumphosphatpuffers

Die P=O-Schwingung des Phosphatpuffers reagiert mit Protonenaufnahme bzw. -abgabe auf Veränderungen des pH-Wertes der Probe durch elektrochemisch induzierte Protonentransfers im Protein und den Mediatoren (*Hellwig 1998*). Die protonierte Form manifestiert sich in einer positiven Bande bei 1152 cm^{-1} , die eine Streckschwingung des H_2PO_4^- -Moleküls darstellt. Infolge einer Deprotonierungsreaktion entsteht die starke negative Bande bei 1090 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1086 cm^{-1} . Sie läßt sich auf die Streckschwingung der HPO_4^{2-} -Gruppe zurückführen (*Baymann et al. 1999*).

In Abb. 4-8 sind die Beiträge der einzelnen Proteinbestandteile zu den Banden veranschaulicht. Sie zeigt deutlich, daß sich häufig Signale mehrerer Komponenten zu einer Gesamtbande überlagern. Diese Tatsache erschwert eine endgültige Zuordnung der Banden, so daß alle Ergebnisse als vorläufig zu betrachten sind. Abschließende Resultate lassen sich somit nur durch weiterführende und ergänzende Untersuchungen gewinnen.

Dies wären zum Beispiel:

Mutation einzelner Aminosäuren

- Einsatz isotope-markierter Substanzen (Chinone, Häme)
- Isolierung einzelner Untereinheiten
- pH-Abhängigkeit
- Vergleich mit bc_1 -Komplexen anderer Organismen

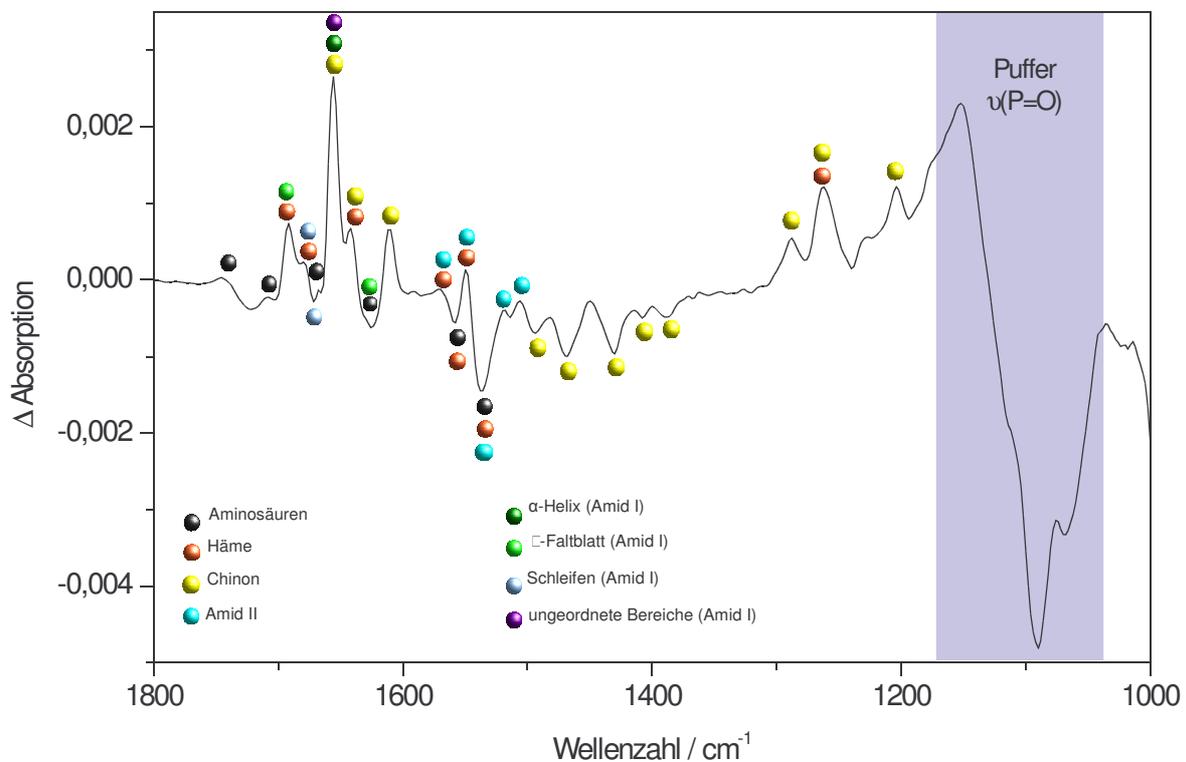


Abbildung 4-8

Grafische Veranschaulichung der Beiträge der einzelnen Proteinbestandteile zur Entstehung der FTIR-Differenzbanden des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* (vorläufige Zuordnung nach Kapitel 4.1.2.2). Details s. Text und Tabelle 4-2.

Tabelle 4-2 faßt alle für das Gesamtspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* getroffenen Bandenzuordnungen zusammen. In den folgenden Kapiteln werden diese anhand der FTIR-Differenzspektren der Kofaktoren weiter diskutiert und untermauert.

Bandenposition in cm ⁻¹	Zuordnung	Kofaktor
1746 (+)	v (C=O)	Asp/Glu
1710 (+)	v (C=O)	Asp/Glu
1692 (+)	Amid I	β-Faltblatt
	v (C=O)	Hämpropionate
1680 (+)	v (C=O)	Hämpropionate
	v (C=O)	Asn/Gln
	Amid I	Schleifenstrukturen
1672 (-)	Amid I	Schleifenstrukturen
1670 (+)	v (CN ₃ H ₅) ^{as}	Arg
1656 (+)	Amid I	α-helikale Strukturen, ungeordnete Bereiche
	v (C=O)	Chinon
1642 (+)	v (C=O)	Chinon
	v ₃₇	Häm c ₁
1630 (+)	Amid I	β-Faltblatt
	v (CN ₃ H ₅) ^{sym}	Arg
1610 (+)	v (C=C)	Chinon
1592 (+)		
1570 (+)	Amid II	
	v ₃₇	Häm b _L
	v ₃₈	Häm c ₁
1558 (-)	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{as}	Asp/Glu
1550 (+)	Amid II	
	v ₃₈	Häm b _L
1536 (-)	Amid II	
	v (COO ⁻) ^{as}	Asp/Glu
	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionate
1518 (+)	Amid II	
1506 (+)	Amid II	
1494 (-)		Chinolring
1468 (-)		Chinolring
1430 (-)		Chinolring
1408 (-)		Chinolring
1388 (-)		Chinolring
	v (COO ⁻) ^{sym}	Asp/Glu
1368 (-)	v (COO ⁻) ^{sym}	Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{sym}	Asp/Glu
1288 (+)	v (C-O)	Methoxygruppen Chinon
1262 (+)	v (C-O)	Methoxygruppen Chinon
	v ₄₂	Häm c ₁
1240 (-)	v ₄₂	Häm b _H
	v ₄₂	Häm c ₁
1204 (+)		Chinon
1176 (+)		
1152 (+)		
1090 (-)		P=O Phosphatpuffer
1068 (-)		

Tabelle 4-2

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des Gesamtspektrums des bc₁-Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer pH 7, (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands

4.1.2.3 Trennung der Beiträge der Kofaktoren des Komplexes durch selektive Potentialschritte

Um zu analysieren, wie die einzelnen Kofaktoren zur Entstehung der Banden des Gesamtspektrums beitragen, wurden ihre Differenzspektren durch geeignete Potentialschritte voneinander getrennt. Dazu wurden die in Kapitel 4.1.1.1 ermittelten Mittelpunktspotentiale verwendet. Ausgangs- und Endpotential wurden jeweils so gewählt, daß ein möglichst großer Potentialbereich abgedeckt wurde, ohne daß schon Beiträge anderer Kofaktoren zu erwarten waren. Die erhaltenen Spektren spiegeln die Redoxreaktion des angesprochenen Kofaktors aber auch seiner unmittelbaren Umgebung wider.

Beiträge des Häm b_L

Häm b_L liegt in unmittelbarer Nähe der Q_o -Bindestelle und ist direkt eingebunden in den Elektronentransferweg. An der Q_o -Bindestelle werden durch die Oxidation von Chinol zu Chinon zwei Elektronen freigesetzt. Eines davon wird über das Häm b_L in Richtung Häm b_H und Q_i -Bindestelle weitergeleitet.

Das Mittelpunktspotential des Häm b_L beträgt wie in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben - 292 mV gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode. Um seine Beiträge zum Spektrum des Gesamtkomplexes (Abb. 4-6) zu ermitteln, wurde ein Potentialschritt von -0.5 nach -0.23 V gewählt. Im Verlauf dieser Potentialveränderung wird das zu Beginn reduzierte Häm oxidiert. Die Vollständigkeit der

Reaktion wurde anhand der simultan aufgenommenen Spektren im sichtbaren Spektralbereich kontrolliert. So kann ebenfalls ausgeschlossen werden, daß andere Kofaktoren zum IR-Spektrum beitragen. Das Kontrollspektrum ist in Abb. 4-9 dargestellt. Es zeigt die typische

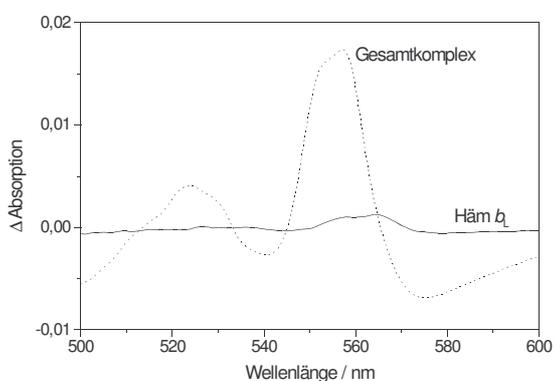


Abbildung 4-9

Kontrollspektrum der α -Bande des Häm b_L im sichtbaren Spektralbereich von 500 bis 600 nm für einen Potentialschritt von -0.5 nach -0.23 V. Zum Vergleich ist das Gesamtspektrum des Komplexes (gepunktet) eingezeichnet.

geteilte α -Bande des Häm b_L mit Maxima bei 559 und 566 nm. Die Intensität der Banden ist im Vergleich zum Gesamtspektrum sehr gering. Dies läßt sich auch beim elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum feststellen, das in Abb. 4-10A dargestellt ist.

Abb. 4-10B zeigt eine vergrößerte Darstellung des FTIR-Differenzspektrum des Häm b_L für den oben genannten Potentialschritt. Zur Aufnahme dieses Spektrums waren Äquilibrierungszeiten im Bereich von 15 bis 20 min notwendig. Diese sind im Vergleich zum Gesamtspektrum sehr hoch und liegen im Grenzbereich, für den noch eine ausreichende Detektor- und Gerätestabilität erwartet werden kann. Die Qualität der Spektren ist aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses relativ gering. Trotzdem konnten zahlreiche reproduzierbare und reversible Banden gefunden werden, die im Folgenden diskutiert werden. Die Beschreibung erfolgt anhand des *ox-minus-red* Spektrums. Das *red-minus-ox* Spektrum zeigt analoge Signale, wird aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

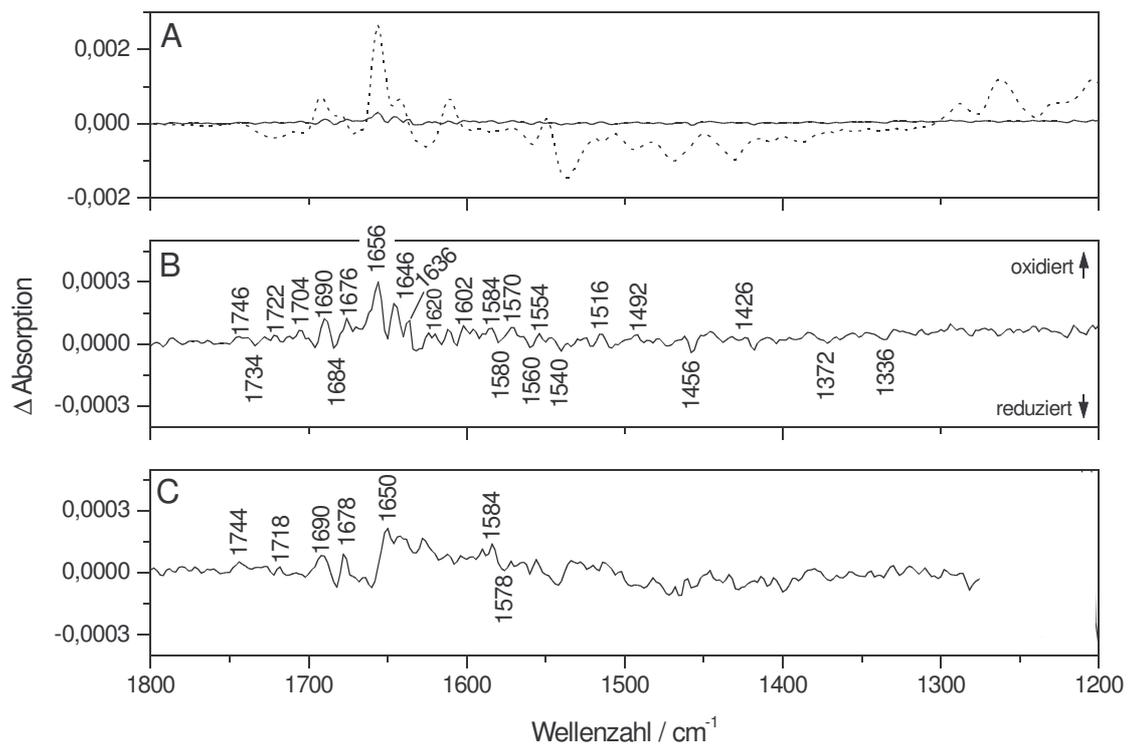


Abbildung 4-10

Elektrochemisch induziertes *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum des Häm b_L und seiner Umgebung für einen Potentialschritt von -0.5 nach -0.23 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer. A: Intensitätsvergleich mit dem Differenzspektrum des Gesamtkomplexes (gepunktet); B: Differenzspektrum des Häm b_L in H₂O-Puffer (pH 7); C: Differenzspektrum des Häm b_L in D₂O-Puffer (pD 7).

Das Bandenmuster des Häm b_L -Spektrums ähnelt den entsprechenden Spektren der bc_1 -Komplexe aus *Rhodobacter capsulatus* und Rinderherz-Mitochondrien (Baymann *et al.* 1999, Iwaki *et al.* 2003). Die Bandenpositionen variieren meist nur um wenige Wellenzahlen. Besonders das Spektrum des *Rb. capsulatus*-Komplexes weicht nur in wenigen Bereichen vom oben gezeigten ab. Dies bestätigt eine äquivalente Funktion der Häme beider Organismen und läßt sich anhand der hohen Sequenzhomologie der Cytochrom b -Untereinheiten erwarten (siehe Anhang 7.1).

Im Amid I-Bereich lassen sich drei stärkere positive Signale bei 1656, 1646 und 1636 cm^{-1} finden, die wahrscheinlich die C=O-Streckschwingung der Peptidcarbonyle repräsentieren. Die 1656 cm^{-1} -Bande weist auf konformelle Veränderungen der unmittelbaren Umgebung des Häm hin, das zwischen zwei α -Helices in die Cytochrom b -Untereinheit eingebunden ist (vgl. Abb. 2-8). Leider ließen sich hier durch H/D-Austausch keine neuen Erkenntnisse gewinnen, da die Qualität dieses Spektrums besonders im Amid I-Bereich sehr schlecht ist (Abb. 4-10C). Es beruht auf einem einzigen Experiment, während das Spektrum in H_2O -Puffer (Abb. 4-10B) mehrfach reproduziert werden konnte.

Beiträge der Amid II-Schwingung lassen sich am ehesten der Bande bei 1570 cm^{-1} zuordnen. Sie ist die Einzige, deren Intensität sich nach H/D-Austausch merklich verändert. Die erwartete Verschiebung der Bande zu etwa 1480 cm^{-1} kann allerdings im D_2O -Spektrum (Abb. 4-10C) aufgrund der geringen Signalintensitäten nur schwer nachvollzogen werden. Endgültige Zuordnungen sind äußerst schwierig, da es im Amid II-Bereich auch zu Überlagerungen mit Beiträgen aus $(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ -Schwingungen der Hämpropionate oder einzelner Aminosäureseitenketten kommen kann (siehe unten).

Aus Häm-Modellstudien (Berthomieu *et al.* 1992) sind Absorptionen des Porphyringerüsts und der Vinylsubstituenten (Berthomieu *et al.* 1992, Choi *et al.* 1982) bekannt. Sie liegen für die CaCm -Schwingung (ν_{37} , vgl. Abb. 2-16) zwischen 1655 und 1586 cm^{-1} . Im Spektrum in Abb. 4-10B finden sich zahlreiche Signale in diesem Bereich. Kandidaten für diese Schwingung sind die Banden bei 1602 und 1584 cm^{-1} . Überschneidungen gibt es zu den Absorptionen der CbCb -Schwingung (ν_{38}), die zwischen 1604 und 1542 cm^{-1} erwartet wird. Sie könnte zu den Signalen bei 1580, 1554 und 1540 cm^{-1} beitragen. In den Häm b_L -Spektren des *Rb. capsulatus* bzw. Rinderherz-Komplexes wurden Banden bei 1537 bzw. 1532 cm^{-1} dieser Schwingung zugeordnet (Baymann 1995, Iwaki *et al.* 2003).

Weiterhin könnte die CaN-Schwingung (ν_{41}) beitragen, deren Signale zwischen 1320 bis 1390 cm^{-1} erwartet werden. (Hellwig 1998). Zwei negative Banden bei 1372 und 1336 cm^{-1} sind in Abb. 4-10B ersichtlich. Im Spektrum des Rinderherz- bc_1 -Komplexes wurde eine Bande bei 1336 cm^{-1} auf diese Schwingung zurückgeführt (Iwaki et al. 2003). Für *Rb. capsulatus* wird eine Bande bei 1400 cm^{-1} der CaN-Schwingung zugeordnet. Auf eine nähere Zuordnung soll in der vorliegenden Arbeit verzichtet werden, da auch Beiträge der Vinylsubstituenten oder symmetrische Streckschwingungen der deprotonierten Hämpropionate oder einzelner Aminosäureseitenketten zu den beiden Banden nicht auszuschließen sind (siehe unten).

Die CmH-Deformationsschwingung (ν_{42}) wurde in den Spektren der Modellsysteme zwischen 1150 und 1268 cm^{-1} nachgewiesen. Für die bc_1 -Komplexes aus *Rb. capsulatus* und Rinderherz wurde eine entsprechende Bande bei 1237 cm^{-1} beschrieben (Baymann 1995, Iwaki et al. 2003). Aufgrund der geringen Signalintensität und des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses werden im vorliegenden Spektrum keine Zuordnungen vorgenommen.

Die Beiträge der Vinylsubstituenten wurden in Modellstudien untersucht (Berthomieu et al. 1992, Choi et al. 1992). Die Absorptionen der $\nu(\text{C}\alpha=\text{C}\beta)$ -Schwingung werden bei 1620 cm^{-1} erwartet. Die symmetrische $\delta(=\text{CH}_2)$ -Schwingung liegt bei etwa 1340 cm^{-1} . Im Differenzspektrum des Häm b_L (Abb. 4-10B) lassen sich Banden bei 1620 und 1336 cm^{-1} möglicherweise auf diese Schwingungen zurückführen. Letztere könnte jedoch auch Beiträge der symmetrischen Streckschwingung deprotonierter Hämpropionate beinhalten. Die antisymmetrische $\delta(=\text{CH}_2)$ -Schwingung liegt bei etwa 1100 cm^{-1} und wird von Banden des Kaliumphosphatpuffers überlagert (in der Abbildung nicht dargestellt).

Beiträge der Hämpropionate sollten ebenfalls im Spektrum sichtbar sein. In Abb. 4-10B sind Signale bei 1690 (+), 1684 (-) und 1676 (+) cm^{-1} ersichtlich. Möglicherweise weist auch das Signal bei 1704 cm^{-1} Beiträge von Propionaten auf. Es muß jedoch beachtet werden, daß dieses Signal auch Beiträge von Asp/Glu-Seitenketten beinhalten könnte, so daß eine eindeutige Zuordnung nicht ohne weiteres möglich ist.

Diese positiven Signale würden bedeuten, daß beim oxidierten Häm mindestens ein Propionat protoniert wäre. Für den Hefe- bc_1 -Komplex wurde dies bereits vermutet, wobei wenigstens eins der Propionate während der Reduktion des Häms deprotoniert werden soll (Hunte et al. 2000). Das Auftreten der ersten drei Banden und ihre Positionen sind ebenfalls im Einklang

mit den Spektren aus *Rb. capsulatus* und Rinderherz-Mitochondrien, bei denen maximal Verschiebungen um drei Wellenzahlen relativ zum oben gezeigten Spektrum auftreten (Baymann 1995, Iwaki et al. 2003). Die Zuordnung wird durch das Verhalten der Banden nach H/D-Austausch untermauert (Abb. 4-10C). Die Signalintensität bei 1704, 1690 und 1684 cm^{-1} nimmt ab, während die der Bande bei 1676 cm^{-1} leicht zunimmt. Ein solches Verhalten wurde auch bei den Hämpropionaten der Cytochrom *c* Oxidase beobachtet (Hellwig 1998).

Die Positionen der oben genannten Banden sprechen für Wasserstoffbrückenbindungen zu benachbarten Aminosäuren, die später diskutiert werden. Eine Deprotonierung der Propionate zeigt sich durch Auftreten von Banden der antisymmetrischen und symmetrischen COO^- -Schwingung. Sie werden im Bereich von 1570 bis 1530 cm^{-1} bzw. um 1370 cm^{-1} erwartet (Colthup et al. 1990, Hellwig 1998, Behr et al. 1998). Entsprechende Signale für die $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ -Schwingung können im Spektrum bei 1560 und 1540 cm^{-1} gefunden werden. Überlagerungen mit Beiträgen der $(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ -Schwingung deprotonierter Aminosäureseitenketten oder der Amid II-Schwingung können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die symmetrische COO^- -Schwingung könnte zu den Signalen bei 1372 und 1336 cm^{-1} beitragen. Auch hier sind Anteile anderer Schwingungen nicht auszuschließen.

Durch die Redoxreaktion des Häms können auch Aminosäuren in der Umgebung angesprochen werden, die in den Elektronen/Protonentransferzyklus des Proteins eingebunden sind. Aus Studien mit isolierten Aminosäuren sind typische Absorptionsbereiche für die einzelnen Aminosäuren bekannt, die als Anhaltspunkte dienen können (Venyaminov & Kalnin 1990). Die tatsächliche Zuordnung eines Signals zu einer bestimmten Aminosäure ist letztendlich jedoch nur durch Mutagenese-Studien möglich. Die nachfolgenden Erläuterungen sind auch in Anbetracht des stark verrauschten Spektrums nur als Vorschläge zu verstehen.

Das Spektrum in Abb. 4-10B weist eine positive Doppelbande bei 1746/1738, eine negative Bande bei 1734 cm^{-1} sowie weitere positive Banden bei 1722 und 1704 cm^{-1} auf. In diesem Bereich werden im Wesentlichen Beiträge der C=O-Streckschwingung protonierter Asparaginsäure- und Glutaminsäureseitenketten (kurz auch Aspartat und Glutamat) erwartet. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Signale mehrerer Aspartat- und Glutamatseitenketten, die unterschiedlich stark wasserstoffverbrückt sind. Bei höheren Wellenzahlen läßt sich auf eine schwache Wasserstoffbrückenbindung schließen, während bei niedrigeren Wellenzahlen eine stärkere Bindung vorliegt. Die Zuordnung der COOH -

Säuregruppen ließe sich durch eine Verschiebung der Banden um einige Wellenzahlen nach H/D-Austausch untermauern (Hellwig 1998). Dies ist aufgrund der schlechten Qualität des D₂O-Spektrums (Abb. 4-10C) nur schwer möglich. Unter Vorbehalt läßt sich eventuell eine Verschiebung der Bande bei 1746 nach 1744 sowie der Bande bei 1722 nach 1718 cm⁻¹ erkennen. Das Signal bei 1738 cm⁻¹ scheint im D₂O-Spektrum verschwunden zu sein. Es läßt sich jedoch nicht nachvollziehen, wohin es verschoben ist.

Neben den Signalen der protonierten Säuregruppen sollten sich auch die Banden der deprotonierten Form finden lassen. Sie werden auf Basis der Modellspektren (Venjaminov & Kalnin 1990) zwischen 1674 und 1560 cm⁻¹ ((COO⁻)^{as}) und bei etwa 1400 cm⁻¹ ((COO⁻)^{sym}) erwartet. Das FTIR-Differenzspektrum zeigt drei in Frage kommende Banden bei 1560 und 1540 cm⁻¹ sowie bei 1372 cm⁻¹. Sie lassen sich jedoch nicht ausschließlich auf die COO⁻-Schwingungen zurückführen und können auch Beiträge anderer Proteinbestandteile enthalten (siehe oben).

In der näheren Umgebung des Häm *b_L* finden sich einige Aspartat- und Glutamatseitenketten. Hier ist besonders Glu295 zu nennen, das eine wichtige Verbindung zwischen der Q_o-Bindestelle und dem Häm *b_L* darstellt. Das äquivalente Glu272 aus dem *bc₁*-Komplex von *S. cerevisiae* ist in die Bindung des Chinols involviert und soll im Verlauf der Chinoloxidation sowohl seine Position als auch seinen Protonierungszustand verändern (Crofts et al. 1999, Hunte et al. 2000, Palsdottir et al. 2003). Auf die Bedeutung dieses Glutamats wird im Kapitel 4.1.2.5 noch weiter eingegangen.

In den Röntgenkristallstrukturen der mitochondrialen *bc₁*-Komplexe finden sich in direkter Nachbarschaft der Hämpropionate des Häm *b_L* die Aminosäuren Arginin und Asparagin. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen können als äquivalente Reste in *P. denitrificans* Asn279 und Arg94 identifiziert werden. Asn279 würde bei angenommenem ähnlichen Aufbau der Häm-Umgebungen in Kontakt zum Propionat A, Arg94 zum Propionat D des Häm stehen. Die Nähe zu den Propionaten läßt eine Einbindung in den Redoxzyklus vermuten. Weiterhin könnte auch das konservierte Arg85 beitragen.

Entsprechende Signale im FTIR-Differenzspektrum würden zwischen 1680 und 1670 bzw. 1630 bis 1620 cm⁻¹ auftreten (Venjaminov & Kalnin 1990). Für Asparagin wird die C=O-Streckschwingung bei 1678 cm⁻¹ und die NH₂-Biegeschwingung bei 1622 cm⁻¹ erwartet. Arginin-Schwingungen treten als symmetrische und antisymmetrische Streckschwingung der

CN₃H₅-Seitenkette bei 1633 und 1673 cm⁻¹ auf. Im Spektrum des Häm *b_L* finden sich in Frage kommende Banden bei 1676 und 1670 cm⁻¹ und bei 1624 bzw. 1620 cm⁻¹. Möglicherweise handelt es sich hier um Beiträge der oben genannten Aminosäuren. Eine Überlagerung des 1676 cm⁻¹-Signals mit Beiträgen der Hämpropionate ist jedoch wahrscheinlich. Eine Betrachtung des D₂O-Spektrum könnte die Zuordnung des Asparagin-Signals bestätigen. Die C=O-Bande sollte sich um etwa 30 cm⁻¹ verschieben (*Chirgadze et al. 1975*). Die Intensität des Signals sollte zunehmen. Im D₂O-Spektrum (Abb. 4-10C) läßt sich die Entstehung einer starken Bande bei 1650 cm⁻¹ beobachten, die möglicherweise auf Asparaginbeiträge zurückgeführt werden kann. Im Fall des Arginins bringt die Betrachtung des D₂O-Spektrum keine weiteren Erkenntnisse. Eine Absicherung durch Mutationen ist hier unerlässlich.

Tyrosinschwingungen weisen z.T. sehr hohe Extinktionskoeffizienten auf (*Venyaminov & Kalnin 1990*). Die Ringschwingung protonierter Tyrosine wird im Bereich von 1518 cm⁻¹ ($\epsilon=430 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) erwartet, die der deprotonierten Tyrosine bei 1498 cm⁻¹ ($\epsilon=700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, vgl. Tabelle 2-3). Weitere Banden könnten bei 1612 (Tyr-OH, *Fabian et al. 1994*) und 1602 cm⁻¹ ($\epsilon=160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) auftreten. Im elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum des Häm *b_L* finden sich Banden bei 1612(+), 1602(+), 1516(+), 1510(-) und 1492(+) cm⁻¹ auf, die möglicherweise aus der Protonierung bzw. aus Deprotonierungen verschiedener Tyrosine resultieren. Diese Zuordnung ist jedoch nur sehr vage, da die Intensitätsverhältnisse der Banden zueinander nicht mit dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten entspricht. Hier spielen eventuell Überlagerungen mit anderen Absorptionen und auch die Qualität des Spektrums eine Rolle. In jedem Fall sind Tyrosinbeiträge denkbar. In der Umgebung des Häm finden sich einige Kandidaten wie z.B. Tyr297 (PEWY-Loop) und Tyr147 (wahrscheinlich Teil der Bindetasche des Häm *b_L*).

Im Bereich des Häm *b_L* finden sich zahlreiche konservierte Proline (P202, P271, P277, P294; ohne Anspruch auf Vollständigkeit). Sollten sie zum FTIR-Differenzspektrum beitragen, wären Banden bei 1424 und 1456 cm⁻¹ zu erwarten (*Rothschild et al. 1989*). Das Spektrum zeigt Banden an diesen Positionen, die möglicherweise auf Reaktionen eines oder mehrerer Proline zurückzuführen sind.

Da das Häm von zwei Histidinen (His 97 und His111) ligandiert wird, sind möglicherweise auch deren Ringschwingungen nachweisbar. Sie sollten im Bereich von 1596 cm⁻¹ liegen

(Venyaminov & Kalnin 1990). Nach Deuterierung verschiebt sich diese Bande unter Verringerung ihrer Intensität zu höheren Wellenzahlen (vgl. Tabelle 2-3). Das Spektrum in Abb. 4-10B weist mögliche Histidinbeiträge bei 1596 cm^{-1} auf. Diese Bande scheint im D_2O -Spektrum (Abb. 4-10C) nicht mehr vorhanden zu sein, was eine Zuordnung untermauern würde. Die Verschiebung der Bande läßt sich aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses des Spektrums nicht beurteilen.

Bandenposition in cm^{-1}	Vorläufige Zuordnung	
1746/1738 (+)	v (C=O)	Glu/Asp
1734 (-)	v (C=O)	Glu/Asp
1722 (+)	v (C=O)	Glu/Asp
1704 (+)	v (C=O)	Glu/Asp
	v (C=O)	Hämpropionate
1690 (+)	v (C=O)	Hämpropionate
1684 (-)	v (C=O)	Hämpropionate
1676 (+)	v (C=O)	Hämpropionate
	v (C=O)	Asn
1670 (+)	v (C=O)	Asn
	v (CN ₃ H ₅) ^{as}	Arg
1656 (+), 1646 (+), 1636 (+)	Amid I	
1624 (+)	v (CN ₃ H ₅) ^{sym}	Arg
1620 (+)	v (C α C β)	Vinylsubstituent
	δ (NH ₂)	Asn
1612 (+)	Ring	Tyr-OH
1602 (+)	v ₃₇	
	Ring	Tyr-O ⁻
1596 (+)	Ring	His
1584 (+)	v ₃₇	
1580 (-)	v ₃₈	
1570 (+)	Amid II	
1560 (-)	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{as}	Asp/Glu
1554 (+)	v ₃₈	
1540 (-)	v ₃₈	
	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{as}	Asp/Glu
1516 (+)	v ₁₉ (CC)-Ring	Tyr-OH
1510 (-)	Ring	Tyr-OH
1492 (+)	v ₁₉ (CC)-Ring	Tyr-O ⁻
1456 (-)	Ring-N	Pro
1424 (+)	H-Ring-N	Pro
1372 (-)	v ₄₁	
	v (COO ⁻) ^{sym}	Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{sym}	Asp/Glu
1336 (-)	v ₄₁	
	δ (=CH ₂)	Vinylsubstituent

Tabelle 4-3

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des Häm b_L und seiner Umgebung für einen Potentialschritt von -0.5 nach -0.23 V. (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands.

Wie bereits erwähnt, sind alle in diesem Kapitel diskutierten Zuordnungen als Vorschläge zu betrachten. Die Qualität des Spektrums in Hinblick auf das Signal/Rausch-Verhältnis läßt keine endgültigen Schlüsse zu. Die Zuordnungen der Aminosäureseitenketten können abschließend nur durch ortsgerichtete Mutationen an den entsprechenden Stellen gefestigt oder ausgeschlossen werden. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 4-3 gegeben.

Beiträge des Häm b_H

Häm b_H liegt im Transmembranbereich des Komplexes in der Nähe der Q_i -Bindestelle, an der Chinon zu Chinol reduziert wird. Das Häm übernimmt das aus Richtung Häm b_L kommende Elektron und leitet es zum Chinon weiter.

Für das Mittelpunktspotential wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Wert von -144 mV ermittelt. Zur Aufnahme des elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrums wurde als untere bzw. obere Grenze des Potentialbereichs ein Wert von -230 bzw. 0 V gewählt. Für diesen Potentialschritt sind im sichtbaren Spektralbereich weder Beiträge des Häm b_L noch des Häm c_1 sichtbar (Kontrollspektrum Abb. 4-11). Es

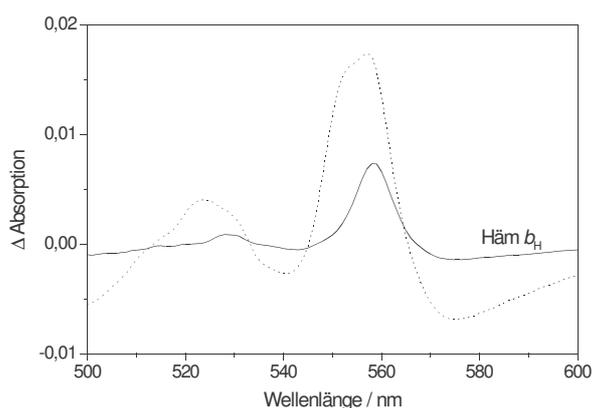


Abbildung 4-11

Kontrollspektrum des Häm b_H im sichtbaren Spektralbereich (α -Bande) für einen Potentialschritt von -0.23 nach 0 V. Gepunktet: Spektrum des Gesamt- bc_1 -Komplexes

kann davon ausgegangen werden, daß dies auch im Infrarotbereich der Fall ist. Der gewählte Potentialschritt umfaßt jedoch auch die Mittelpunktspotentiale der im Komplex gebundenen Chinone, die im sichtbaren Spektralbereich aufgrund geringer Extinktionskoeffizienten nicht nachweisbar sind. Das Mittelpunktspotential des Q/QH_2 -Redoxpaares ist in der Literatur mit unterschiedlichen Werten angegeben. (Ding *et al.* 1992, Baymann 1995, Rich 1984). Es sollte aber in jedem Fall im gewählten Potentialbereich zum Spektrum beitragen.

In Abb. 4-12 ist das elektrochemisch induzierte *ox-minus-red* FTIR-Differenzspektrum des Häm b_H für einen Potentialschritt von -0.230 nach 0 V in Kaliumphosphatpuffer dargestellt. Abb. 4-12A zeigt die Signalintensität im Vergleich zum Spektrum des Gesamtkomplexes (-0.5 \rightarrow 0.5 V). Abb. B stellt das Häm b_H -Spektrum in H₂O-Puffer (pH 7) und Abb. C in D₂O-Puffer (pD 7) dar. Die Äquilibrationszeit betrug wie im Fall des Häm b_L etwa 15 bis 20 min. Durch die höheren Signalintensitäten ist die Qualität der Spektren jedoch wesentlich besser. Auch hier sind *ox-minus-red* und *red-minus-ox* Spektren reversibel und reproduzierbar. Auf eine Darstellung der *red-minus-ox*-Spektren wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Bei Betrachtung der Spektren fällt auf, daß die aufgrund des gewählten Potentialschrittes erwarteten Chinon-Signale fehlen. Sie erscheinen jedoch nach längeren Äquilibrationszeiten von etwa 30 bis 40 min. Da primär die Beiträge des Häm b_H untersucht werden sollten, wurde eine vollständige Äquilibration der Chinone nicht abgewartet. Ihre Banden wurden später auf anderem Wege bestimmt (siehe Kapitel 4.1.2.5). Das Phänomen ist bereits aus Studien von Chinoloxidasen bekannt (P. Hellwig, persönliche Mitteilung). Die hohen Äquilibrationszeiten treten scheinbar dann auf, wenn Messungen in einem engen Bereich um das Mittelpunktspotential der Chinone durchgeführt werden.

Im Amid I-Bereich sind mehrere Signale präsent, die Beiträge des Peptidrückgrates enthalten könnten. Die Bande bei 1656 cm⁻¹ läßt sich auf konformelle Veränderungen der α -helikalen Umgebung des Häm zurückführen. H/D-Austausch (Abb. 4-12C) führt zu einer kleinen Verschiebung der Bande nach 1654 cm⁻¹, wie sie für Helices erwartet wird (Arrondo *et al.* 1993).

In der Nähe des Häm b_H mitochondrialer bc_1 -Komplexe finden sich in der Sekundärstruktur auffallend viele Schleifen und ungeordnete Bereiche (Xia *et al.* 1997, Iwata *et al.* 1998, Hunte *et al.* 2000). Sie könnten auch im Komplex von *P. denitrificans* vorhanden sein. Schleifenstrukturen werden im Bereich zwischen 1662 und 1686 cm⁻¹ erwartet, ungeordnete Bereiche absorbieren zwischen 1642 und 1657 cm⁻¹ (Goormaghtigh *et al.* 1994). Die Signale bei 1670 und/oder 1664 cm⁻¹ ließen sich daher möglicherweise auf Schleifen zurückführen. Eine Schulter bei 1644 cm⁻¹ könnte von strukturellen Veränderungen in ungeordneten Bereichen herrühren. Beide Sekundärstrukturformen zeigen nach Literaturangaben eine

geringe Empfindlichkeit auf Deuterierung. Die Verschiebung der Bande bei 1680 cm^{-1} um 4 Wellenzahlen sowie die Abnahme der Intensität der Bande bei 1670 cm^{-1} nach H/D-Austausch scheinen dies zu bestätigen. Eine Zuordnung bei diesen beiden Signalen ist jedoch schwierig, da Überlagerungen mit anteiligen Beiträgen verschiedener Aminosäureseitenketten möglich sind (siehe unten). Die Schulter bei 1644 cm^{-1} verschiebt sich möglicherweise zu höheren Wellenzahlen. Eine schwache Schulter ist im D_2O -Spektrum bei 1648 cm^{-1} sichtbar. Sie könnte jedoch auch Beiträge von Asparaginseitenketten enthalten, die nach H/D-Austausch in diesem Bereich erwartet werden.

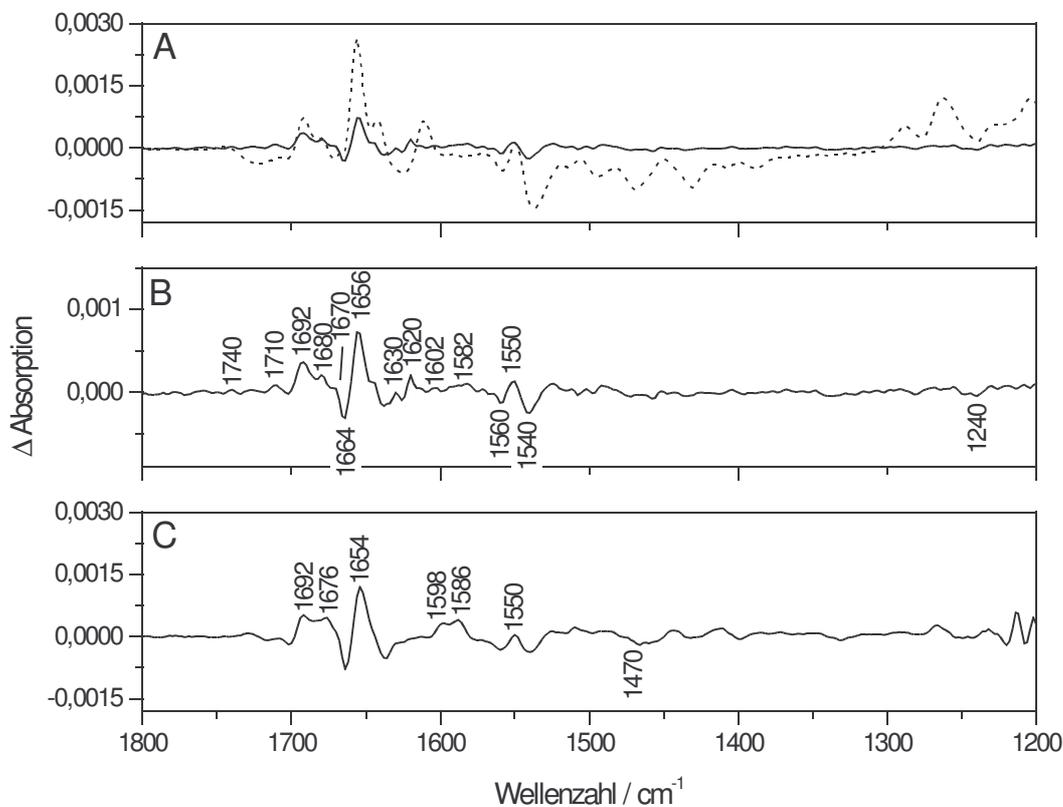


Abbildung 4-12

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum (ox-minus-red) des Häm b_{H} und seiner Umgebung für einen Potentialschritt von $-0,23$ nach 0 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer. A: Intensitätsvergleich mit dem Differenzspektrum des Gesamtkomplexes (gepunktet); B: Differenzspektrum des Häm b_{H} in H_2O -Puffer (pH 7); C: Differenzspektrum des Häm b_{H} in D_2O -Puffer (pD 7).

Amid II-Schwingungen werden zwischen 1575 und 1480 cm^{-1} erwartet. Sie könnten in die Entstehung der Banden bei 1560 , 1550 und 1540 cm^{-1} involviert sein. Bei allen drei Signalen verringert sich die Intensität nach H/D-Austausch. Dies könnte auf die Verschiebung der

Amid II-Anteile dieser Banden in den Bereich um 1470 cm^{-1} zurückzuführen sein (die Entstehung der Amid II'-Bande wird bei 1480 cm^{-1} erwartet).

Ein Großteil der Banden in Abb. 4-12B kann Schwingungen des Hämgerüsts und seiner Substituenten zugeordnet werden. Die *CaCm*-Streckschwingung (ν_{37}) des Porphyringerüsts wird nach Messungen an Modellsystemen zwischen 1655 und 1586 cm^{-1} erwartet (*Berthomieu et al. 1992, Li et al. 1990*). Sie könnte im gezeigten Spektrum zu den kleinen Signalen bei 1602 und 1582 cm^{-1} beitragen.

Eine Unterscheidung der ν_{37} -Schwingung von der *CbCb*-Streckschwingung (ν_{38}) ist sehr schwierig. Sie absorbiert bei ähnlichen Wellenzahlen und wurde, wie bereits bei Häm b_L erwähnt, in Modellstudien zwischen 1604 und 1542 cm^{-1} beobachtet (*Berthomieu et al. 1992*). Bei 1550 cm^{-1} kann eine starke Bande beobachtet werden, die aus dieser Schwingung resultieren könnte. Iwaki et al. (2003) ordnen im Häm b_H des Rinderherz-*bc*₁-Komplexes ein Signal bei 1553 cm^{-1} der ν_{38} -Schwingung zu. Überlagerungen mit Beiträgen der Amid II-Bande werden vermutet und sind auch im *P. denitrificans*-Spektrum wahrscheinlich (siehe oben).

Die *CmH*-Deformationsschwingung (ν_{42}) wird zwischen 1150 und 1268 cm^{-1} erwartet. In den Spektren des Häm b_H aus *Rb. capsulatus* und Rinderherz-Mitochondrien werden charakteristische Banden bei 1236 bzw. 1237 cm^{-1} dieser Schwingung zugeordnet (*Baymann et al. 1999, Iwaki et al. 2003*). Im Häm b_H -Differenzspektrum aus *P. denitrificans* in Abb. 4-12B kann ein Signal bei 1240 cm^{-1} beobachtet werden, das diesen Zuordnungen entsprechen könnte.

Die Beiträge der Vinylsubstituenten wurden bereits in anderen *bc*₁-Studien beschrieben (*Baymann 1995*). Die $\nu(\text{CaC}\beta)$ -Schwingung wird bei 1620 cm^{-1} beobachtet und ist auch im vorliegenden Spektrum vorhanden. Das Signal setzt sich jedoch wahrscheinlich aus Beiträgen mehrerer Komponenten zusammen. Denkbar sind Absorptionen von Asparagin- und Argininschwingungen, die später diskutiert werden. Die antisymmetrische $\delta(=\text{CH}_2)$ -Schwingung wird um 1100 cm^{-1} erwartet. Sie wird jedoch von den Banden des Phosphatpuffers überlagert (der Bereich unterhalb 1200 cm^{-1} ist aufgrund der dominanten Pufferbanden nicht dargestellt). In Modellstudien wird die Position der symmetrischen $\delta(=\text{CH}_2)$ -Schwingung im Bereich von 1340 cm^{-1} beschrieben (*Berthomieu et al. 1992, Choi et al. 1992*).

Protonierte Hämpropionate tragen wahrscheinlich zu den Banden bei 1692 und 1680 cm^{-1} bei. Die Zuordnungen können anhand der Ausführungen im Häm b_L -Kapitel nachvollzogen werden. Nach H/D-Austausch (Abb. 4-12C) verändert sich das Verhältnis der Signalintensitäten. Es kann vermutet werden, daß sich beide Banden zumindest teilweise nach 1676 cm^{-1} verschieben, weshalb sich dessen Intensität erhöht. Wie auch beim Häm b_L verschwindet das Signal bei 1692 cm^{-1} nach Deuterierung nicht.

Die Schwingungen der deprotonierten Hämpropionate werden im Bereich von 1570 bis 1530 cm^{-1} erwartet. Sie tragen wahrscheinlich zu den beiden negativen Banden bei 1560 und 1540 cm^{-1} bei und werden der antisymmetrischen COO^- -Schwingung zugeordnet. Überlagerungen mit Amid II- oder $(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ -Schwingungen von Glu/Asp-Seitenketten können hier nicht ausgeschlossen werden. Die symmetrische COO^- -Schwingung wird unterhalb 1400 cm^{-1} erwartet. In diesem Bereich sind einige sehr kleine Signale im Spektrum sichtbar. Eine exakte Zuordnung ist nicht möglich.

Oberhalb von 1710 cm^{-1} werden ausschließlich Beiträge der Aminosäureseitenketten der Glutamin- und Asparaginsäure erwartet. Die Signale bei 1740 und 1710 cm^{-1} können deshalb wahrscheinlich auf C=O-Schwingungen dieser Seitenketten zurückgeführt werden. Die korrespondierenden COO^- -Schwingungen treten bei 1560 und 1540 cm^{-1} auf (antisymmetrische Schwingung). Die symmetrische COO^- -Schwingung sollte bei etwa 1400 cm^{-1} erscheinen, wo einige Signale mit geringer Intensität im Spektrum vorhanden sind. Ein weiterer Beitrag dieser Schwingung findet sich laut Experimenten mit isolierten Aminosäuren (*Venyaminov & Kalnin 1990*) bei 1250 cm^{-1} . Sie trägt möglicherweise zu Banden bei 1250 oder 1240 cm^{-1} bei. Ein Kandidat für ein solches Bandenmuster ist Asp252. Es ist in den b_{c1} -Komplexen vieler Organismen konserviert (*Trumpower 1990*). Das mitochondriale Äquivalent befindet sich in Röntgenkristallstrukturen in unmittelbarer Nähe des Hämpropionats (*Zhang et al. 1998*). Diese Aminosäure ist zudem direkt in die Chinonbindung in der Q_i -Bindestelle eingebunden (*Hunte et al. 2000*). Zuordnungen sind ohne Mutagenesestudien aber nicht möglich.

Für das Häm b_H -Differenzspektrum aus *Rb. capsulatus* diskutiert Baymann (1995) Beiträge von Argininseitenketten. Sie finden sich für die antisymmetrische Streckschwingung der Guanidingruppe ($-\text{CN}_3\text{H}_5$) bei 1682 und 1670 cm^{-1} , während die symmetrische Streckschwingung bei 1642 cm^{-1} identifiziert wurde. Nach Studien an isolierten Argininen

werden die Schwingungen bei 1673 und 1633 cm^{-1} erwartet (Venyaminov & Kalnin 1990). Abb. 4-13 zeigt eine vergrößerte Darstellung des Spektralbereiches von 1685 bis 1560 cm^{-1} aus Abb. 4-12B/C. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum aufgenommen in H_2O -Puffer. Bei 1680 bzw. 1670 cm^{-1} und 1630 bzw. 1620 cm^{-1} sind in Frage kommende Banden ersichtlich. Sowohl antisymmetrische als auch symmetrische Schwingung reagieren empfindlich auf H/D-Austausch. Das Signal der antisymmetrischen Mode sollte sich laut der Modellstudien nach 1608 cm^{-1} verschieben. Im D_2O -Spektrum (Abb. 4-13, gepunktete Linie) ist eine entsprechende Bande bei 1598 cm^{-1} sichtbar. Die symmetrische Schwingung verschiebt sich, wie von Venyaminov & Kalnin (1990) beschrieben, nach 1586 cm^{-1} . Beiträge von Argininen zu den oben erwähnten Banden sind somit sehr wahrscheinlich.

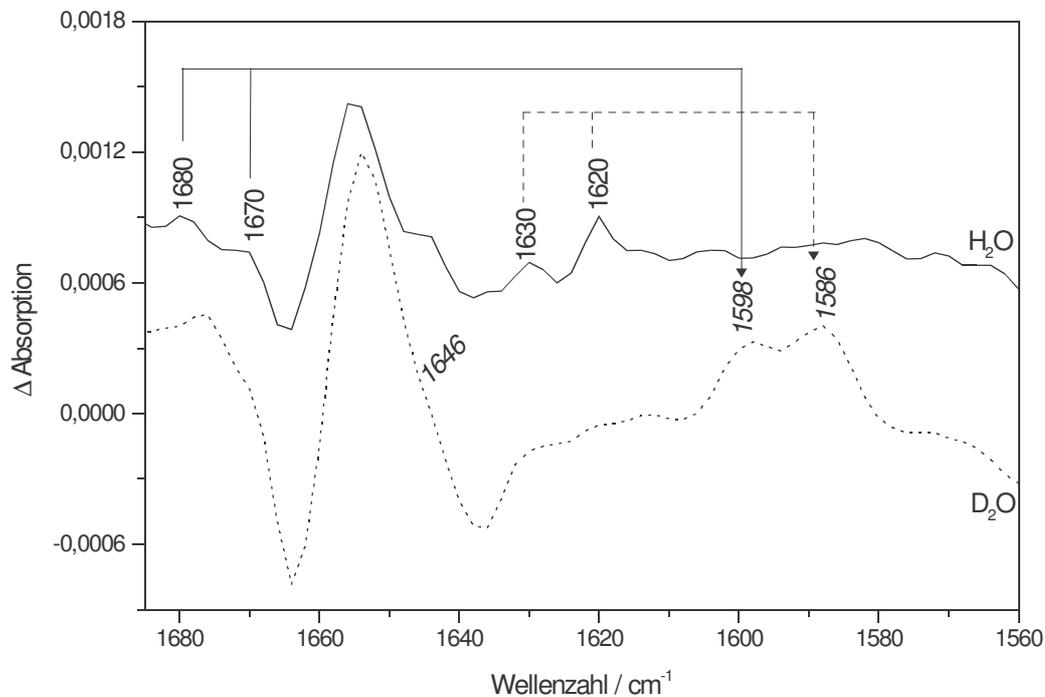


Abbildung 4-13

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des Häm b_{H} im Spektralbereich von 1685 bis 1560 cm^{-1} aufgenommen in H_2O - (durchgezogene Linie) und D_2O -Puffer (gepunktete Linie) zur Zuordnung möglicher Beiträge von Arginin-Seitenketten

Überlagerungen treten vermutlich mit Beiträgen der Hämpropionate bei 1680 cm^{-1} auf. Im D_2O -Spektrum könnten Banden Anteile aus der ν_{37} -Schwingung des Hämphorphyringerüsts enthalten.

Ein Kandidat für die besprochenen Signale ist Arg114, welches über eine Wasserstoffbrücke mit einem Propionat des Häm b_H wechselwirken könnte (Baymann 1995). Im *S. cerevisiae*- bc_1 -Komplex findet sich an entsprechender Stelle der Aminosäuresequenz ein Lysin, das eine äquivalente H-Brücke aufbauen kann (Brandt & Trumpower 1994).

Im Bereich der Signale bei 1680 und 1670 bzw. 1630 und 1620 cm^{-1} sind außerdem Beiträge der Asparaginseitenketten möglich. Nach Deuterierung sollte sich die Bande der C=O-Schwingung zu etwa 1648 cm^{-1} verschieben (Venyaminov & Kalnin 1990). Durch die zahlreichen Überlagerungen mit anderen Beiträgen läßt sich dies nur schwer nachvollziehen. Die Entstehung einer Schulter bei 1648 cm^{-1} im D_2O -Spektrum (vgl. Abb. 4-13) liefert eventuell einen Hinweis darauf.

Beiträge anderer Aminosäureseitenketten werden nicht beschrieben, da für sie keine ausreichenden Hinweise vorliegen. Denkbar wären noch Banden von Histidinen, die wie im Fall des Häm b_L das zentrale Eisenatom des Häm ligandieren. Mehrere Tyrosine, die in näherer Umgebung des Häm liegen, könnten ebenfalls beitragen. Die Bande bei 1250 cm^{-1} wäre ein Kandidat für die Tyr-C-O-Streckschwingung (Abb. 4-12B). Im Spektrum finden sich jedoch keine weiteren auffälligen Tyrosinsignale. Auf eine ausführliche Diskussion wird daher verzichtet.

In Tabelle 4-4 sind alle vorläufigen Zuordnungen für die Redoxreaktion des Häm b_H und der dadurch beeinflussten Proteinumgebung zusammengefaßt. Endgültige Zuordnungen müßten durch weiterführende Experimente bestätigt werden. Denkbar sind hier Mutationen zur Identifizierung einzelner Aminosäuren oder Isotopenmarkierungen.

Bandenposition in cm^{-1}	Vorläufige Zuordnung
1740 (+)	v (C=O) Glu/Asp
1710 (+)	
1692 (+)	v (C=O) Hämpropionate
1684 (-)	
1680 (+)	v (C=O) Hämpropionate
	v (C=O) Asn
	v (CN ₃ H ₅) ^{as} Arg
1670 (+)	Amid I
	v (C=O) Asn
	v (CN ₃ H ₅) ^{as} Arg
1664 (-)	Amid I
1656 (+)	
1644 (+)	
1630 (+)	v (CN ₃ H ₅) ^{sym} Arg
	δ (NH ₂) Asn
1620 (+)	v (C α C β) Vinylsubstituent
	v (CN ₃ H ₅) ^{sym} Arg
	δ (NH ₂) Asn
1602 (+)	V ₃₇
1582 (+)	V ₃₇
1560 (-)	Amid II
	v (COO ⁻) ^{as} Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{as} Asp/Glu
1550 (+)	Amid II
	V ₃₈
1540 (-)	Amid II
	v (COO ⁻) ^{as} Hämpropionate
	v (COO ⁻) ^{as} Asp/Glu
1250 (-)	v (COO ⁻) ^{sym} Asp/Glu
1240 (-)	V ₄₂

Tabelle 4-4

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des Häm b_H und seiner Umgebung für einen Potentialschritt von -0.23 nach 0 V. (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands. Details siehe Text.

Beiträge des Häm c_1 und des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins

Das c -Häm des Cytochrom c_1 und das Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Protein bilden die Hochpotentialkette des Q-Zyklus. Sie werden im Verlauf des Redoxzyklus durch das zweite bei der Chinoloxidation an der Q_o-Bindestelle frei werdende Elektron reduziert. Das Elektron gelangt auf diesem Weg zum Cytochrom c , das dieses zum Komplex IV (Cytochrom c Oxidase) der Atmungskette transferiert .

Die Mittelpunktspotentiale des Häm und des Eisen-Schwefel-Zentrums liegen in einem ähnlichen Bereich. Das Potential des Häm beträgt 89 mV, das des Rieske-Proteins 105 mV

(vgl. Tabelle 4-1). Eine spektroskopische Trennung mittels selektiver Potentialschritte ist bei diesem geringen Unterschied nicht möglich. Um die Beiträge beider Kofaktoren zum Gesamtspektrum des Komplexes zu ermitteln, wurde ein Potentialschritt von 0 bis +0.5 V gewählt. In diesem Bereich treten keine Beiträge anderer Kofaktoren auf. Das parallel aufgenommene Kontrollspektrum im sichtbaren Spektralbereich (Abb. 4-14) zeigt im Wesentlichen die α -Bande des Häm c_1 bei 553 nm. Beiträge des Rieske-Proteins sind nicht nachweisbar (vgl. Abb. 4-5D).

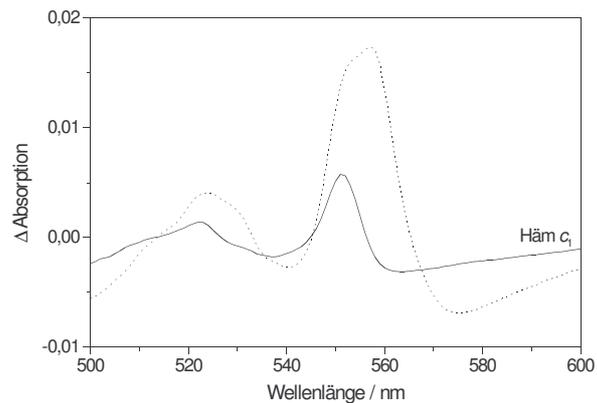


Abbildung 4-14

Kontrollspektrum des Häm c_1 im sichtbaren Spektralbereich der α -Bande für einen Potentialschritt von 0 nach 0.5 V. Gepunktet: Gesamtspektrum des bc_1 -Komplexes

In Abb. 4-15 ist das elektrochemisch induzierte *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aufgenommen im Potentialbereich von 0 bis +0.5 V dargestellt. Es zeigt die redoxabhängigen Veränderungen der Cytochrom c_1 -Untereinheit und des Rieske-Proteins. Die Beiträge der beiden Untereinheiten im Vergleich zum Gesamtspektrum sind in Abb. 4-15A ersichtlich. Die Bandenintensitäten liegen unter denen des Häm b_H , jedoch über denen des Häm b_L . Abb. 4-15B zeigt eine detaillierte Darstellung der Banden in H_2O -Puffer (pH 7), Abb. 4-15C in D_2O -Puffer (pD 7). Die Äquilibrierungszeit für diese Spektren war wesentlich geringer als die der b -Häme (~10 min). Dies wurde auch schon für den *Rb. capsulatus* bc_1 -Komplex beobachtet (Baymann 1995). Hier spielt wahrscheinlich die Wahl des Potentialbereichs eine Rolle. Mit ihm konnte ein relativ großer Potentialbereich abgedeckt werden, ohne daß Beiträge andere Kofaktoren erfaßt wurden. Das Verwenden solcher "Überpotentiale" verkürzt die Äquilibrierungszeit meist deutlich, wie sich dies am Beispiel des Gesamtspektrums deutlich zeigt ($T_{\text{Äquil.}} \sim 3$ min).

Die entsprechenden *red-minus-ox*-Spektren sind reversibel und reproduzierbar. Sie werden auch hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

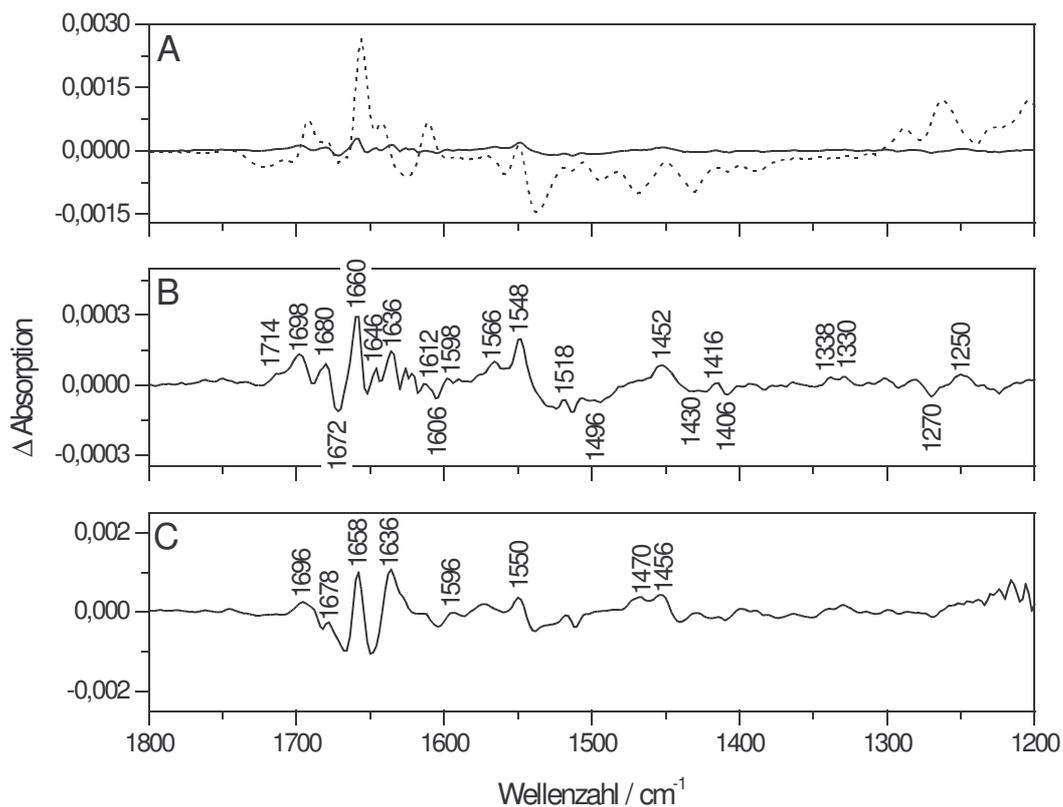


Abbildung 4-15

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum (ox-minus-red) des Häm c_1 und des Rieske-Proteins für einen Potentialschritt von 0 nach +0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer. A: Intensitätsvergleich mit dem Differenzspektrum des Gesamtkomplexes (gepunktet); B: Differenzspektrum in H_2O -Puffer (pH 7); C: Differenzspektrum in D_2O -Puffer (pD 7).

Im Amid I-Bereich werden Beiträge von Sekundärstrukturelementen beider Untereinheiten erwartet. Aus den Kristallstrukturen des mitochondrialen bc_1 -Komplexes ist bekannt, daß die Sekundärstruktur der Cytochrom c_1 -Untereinheit aus α -Helices besteht, die über ausgedehnte Schleifen und ungeordnete Bereiche des Peptidrückgrates miteinander verbunden sind. Das Rieske-Protein besteht aus drei Schichten von β -Faltblättern, die über Schleifen miteinander verbunden sind. Es ist über einen Membrananker mit dem Komplex verbunden.

Die Schwingungen des im Rieske-Protein gebundenen Eisen-Schwefel-Zentrums werden unterhalb von 1000 cm^{-1} , so daß sie mit dem verwendeten Detektor und der mit CaF_2 -Fenstern bestückten Meßzelle nicht nachgewiesen werden können. Beiträge aus konformellen Änderungen seiner Umgebung sowie in die Redoxreaktion eingebundener Aminosäureseitenketten sind aber möglich.

Signale bei 1698, 1680, 1672, 1660, 1646 und 1636 cm^{-1} können Amid I-Schwingungen zugeordnet werden. Die β -Faltblatt-Struktur des Rieske-Proteins ist für die Entstehung der Bande bei 1698 cm^{-1} verantwortlich. Die Position oberhalb von 1690 cm^{-1} ist typisch für Rieske-Proteine und wurde in allen bekannten bc_1 -Komplex-Spektren gefunden (Baymann 1995, Iwaki et al. 2003). Nach H/D-Austausch (Abb. 4-15C) verschiebt sich die 1698 cm^{-1} -Bande leicht zu einer breiten Struktur mit einem Maximum bei 1696 cm^{-1} , was die Zuordnung zur Amid I-Schwingung untermauert. Weitere Beiträge von β -Faltblättern sind beim Signal bei 1636 cm^{-1} wahrscheinlich, da es seine Position nach Deuterierung nicht verändert. Die Intensität erhöht sich vermutlich durch Überlagerungen mit anderen Banden.

Die Entstehung der Signale bei 1680 und 1672 cm^{-1} läßt sich auf mehrere Faktoren zurückführen. Schleifenstrukturen des Cytochrom c_1 , aber auch des Rieske-Proteins könnten beitragen. Überlagerungen mit Schwingungen protonierter Hämpropionate in diesem Bereich sind wahrscheinlich. Im Signal von 1660 cm^{-1} spiegeln sich möglicherweise strukturelle Veränderungen der α -Helices des Cytochrom c_1 wider. Deuterierung der Probe verschiebt die Bande um zwei Wellenzahlen, wodurch diese Zuordnung gefestigt wird (Arrondo et al. 1993). Absorptionen der zahlreichen ungeordneten Bereiche in der Sekundärstruktur des Cytochrom c_1 könnten das Signal bei 1646 cm^{-1} verursachen. Es verschiebt sich wahrscheinlich nach H/D-Austausch unter die breite Bande bei 1636 cm^{-1} .

Amid II-Schwingungen tragen wahrscheinlich zu den Banden bei 1566 und 1548 cm^{-1} bei. Beide Signale reagieren empfindlich auf H/D-Austausch. Die erste Bande verschwindet völlig im D_2O -Spektrum, bei der zweiten nimmt die Intensität ab. Sie wird wahrscheinlich von Schwingungen des Häm-Porphyringerüsts überlagert (siehe unten). Durch die Aufhebung der Kopplung zwischen N-H-Deformations- und C-N-Streckschwingung verschiebt sich die C-N-Schwingung in den Bereich von 1490-1460 cm^{-1} . Im Spektrum in Abb. 4-15C sind zwei intensive Signale bei 1470 und 1456 cm^{-1} zu sehen, die möglicherweise der Amid II'-Bande zuzuordnen sind.

Die CaCm -Schwingung (ν_{37}) des Häm c -Porphyringerüsts wird zwischen 1655 und 1584 cm^{-1} erwartet. Diese Zuordnungen beruhen auf Häm b -Modellstudien (Berthomieu et al. 1992, Choi et al. 1982, Li et al. 1990). Auch für c -Typ-Häme wurden ähnliche Werte publiziert. Le Moigne et al. (1999) ordnen die ν_{37} -Schwingung des c_1 -Häm aus dem *Rhodospirillum rubrum*- bc_1 -Komplex bei 1595 cm^{-1} zu. Hu et al. (1993) und Desbois (1994) identifizieren sie

in Cytochrom *c* bei 1637 bzw. 1603 cm^{-1} . Im vorliegenden Spektrum werden Teile der Banden bei 1636 und 1598 cm^{-1} vorläufig der ν_{37} -Schwingung zugeordnet. Beide Signale zeigen bei Deuterierung keine bis geringe Veränderungen der Bandenpositionen (max. 2 cm^{-1} , siehe Abb. 4-15C), so daß die Zuordnung sehr wahrscheinlich ist. Überlagerungen mit anderen Beiträgen sind jedoch möglich (vgl. Tabelle 4-5).

Die *CbCb*-Schwingung (ν_{38}) sollte zwischen 1602 und 1540 cm^{-1} beitragen. Hu et al. (1993) ordnen sie für *c*-Typ-Häme bei 1553 cm^{-1} zu. Ein entsprechender Kandidat findet sich im Spektrum bei 1548 cm^{-1} .

Weitere mögliche Hämschwingungen finden sich bei 1338 und 1330 bzw. 1250 cm^{-1} . Die ersten beiden könnten Beiträge der *CaN*-Schwingung (ν_{41}) darstellen, die in diesem Bereich erwartet werden (Hu et al. 1993, Berthomieu et al. 1992). Die Bande bei 1250 cm^{-1} weist auf Beiträge der *CmH*-Deformationsschwingung (ν_{42}) hin. Sie wurde in den *bc*₁-Komplexen aus *Rb. capsulatus* und Rinderherz-Mitochondrien bei 1240 cm^{-1} identifiziert (Baymann 1995, Iwaki et al. 2003).

Die C=O-Streckschwingung protonierter Hämpropionate könnte zur Bande bei 1680 cm^{-1} beitragen. Sie verschiebt sich nach H/D-Austausch (Abb. 4-15C) nur wenig nach 1678 cm^{-1} . Die zugeordnete antisymmetrische COO⁻-Schwingung wird im Bereich zwischen 1570 und 1530 cm^{-1} erwartet. Im Spektrum in Abb. 4-15B finden sich breite negative Banden bei 1558 und ca. 1534 cm^{-1} , die Anteile dieser Schwingung enthalten könnten. Die symmetrische COO⁻-Schwingung wird bei etwa 1370 cm^{-1} vermutet. Beiträge der Vinylsubstituenten des Häm *c* werden im Gegensatz zum Häm *b* nicht erwartet, da sie über Thioetherbrücken fest an das Protein gebunden sind.

Beiträge verschiedener Aminosäureseitenketten können im Differenzspektrum vermutet werden. Eine Schulterstruktur bei 1714 cm^{-1} weist auf Absorptionen protonierter Glu/Asp-Seitenketten hin. Die antisymmetrischen Schwingungen der deprotonierten COO⁻-Seitenketten würden im Bereich von 1570-1540 cm^{-1} erwartet (Venjaminov & Kalnin 1990). In Frage kommen hier das negative Signal bei 1558 cm^{-1} und eventuell auch die sehr breite negative Bandenstruktur um 1532 cm^{-1} . Genauere Zuordnungen sind jedoch nicht möglich. Die symmetrische Schwingung absorbiert im Bereich von 1400 cm^{-1} . Im Spektrum kann ein Kandidat dafür bei 1406 cm^{-1} gefunden werden. Besonders in der Aminosäuresequenz des Cytochrom *c*₁ findet sich ein besonders hoher Anteil von Glutaminsäuren (Ludwig et al.

1983). Aber auch das Rieske-Protein weist einige konservierte Aparagin- und Glutaminsäuren auf (*Kurowski & Ludwig 1987*, siehe Anhang 7.1A).

Nach Vergleichen mit Studien an isolierten Tyrosinen (*Venyaminov & Kalnin 1990*) könnten Ringschwingungen mehrerer Tyrosine an der Entstehung der Banden bei 1612, 1606, 1518 und 1496 cm^{-1} beteiligt sein.

Beiträge der COH-Schwingung des Tyrosins werden bei etwa 1245 cm^{-1} erwartet, die korrespondierende C-O-Schwingung bei 1269 cm^{-1} . Im Spektrum in Abb. 4-15B sind zwei Banden bei 1270 und 1250 cm^{-1} zu finden, die dafür in Frage kommen.

In den Strukturen der mitochondrialen bc_1 -Komplexe finden sich besonders zahlreiche Tyrosine in der Cytochrom c_1 -Untereinheit im Bereich des Häm. Auch im Cytochrom c_1 -Spektrum aus *Rb. capsulatus* wurden Tyrosinschwingungen identifiziert (*Baymann 1995*). Denkbar ist aber auch die Beteiligung eines Tyrosins des Rieske-Proteins. Schröter et al. (1998) untersuchten in einer Mutagenesestudie Aminosäureseitenketten, die Wasserstoffbrücken zum Eisen-Schwefel-Zentrum ausbilden. Sie fanden eine Beteiligung des Tyr159. Dessen Austausch gegen Phenylalanin führt zur Abnahme der Aktivität des Proteins auf etwa 30% und einer Erniedrigung des Mittelpunktspotentials um 44 mV.

Das Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Proteins ist von mehreren konservierten Prolinen umgeben (*Link 1999*). Schwingungen des Prolinrings wurden auch im FTIR-Differenzspektrum des *Rb. capsulatus*- und des Rinderherz-Rieske-Proteins gefunden (*Baymann 1995, Iwaki et al. 2003*). Sollten sie an der Redoxreaktion des Proteins beteiligt sein, werden ihre Beiträge bei 1456 und 1424 cm^{-1} erwartet (*Fabian et al. 1994, Rothschild et al. 1989*). Im Spektrum in Abb. 4-15B sind zwei Signale bei 1452 und 1430 cm^{-1} vorhanden. Beide Banden werden, wie bei Baymann (1995) beschrieben, kaum durch Deuterierung beeinflusst. Durch Vergleiche mit den *S. cerevisiae* (*Hunte et al. 2000*) und Rinderherz-Sequenzen (*Link et al. 1996*) könnten in *P. denitrificans* die Proline 139, 153, 169, 171 und 177 zur Entstehung der oben beschriebenen Banden beitragen (siehe auch nächstes Kapitel). Dies müßte jedoch durch weiterführende Untersuchungen abgesichert werden.

Möglicherweise tragen auch Histidine zum Spektrum bei, die sowohl Häm c_1 als auch das Eisen-Schwefel-Zentrum ligandieren. Sie könnten Bestandteil der Bande bei 1598 cm^{-1} sein. Eine Zuordnung ist aber durch den niedrigen Extinktionskoeffizient der His-Ringschwingung

und Überlagerungen mit Hämschwingungen schwierig. Die beiden anderen Liganden (Methionin bei Häm c_1 und Cystein bei [2Fe-2S]) können nicht im Spektrum nachgewiesen werden. Cystein könnte zwischen 1424 und 1269 cm^{-1} beitragen (vgl. Barth 2001). Die Intensität der Signale ist aber wahrscheinlich zu gering, um im Differenzspektrum sichtbar zu sein. Für Methionin sind im Bereich zwischen 1800 und 1000 cm^{-1} keine signifikanten Signale sichtbar (Wolpert *et. al.*, *in press*).

Eine Zusammenfassung der eben getroffenen Zuordnungen für das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum mit Beiträgen der Untereinheiten Cytochrom c_1 und Rieske-Protein findet sich in Tabelle 4-5.

Bandenposition in cm^{-1}	Vorläufige Zuordnung	
1714 (+)	v (C=O)	Asp/Glu
1698 (+)	Amid I	β -Faltblatt
1680 (+)	Amid I	Schleifenstrukturen
	v (C=O)	Hämpropionate
1672 (-)	Amid I	Schleifenstrukturen
1660 (+)	Amid I	α -Helices
1646 (+)	Amid I	ungeordnete Bereiche
1636 (+)	Amid I	β -Faltblatt
	ν_{37}	Häm c_1
1612 (+)	Ring	Tyr-OH
1604 (-)	Ring	Tyr-O $^-$
1598 (+)	ν_{37}	Häm c_1
	Ring	His
1566 (+)	Amid II	
1558 (-)	v (C=O)	Hämpropionate
	v (COO $^-$) ^{as}	Asp/Glu
1548 (+)	Amid II	
	ν_{38}	Häm c_1
1518 (+)	ν_{19} (CC)-Ring	Tyr-OH
1496 (-)	ν_{19} (CC)-Ring	Tyr-O $^-$
1452 (+)	H-Ring-N	Pro
1430 (-)	Ring-N	Pro
1406 (-)	v (COO $^-$) ^{sym}	Asp/Glu
1338 (+)	ν_{41}	Häm c_1
1330 (+)	ν_{41}	Häm c_1
1270 (-)	ν_{7a} (C-O $^-$)	Tyr
1250 (+)	ν_{42}	Häm c_1
	δ (COH)	Tyr

Tabelle 4-5

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des Häm c_1 und des Rieske-Eisen-Schwefel-Proteins und ihrer Umgebungen für einen Potentialschritt von 0 nach +0.5 V. (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands. Details siehe Text.

4.1.2.4 FTIR-Differenzspektren der wasserlöslichen Fragmente des Rieske-Proteins und der Cytochrom c_1 -Untereinheit

Um die Beiträge des Cytochrom c_1 und des Rieske-Proteins (Abb. 4-15) voneinander trennen zu können, wurden von beiden wasserlöslichen Fragmente isoliert und vermessen. Ihre FTIR-Differenzspektren sollen im Folgenden diskutiert werden.

FTIR-Differenzspektrum des wasserlöslichen Rieske-Fragmentes

In Abb. 4-16 ist das elektrochemisch induzierte *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum des wasserlöslichen Rieske-Fragmentes aus *P. denitrificans* aufgenommen bei einem Potentialschritt von 0 nach 0.5 V in Phosphatpuffer (pH 7, durchgezogene Linie) und Phosphatpuffer (pD 7, gepunktete Linie) dargestellt. Dieses Fragment enthält nur die redoxaktive Domäne des Rieske-Proteins. Der Membrananker und die flexible Scharnierregion, die für die Bewegung der Untereinheit während des Redoxzyklus verantwortlich gemacht wird, wurden durch die Isolierung entfernt.

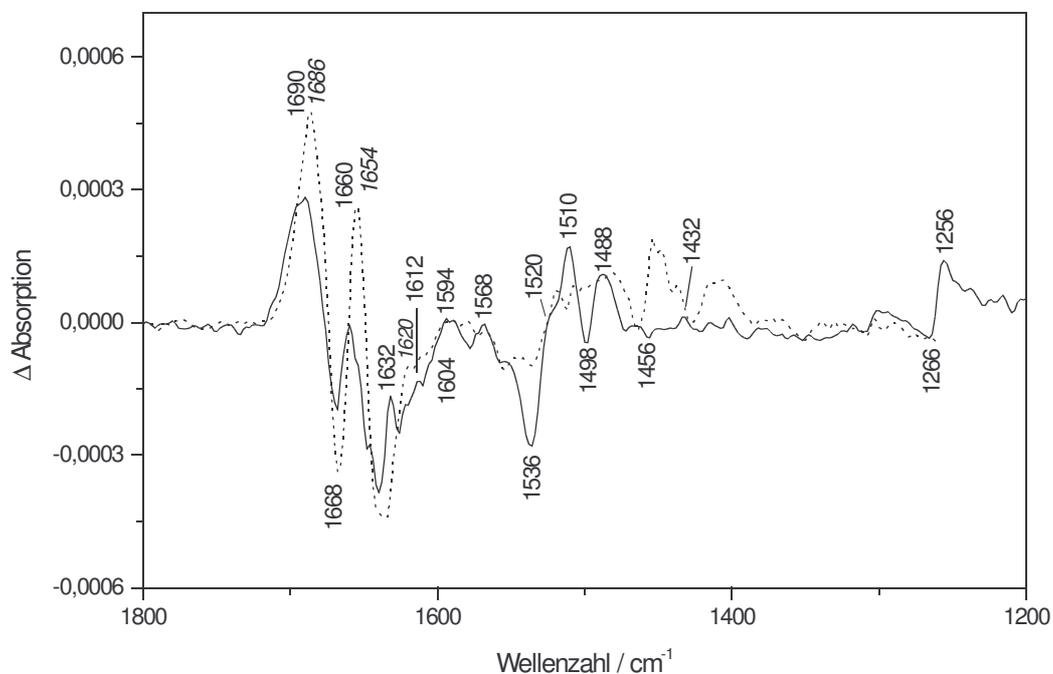


Abbildung 4-16

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum (*ox-minus-red*) des wasserlöslichen Fragments des Rieske-Proteins aufgenommen in Phosphatpuffer pH7 (durchgezogene Linie) und pD 7 (gepunktet, kursiv beschriftet).

Das Spektrum ähnelt in Struktur und Verhältnis der Signalintensitäten sehr stark dem FTIR-Differenzspektrum des isolierten Rieske-Proteins aus Rinderherz-Mitochondrien (Baymann 1995), dessen Aufbau in Abb. 4-17 ersichtlich ist (Link et al. 1996). Die Bandenpositionen weichen in beiden Spektren maximal 6 cm^{-1} voneinander ab, meist ist die Verschiebung sogar noch geringer, so daß von einer großen funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit beider Fragmente auszugehen ist. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, trägt das [2Fe-2S]-Zentrum selbst nicht zum Spektrum bei. Die hohen Massen der beteiligten Atome führen dazu, daß die Fe-S-Schwingung im niederfrequenten Spektralbereich unterhalb 1000 cm^{-1} absorbiert.

Im Amid I-Bereich des Spektrums in Abb. 4-16 finden sich Signale bei 1690 und 1632 cm^{-1} . Sie könnten den Banden bei 1698 und 1632 cm^{-1} im Spektrum des in den Gesamtkomplex eingebundenen Rieske-Proteins (vgl. Abb. 4-15) entsprechen. Eine Verschiebung der Signale der isolierten Untereinheit zu kleineren Wellenzahlen wurde schon für das Rinderherz-Fragment gefunden (Baymann 1995). Sie läßt sich wahrscheinlich auf die veränderte Bindungsstärke von Wasserstoffbrücken infolge der Isolierung des Fragments zurückführen. Die Position der Banden spricht für strukturelle Veränderungen

innerhalb der β -Faltblätter der Untereinheit. Daran gekoppelt könnten sich Beiträge der Schleifenstrukturen zwischen den drei Faltblättern ergeben. Sie tragen möglicherweise zum negativen Signal bei 1668 cm^{-1} bei. Dieses findet sich im Spektrum des Gesamtkomplexes bei 1672 cm^{-1} (Abb. 4-6) und im Teilspektrum von Rieske-Protein und Cyt c_1 (Abb. 4-15) bei 1670 cm^{-1} wieder. Eine Bande bei 1680 cm^{-1} , die in allen bisherigen Spektren vorhanden war, kann beim Rieske-Fragment nicht identifiziert werden. Sie wurde zuvor (neben Beiträgen der Hämpropionate) Schleifenstrukturen zugeordnet. Wahrscheinlich dominiert hier der Hämpropionatanteil. Beiträge der Cytochrom c_1 -Schleifen sind aber nicht auszuschließen. Denkbar ist auch, daß das durch die Isolierung des Rieske-Fragmentes abgetrennte flexible

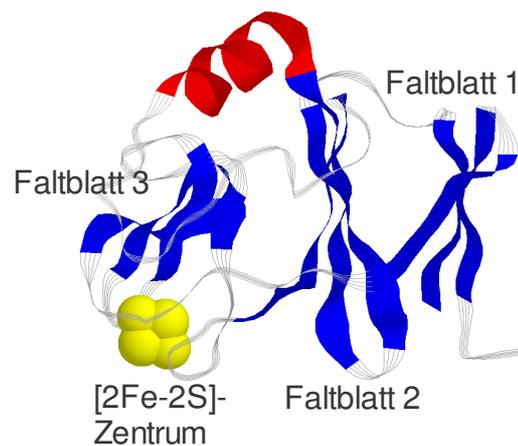


Abbildung 4-17

Kristallstruktur des wasserlöslichen Fragmentes des Rieske-Proteins aus Rinderherz-Mitochondrien. PDB-Eintrag: 1RIE (Link et al. 1996)

Verbindungsstück zwischen redoxaktiver Domäne und Membrananker bei 1680 cm^{-1} beiträgt. Damit könnte u. U. die Bewegung des Rieske-Proteins im FTIR-Spektrum nachgewiesen werden. Eine solche müßte durch Mutagenese oder Isotopenmarkierung im Bereich der Linkerregion spezifisch überprüft werden. Dies läßt sich nur im intakten bc_1 -Komplex durchführen.

Ein weiteres Signal im Amid I-Bereich bei 1660 cm^{-1} weist auf Beiträge α -helikaler Strukturen hin. Aus Analysen der Aminosäuresequenzen und Kristallstrukturen mitochondrialer Rieske-Proteine ist bekannt, daß in einer Schleife zwischen zwei Strängen des β -Faltblattes 2 eine α -Helix eingebunden ist (vgl. Abb. 4-17). Bakterielle bc_1 -Komplexe enthalten diese ebenfalls (*Link 1999*). In der Sequenz des *P. denitrificans* läßt sich etwa ab Aminosäure 82 ein in Frage kommender Bereich ausmachen (*Kurowski & Ludwig 1987*, siehe Anhang 7.1).

Die Zuordnungen der oben genannten Banden zur Amid I-Schwingung werden durch das nach H/D-Austausch aufgenommene Spektrum (Abb. 4-16, gepunktet und kursiv beschriftet) untermauert. Die Verschiebung beträgt minimal 4 cm^{-1} ($1690 \rightarrow 1686\text{ cm}^{-1}$) und maximal 12 cm^{-1} ($1632 \rightarrow 1620\text{ cm}^{-1}$) und liegt damit in einem Bereich, wie er für die Amid I-Bande publiziert ist (*Arrondo et al. 1993*, *Goormaghtight et al. 1994*). Die geringe Empfindlichkeit der Signale auf Deuterierung läßt auch eine Überlagerung mit Beiträgen der Aminosäuren Arginin, Asparagin und Glutamin weitestgehend ausschließen. Deren Banden würden durch H/D-Austausch um $30\text{-}60\text{ cm}^{-1}$ zu kleineren Wellenzahlen verschoben (*Venyaminov & Kalnin 1990*).

Banden der Amid II-Schwingung finden sich bei 1568 , 1536 , 1510 , 1498 und 1488 cm^{-1} . Besonders die Signale bei 1536 , 1510 und 1498 cm^{-1} zeigen eine deutliche Abnahme der Intensität nach H/D-Austausch (Abb. 4-16, gepunktet). Im D_2O -Spektrum läßt sich die Entstehung intensiver Banden zwischen 1400 und 1480 cm^{-1} beobachten, die sich wahrscheinlich der Amid II'-Bande zuordnen lassen.

Im gemeinsamen FTIR-Differenzspektrum der Untereinheiten Cytochrom c_1 und Rieske-Protein (Abb. 4-15, Tabelle 4-5) wurden Beiträge einiger Aminosäureseitenketten diskutiert. Sollten sie von Aminosäuren des Rieske-Proteins stammen und am Elektronentransferprozeß

teilhaben, müßten sie im oben gezeigten Spektrum zu finden sein. Bis auf Glutaminsäureseitenketten sind Beiträge aller erwähnten Aminosäuren denkbar. In unmittelbarer Umgebung des Eisen-Schwefel-Zentrums können zahlreiche in Frage kommende Seitenketten identifiziert werden, die im Folgenden diskutiert werden. Zu besseren Veranschaulichung ist der Lage ausgewählter Aminosäuren in Abb. 4-18 dargestellt. Sie basiert auf den Strukturdaten des isolierten Rinderherz-Rieske-Proteins. Die Numerierung entspricht der Aminosäuresequenz des *P. denitrificans*-Komplexes.

Histidinschwingungen wurden im Cyt c_1 /Rieske-FTIR-Differenzspektrum (Abb. 4-15) bei 1598 cm^{-1} zugeordnet. Im oben gezeigten Spektrum ist die Bande bei 1594 cm^{-1} ist ein Kandidat für diese Ringschwingung (Venyaminov & Kalnin 1990, Hasegawa et al. 2000). Protonierte Histidine liefern Modellstudien zufolge ein signifikantes Signal bei 1633 cm^{-1} (Berthomieu et al. 2001) und bei 1490 cm^{-1} (Hasegawa et al. 2000). Letzteres verschiebt sich durch Deuterierung um 5 cm^{-1} . Im Spektrum in Abb. 4-16 sind entsprechende Signale bei 1632 und 1488 cm^{-1} (mit einer Verschiebung nach 1482 cm^{-1} nach Deuterierung) zu sehen. Überlagerungen mit Amid II-Schwingungen sind hier jedoch wahrscheinlich. Für die Entstehung der Banden könnten His134 und/oder His155 verantwortlich sein. Sie ligandieren das $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentrum. Ebenfalls denkbar sind Beiträge des konservierten His158, das sich in unmittelbarer Nähe des Clusters befindet.

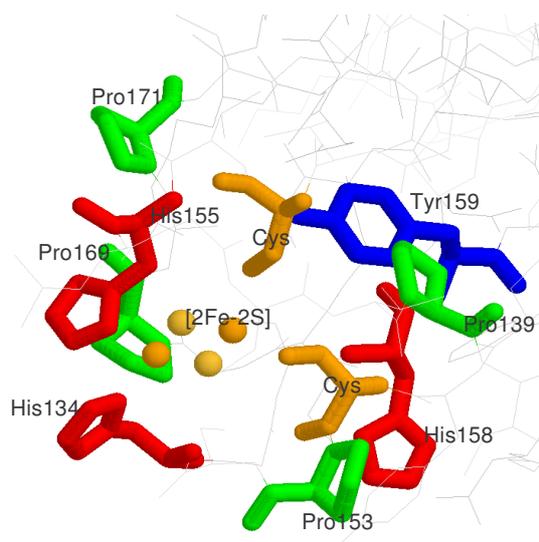


Abbildung 4-18

Modellierte Umgebung des $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentrums des Rieske-Proteins aus *P. denitrificans* basierend auf der Kristallstruktur des wasserlöslichen Rinderherz-Rieske-Fragments (PDB-Eintrag: 1RIE)

Die Ligandierung des aktiven Zentrums des Rieske-Proteins durch Cysteine läßt sich im Infrarotdifferenzspektrum schwer nachweisen. Die $\nu(\text{SH})$ -Schwingung wird bei 2551 cm^{-1} erwartet und liegt damit außerhalb des untersuchten Spektralbereiches, die $\delta(\text{CH}_2)$ -Schwingung könnte im Bereich von 1424 cm^{-1} beitragen (*Colthup et al. 1990*). Bisher konnte sie aufgrund der geringen Bandenintensität in Proteinen nicht eindeutig zugeordnet werden (vgl. *Barth 2001*).

Prolinschwingungen könnten zu den Banden bei 1456 und 1432 cm^{-1} beitragen (Abb. 4-16). Die Aminosäuresequenz des Rieske-Protein aus *P. denitrificans* weist einige potentielle Kandidaten für Prolinbeiträge auf (vgl. Anhang 7.1). Die Schleifenstruktur, in der das $[\text{2Fe-2S}]$ -Zentrum gebunden ist, enthält die stark konservierte Abfolge Gly-Pro-Ala-Pro (enthalten im sogenannten Pro-Loop). Sie findet sich in *P. denitrificans*-Enzym als Gly168-Pro169-Ala170-Pro171. Aus Mutagenesestudien ist bekannt, daß sich Veränderungen im Pro-Loop stark auf die Stabilität des Eisen-Schwefel-Clusters auswirken (*Link 1999*). Weitere in Frage kommende Proline sind Pro139, Pro153 und Pro177. Sie sind in vielen Organismen konserviert. Das Äquivalent zu Pro153 in *S. cerevisiae* beeinflußt das Mittelpunktspotential des $[\text{2Fe-2S}]$ -Clusters. Welches der genannten Proline letztendlich für die Signale verantwortlich sein könnte, muß durch ortsgerichtete Mutationen geklärt werden.

Die Differenzbande zwischen 1266 und 1256 cm^{-1} läßt sich möglicherweise Tyrosinschwingungen zuordnen. Im Bereich von 1269 cm^{-1} wird die C-O-Streckschwingung erwartet, bei 1245 cm^{-1} die COH-Schwingung. Diese Schwingungen könnten zur Entstehung der Bande beitragen. Tyrosinringschwingungen sollten sich nach Modellstudien an isolierten Tyrosinen bei 1612 , 1518 , 1602 und 1498 cm^{-1} finden lassen (*Venyaminov & Kalnin 1990*). Das Spektrum in Abb. 4-16 weist an allen Positionen mögliche Tyrosinbeiträge auf. Ein kleines positives Signal bei 1612 cm^{-1} sowie eine starke Schulterstruktur bei 1520 cm^{-1} könnten von Schwingungen des protonierten Tyr-Ringes herrühren. Die Schwingungen des deprotonierten Ringes könnten zur kleinen Schulter bei 1604 cm^{-1} und dem ausgeprägten negativen Signal bei 1498 cm^{-1} beitragen. Alle genannten Banden konnten auch im Cyt c_1 /Rieske-Spektrum identifiziert werden (Abb. 4-15). Die Beteiligung eines Tyrosins des Rieske-Proteins zu diesem Spektrum ist somit sehr wahrscheinlich. Tyr159 in unmittelbarer Nähe des Fe-S-Clusters wurde bereits als möglicher Kandidat diskutiert.

In Tabelle 4-6 sind alle vorläufigen Zuordnungen zu den Banden des elektrochemisch induzierten *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrums des wasserlöslichen Rieske-Fragments aus *P. denitrificans* zusammengefaßt.

Bandenposition in cm ⁻¹	Vorläufige Zuordnung	
1690 (+)	Amid I	β-Faltblatt
1668 (-)	Amid I	Schleifenstrukturen
1660 (+)	Amid I	α-Helices
1636 (+)	Amid I	β-Faltblatt
1612 (+)	Ring	Tyr-OH
1604 (-)	Ring	Tyr-O ⁻
1594 (+)	Ring	His
1568 (+)	Amid II	
1536 (-)	Amid II	
1520 (+)	v ₁₉ (CC)-Ring	Tyr-OH
1510 (+)	Amid II	
1498 (-)	Amid II	
	v ₁₉ (CC)-Ring	Tyr-O ⁻
1488 (+)	Amid II	
	Ring	His
1456 (-)	H-Ring-N	Pro
1432 (+)	Ring-N	Pro
1266 (-)	v _{7a} (C-O ⁻)	Tyr
1256 (+)	δ(COH)	Tyr

Tabelle 4-6

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des wasserlöslichen Rieske-Eisen-Schwefel-Fragmentes und seiner Umgebungen für einen Potentialschritt von 0 nach +0.5 V. (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands. Details siehe Text.

FTIR-Differenzspektrum der isolierten Cytochrom c₁-Untereinheit

Abb. 4-19 zeigt das elektrochemisch induzierte *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum der isolierten Cytochrom c₁-Untereinheit aus *P. denitrificans*. Das Spektrum entspricht einem Potentialschritt von 0 nach +0.5 V und wurde in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) aufgenommen. Die Äquilibrierungszeit betrug etwa 3 min.

Das untersuchte wasserlösliche Fragment enthält im Wesentlichen die Bindedomäne des redoxaktiven Häms und seine unmittelbare Umgebung. Die aus überwiegend sauren Aminosäureresten bestehende Anfangssequenz und der Membrananker der Cytochrom c₁-Untereinheit wurden während der Präparation entfernt (vgl. Eichhorn 2003).

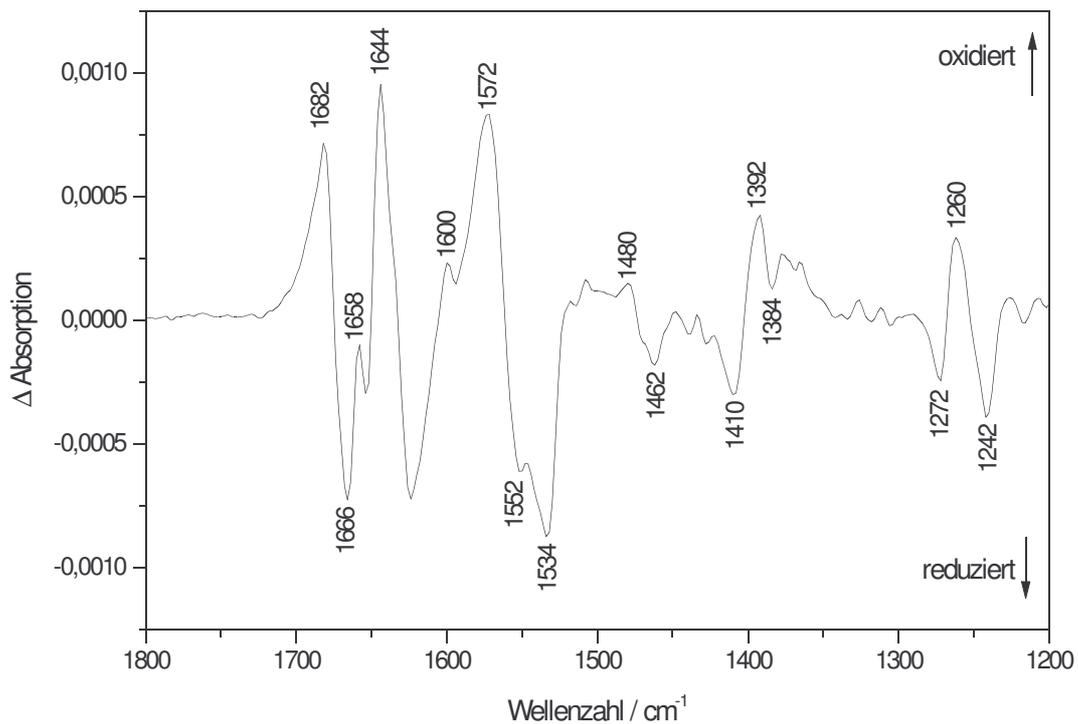


Abbildung 4-19

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum (ox-minus-red) des wasserlöslichen Cytochrom c_1 -Fragmentes aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) für einen Potentialschritt von 0 nach +0.5 V.

Das FTIR-Differenzspektrum weist ein ausgeprägtes Bandenmuster auf. Im Gegensatz zu den Spektren der isolierten Rieske-Proteine (Baymann 1995, vgl. vorheriges Kapitel) unterscheidet sich dieses Spektrum stark vom dem seines mitochondrialen Gegenstückes. Das Differenzspektrum des Cytochrom c_1 -Fragmentes aus Rinderherz-Mitochondrien (Iwaki *et al.* 2003) zeigt besonders im Amid I-Bereich deutliche Abweichungen in Lage und Intensität der Banden im Vergleich zum oben dargestellten Spektrum.

Der Amid I-Bereich des *P. denitrificans*-Cytochrom c_1 -Spektrums weist zwei starke positive Signale bei 1682 und 1644 cm^{-1} und ein kleineres bei 1658 cm^{-1} auf. Eine ausgeprägte negative Bande findet sich bei 1666 cm^{-1} . Auch im gemeinsamen Rieske/Cyt c_1 -Spektrum (Abb. 4-15, Tabelle 4-5) können diese Signale an ähnlichen Positionen identifiziert werden. Die maximale Verschiebung beträgt 4 cm^{-1} im Fall des negativen Signals. Sie ist wahrscheinlich Folge der Isolierung des Fragmentes und der Abtrennung der Anfangssequenz und damit verbundener veränderter Bindungsverhältnisse im Protein. Alle genannten Banden

können Beiträge der C=O-Streckschwingungen des Peptidrückgrates enthalten. Die Signale bei 1682 und 1666 cm^{-1} lassen sich auf Verschiebungen in den Schleifenstrukturen während der Redoxreaktion zurückführen. Sie verbinden die α -helikalen Bestandteile der Untereinheit miteinander, die bei 1658 cm^{-1} beitragen. Ungeordnete Bereiche in der Sekundärstruktur absorbieren vermutlich bei 1644 cm^{-1} . Besonders bei dieser Bande, aber auch zum großen Signal bei 1682 cm^{-1} sind Beiträge der Hämschwingungen sehr wahrscheinlich. Sie werden später diskutiert.

Der Amid II-Schwingung könnten Anteile der Banden bei 1572, 1552 und 1534 cm^{-1} zugerechnet werden. Mögliche Überlagerungen mit Signalen der ν_{38} -Schwingung des Häm-Porphyringerüsts und der $(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ -Schwingung der Hämpropionate sollten hierbei beachtet werden (siehe unten).

Die Schwingungen des Häm-Porphyringerüsts und seiner Propionatgruppen scheinen im Spektrum in Abb. 4-19 zu dominieren. Betrachtet man Modelle für den Elektronentransfer in mitochondrialen bc_1 -Komplexen, ist dies nachvollziehbar. Die Abstände zwischen den beteiligten Kofaktoren sind so gering, daß der Elektronentransfer direkt oder über wenige

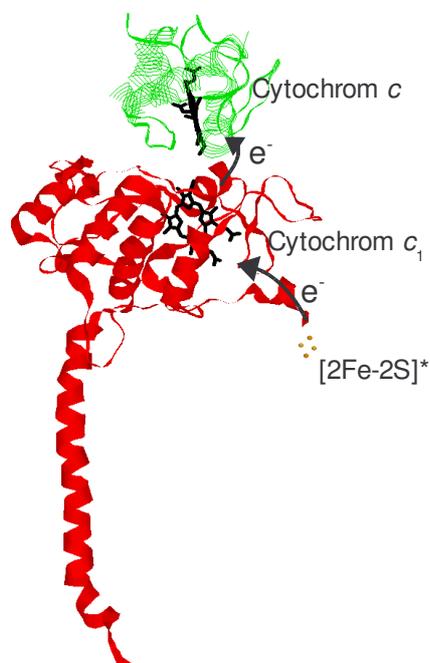


Abbildung 4-20

Möglicher Elektronentransferweg vom Eisen-Schwefel-Zentrum über Cytochrom c_1 zum Cytochrom c am Beispiel des *S. cerevisiae* bc_1 -Komplexes (PDB-Eintrag: 1KYO)

Zwischenschritte stattfinden könnte. Zhang et al. (1998) postulieren einen Transfer des Elektrons vom Eisen-Schwefel-Zentrum über ein Propionat des Häm. Der Abstand zwischen dem Häm c des Cytochrom c_1 und dem Häm des Cytochrom c ist so gering, daß der Weitertransport des Elektrons wahrscheinlich über einen direkten Häm-Häm-Transfer erfolgt (Lange & Hunte 2002). Abb. 4-20 zeigt eine einfache Darstellung des postulierten Elektronentransferweges (dargestellt durch die beiden Pfeile) am Beispiel der Cytochrom c_1 -Struktur aus *S. cerevisiae*. Das [2Fe-

2S]-Zentrum als Elektronendonator und der Elektronenakzeptor Cytochrom *c* sind eingezeichnet. Wenn sich der Mechanismus auf den *P. denitrificans*-Komplex übertragen lässt, sind starke Häm-Signale im oben gezeigten FTIR-Differenzspektrum wahrscheinlich.

Die antisymmetrische CaCm-Schwingung (ν_{37}) des Porphyringerüsts wird nach Häm *b*-Modellstudien zwischen 1655 und 1586 cm^{-1} erwartet (*Berthomieu et al. 1992, Choi et al. 1982, Li et al. 1990*, vgl. Abb. 4-21). Diese Werte können auch als Anhaltspunkte für Häm *c* dienen, da sich die Strukturen beider Hämgerüste nur im Bereich der Vinylsubstituenten unterscheiden. Durch Untersuchungen mit isotoopenmarkiertem Häm *c* identifizierten *Hu et al.* (1993) die ν_{37} -Schwingung bei 1637 cm^{-1} . Im Rieske/Cyt c_1 -Spektrum aus dieser Arbeit wurden ν_{37} -Beiträge zu den Banden bei 1636 und 1598 cm^{-1} zugeordnet. Im vorliegenden Spektrum des isolierten Cytochrom c_1 werden die Banden bei 1644 und 1600 cm^{-1} auf die CaCm-Schwingung zurückgeführt. Das intensive 1644 cm^{-1} -Signal könnte, wie oben erwähnt, auch auf Veränderungen in ungeordneten Bereichen der Sekundärstruktur hinweisen.

Die CbCb-Schwingung (ν_{38}) absorbiert im Bereich von 1604 bis 1542 cm^{-1} . Cytochrom *c* weist eine Bande bei 1610 cm^{-1} auf, die dieser Schwingung zugeordnet wurde (*Hu et al. 1993*). Im FTIR-Differenzspektrum findet sich eine starke positive Bande bei 1572 cm^{-1} . Sie wird vorläufig der ν_{38} -Schwingung zugeschrieben. Eine Überlagerungen mit Beiträgen der Amid II-Schwingung ist hier jedoch wahrscheinlich.

In der Differenzbande zwischen 1480 und 1462 cm^{-1} spiegelt sich möglicherweise die symmetrische CaCm-Schwingung (ν_{39}) wider. Sie wurde bisher in Proteinspektren nicht zugeordnet. Modellstudien weisen sie jedoch zwischen 1478 im oxidierten und 1455 cm^{-1} im reduzierten Zustand des Häms (*Berthomieu et al. 1992*) bzw. bei 1501 cm^{-1} aus (*Hu et al. 1993*).

Die CaN-Schwingung (ν_{41}) des Porphyringerüsts wird zwischen 1390 und 1320 cm^{-1} erwartet. Sie wird der Bande bei 1392 cm^{-1} zugeordnet. In den Spektren des Rinderherz-Cytochrom c_1 ist sie bei 1409 cm^{-1} zu finden (*Iwaki et al. 2003*). Bei 1260 cm^{-1} trägt wahrscheinlich die CmH-Schwingung (ν_{42}) bei. In Modellspektren wurde sie zwischen 1268 und 1150 cm^{-1} identifiziert. Für das Rinderherz-Cytochrom c_1 wird eine Bandenposition von 1342 cm^{-1} angegeben (*Iwaki et al. 2003*).

Besondere Bedeutung kommt den beiden Hämpropionaten zu, da sie direkt in den Elektronentransfer involviert sein sollen. Das Propionat D (siehe Abb. 4-21) wird dabei als Akzeptor für das vom Rieske-Protein kommende Elektron diskutiert, welches dann über Pyrrolring C zum Cytochrom *c* weitergegeben wird (Zhang *et al.* 1998). Die Signale dieses Propionates sollten also in jedem Fall im Spektrum vorhanden sein. Die C=O-Streckschwingung des protonierten Propionats wird bei etwa 1710 cm^{-1} erwartet (Moss *et al.* 1990, Tonge *et al.* 1989). Durch Wasserstoffverbrückungen verschiebt sich die Bande zu niedrigeren Wellenzahlen (Behr *et al.* 1998). Das Differenzspektrum in Abb. 4-19 zeigt im oxidierten Zustand eine Bande bei 1682 cm^{-1} , die Kandidat für die C=O-Schwingung mindestens eines der Hämpropionate ist. Sie findet sich in allen Spektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans*, in denen Beiträge des Cytochrom c_1 möglich sind (vgl. Abb. 4-6 und 4-15). Die Zuordnung ist somit sehr wahrscheinlich.

Im reduzierten Zustand sind die Schwingungen der deprotonierten Hämpropionate nachweisbar. Die antisymmetrische COO^- -Schwingung trägt zu den Banden bei 1552 und 1534 cm^{-1} bei. Die symmetrische Schwingung läßt sich möglicherweise dem Signal bei 1384 cm^{-1} zuordnen.

Das elektrochemisch induzierte Differenzspektrum zeigt, daß der Elektronentransfer im wasserlöslichen Cytochrom c_1 -Fragment im Wesentlichen durch die Redoxreaktion des Häm geprägt ist. Seine Banden dominieren das Spektrum. Neben Beiträgen des Häms könnten Liganden His294 zur Bande bei 1600 cm^{-1} vermutet werden. Der zweite Ligand des zentralen Eisenatoms Methionin kann nicht zugeordnet werden.

Prolinschwingungen könnten zu den Banden bei 1462 und 1434 cm^{-1} beitragen. In der Aminosäuresequenz der Cytochrom c_1 -Untereinheit finden sich einige konservierte Proline. Eine genauere Zuordnung ist aber zur Zeit noch nicht möglich.

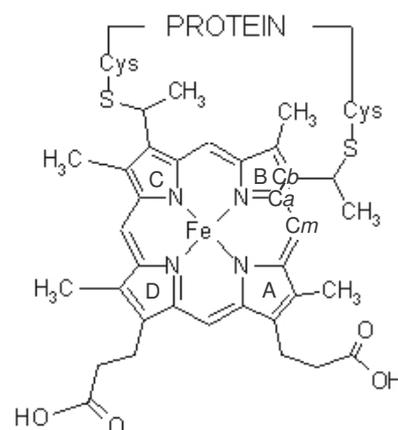


Abbildung 4-21

Struktur des Häm *c*-Porphyringerüsts zur Verdeutlichung des Elektronentransfers in der Cytochrom c_1 -Untereinheit

In Studien an wasserlöslichen Cytochromen *c* werden Beiträge von Tyrosinschwingungen zu Banden im Bereich von 1260 cm⁻¹ beschrieben (Baymann 1991). Diese Zuordnung kann im vorliegenden Spektrum nicht bestätigt werden, da die charakteristischen Tyrosinsignale nicht nachgewiesen werden können, die bei 1518/1496 cm⁻¹ erwartet werden.

Tabelle 4-7 faßt alle vorläufig getroffenen Zuordnungen zum elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum des wasserlöslichen Cytochrom *c*₁-Fragmentes zusammen.

Bandenposition in cm ⁻¹	Vorläufige Zuordnung	
1682 (+)	Amid I	Schleifenstrukturen
	v (C=O)	Hämpropionat
1666 (-)	Amid I	Schleifenstrukturen
1658 (+)	Amid I	α-Helices
1644 (+)	Amid I	ungeordnete Bereiche
	v ₃₇	Häm
1600 (+)	v ₃₇	Häm
	Ring	His
1572(+)	Amid II	
	v ₃₈	Häm
1552 (-)	Amid II	
	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionat
1534 (-)	Amid II	
	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionat
1480 (+)	v ₃₉	Häm
1462 (-)	v ₃₉	Häm
	Ring	Pro
1434 (+)	Ring	Pro
1392 (+)	v ₄₁	Häm
1384 (-)	v (COO ⁻) ^{sym}	Hämpropionat
1260 (+)	v ₄₂	Hämring

Tabelle 4-7

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des wasserlöslichen Cytochrom *c*₁-Fragmentes und seiner Umgebungen für einen Potentialschritt von 0 nach +0.5 V. (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands. Details siehe Text.

4.1.2.5 Eigenschaften der gebundenen Chinone

Wie bereits zu Beginn der Diskussion erwähnt, werden die FTIR-Differenzspektren des *bc*₁-Komplexes aus *P. denitrificans* von Banden der gebundenen Chinone dominiert. Sie lassen sich durch Vergleich mit dem Differenzspektrum eines Chinons in Lösung leicht identifizieren. Verschiedene Studien zeigen, daß sich die Position der meisten Banden durch

die Bindung des Chinons im Protein im Vergleich zum freien Chinon nur unwesentlich verändert (Breton *et al.* 1994a,b, Breton *et al.* 1995, Baymann 1995, Hellwig *et al.* 1999b, Remy *et al.* 2003).

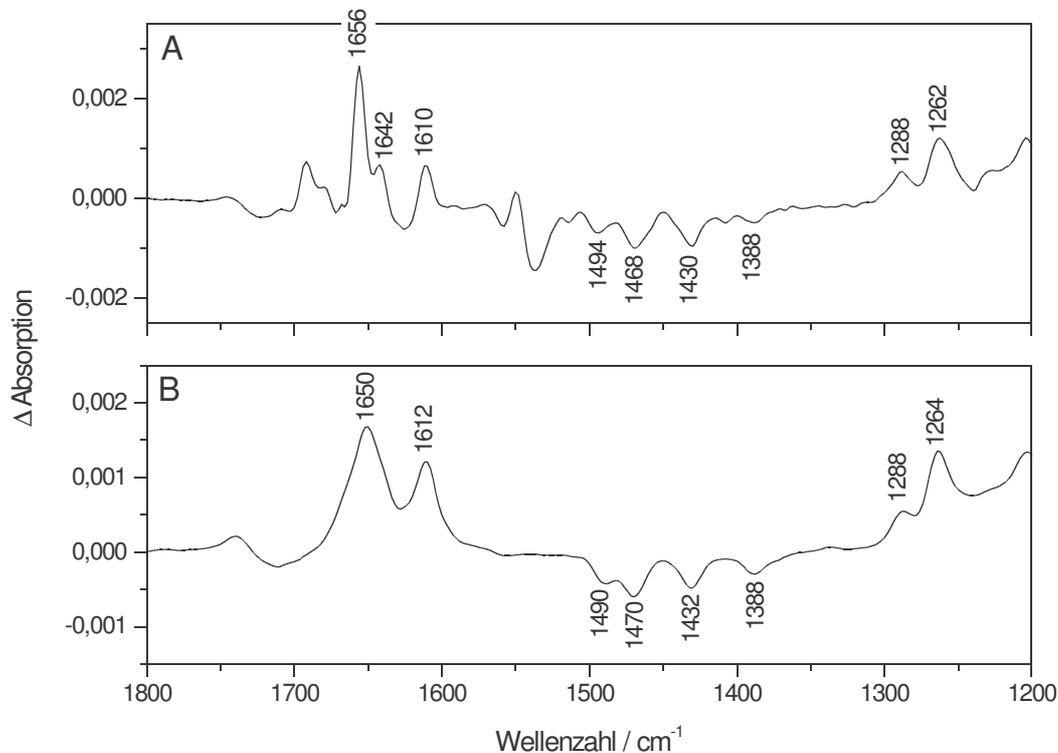


Abbildung 4-22

Elektrochemisch induzierte ox-minus-red-FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* (A) und des UQ₂ (B, aus Hellwig *et al.* 1999b) aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V

Abb. 4-22A zeigt das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V. In Abb. 4-22B ist das Differenzspektrum des Ubichinon-2 in wässriger Kaliumphosphatpuffer-Lösung für den gleichen Potentialschritt dargestellt. Dieses Spektrum wurde bereits publiziert (Hellwig *et al.* 1999b). Die dort getroffenen Bandenzuordnungen können zur Interpretation des oberen Spektrum herangezogen werden. Dabei spielt der Unterschied in der Länge der Isoprenoid-Seitenkette zwischen UQ₂ und UQ₁₀, dem natürlichen Substrat des *P. denitrificans* bc_1 -Komplexes, keine Rolle, da nur Beiträge des Rings und der direkten Liganden zu erwarten sind. Die spektroskopischen Eigenschaften beider Chinone sind sehr ähnlich (Bauscher & Mantele 1992). Positive Signale in beiden Spektren entsprechen dem neutralen Chinon (Q),

negative Banden werden dem reduzierten und protonierten Chinol (QH₂) zugeordnet (vgl. Abb. 2-3). Beiträge des an der Q_i-Bindestelle gebundenen Semichinons sind nicht sehr wahrscheinlich. Ein thermodynamisch relativ stabiles Semichinon wurde mittels ESR-Spektroskopie detektiert (Meinhardt et al. 1987). Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Äquilibrierungszeiten im Minutenbereich reagiert es vermutlich weiter, so daß nur die Banden des Chinons und Chinols nachweisbar sind. Beiträge eines Semichinons an der Q_o-Bindestelle können nicht erwartet werden. Sollte es existieren, müßte es sehr kurzlebig sein (Mitchell 1976, Brandt & Trumpower 1994). Diese Vermutung beruht auf Betrachtungen der Mittelpunktspotentiale der Chinon/Semichinon- und Semichinon/Chinol-Paare, die sich um etwa 350 mV unterscheiden sollen. Dies führt dazu, daß das Semichinon thermodynamisch sehr instabil ist (vgl. Brandt & Trumpower 1994).

Im Vergleich zu anderen FTIR-Differenzspektren von bc₁-Komplexen (*Rb. capsulatus*: Baymann 1995, *Rinderherz-Mitochondrien*: Iwaki et al. 2003, *S. cerevisiae*: siehe diese Arbeit) fällt die große Dominanz der Chinonbanden auf. Sie läßt sich auf einen 3-4fach höheren Chinongehalt des *P. denitrificans*-Komplexes zurückführen (Yang & Trumpower 1986), der offensichtlich auch während der Präparation erhalten bleibt. Es kann deshalb angenommen werden, daß beide Chinonbindestellen besetzt sind. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu den bereits bekannten Spektren des bc₁-Komplexes, bei denen nur die Besetzung der Q_i-Bindestelle diskutiert werden konnte. Die folgenden Erläuterungen beziehen sich zunächst auf alle im Komplex gebundenen Chinone ohne Rücksicht auf den Bindungsort. Später soll versucht werden, einzelne Beiträge der Q_o- und/oder Q_i-Bindestelle zuzuordnen.

Die zwei C=O-Streckschwingungen des neutralen Chinons (Abb. 2-18) werden im Spektrum des Chinons in Lösung (Abb. 4-22B) der Bande bei 1650 cm⁻¹ zugeordnet (Bauscher & Mantele 1992, Hellwig et al. 1999b). Die beiden Sauerstoffatome können unterschiedlich starke Wasserstoffbrücken zu ihrer Proteinumgebung ausbilden. Eine asymmetrische H-Bindung zu den C=O-Gruppen führt zur Aufspaltung der Bande (Breton et al. 1995). Im *Rb. capsulatus*-bc₁-Komplex werden die Beiträge der beiden Schwingungen bei 1664 und 1648 cm⁻¹ zugeordnet (Baymann 1995). Iwaki et al. (2003) identifizieren im *Rinderherz*-bc₁ eine einzelne Bande bei 1656 cm⁻¹ als Kandidat für die C=O-Schwingung. In beiden Arbeiten werden die Signale ausschließlich dem an der Q_i-Bindestelle gebundenen Chinon zugerechnet. Banden der C=O-Streckschwingungen finden sich im vorliegenden Differenzspektrum des

P. denitrificans-Komplex (Abb. 4-22A) bei 1656 und 1642 cm^{-1} . Durch die Bindung des Chinons wird seine Orientierung im Protein weitestgehend festgelegt. Konformelle Veränderungen werden dadurch erschwert. Deshalb erscheinen die Signale im Spektrum schmaler als beim Chinon in Lösung. Ähnlich wie bei Untersuchungen an isotope-markierten Chinonen in der Cytochrom *bo*₃-Oxidase läßt die geringe Verschiebung der Banden im Vergleich zum freien Chinon eine relativ schwache Wasserstoffverbrückung zwischen Substrat und Bindetaschen vermuten. Die Ausbildung einer starken Wasserstoffbrücke würde zu einer deutlicheren Verschiebung der Banden führen (Hellwig *et al.* 1999b).

Die C=C-Schwingung des Chinonrings kann dem Signal bei 1610 cm^{-1} zugeordnet werden. Die Bandenposition wird nur wenig von der Proteinumgebung beeinflusst. In Differenzspektren freier Chinone wurde sie bei 1610 cm^{-1} (Bauscher & Mäntele 1992, in Lösungsmittel) bzw. 1612 cm^{-1} (Hellwig *et al.* 1999b, in wäßriger Lösung) identifiziert. Die C=C-Schwingung gebundener Chinone absorbiert im Differenzspektrum des *Rb. capsulatus-bc*₁-Komplexes bei 1608 cm^{-1} . Im Spektrum des Rinderherz-*bc*₁-Komplexes (Iwaki *et al.* 2003) wurde eine der Banden an entsprechender Position dagegen nicht gefunden. Dies könnte am geringeren Chinongehalt dieser Proben liegen.

Zwei weitere charakteristische Banden des neutralen Chinons treten bei 1288 und 1262 cm^{-1} auf. Sie können eindeutig der C-OCH₃-Schwingung der Methoxygruppen des Chinons zugeordnet werden. Die Positionen der Banden im proteingebundenen Zustand entsprechen bis auf geringe Verschiebungen von max. 2 cm^{-1} denen des gelösten Chinons (Hellwig *et al.* 1999b). Quantenmechanische Berechnungen weisen darauf hin, daß Frequenz und Kopplungsstärke der Methoxy-Schwingungen abhängig von der Orientierung der Gruppen gegenüber dem Chinonring sind (Nonella & Brändli 1996, Burie *et al.* 1997). Daraus läßt sich schließen, daß beide Methoxygruppen durch die Bindung im Protein nur geringe konformelle Veränderungen im Vergleich zum gelösten Chinon erfahren. Remy *et al.* (2003) diskutieren anhand isotope-markierter Chinone, daß die Methoxygruppen-Schwingungen an verschiedene C-C-Schwingungen des Chinonrings gekoppelt sind. Die Schwingung, die zum Signal bei 1262 cm^{-1} beiträgt, soll dabei stärker gekoppelt sein als die Schwingung bei 1288 cm^{-1} . Sie vermuten weiterhin, daß die Schwingungen der Methoxygruppen untereinander stark gekoppelt sind und somit nicht voneinander unterschieden werden können. Studien von Pennock (1965), bei denen die Methoxygruppen durch Ethoxygruppen ausgetauscht wurden,

zeigen außerdem, daß die Beiträge der O-CH₃-Schwingung zu den Banden bei 1288 und 1262 cm⁻¹ ausgeschlossen werden können.

Im reduzierten Zustand (Abb. 4-22A, negative Banden) zeigen sich die Beiträge des protonierten Chinols. Sie treten bei 1494, 1468, 1430 und 1388 cm⁻¹ auf. Auch sie entsprechen in ihren Positionen weitestgehend den Spektren für Chinone in Lösung (Abb. 4-22B). Ihre Entstehung läßt sich auf die Reorganisation des Chinonrings infolge der Protonierung zurückführen, wobei Beiträge der Isoprenoid-Seitenkette, der Methoxygruppen und der am Chinonring gebundenen CH₃-Methylgruppe denkbar sind. Die Deformationsschwingungen der C-CH₂ bzw. C-CH₃-Gruppen der Isoprenoid-Seitenkette können zwischen 1465 und 1376 cm⁻¹ erwartet werden (*Pennock 1965, Bellamy 1958*). Im Bereich um 1450 cm⁻¹ könnte die O-CH₃-Schwingung der Methoxygruppen beitragen (*Breton et al. 1994b*). Eine Studie an isolierten Chinonen ordnet C-C-Ringschwingungen des QH₂ im Bereich von 1350 bis 1492 cm⁻¹ zu (*Bauscher & Mäntele 1992*).

Tabelle 4-8 faßt die Beiträge der gebundenen Chinone zum Gesamtspektrum des bc₁-Komplexes aus *P. denitrificans* zusammen.

Bandenposition in cm ⁻¹	Vorläufige Zuordnung	
1656 (+)	v (C=O)	Q
1642 (+)	v (C=O)	Q
1610 (+)	v (C=C)	Q
1494 (-)	Umorganisationen des Chinolrings und seiner Substituenten	QH ₂
1468 (-)		
1430 (-)		
1388 (-)		
1288 (+)	v (C-O)	Q, Methoxygruppen
1262 (+)	v (C-O)	Q, Methoxygruppen
1204 (+)		Q

Tabelle 4-8

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden der gebundenen Chinone im Gesamtspektrum des bc₁-Komplexes aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V. (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands. Q: Chinon, QH₂: Chinol. Details siehe Text.

Der schon mehrfach erwähnte hohe Chinongehalt der *P. denitrificans*-Proben legt den Versuch nahe, diesen anhand der Intensität charakteristischer Banden zu bestimmen. Es konnte im Verlauf der Experimente beobachtet werden, daß sich die Intensität der Chinonbanden je nach Vorbereitung der Meßproben veränderte (vgl. Abb. 4-24A). Sie war um so geringer, je öfter während der Ultrafiltration der Proben mit Puffer verdünnt und wieder aufkonzentriert wurde (siehe Kapitel 3.3.1/3.3.2). Es kann somit davon ausgegangen werden, daß Chinon während dieses Vorgangs aus dem Protein „gespült“ wurde (*Der Begriff Chinon steht in den folgenden Ausführungen zur Vereinfachung häufig sowohl für Ubichinon als auch Ubichinol. Bei Beschreibungen der Q_o-Bindestelle handelt es sich um Ubichinol QH₂, bei der Q_i-Bindestelle um Ubichinon Q*).

Am wenigsten von der Bindung im Protein und durch Überlagerungen von Beiträgen anderer Proteinbestandteile beeinflußt sind die Differenzbanden der Methoxygruppen bei 1288 und 1262 cm⁻¹. Letztere wurde deshalb als Indikator zur Abschätzung des Chinongehalts ausgewählt. Um mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Chinonkonzentration bestimmen zu können, muß die Schichtdicke der Probe sowie der Extinktionskoeffizient der Bande bekannt sein. Eine Korrelation zwischen Protein- und Chinonkonzentration wird hergestellt, indem diese mit der Proteinkonzentration der Probe verglichen wird.

Die Schichtdicke wurde zu Beginn jedes Experimentes anhand der Absorption des in der Probe enthaltenen Wassers bestimmt. Die Proteinkonzentration kann aus der Intensität der α -Bande des Differenzspektrum im sichtbaren Spektralbereich berechnet werden. Dazu wurde ein Extinktionskoeffizient von 28.5 mM⁻¹cm⁻¹ (562-575 nm) verwendet (*Vanneste 1966*), der den beiden *b*-Hämen eines Monomers entspricht.

Für den Extinktionskoeffizienten der Absorptionsbande der Methoxygruppen im infraroten Spektralbereich bei 1262 cm⁻¹ konnte in der Literatur kein Vergleichswert gefunden werden. Er wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit ermittelt. Dazu wurden Ubichinon-10-Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Bereich von 3-50 mM hergestellt. Da UQ₁₀ kaum wasserlöslich ist, wurde als Lösungsmittel Tetrahydrofuran verwendet. Das Lösungsmittel scheint keinen Einfluß auf Lage und Intensität der Bande zu haben. Experimente mit kurzkettigeren Chinonen in wäßriger Lösung liefern vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die Proben wurden in einer im Arbeitskreis entwickelten Infrarot-Meßzelle vermessen. Sie besteht aus zwei CaF₂-Fenstern, die in einer Halterung fixiert werden. In

einem der Fenster befindet sich eine Vertiefung, so daß mit einer definierten Schichtdicke gemessen werden kann. Für jede Chinonkonzentrationen wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und die Intensität der Bande bei 1262 cm^{-1} bestimmt (Abb. 4-23A). Die Intensitäten wurden anschließend als Funktion der Konzentration aufgetragen. Man erhält wie erwartet eine Gerade (Abb. 4-23B). Da die Schichtdicke der Meßzelle bekannt ist, läßt sich unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes aus der Steigung der Gerade der Extinktionskoeffizient der Methoxygruppen-Schwingung berechnen. Es ergibt sich ein Wert von $\varepsilon = 0.4\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

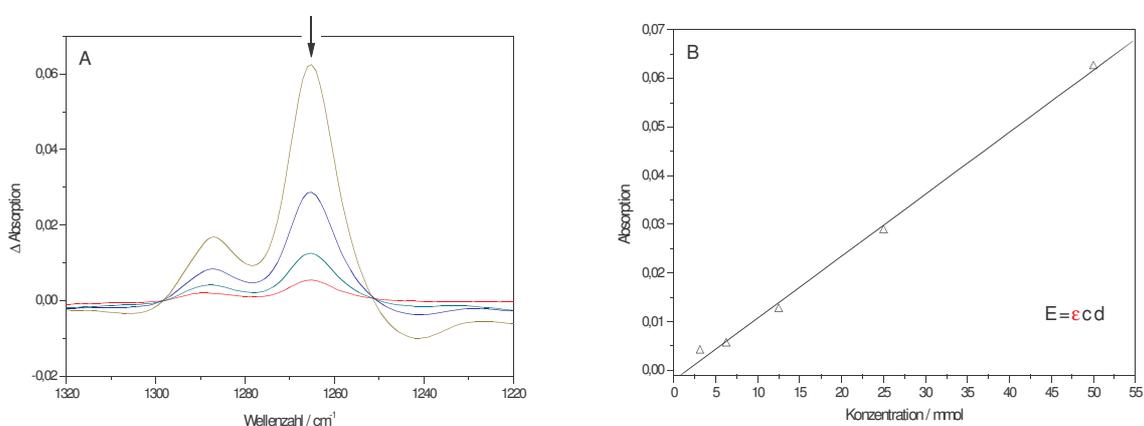


Abbildung 4-23

Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der Absorptionsbande der Chinon-Methoxygruppen. A: Absorptionsspektren des UQ₁₀ in Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration. B: Abhängigkeit der Signalintensität der 1262 cm^{-1} -Bande von der Konzentration der Chinonlösung.

Abb. 4-24A zeigt elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* mit unterschiedlichen Chinongehalten. Das gepunktet gezeichnete Spektrum stellt dabei die höchste beobachtete Chinonkonzentration dar, während das zweite Spektrum (durchgezogene Linie) die geringste beobachtete Konzentration aufweist. Beide Spektren wurden anhand der Spektren im sichtbaren Spektralbereich auf die gleiche Cytochrom *b*-Konzentration normiert. Mit Hilfe des oben bestimmten Extinktionskoeffizienten konnten aus diesen Spektren Maximal- und Minimalwerte für den Chinongehalt der untersuchten Proben bestimmt werden. Er lag zwischen 2.6 und 3.3 Molekülen Chinon pro bc_1 -Monomer und ist abhängig von der Probenvorbereitung, insbesondere der Durchführung des Pufferaustausches.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Ergebnissen von Yang & Trumpower (1986), die einen ähnlich hohen Chinongehalt im *P. denitrificans* bc_1 -Komplex fanden. Bartoschek et al. (2001) wiesen für mitochondriale bc_1 -Komplexe ebenfalls drei spezifisch gebundene Chinone nach. Kristallstrukturen zeigen, daß eines davon in der Q_i -Bindestelle bindet (Iwata et al. 1998, Hunte et al. 2000). Die beiden anderen können gleichzeitig an der Q_o -Bindestelle binden und durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren unabhängig voneinander ersetzt werden (Bartoschek et al. 2001). Diese Beobachtung stützt das *double-occupancy*-Modell von Ding (Ding et al. 1992). Dieses Modell wurde anhand von Experimenten am *Rb. capsulatus*- bc_1 -Komplex aufgestellt. Es postuliert die gleichzeitige Bindung von zwei Chinonen an Q_o , von denen eines stärker als das andere gebunden ist.

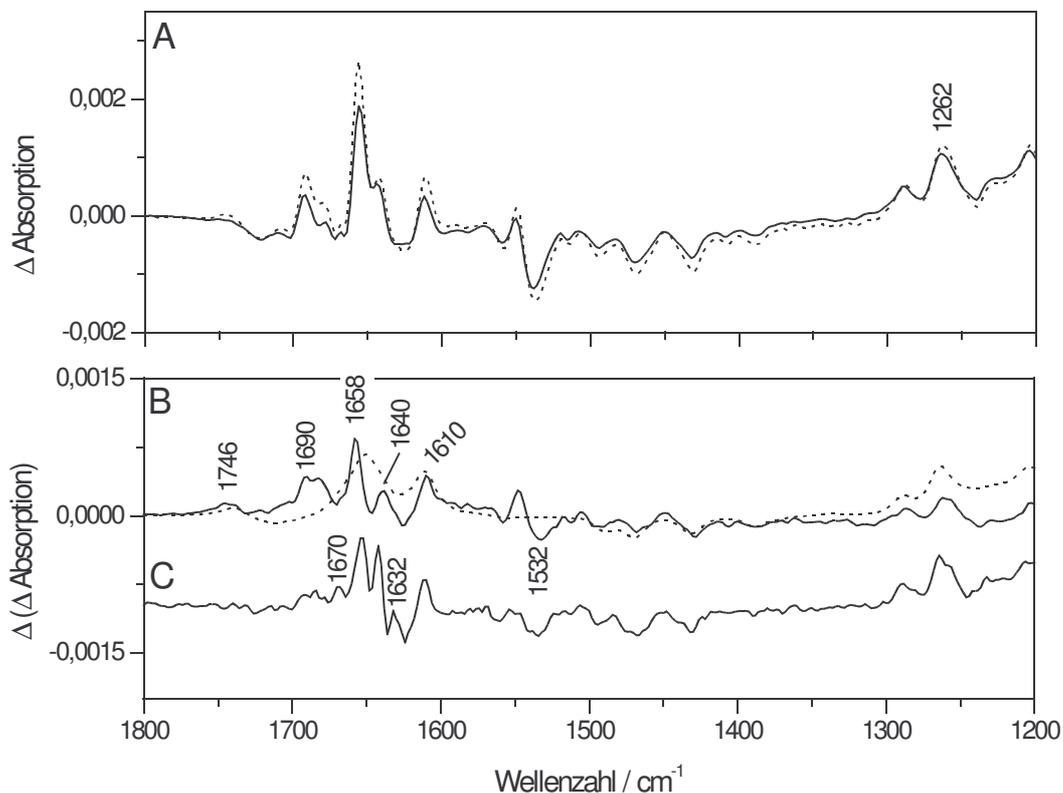


Abbildung 4-24

Vergleich der *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* mit unterschiedlichem Chinongehalt für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Phosphatpuffer (pH 7). A: gepunktete Linie: Spektrum mit der größten beobachteten Chinonkonzentration, durchgezogene Linie: geringste beobachtete Konzentration. B: Doppeldifferenzspektrum berechnet aus den Spektren der Abbildung A. Die Signale repräsentieren Veränderungen in der Q_o -Bindestelle nach Entfernung dort gebundenen Chinons, gepunktete Linie: Spektrum des Chinons in Lösung. C: Doppeldifferenzspektrum mit Signalen aller gebundenen Chinone berechnet auf der Basis von Spektren ausgewählter Potentialschritte. Details siehe Text.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen ebenfalls dieses Modell. Sie belegen die Bindung von durchschnittlich drei Chinonen, von denen mindestens ein schwächer gebundenes durch intensiven Pufferaustausch leicht entfernt werden kann (Abb. 4-24A). Dies zeigt sich durch die Abnahme der Signalintensität aller Banden, die zuvor den Chinonen zugeordnet wurden.

Das Doppeldifferenzspektrum in Abb. 4-24B zeigt die Veränderungen im Protein, die sich durch die Bindung bzw. Entfernung zusätzlichen Chinons ergeben. Dazu wurden die Spektren aus Abb. 4-24A voneinander abgezogen. Berücksichtigt man das *double-occupancy*-Modell (Ding 1992, 1995), müßten die meisten Signale vom aus der Q_o-Bindestelle entfernten Chinol und der dadurch beeinflussten Proteinumgebung stammen. Es wird angenommen, daß dieses offensichtlich schwächer gebundene der beiden Chinole im proximalen Bereich der zweigeteilten Q_o-Bindestelle nahe Häm *b_L* lokalisiert ist (Ding *et al.* 1995, Brandt 1996).

In jedem Fall unterscheidet sich dieses Spektrum deutlich vom Doppeldifferenzspektrum in Abb. 4-24C, das Beiträge der Chinone beider Bindestellen beinhaltet. Dieses Spektrum wird später ausführlich besprochen.

Im Doppeldifferenzspektrum (Abb. 4-24B) lassen sich die typischen Chinonbanden identifizieren. Bei 1658 und 1640 cm⁻¹ finden sich die Beiträge der C=O-Streckschwingung. Position und geringe Breite der Banden beweist, daß es sich um gebundenes Chinon handelt. Ungebundenes Chinon, wie in der Abbildung durch das gepunktet gezeichnete Spektrum dargestellt, würde ein wesentlich breiteres Signal bei etwa 1650 cm⁻¹ aufweisen. Die Bande wäre zudem nicht aufgespalten. Die C=C-Schwingung trägt zum Signal bei 1610 cm⁻¹ bei. Leicht identifizierbar sind auch die Banden der Methoxygruppen-Schwingungen bei 1288 und 1262 cm⁻¹ sowie die Signale des reduzierten QH₂ im Bereich der negativen Banden von 1494 bis 1388 cm⁻¹.

Zusätzliche Signale zeigen sich im Bereich von 1746, 1690 und 1532 cm⁻¹. Sie könnten Veränderungen in der Proteinumgebung wiedergeben, die sich durch die Chinonabgabe ergeben. Die Bandenstruktur um 1690 cm⁻¹ könnte von einer Beteiligung eines protonierten Hämpropionates des Häm *b_L* stammen. Es zeigt sich auch im Differenzspektrum des Häm selbst (Abb. 4-10). Das Signal bei 1746 cm⁻¹ deutet auf Protonierungen einer oder mehrerer Glu/Asp-Seitenkette(n) durch die Chinonbindung hin. Die Bande bei 1532 cm⁻¹ könnte

Beiträge der COO⁻-Schwingungen der korrespondierenden deprotonierten Form des Propionates und/oder der Aminosäureseitenketten beinhalten.

Die Protonierung einer Glutaminsäureseitenkette im Verlauf der QH₂-Bindung wird in der Literatur ausgiebig diskutiert (*u.a. Crofts et al. 1999, Crofts et al. 1999a, Berry et al. 2000a, Hunte et al. 2000, Palsdottir et al. 2003*). Als Kandidat in mitochondrialen bc₁-Komplexen ist Glu272 (Hefe-Numerierung) im Gespräch. Es soll über die deprotonierte Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zur C-OH-Gruppe des Ubichinols ausbilden. Im Verlauf der Chinoloxidation wird die H-Brücke gelöst und die Glutamatseitenkette protoniert.

Überträgt man dieses Szenario auf den *P. denitrificans*-Komplex, ergibt sich folgende Möglichkeit zur Entstehung der oben beschriebenen Signale. Die bei der Bindung des Chinols im Komplex deprotonierte Seitenkette des Glu295 (äquivalent zu Glu272 in Hefe) wird im Verlauf der Chinoloxidation protoniert. Dies zeigt sich in der Entstehung der Bande bei 1746 cm⁻¹. Die C=O-Streckschwingung des deprotonierten (oxidierten) Ubichinons trägt zu den Signalen bei 1658 und 1640 cm⁻¹ bei. Die Bande bei 1532 cm⁻¹ läßt sich vermutlich teilweise der (COO⁻)^{as}-Schwingung des deprotonierten Ausgangszustand der Aminosäureseitenkette zuordnen.

Im Hefe-bc₁-Komplex ist das Chinol über ein ausgedehntes Netz von Wasserstoffbrücken und Wassermolekülen mit dem Propionat A des Häm b_L verbunden (*Hunte et al. 2000, Palsdottir et al. 2003*). Falls dies auch in *P. denitrificans* der Fall ist, ist eine direkte Reaktion des Hämpropionats auf Bindungsvorgänge an der Q_o-Bindestelle wahrscheinlich. Sie wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit diskutiert (siehe vorn) und zeigt sich möglicherweise durch das Auftreten der Banden im Bereich von 1690 cm⁻¹ (Abb. 4-24B). Die deprotonierte Propionatgruppe des Häm b_L trägt wahrscheinlich zur Bande bei 1532 cm⁻¹ bei.

Abb. 4-25 zeigt eine vergrößerte Darstellung der Differenzspektren aus Abb. 4-24A für den Spektralbereich von 1770 bis 1710 cm⁻¹. Sie macht deutlich, daß neben Glu295 weitere protonierte Asp/Glu-Seitenketten in die Redoxreaktion eingebunden sein müssen. Die vermutete Protonierung des Glu295, die für die Entstehung des Signals bei 1746 cm⁻¹ verantwortlich gemacht wurde, tritt erst bei Bindung des zweiten Chinols auf. Das Spektrum mit dem niedrigeren Chinongehalt (durchgezogene Linie) weist dieses Signal nicht auf. Dafür treten bei 1742 und 1734 cm⁻¹ zusätzliche Signale protonierter Asp/Glu-Seitenketten auf. Da

sie auch bei niedrigerem Chinongehalt der Probe vorhanden sind, könnten sie von Aminosäuren aus der Umgebung des stärker gebundenen Chinol stammen. Möglicherweise zeigen sich aber auch Banden, die auf Protonierungen in Verbindung mit dem an Q_i gebundenen Chinon stehen. Ihre Beiträge könnten bei hohem Chinongehalt von den stärkeren Signalen der Chinole überlagert sein.

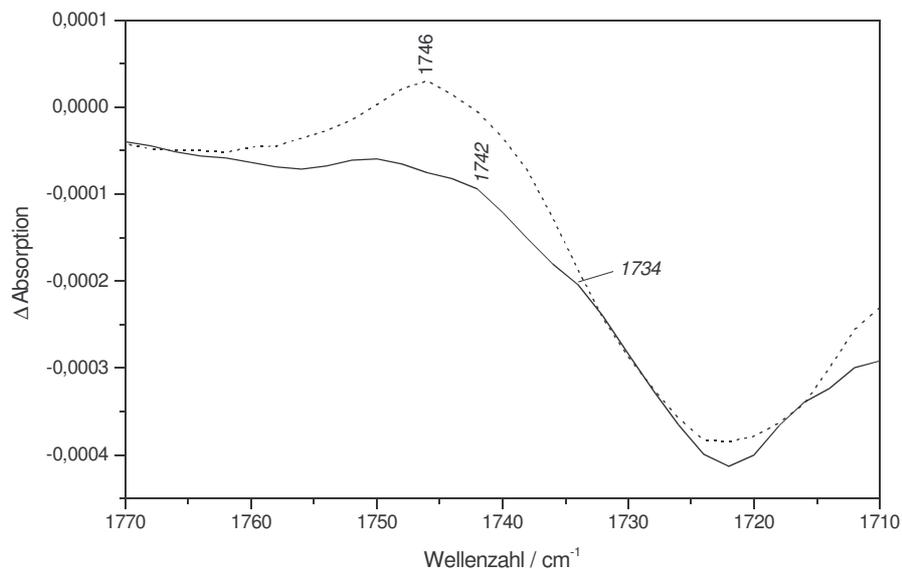


Abbildung 4-25

Vergößerte Darstellung des Spektralbereiches von 1770 bis 1710 cm^{-1} aus Abbildung 4-24A zum Vergleich der ox-minus-red-FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Phosphatpuffer (pH 7) mit unterschiedlichen Chinongehalt. A: gepunktete Linie: Spektrum mit der größten beobachteten Chinonkonzentration, durchgezogene Linie: geringste beobachtete Konzentration.

In der Aminosäuresequenz der Cytochrom *b*-Untereinheit des *P. denitrificans* finden sich einige Kandidaten, die zur Entstehung der Banden beitragen könnten. Asp252, Asp86, Asp278 oder Glu415 sind beispielsweise Aminosäuren, die in den meisten mitochondrialen und bakteriellen bc_1 -Komplexen konserviert sind. Ihnen könnte daher eine besondere Bedeutung zukommen. Vom Äquivalent des Asp252 aus mitochondrialen Strukturen ist bekannt, daß es in unmittelbarer Nähe des Chinons an der Q_i -Bindestelle liegt. Seine protonierte Seitenkette könnte zur Stabilisierung des Chinons in der Bindestelle eine Wasserstoffbrücke zu einer der beiden C=O-Chinongruppen ausbilden. Zusätzlich kommt es als Protonendonator während der Chinonreduktion in Frage (Hunte *et al.* 2000). Abschließende Zuordnungen der Banden zu einzelnen Aminosäuren müssen jedoch durch ortsgerichtete Mutagenese abgesichert werden.

Wie bereits kurz erwähnt, unterscheiden sich die Signale, die gerade den Chinonen der Q_o -Bindestelle zugeordnet wurden, von denen in Abb. 4-24C gezeigten. Wie dieses Doppeldifferenzspektrum berechnet wurde, soll im folgenden kurz erläutert werden.

Bei der Besprechung der Differenzspektren der einzelnen Kofaktoren in Kapitel 4.1.2.3 war im elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum des Häm b_H aufgefallen, daß die ebenfalls erwarteten Signale der im Komplex gebundenen Chinone fehlen. Dies wurde auf die spezielle Wahl des Potentialbereiches zurückgeführt. Um die Chinonbeiträge dennoch nachweisen zu können, wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein Differenzspektrum für den Potentialbereich von -0.23 bis 0.5 V aufgenommen (das Spektrum wird hier nicht gezeigt). Dies enthält Beiträge des Häm b_H , des Häm c_1 , des Rieske-Proteins und der Chinone. Von diesem Spektrum wurde das Differenzspektrum des Häm c_1 /Rieske-Proteins (Abb. 4-15B) abgezogen. Dadurch erhält man ein Spektrum des Häm b_H , das auch die Banden der Chinone zeigt. Dieses ist in Abb. 4-24C dargestellt. Es unterscheidet sich in einigen Bereichen vom Spektrum, das dem Chinon der Q_o -Bindestelle zugeordnet wurde. Die Vermutung liegt nahe, daß sich hier besonders die Beiträge des Chinons an der Q_i -Bindestelle manifestieren, da auch in anderen FTIR-Studien des bc_1 -Komplexes die Beiträge dieses Chinons immer in Verbindung mit dem Spektrum des Häm b_H diskutiert werden (*Baymann 1995, Iwaki et al. 2003*). Überlagerungen mit den Signalen des Chinols an Q_o können jedoch unter den gewählten Meßbedingungen (Potentialbereich, pH-Wert) nicht ausgeschlossen werden.

Die Chinonbanden sind auch hier leicht zu identifizieren. Die C=O-Streckschwingung trägt bei 1652 und 1642 cm^{-1} bei. Die erste Bande ist im Vergleich zum Spektrum des Chinols der Q_o -Bindestelle um 4 cm^{-1} verschoben (vgl. Abb. 4-24B). Dies läßt auf eine stärkere Wasserstoffverbrückung des Chinons schließen. Die zweite Bande zeigt eine deutlich höhere Intensität als im Vergleichsspektrum. Möglicherweise zeigt sich damit eine stark asymmetrische Bindung des Chinons in der Q_i -Bindestelle. Die Beiträge des Chinols zeigen sich bei beiden Banden durch leichte Schultern in der Bandenstruktur. Die anderen Chinonsignale unterscheiden sich in beiden Spektren kaum voneinander und können nicht einer bestimmten Bindestelle zugeordnet werden.

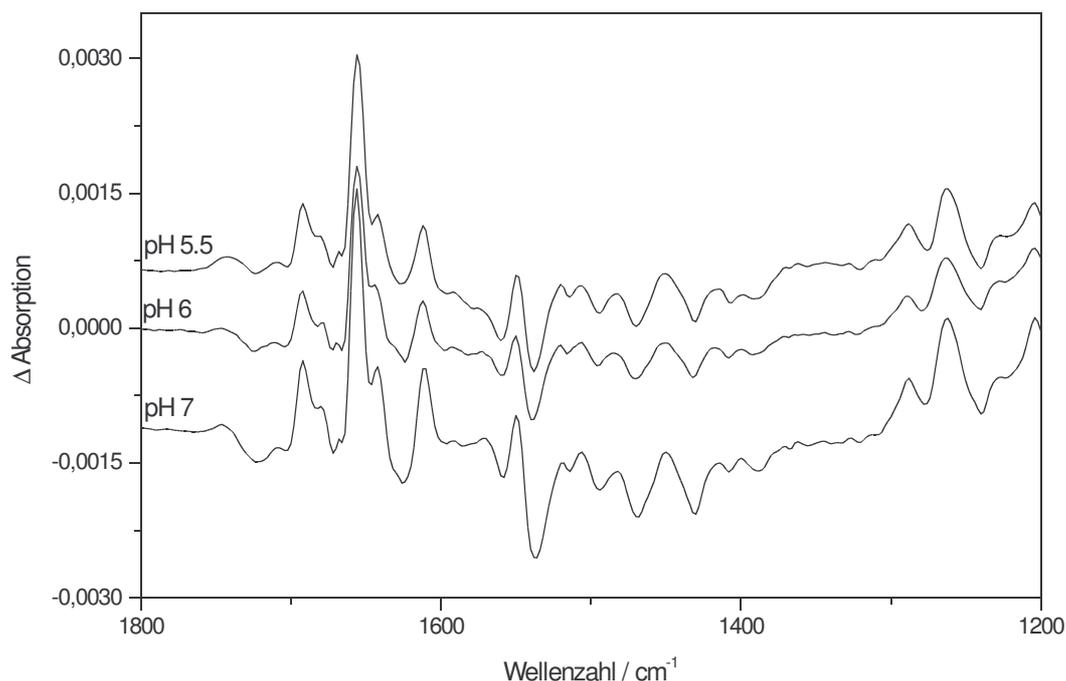
Zwei Banden bei 1670 und 1632 cm^{-1} lassen sich Schwingungen von Argininseitenketten zuordnen. Sie traten auch schon im Differenzspektrum des Häm b_H auf und sind somit eher an

dessen Redoxreaktion gekoppelt. Auch Beiträge der Hämpropionate wie sie schon im Spektrum des Häm b_H (Abb. 4-12) zu sehen waren, sind vorhanden. Sie sollen hier nicht noch einmal beschrieben werden.

Zum Abschluß des Kapitels soll kurz der Einfluß des pH-Wertes auf die Spektren besprochen werden. Im allgemeinen werden Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt, um zusätzliche Informationen über protonierbare Gruppen im Protein zu erhalten. Es kann beispielsweise auf den pK-Wert einer Gruppe geschlossen werden, der sich durch die Redoxreaktion verändern kann. Dadurch läßt sich die Zuordnung zu bestimmten protonierbaren Aminosäureseitenketten wie Asp/Glu oder auch Hämpropionaten untermauern (*Hellwig 1998*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen bei pH 5.5, 6, 7 und 8 durchgeführt. Für die Messungen bei pH 8 wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet. (200 mM Boratpuffer bzw. 100 mM Phosphatpuffer). In beiden Fällen konnten jedoch keine verwertbaren Spektren aufgenommen werden. Das Protein war unter den gegebenen Meßbedingungen nicht stabil und denaturierte teilweise. Dies konnte durch den Verlust der Redoxaktivität der *b*-Häme im sichtbaren Spektralbereich beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Messungen bei pH 5.5 wurden in 200 mM Cacodylatpuffer durchgeführt. Für die pH-Werte 6 und 7 wurde 100 mM Phosphatpuffer verwendet. Alle Pufferlösungen enthielten 100 mM KCl als Leitsalz sowie 0.02 % DDM als Detergenz. Abb. 4-26 zeigt die FTIR-Differenzspektren der Messungen in Pufferlösungen mit den pH-Werten 5.5, 6 und 7 (siehe Kapitel 3.3.2).

Die Spektren ähneln sich in ihrer Bandenstruktur, zeigen jedoch Unterschiede im Bezug auf die Signalintensität. Diese beruhen auf einen unterschiedlichen Chinongehalt der Proben, der auf zwei Effekte zurückgeführt werden könnte. Zum einen kann durch das Umpuffern Chinon verloren gehen. Dies entspricht dem Vorgang, der in Bezug auf die Q_o -Bindestelle besprochen wurde und zeigt sich in Änderungen des Protonierungszustandes einiger Aminosäureseitenketten. Analog dazu sollten sich in den Spektren mit niedrigerem Chinongehalt (pH 5.5 und 6) ähnliche Protonierungssignale finden lassen wie für Abb. 4-25 diskutiert. Dies ist der Fall. In Abb. 4-27 ist der entsprechende Spektralbereich vergrößert dargestellt.

**Abbildung 4-26**

Elektrochemisch induzierte *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten im Spektralbereich von 1800 bis 1200 cm^{-1} .

In der Probe, die in Pufferlösung mit pH 7 vermessen wurde, findet sich der höchste Chinongehalt. Er korrespondiert mit dem Signal bei 1746 cm^{-1} , das bereits der Protonierung einer Glutamat- oder Aspartatseitenkette zugeordnet wurde. Bei pH 6 nimmt die Intensität dieser Bande stark ab. Dies könnte von der Deprotonierung der Seitenkette herrühren. Zusätzliche Signale treten bei 1736 und 1730 cm^{-1} auf. Sie stammen wahrscheinlich von Protonierungen anderer Glu/Asp (siehe oben). Bei pH 5.5 ist eine breite Bande im Bereich von 1742 cm^{-1} zu beobachten. Die Schulterstruktur bei 1736 cm^{-1} ist nur noch schwach vorhanden, die Bande bei 1730 cm^{-1} ist verschwunden. Dies spricht für eine Veränderung im Protonierungszustand der dafür verantwortlichen Gruppe.

Die Signale im Bereich von 1742 und 1730 cm^{-1} traten schon in vorher beschriebenen Spektren auf (Abb. 4-25). Die Bande bei 1736 cm^{-1} dagegen konnte bisher noch nicht beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, daß neben dem Verlust von Chinon während des Umpufferns noch andere Effekte auftreten. Beispielsweise kann die

Bindeaffinität des Chinons durch die unterschiedlichen pH-Bedingungen beeinflusst werden. Bei niedrigen pH-Werten könnte die Affinität des Chinons zur Bindung im Komplex geringer sein, da die Chinonbindung behindert wird. Möglicherweise werden auch eine oder mehrere Aminosäureseitenketten abhängig von ihrem pKa-Wert bei niedrigen pH-Werten protoniert. Dann fallen sie als Bindungspartner für das Chinon aus, da die Ausbildung von Wasserstoffbrücken nicht mehr möglich ist. Zur Untermauerung dieser Thesen sind aber noch weiterführende Experimente notwendig.

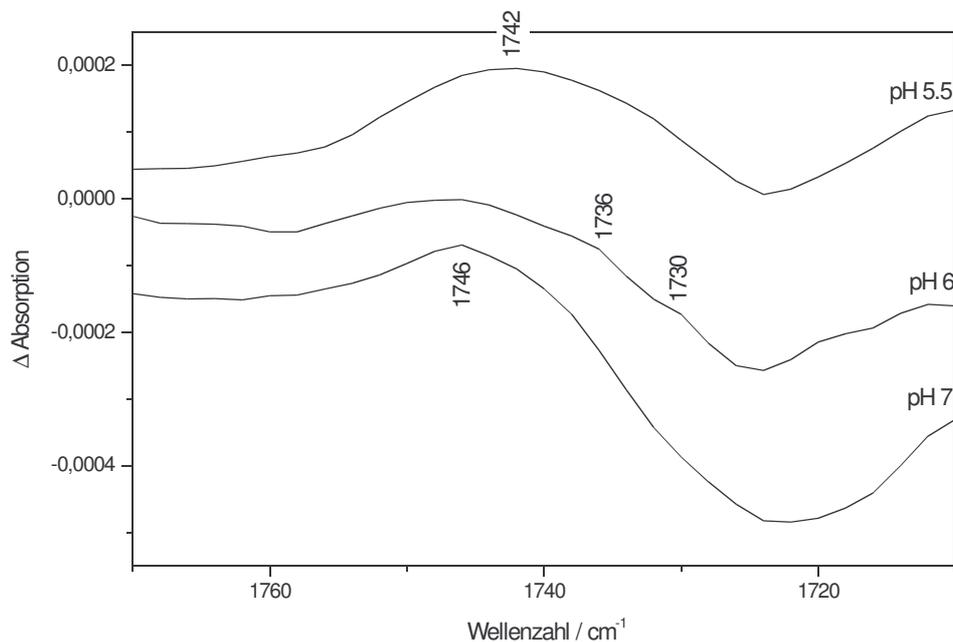


Abbildung 4-27

Elektrochemisch induzierte ox-minus-red-FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten im Spektralbereich von 1770 bis 1710 cm^{-1} .

Abschließend läßt sich vorläufig sagen, daß der geringere Chinongehalt des bc_1 -Komplexes bei saureren pH-Werten wahrscheinlich auf der Kombination von diesen zwei Effekten beruht. Zum einen wird durch den Umpuffervorgang die Konzentration gebundenen Chinons herabgesetzt. Zum anderen könnte die Bindeaffinität des Chinons von den pH-Bedingungen beeinflusst werden.

4.1.2.6 Bindung von Inhibitoren

Inhibitoren bieten gute Möglichkeiten, die molekularen Mechanismen von Proteinen aufzuklären. Zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Inhibitoren führten zur Postulierung der beiden Chinonbindestellen des bc_1 -Komplexes und letztendlich zur Aufstellung des Q-Zyklus als Funktionsmodell (Mitchell 1975, Brandt & Trumppower 1994, Crofts et al. 1999a). Abgeleitet von ihrem Bindungsort unterscheidet man Q_i - und Q_o -Inhibitoren (siehe Kapitel 2.1.4.2).

Im Rahmen der Experimente am bc_1 -Komplex aus *P. denitrificans* wurden die Inhibitoren Antimycin A und Stigmatellin verwendet. Die elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren des inhibierten Komplexes können Hinweise auf an der Bindung des Hemmstoffs beteiligte Proteinbestandteile und damit die Wirkungsweise der Inhibitoren liefern. Möglicherweise lassen sich daraus auch Schlüsse auf den Reaktionsmechanismus des bc_1 -Komplexes ziehen.

Bindung von Antimycin A

Antimycin A ist ein Vertreter der Q_i -Inhibitoren (Slater 1973). Es verhindert den Elektronentransfer vom Häm b_H zum Ubichinon an der Q_i -Bindestelle. In Abb. 4-28 ist die chemische Struktur des Antimycin A dargestellt. Hauptmerkmal ist ein Dilactonring, an den über eine Amidbindung ein 3-Formamidosalicylring gebunden ist (Slater 1973). Die 9-Ring-Struktur des Dilactons ist verschiedenen Studien zufolge nicht entscheidend für die Aktivität des Antimycin A verantwortlich, könnte aber regulative Funktionen für die Einpassung der Salicylsäuregruppe in die Bindetasche besitzen. Die 3-Formylaminogruppe (grau markiert) scheint dagegen entscheidend für eine feste Bindung des Inhibitors im Protein zu sein (Tokutake et al. 1994, Miyoshi et al. 1995). In Kristallstrukturen mitochondrialer bc_1 -Komplexe zeigt sich eine unmittelbare Nachbarschaft des 3-Formamidosalicylring

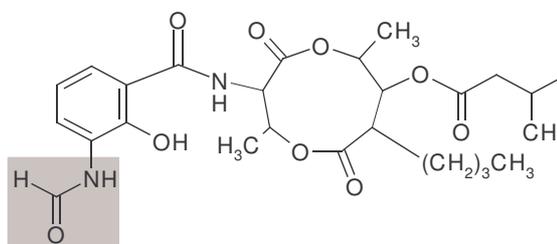


Abbildung 4-28

Struktur des Antimycin A. Die für die Bindung im Protein verantwortlich Formylaminogruppe ist grau markiert (Tokutake et al. 1994).

mit einem Hämpropionat des Häm b_H (Zhang *et al.* 1998). Die Bindetaschen von Ubichinon und Antimycin A sind nicht identisch, überlappen sich aber stark (Kim *et al.* 1998), so daß das an Q_i gebundene Chinon durch Antimycin aus der Bindestelle verdrängt wird (Kim *et al.* 1998, Xia *et al.* 1997, Bartoschek *et al.* 2001). Die Bindung des Inhibitors läßt sich durch eine Rotverschiebung der α -Bande des reduzierten Häm b_H im sichtbaren Spektralbereich nachweisen (von Jagow & Link 1986). Die Größe der Verschiebung variiert dabei möglicherweise in Abhängigkeit vom Chinongehalt der Probe und dem Grad der Inhibierung. Bisher bekannte Werte liegen zwischen 0.3 und 2 nm (von Jagow & Link 1986, Berry *et al.* 1991).

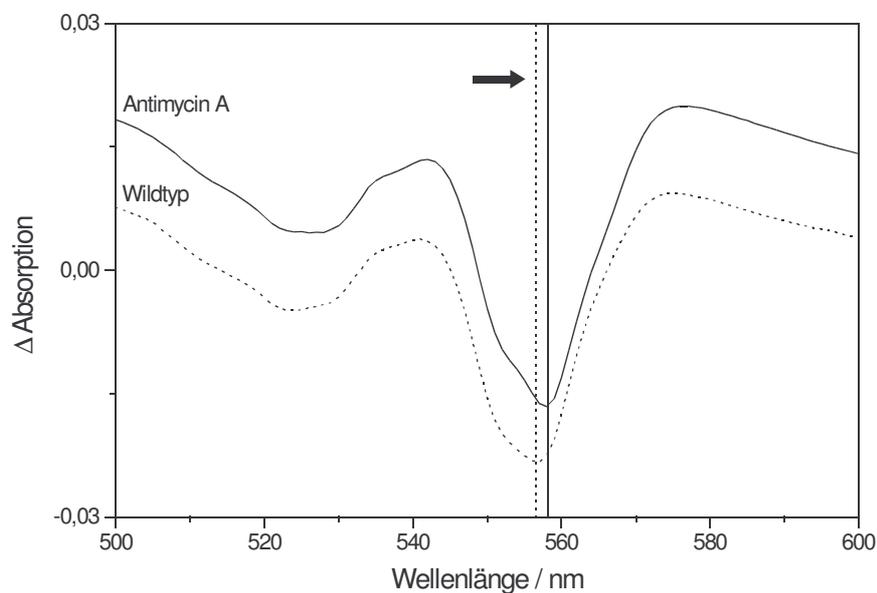


Abbildung 4-29

Rotverschiebung der α -Bande des Häm b_H durch Bindung von Antimycin A. Durchgezogene Linie: Spektrum des inhibierten Komplexes, gepunktete Linie: Spektrum des nativen Komplexes.

Der bc_1 -Komplex aus *P. denitrificans* wurde wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben inhibiert. Daß eine Bindung des Antimycin A stattfand, konnte anhand der eben beschriebenen Verschiebung der α -Bande des Häm b_H um 1 nm beobachtet werden. Abb. 4-29 verdeutlicht dies anschaulich.

Das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des mit Antimycin A inhibierten bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* ist in Abb. 4-30 dargestellt. Im Vergleich zum Spektrum

des Wildtypes (gepunktet) zeigen sich nur wenige Veränderungen. Das läßt darauf schließen, daß durch die Bindung des Antimycins keine weitreichenden Strukturveränderungen im Komplex auftreten. Kristallstrukturen mitochondrialer bc_1 -Komplexes bestätigen diese Vermutung (Xia et al. 1997, Kim et al. 1998).

Die Abnahme der Signalintensität der Banden bei 1650 und 1642 cm^{-1} sowie im Bereich der Absorptionen der Chinon-Methoxygruppen bei 1288 und 1262 cm^{-1} lassen sich auf die Verdrängung des Ubichinons aus der Q_I -Bindestelle zurückführen. Die genannten Banden sind in der Abbildung durch unterbrochene Pfeile dargestellt.

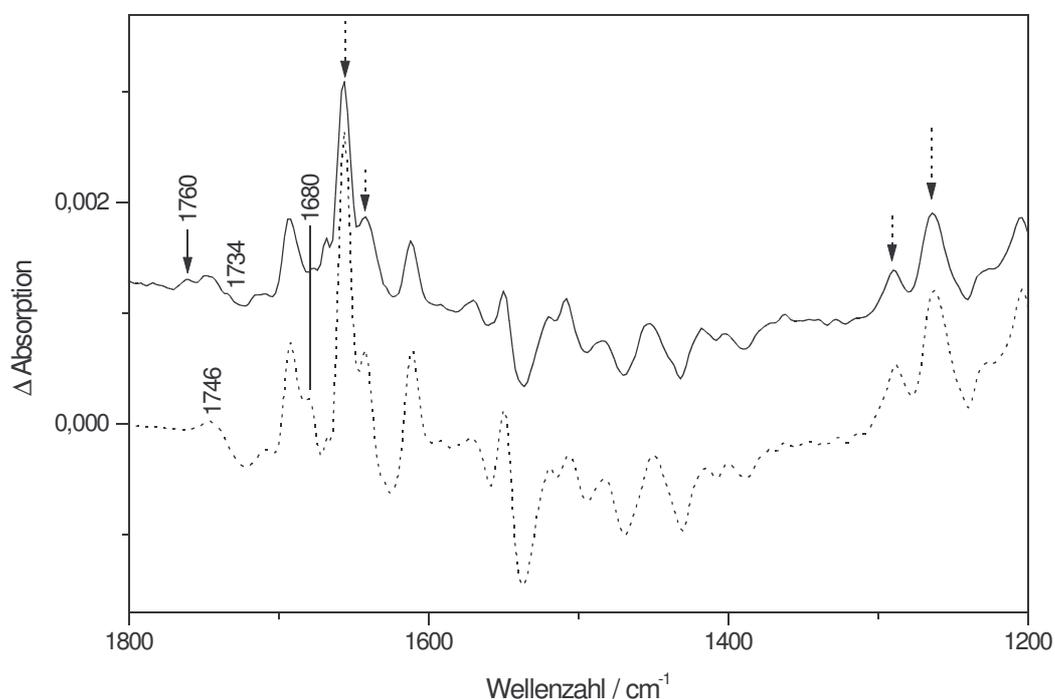


Abbildung 4-30

Elektrochemisch induziertes ox-minus-red-FTIR-Differenzspektrum des durch Antimycin A inhibierten bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V (durchgezogene Linie). Zum Vergleich ist das unter gleichen Bedingungen aufgenommene Spektrum des nativen Komplexes dargestellt (gepunktete Linie), beide Spektren wurden auf die gleiche Proteinkonzentration normiert.

Zusätzliche Signale finden sich bei 1760 und 1734 cm^{-1} (durchgezogener Pfeil). Diese stammen vermutlich von Absorptionen der C=O-Schwingungen des Antimycins selbst und können auch im elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum des Inhibitors in Lösung beobachtet werden, das im Anhang 7.2 gezeigt ist. An der Verschiebung der im Lösungsmittelspektrum bei 1742 cm^{-1} vorhandenen Bande nach 1734 cm^{-1} infolge der

Bindung im Protein scheint die an dieser Schwingung beteiligten Gruppe im oxidierten Zustand eine Wasserstoffbrücke zum Protein auszubilden. Welche der in Abb. 4-28 ersichtlichen C=O-Gruppen im einzelnen beiträgt, läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend sagen. Weitere Beiträge des Antimycins sind im Spektrum nicht identifizierbar. Sie könnten vorhanden sein, werden aber wahrscheinlich von Proteinsignalen überlagert (z.B. bei 1666 cm^{-1} und zwischen 1500 bis 1300 cm^{-1}).

Eine deutliche Veränderung im FTIR-Differenzspektrum des inhibierten bc_1 -Komplexes im Vergleich zum Wildtyp zeigt sich bei 1680 cm^{-1} . Die im Wildtypspektrum deutlich ausgeprägte Bande ist nach Bindung des Antimycin A deutlich kleiner. Das bedeutet, daß Gruppen, die in die Redoxreaktion des Komplexes involviert sind, durch Bindung des Inhibitors nicht mehr angesprochen werden. Letzendlich heißt dies, daß Elektronen- bzw. Protonentransferwege blockiert werden, was der Grund für die Inhibierung des Proteins durch Antimycin A sein könnte.

In vorangegangenen Kapiteln wurde das Signal bei 1680 cm^{-1} Schwingungen protonierter Hämpropionate oder Schwingungen von Arginin- bzw. Asparaginseitenketten zugeordnet. Die Intensität der Bande läßt vermuten, daß es sich aus Beiträgen mehrerer Schwingungen zusammensetzt. Ohne weitere Experimente ist jedoch schwierig zu beurteilen, welche der genannten Proteinbestandteile durch das Antimycin A beeinflusst werden. Für Beiträge von Aminosäureseitenketten lassen sich mehrere Kandidaten finden. Arg114 wurde bereits im Kapitel 4.1.2.3 als Bindungspartner für ein Häm b_H -Propionat diskutiert. Mutagenesestudien zeigten Störungen in der Kinetik der Q_i -Reaktion bei Veränderungen des Asp223 (*Brasseur et al. 1996*). Für diese Aminosäure wird eine Beteiligung am protonenleitenden System des bc_1 -Komplexes diskutiert. Neben diesen beiden gibt es noch zahlreiche andere konservierte Asn/Arg-Seitenketten im Bereich der Q_i -Bindestelle, die auch durch die Inhibitorbindung beeinflusst werden könnten. Zu deren Identifizierung sind jedoch weiterführende Studien notwendig.

Bindung von Stigmatellin

Stigmatellin gehört zur Gruppe des Q_o -Inhibitoren, die in drei Klassen unterteilt werden (von Jagow & Link 1986). Sie behindern den Elektronentransfer vom Ubichinol zum Rieske-Protein. Die Bindedomäne des Stigmatellins läßt sich nicht auf eine der beiden Bindetaschen der Q_o -Bindestelle festlegen. Damit bildet es eine eigene Klasse unter den Q_o -Hemmstoffen. Studien zeigen eine Überlappung mit mit den Bindestellen der Inhibitoren der beiden anderen Klassen (Kim *et al.* 1998), wobei Klasse I-Inhibitoren (z. B. MOA) ausschließlich im proximalen und Klasse II-Inhibitoren (HDBT) im distalen Bereich der Bindestelle lokalisiert sind. Durch diese großflächige Bindedomäne kann vermutet werden, daß bei Inhibierung mit Stigmatellin beide Chinone aus der Q_o -Bindetasche verdrängt werden. Experimente an mitochondrialen Komplexen scheinen dies zu bestätigen (Bartoschek *et al.* 2001).

Abb. 4-31 zeigt die chemische Struktur des Inhibitors. Durch Analyse der Röntgenkristallstruktur ist die Bindedomäne gut charakterisiert (Hunte *et al.* 2000). Im Hefe- bc_1 -Komplex wurden zwei direkte Bindungspartner des

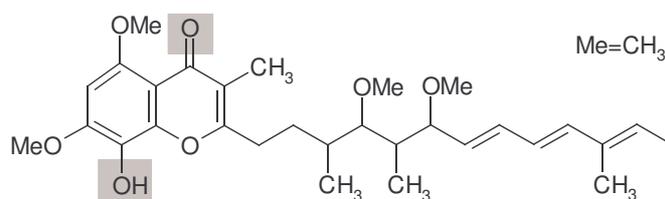


Abbildung 4-31

Struktur des Stigmatellin. Die markierten Bereiche bezeichnen die vermuteten Kontaktstellen für die Bindung des Inhibitors im Protein (nach Hunte *et al.* 2000)

Stigmatellins identifiziert. Das bereits mehrfach diskutierte Glu272 der Cytochrom b -Untereinheit bildet im deprotonierten Zustand eine Wasserstoffbrücke zur OH-Gruppe des Inhibitors aus. Die C=O-Gruppe des Inhibitors ist mit dem Imidazolring des His181 des Rieske-Proteins wasserstoffverbrückt. Beide Aminosäuren sind auch im *P. denitrificans*-Komplex konserviert (Glu295 und His155), so daß von einem ähnlichen Bindeverhalten des Stigmatellins ausgegangen werden kann.

Die Bindung des Inhibitors führt ähnlich wie im Fall des Antimycin A zu einer Rotverschiebung der α -Bande im sichtbaren Spektralbereich, hier allerdings für Häm b_L . Dies kann jedoch aufgrund des geringen Extinktionskoeffizienten dieses Häms im VIS-Differenzspektrum nur schwer beobachtet werden. Um dennoch eine ausreichende Inhibierung des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* sicherzustellen, wurde zu Beginn der Experimente ein Überschuß an Stigmatellin zur Probe zugegeben im Verhältnis 10:1.

In Abb. 4-32 ist ein elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des inhibierten Komplexes dargestellt, das typisch für diese ersten Studien ist. Es zeigt zahlreiche Banden, die für das Protein nicht charakteristisch sind. Ein sehr ähnliches Bandenmuster wurde auch für den inhibierten Hefe- bc_1 -Komplex gefunden (siehe Kapitel 4.2.2.3). Die Vermutung liegt nahe, daß Stigmatellin selbst zum Spektrum beiträgt. Zur Überprüfung wurde der Inhibitor in $\text{CH}_3\text{-OD}$ -Lösung vermessen. Das entsprechende Differenzspektrum ist in Anhang 7.2 ersichtlich. Das dort gezeigte Spektrum des Undecanyl-Stigmatellins entspricht dem des natürlichen Stigmatellins, das für den *P. denitrificans*- bc_1 -Komplex verwendet wurde (vgl. Kapitel 4.2.2.3). Es beweist, daß Stigmatellin redoxaktiv ist und im Vergleich zu anderen Inhibitoren sehr intensive Differenzbanden aufweist. Charakteristische Banden finden sich im Lösungsmittelspektrum bei 1708, 1674, 1608, 1584, 1570 sowie bei 1250 cm^{-1} . Über den Bereich zwischen 1500 und 1300 cm^{-1} können aufgrund starker Absorptionen des Lösungsmittels keine Aussagen getroffen werden.

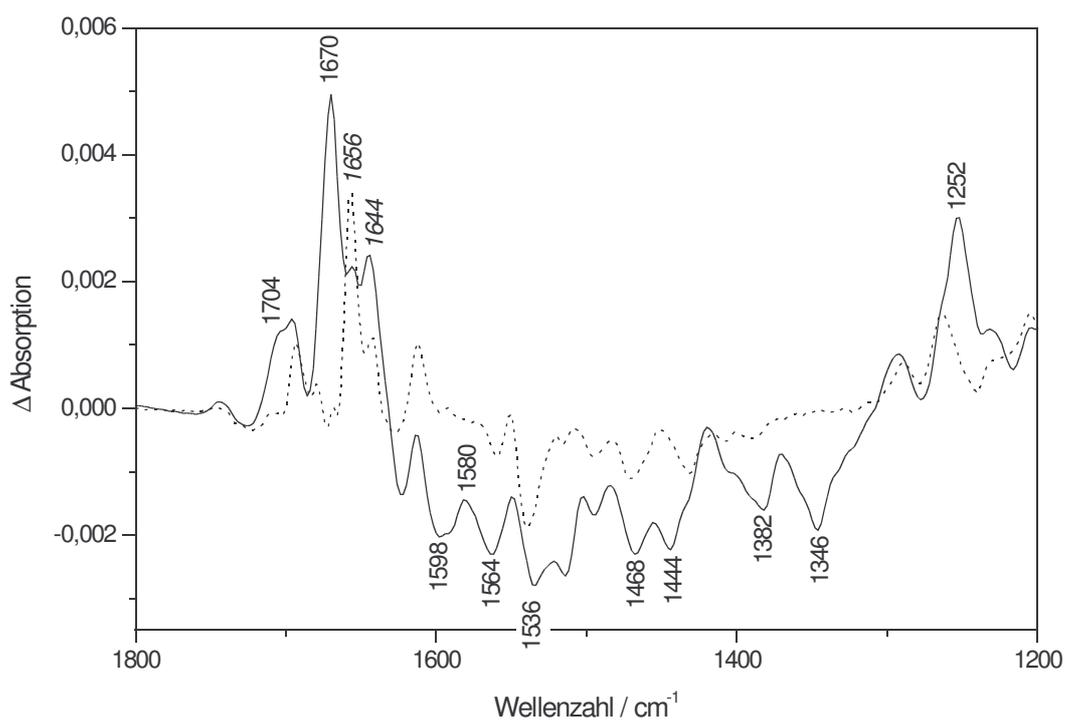


Abbildung 4-32

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* inhibiert mit einem Überschuß an Stigmatellin (durchgezogene Linie, Inhibitor/Protein-Verhältnis ca. 10:1) aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Phosphatpuffer pH 7. Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Proteins unter gleichen Meßbedingungen dar.

Im Differenzspektrum des inhibierten Proteins können diese Banden ebenfalls zugeordnet werden. Signale bei 1704, 1670 und 1252 cm^{-1} sowie zwischen 1598 und 1346 cm^{-1} stammen von Redoxreaktionen des im Überschuß vorhandenen und nicht gebundenen Stigmatellin. Sie werden im Kapitel 4.2.2.3 noch ausführlicher diskutiert. Die Verschiebung der Bandenpositionen um 2-10 cm^{-1} im Vergleich zum Lösungsmittelspektrum läßt sich auf die unterschiedlichen Meßbedingungen zurückführen (Verwendung von Phosphatpuffer statt des Lösungsmittels $\text{CH}_3\text{-OD}$). Es finden sich jedoch auch Hinweise auf gebundenes Stigmatellin. Veränderungen im Bereich der Amid I-Bande bei 1656 und 1644 cm^{-1} (kursiv beschriftet) lassen sich nur durch Wechselwirkungen des Proteins mit dem Inhibitor zurückführen.

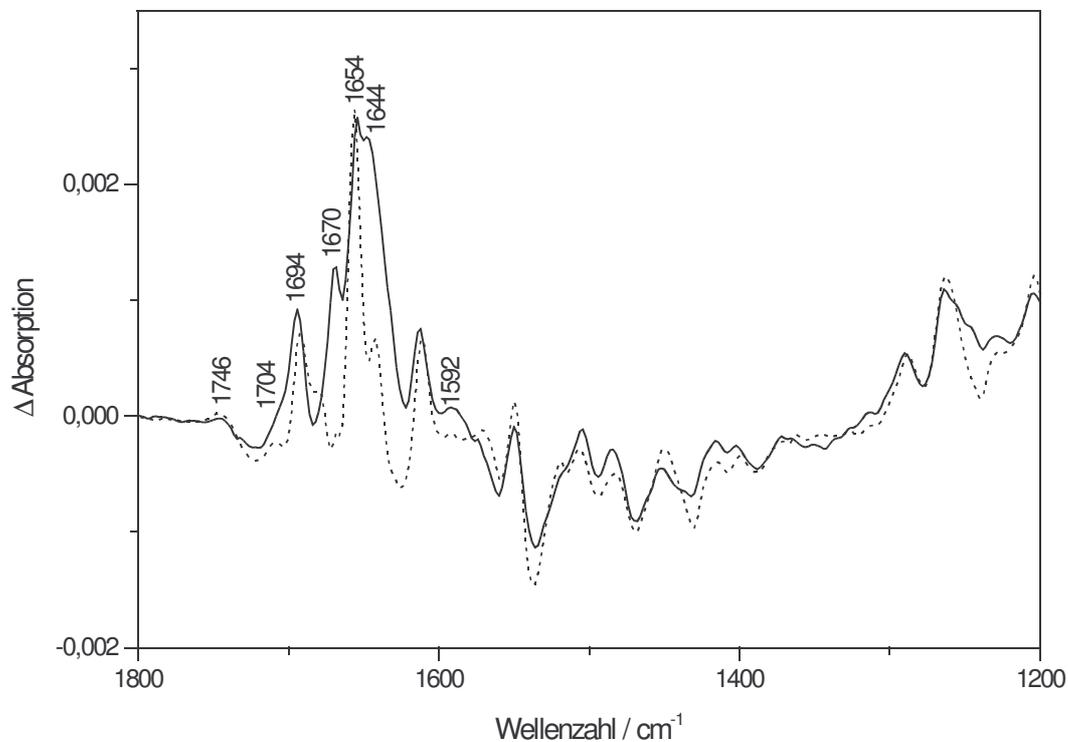


Abbildung 4-33

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* inhibiert mit Stigmatellin (durchgezogene Linie, Inhibitor/Protein-Verhältnis ca. 2:1) aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Phosphatpuffer pH 7. Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Proteins unter gleichen Meßbedingungen dar.

Aussagen über kleinere Veränderungen im Protein wie die vermutete Deprotonierung einer Glutaminsäureseitenkette lassen sich durch die Dominanz der Stigmatellin-Signale nicht treffen. Deshalb wurden die Experimente mit geringeren Inhibitorkonzentrationen weitergeführt. Abb. 4-33 zeigt das FTIR-Differenzspektrum des *P. denitrificans*- bc_1 -

Komplexes nach Zugabe von Stigmatellin im Verhältnis von 2:1. Damit ist immer noch ein Hemmstoff-Überschuß vorhanden, so daß weiterhin von einer ausreichenden Inhibierung des Proteins ausgegangen werden kann.

Dieses Spektrum zeigt signifikant weniger Signale ungebundenen Stigmatellins. Sie tragen wahrscheinlich zur Schulter bei 1704 cm^{-1} und zur Bande bei 1670 cm^{-1} bei. Die Signale des gebundenen Inhibitors sind zum größten Teil von Beiträgen des Proteins überlagert, die sich aufgrund der Inhibierung deutlich von denen des Wildtyps unterscheiden. Besonders beeinflußt wird wie schon im in Abb. 4-32 gezeigten Spektrum der Amid I-Bereich, der später noch diskutiert wird.

Daneben sind zwei Banden auffällig, die im Rahmen der Diskussion der Häm b_L -Differenzspektren Beiträgen von Aminosäureseitenketten zugeordnet wurden. Sie werden durch die Bindung von Stigmatellin offensichtlich besonders betroffen. Sie geben möglicherweise Hinweise auf die Bindungspartner des Inhibitors im Protein. Bei 1592 cm^{-1} findet sich ein Signal, dessen Intensität im Vergleich zum Spektrum des nativen Proteins stark zunimmt. In diesem Bereich wurden zuvor Histidinringschwingungen vermutet. Es könnte daher vom His155 des Rieske-Protein stammen, das vermutlich über eine Wasserstoffbrücke an die C=O-Gruppe des Stigmatellin gebunden ist. Ein Hinweis auf den zweiten Bindungspartner liefert die Bande bei 1746 cm^{-1} . Der betreffende Bereich des Spektrums ist in Abb. 4-34 vergrößert dargestellt.

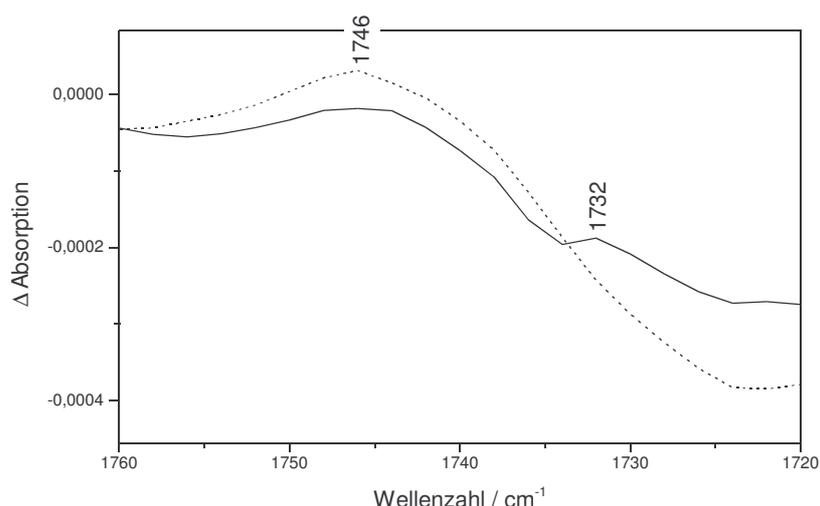


Abbildung 4-34

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* inhibiert mit Stigmatellin aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Phosphatpuffer pH 7. Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Proteins unter gleichen Meßbedingungen dar. Vergrößerte Darstellung des Spektralbereiches von 1760 bis 1720 cm^{-1} aus Abbildung 4-33.

Das Signal bei 1746 cm^{-1} resultiert wie bereits beschrieben (Kapitel 4.1.2.5) aus Beiträgen protonierter Asp- oder Glu-Seitenketten. Die Bindung des Stigmatellins führt zur Abnahme der Signalintensität. Ein zweites Signal bei 1732 cm^{-1} spricht für die Protonierung einer Asp/Glu-Seitenkette. Dieses Bandenmuster läßt zwei Erklärungsmöglichkeiten zu:

- (1) die Aminosäure, die zum Signal bei 1746 cm^{-1} beiträgt, wird durch die Inhibitorbindung deprotoniert und eine zweite Aminosäurerest wird parallel dazu protoniert;
- (2) die Umgebung der protonierten Säuregruppe wird durch das Stigmatellin so verändert, daß sich Unterschiede in der Wasserstoffverbrückung der Gruppe ergeben. Eine Abschwächung der Bindung würde zur Verschiebung des Signals zu niedrigeren Wellenzahlen führen. In Übereinstimmung mit der vermuteten Wechselwirkung des Stigmatellins im Protein wird der ersten Möglichkeit der Vorrang gegeben (Hunte *et al.* 2000). Damit würde die Abnahme der Bande bei 1746 cm^{-1} von einer Deprotonierung der Säuregruppe des Glu295 stammen, das äquivalent zum Glu272 in mitochondrialen Komplexen ist (siehe auch Kapitel 4.2.2.3).

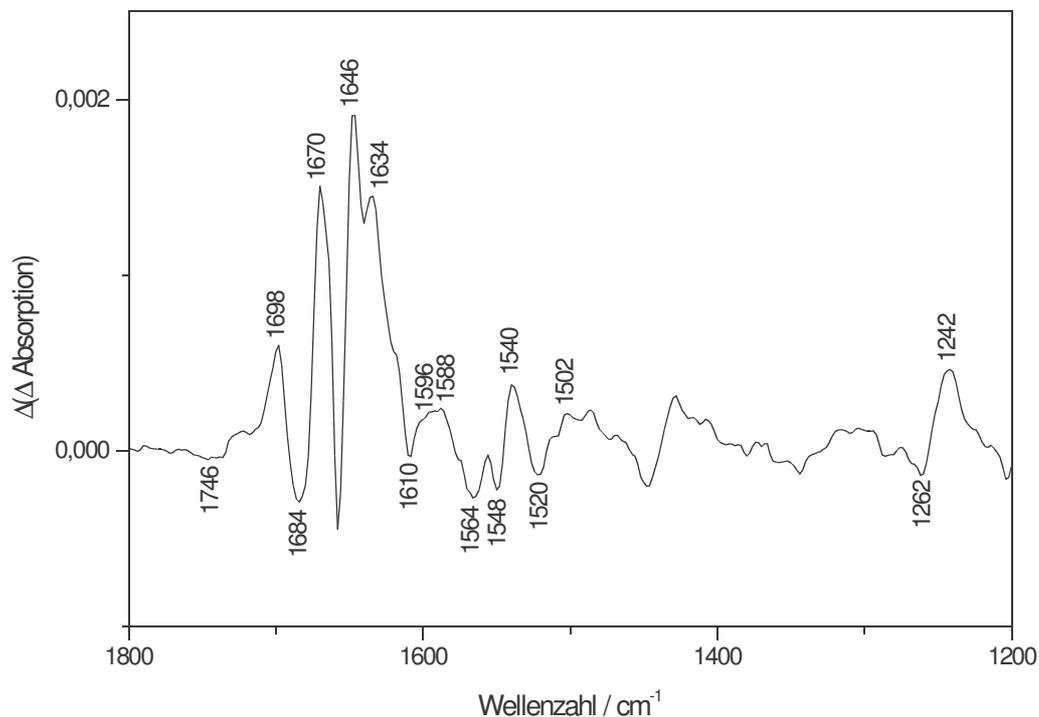


Abbildung 4-35

Doppeldifferenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans*, das die Auswirkungen der Stigmatellinbindung im Protein verdeutlicht. Die Berechnung erfolgte aus den in Abbildung 4-33 gezeigten Spektren des inhibierten und des nativen Komplexes.

Das FTIR-Differenzspektrum des inhibierten bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* zeigt deutliche Veränderungen im Amid I-Bereich (vgl. Abb. 4-33). Um sie näher zu charakterisieren, wurde ein Doppeldifferenzspektrum aus den Spektren des inhibierten und des nativen Komplexes berechnet. Dazu wurde das Wildtypspektrum vom Spektrum des inhibierten Komplexes subtrahiert. Es zeigt die Unterschiede in den Spektren, die auf die Bindung des Stigmatellin zurückzuführen sind und ist in Abb. 4-35 dargestellt.

Die eben beschriebenen Veränderungen der Schwingungen der Glutamatseitenkette und des Histidinrings zeigen sich auch hier im Spektrum bei 1746 und im Bereich von 1590 cm^{-1} . Im Amid I-Bereich finden sich desweiteren Signale bei 1698, 1684, 1646 und 1634 cm^{-1} . Sie könnten auf Umorganisationen in der Sekundärstruktur des Proteins hinweisen. Aus mitochondrialen Strukturen ist bekannt, daß durch die Bindung von Stigmatellin das Rieske-Protein in der sogenannten b -Position nahe Häm b_L fixiert wird (Zhang *et al.* 1998, Crofts *et al.* 1999a,b). Die Banden bei 1698 und 1634 cm^{-1} weisen auf Veränderungen in Strukturen im Bereich der β -Faltblätter des Rieske-Proteins hin.

Zum Signal bei 1698 cm^{-1} könnten auch von protonierte Propionate des Häm b_L beitragen, die durch die Inhibitorbindung beeinflusst werden. Auch die Banden bei 1684 und 1670 cm^{-1} sind Kandidaten für Veränderungen im Propionatbereich. Für die entsprechenden Signale der deprotonierten Propionate kommen die Banden bei 1564 und 1548 cm^{-1} in Frage. Nicht auszuschließen ist, daß auch andere Hämschwingungen beeinflusst werden. Die Signale bei 1588, 1540 und 1242 cm^{-1} könnten darauf hinweisen. Sie liegen in Bereichen, in denen die ν_{37} , ν_{38} und ν_{42} -Schwingungen des Häm-Porphyringerüsts erwartet werden.

Ebenso denkbar sind Beiträge von Asparagin- und Argininseitenketten zu den Signalen bei 1670 und 1634 cm^{-1} . Im Hefe- bc_1 -Komplex wird die Beteiligung von mehreren Tyrosinen im Bereich zwischen Häm b_L und Stigmatellin diskutiert (Hunte *et al.* 2000). Für Tyrosinschwingungen in Frage kommende Signale finden sich auch im Doppeldifferenzspektrum in Abb. 4-35. Bei 1610 und 1520 cm^{-1} sind Beiträge des protonierten Tyr-OH-Ringes möglich. Signale des deprotonierten Ringes finden sich möglicherweise bei 1602 und 1502 cm^{-1} . Auch die Banden bei 1262 und 1245 cm^{-1} könnten teilweise von Tyrosinschwingungen herrühren.

4.2 Spektren des bc_1 -Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 UV/VIS-Differenzspektren und Potentialtitrationen

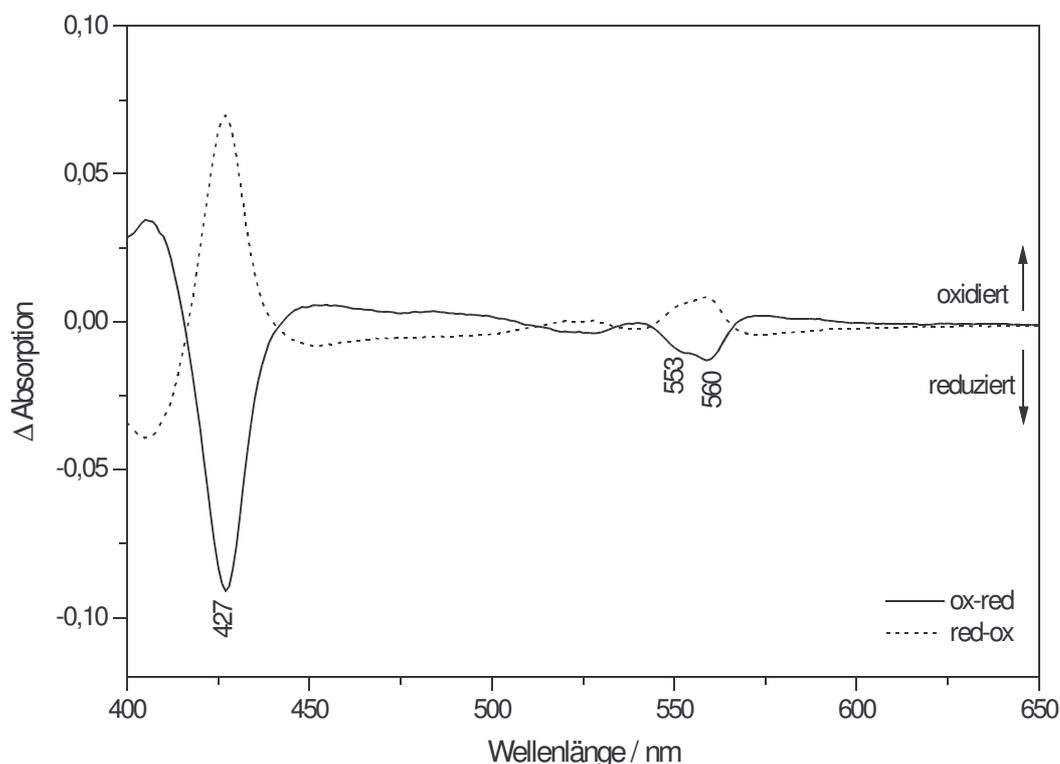


Abbildung 4-36

Elektrochemisch induziertes Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* für einen Potentialsprung von -0.5 nach 0.5 V und zurück. Durchgezogene Linie: oxidiert-minus-reduziert, gepunktet: reduziert-minus-oxidiert.

Abb. 4-36 zeigt die elektrochemisch induzierten Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* aufgenommen für einen Potentialschritt von 0.5 nach 0.5 V und zurück im sichtbaren Spektralbereich von 400 bis 650 nm. Die Spiegelsymmetrie der beiden Spektren bestätigt den vollständig reversiblen Ablauf der Redoxreaktion.

Obwohl das Spektrum dem des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* (Kapitel 4.1.1) stark ähnelt, ergeben sich geringe Unterschiede zwischen den Spektren beider Organismen. Die Position der Soretbande ist um 1 nm nach 427 nm verschoben. Vermutlich aufgrund dieser Verschiebung ist eine im bakteriellen Protein sichtbare Schulterstruktur bei 418 nm, die dem Cytochrom c_1 zugeordnet wurde, hier nicht ausgeprägt.

Die Struktur und Position der α -Bande dagegen ist in beiden Organismen nahezu identisch. Beiträge des Cytochrom c_1 finden sich bei 553 nm. Die beiden b -Häme zeigen sich in den Banden bei 560 nm und der schwach ausgeprägten Schulter bei 566 nm, wobei Häm b_H den größten Anteil am Signal bei 560 nm hat. Die in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Grundlagen zur Entstehung der Banden gelten analog für die hier gezeigten Spektren.

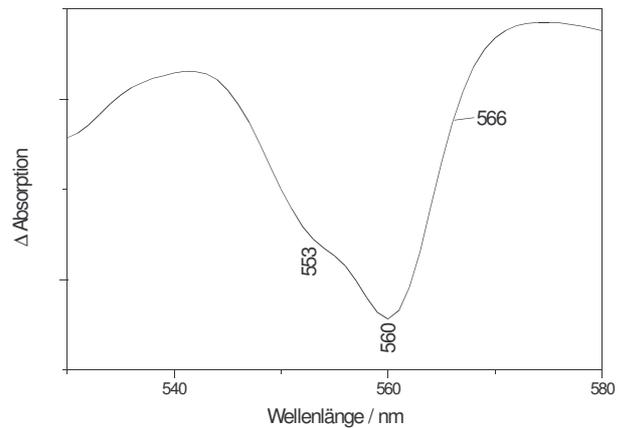


Abbildung 4-37

Vergrößerte Darstellung der α -Bande des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* im Spektralbereich von 530 bis 580 nm.

Im Anschluß an jedes Experiment wurden Potentialtitrationen im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt, um die Mittelpunktspotentiale der einzelnen Kofaktoren zu bestimmen. Die Vorgehensweise war dabei identisch zu den Messungen am *P. denitrificans*-Komplex (Kapitel 4.1.1.1). Es konnten jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, was wahrscheinlich auf die Größe des Proteins zurückzuführen ist. Der Hefe-Komplex reagierte bei einzelnen Zwischenschritten noch langsamer als der bakterielle Komplex, so daß für die Stabilität des Proteins unzumutbar lange Äquilibrierungszeiten zur Erreichung eines Reaktionsgleichgewichtes erforderlich waren. Sie führten dazu, daß von 8 in oxidativer Richtung durchgeführten Titrationen nur drei teilweise ausgewertet werden konnten. Bei Spektren der reduktiver Titration waren keine Auswertungen möglich, da bei allen starke Denaturierungseffekte beobachtet wurden. Sie äußern sich durch eine Abnahme der Signalintensität der α -Bande. Die Nernstkurven zeigen häufig einen sehr flachen Verlauf oder das Auftreten eines sehr niedrigen Redoxpotentials unterhalb von -400 mV.

In Abb. 4-38 sind Beispiele für Nernstkurven dargestellt, die sich nach Auswertung der α -Bande bei 553 nm ergeben. Sie unterscheiden sich deutlich in ihrem Verlauf. Sowohl Lage als auch Ausprägung der drei Potentialstufen weichen voneinander ab. Die rote, mit Dreiecken markierte Kurve zeigt schon Denaturierungseffekte im Bereich des Häm b_H , die auch im

Differenzspektrum nachweisbar waren (nicht gezeigt). Die aus den Kurven ermittelten Mittelpunktspotentiale der Häme variieren stark. Für Häm c_1 ergaben sich somit Werte zwischen 80 und 235 mV. Das Mittelpunktspotential des Häm b_H bewegte sich zwischen 20 und -185 mV, während das Häm b_L -Potential von -235 bis -360 mV schwankte. Strukturell vergleichbare mitochondriale Komplexe weisen Mittelpunktspotentiale von 34 mV für Häm c_1 , -128 mV für Häm b_H und -258 mV für Häm b_L auf (*Iwaki et al. 2003*). Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß die Äquilibrierungszeiten nicht ausreichend waren. Da sie aus Protein-Stabilitätsgründen nicht länger gewählt werden konnten, können hier keine Werte für die Mittelpunktspotentiale der Häme angegeben werden. Die Meßbedingungen, unter denen die Titrations durchgeführt werden, müssen hierfür erst optimiert werden. Dies kann in erster Linie über die Anpassung des Mediator-Cocktails erfolgen.

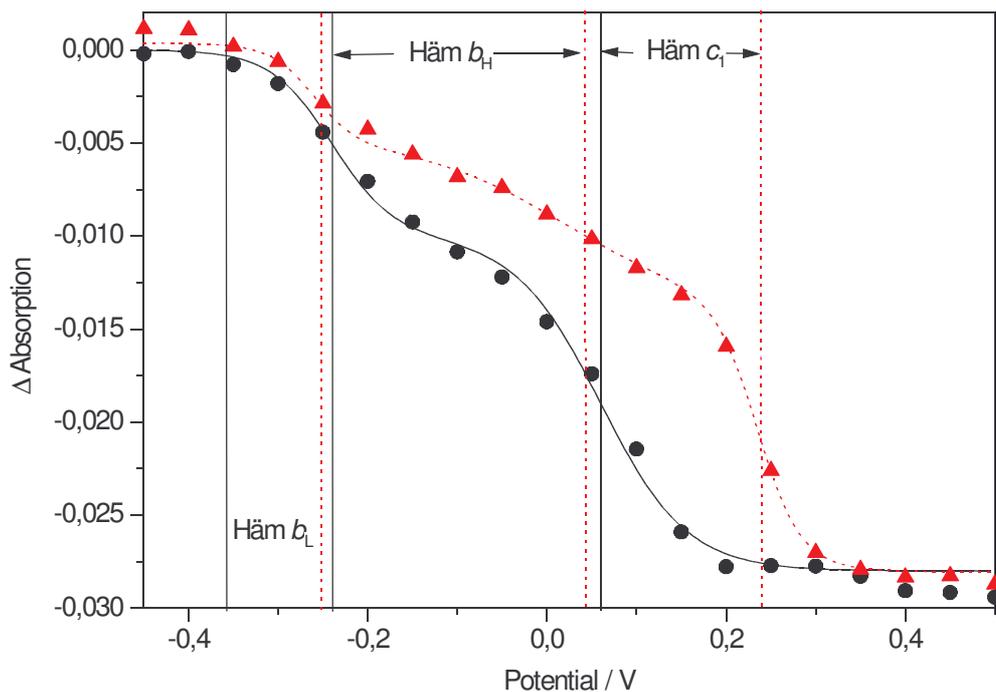


Abbildung 4-38

Beispiele für Nernstkurven, die sich aus der Absorptionsänderung der α -Bande in Abhängigkeit vom Potential ergeben. Die berechneten Mittelpunktspotentiale der drei Häme sind jeweils durch die senkrechten Linien angegeben.

4.2.2 Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren

4.1.2.2 Vorversuche

Wie bei den Experimenten am *P. denitrificans*- bc_1 -Komplex mußte das Meßsystem an das Hefe-Protein angepaßt werden. Zu Beginn wurde getestet, unter welchen Präparationsbedingungen der bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* am besten für die FTIR-Spektroskopie geeignet war. Dazu wurde das Protein nach unterschiedlichen Aufreinigungsstufen in der elektrochemischen Dünnschichtzelle untersucht. Für die Kristallisation durchläuft der Komplex üblicherweise drei Reinigungsschritte. Zwei Aufreinigungsschritte erfolgen über verschiedene Anionenaustausch-Chromatographiesäulen (siehe Kapitel 3.1.1.2) und als dritter Schritt schließt sich eine Gelfiltration mittels Größenausschluß-Chromatographie (*Pálsdóttir & Hunte 2002*) an. Die Vermessung des Proteins nach Durchlaufen des ersten Anionenaustausch-Schrittes brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da zu viele proteinfremde Bestandteile in der Probe vorhanden waren. Im Gegensatz dazu konnten für die Proben nach Durchlaufen der zweiten Chromatographie-Säule sehr stabile und reversible Spektren aufgenommen werden. Sie unterschieden sich bis auf einen leicht höheren Chinongehalt nicht von den Spektren der Proben nach dem dritten Filtrationsschritt (nicht gezeigt). Da die letzte Gelfiltration sehr zeitaufwändig ist und keinen nennenswerten Qualitätsgewinn bringt, wurden die Proben des Hefe- bc_1 -Komplexes jeweils nach dem zweiten Präparationsschritt vermessen. Diese Meßbedingungen entsprachen somit nicht exakt denen der Kristallisation. Die FTIR-Messungen wurden bei pH 6.9 durchgeführt, während die Kristallisation unter leicht veränderten Pufferbedingungen bei pH 8 erfolgte (*Hunte et al. 2000*).

Die bisher verwendete Modifizierung des Goldnetzes mit Cysteamin-Lösung erwies sich für den sehr großen Hefe- bc_1 -Komplex ebenso als ungeeignet wie die Modifizierung mit PATS-3, wie sie von Baymann (1995) für den bc_1 -Komplex aus *Rb. capsulatus* und von Tautu (2000) für das Hefe-Protein verwendet wurde. Eine gute Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Spektren konnte dagegen mit einer Mischung aus 2 mM Cysteamin- und 2 mM Mercaptopropionsäure-Lösung im Verhältnis 1:1 erzielt werden.

Als Mediatoren wurde die bereits von den *P. denitrificans*-Experimenten bekannte Mischung verwendet (Tabelle 3-1). Die Äquilibrierungszeiten für eine vollständige Redoxreaktion lagen mit 3-4 min leicht höher als für den bakteriellen Komplex, aber immer noch in einem akzeptablen Bereich für die FTIR-Spektroskopie. Teilreaktionen benötigten wesentliche längere Äquilibrierungszeiten, so daß häufig keine Differenzspektren aufgenommen werden konnten. Hier sind noch Anpassungen des Mediatorcocktails an die Proteinbedingungen notwendig. Da die Experimente am bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* sich im Rahmen dieser Arbeit auf die Gesamtreaktion des Proteins konzentrierten, wurden keine weiteren Optimierungen der Mediatoren vorgenommen.

4.1.2.3 FTIR-Differenzspektren des Wildtyps

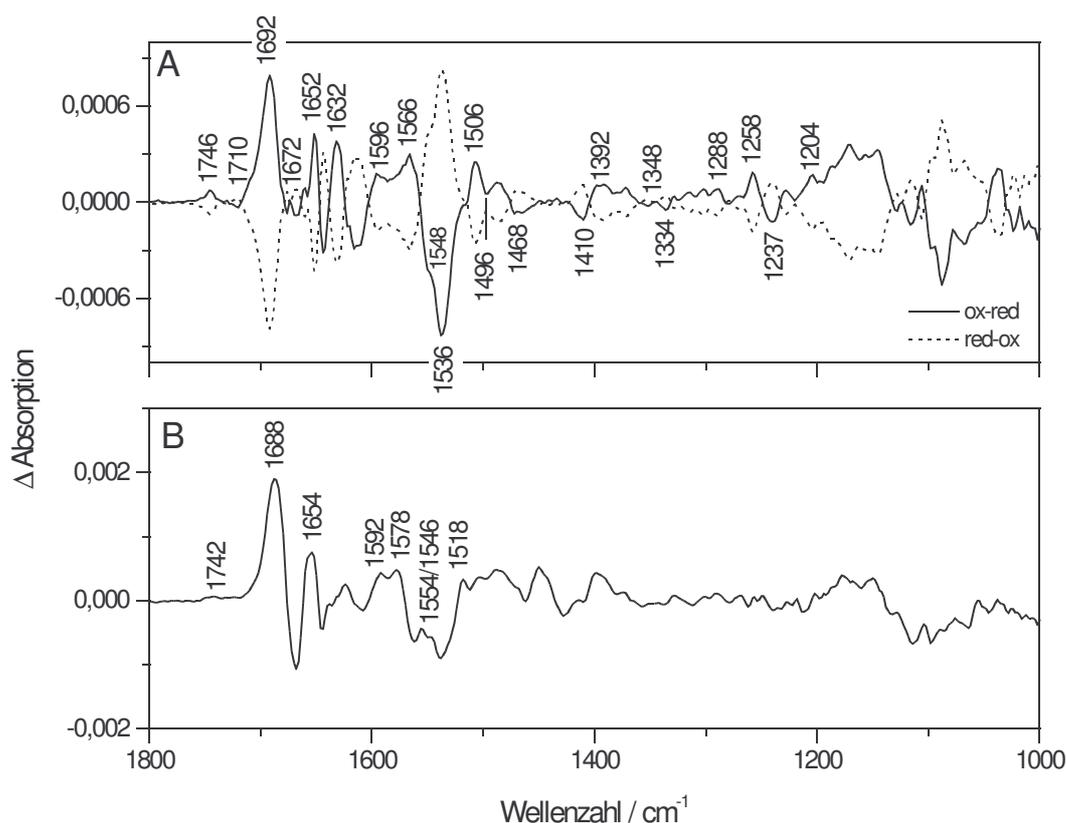


Abbildung 4-39

A: Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V (ox-minus-red, durchgezogene Linie) und zurück (red-minus-ox, gepunktete Linie) aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9) im Spektralbereich von 1800 bis 1000 cm^{-1} . B: FTIR-Differenzspektrum des Komplexes in D_2O -Puffer (pD 7).

Abb. 4-39A zeigt die elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V (vs. Ag/AgCl/3 M KCl) und zurück aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9) im Spektralbereich von 1800 bis 1000 cm^{-1} . Der vollständige Ablauf der Redoxreaktion läßt sich an der Spiegelsymmetrie der beiden Spektren ablesen. Im Folgenden werden für einen Großteil der auftretenden Banden Zuordnungen vorgeschlagen. Ein Vergleich mit den bereits ausführlich diskutierten Spektren des bc_1 -Komplexes aus *P. denitrificans* erfolgt später in Kapitel 4.3.

Der Amid I-Bereich des Differenzspektrums wird von drei positiven Banden bei 1692, 1652 und 1632 cm^{-1} dominiert. Sie spiegeln Schwingungen des Proteinrückgrates wider (vgl. Kapitel 4.1.2.2). Die Signale bei 1692 und 1632 cm^{-1} sind typisch für die β -Faltblattstruktur des Rieske-Proteins. Die α -Helices der Cytochrom *b*-Untereinheit tragen wahrscheinlich bei 1652 cm^{-1} bei. Überlagerungen mit Signalen anderer Proteinbestandteile sind bei allen drei Banden möglich und werden an entsprechender Stelle besprochen. Das negative Signal bei 1644 cm^{-1} wird ebenfalls Amid I-Schwingungen zugerechnet.

Die Signale der Amid II-Schwingung lassen sich aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber H/D-Austausch durch einen Vergleich mit dem FTIR-Differenzspektrum des Komplexes in D_2O -Puffer (Abb. 4-39B) relativ leicht identifizieren. Die Banden bei 1566 und 1506 cm^{-1} (Abb. 4-39A) sind nach H/D-Austausch vollständig verschwunden. Die Intensität des starken negativen Signals bei 1536 cm^{-1} nimmt durch Deuterierung der Probe deutlich ab. Bei der Entstehung dreier Banden sind Beiträge der Amid II-Schwingung somit sehr wahrscheinlich. Überlagerungen mit Signalen der Hämschwingungen und COO^- -Schwingungen deprotonierter Aminosäureseitenketten sind in diesem Bereich aber nicht auszuschließen.

Beiträge der Gerüstschwingungen werden, wie bei der Diskussion der Differenzspektren des *P. denitrificans*-Komplexes besprochen, in einem relativ ausgedehnten Spektralbereich erwartet. Zahlreiche Überlagerungen mit Beiträgen der Häme oder anderer Proteinbestandteile erschweren die Zuordnung zusätzlich.

Absorptionen des Häm-Porphyringerüsts sind aus Häm-Modellstudien bekannt (*Berthomieu et al. 1992, Hu et al. 1993*). Die CaCm -Schwingung (ν_{37}) wird zwischen 1655 und 1586 cm^{-1} erwartet. Hu et al. (1993) identifizierten diese Schwingung für *c*-Typ-Häme bei 1637 cm^{-1} . Denkbar ist ein Beitrag der ν_{37} -Schwingung des Häm c_1 zu der ausgeprägten positiven Bande

bei 1632 cm^{-1} in Abb. 4-39A. Das Signal bei 1596 cm^{-1} läßt sich möglicherweise der ν_{37} -Schwingung eines oder beider *b*-Häme zuordnen. In diesem Bereich werden allerdings auch Beiträge von Histidin-Ringschwingungen erwartet.

Die *CbCb*-Schwingung (ν_{38}) des Porphyringerüsts trägt in den bereits genannten Modellstudien zwischen 1604 und 1542 cm^{-1} bei. Als Kandidaten kommen hier die Signale bei 1556 und 1548 cm^{-1} in Frage. Sie erscheinen als Schulterstrukturen im Spektrum des nativen Proteins. Im D_2O -Spektrum lassen sich mit geringen Verschiebungen bei 1554 und 1546 cm^{-1} sehr deutlich identifizieren. Die Banden können sowohl von den *b*-Hämen als auch dem *c*-Häm stammen.

Zwischen 1390 und 1320 cm^{-1} wird die *CaN*-Schwingung (ν_{41}) erwartet. Im Spektrum in Abbildung 4-39A sind einige Banden zwischen 1334 und 1392 cm^{-1} Kandidaten für diese Schwingung. Zuordnungen sind hier schwierig, da auch Überlagerungen mit Beiträgen deprotonierter Hämpropionate oder auch den Vinylsubstituenten des Häms nicht auszuschließen sind.

Im FTIR-Differenzspektrum des *bc*₁-Komplexes aus *P. denitrificans* wurde die *CmH*-Deformationsschwingung (ν_{42}) bei 1262 cm^{-1} zugeordnet. Nach Modellstudien wird sie zwischen 1150 und 1268 cm^{-1} erwartet. Im Spektrum des Hefeproteins kann das Signal bei 1258 cm^{-1} teilweise auf diese Hämschwingung zurückgeführt werden. Möglicherweise beinhaltet dieses Signal aber auch Beiträge von Tyrosinschwingungen und/oder der Methoxygruppen des Chinons.

Beiträge der C=O-Streckschwingung protonierter Hämpropionate werden nach Analysen der Kristallstruktur erwartet (Hunte *et al.* 2000) und können anteilig der ausgeprägten Bande bei 1692 cm^{-1} zugeordnet werden. Die korrespondierenden Banden der antisymmetrischen Schwingung der deprotonierten Form sollten sich im Bereich von 1570 bis 1530 cm^{-1} , die der symmetrischen COO^- -Schwingung bei etwa 1400 cm^{-1} finden (Hellwig 1998, Behr *et al.* 1998). Die Signale bei 1566 , 1536 und 1410 cm^{-1} kommen hierfür in Frage.

Beiträge einzelner Aminosäureseitenketten können ebenfalls im Differenzspektrum des Hefe-*bc*₁-Komplexes in Abb. 4-39A identifiziert werden. Die Banden bei 1746 und 1710 cm^{-1} traten auch in den Spektren des *P. denitrificans* und des *Rb. capsulatus*-Komplexes auf. Sie wurden Schwingungen protonierter Glutaminsäure- oder Asparaginsäureseitenketten zugeordnet. Diese Zuordnung ist auch hier wahrscheinlich. Die Spektren des Komplexes nach

Deuterierung untermauern dies. Beide Signale sind um 4 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen verschoben.

Auch die Beiträge anderer Aminosäuren lassen sich vermuten. Typische scharfe Banden der protonierten bzw. deprotonierten Phenolgruppe des Tyrosins treten bei 1518 und 1496 cm^{-1} auf. Weitere aus Studien mit isolierten Aminosäuren (Venjaminov & Kalnin 1990) bekannte Tyr-Banden finden sich im Spektrum in der Differenzbande bei $1258/1237\text{ cm}^{-1}$. Diese Signale weisen auf Änderungen im Protonierungszustand mehrerer Tyrosine im Laufe der Redoxreaktion hin. Zahlreiche Kandidaten im Bereich der Chinonbindestellen sind hierfür im Gespräch (siehe nächstes Kapitel).

Das in D_2O -Puffer aufgenommene Differenzspektrum (Abb. 4-39B) läßt Schlüsse auf die Beteiligung von Asparagin, Glutamin und Argininseitenketten während der Redoxreaktion zu. Ihre Beiträge werden in H_2O -Puffer zwischen 1680 und 1670 bzw. 1630 und 1620 cm^{-1} erwartet. Entsprechende Signale finden sich bei 1672 , 1632 und 1620 cm^{-1} (Abb. 4-39A). Alle drei Aminosäuren reagieren empfindlich auf H/D-Austausch. Verschiebungen von 30 bis 60 cm^{-1} sind die Folge (vgl. Tabelle 2-3). Das D_2O -Spektrum zeigt starke Veränderungen in den in Frage kommenden Bereichen. Insbesondere die Bande bei 1672 cm^{-1} tritt nicht mehr auf. Dafür entstehen zahlreiche neue Signale zwischen 1658 und 1578 cm^{-1} . Dies ist der Bereich, in dem die durch Deuterierung verschobenen Banden erwartet werden können. Für alle Aminosäuren finden sich in der Nähe der redoxaktiven Zentren Kandidaten, die am Redoxzyklus des Proteins beteiligt sein können.

Die Banden des im Komplex gebundenen Chinons sind wesentlich geringer ausgeprägt als im *P. denitrificans*-Komplex. Dies deutete auf den geringeren Chinongehalt des Proteins hin. Die Kristallstruktur des Hefe-Komplexes weist nur ein gebundenes Chinon an der Q_i -Bindestelle auf (Hunte et al. 2000). Beiträge der $\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung dieses Chinons finden sich wahrscheinlich in den Banden bei 1652 und 1632 cm^{-1} . Die $\text{C}=\text{C}$ -Schwingung trägt möglicherweise zu einem sehr kleinen Signal bei 1612 cm^{-1} bei. Die Methoxygruppen-Schwingungen, die üblicherweise bei 1288 und 1262 cm^{-1} nachweisbar sind, lassen sich nur schwer identifizieren. Bei 1288 cm^{-1} zeigt sich eine dafür in Frage kommende Bande, während bei 1262 cm^{-1} kein Signal nachweisbar ist. Dafür findet sich eine starke Bande bei 1258 cm^{-1} , die sich aber aus der Überlagerung verschiedener Schwingungen ergibt. Beiträge des protonierten QH_2 lassen sich möglicherweise den negativen Banden bei 1496 , 1468 und 1410 cm^{-1} zuweisen.

Tabelle 4-9 enthält eine Zusammenfassung der eben getroffenen vorläufigen Zuordnungen.

Bandenposition in cm ⁻¹	Zuordnung		Untereinheit
1746 (+)	v (C=O)	Asp/Glu	
1710 (+)	v (C=O)	Asp/Glu	
1692 (+)	Amid I	β-Faltblatt	Rieske-Protein
	v (C=O)	Hämpropionate	Cyt <i>b</i> und/oder <i>c</i> ₁
1672 (+)	v (CN ₃ H ₅) ^{as}	Arg	
	v (C=O)	Gln, Asn	
1652 (+)	Amid I	α-helikale Strukturen	
	v (C=O)	Chinon	
1644 (-)	Amid I		
1632 (+)	Amid I	β-Faltblatt	Rieske-Protein
	v (C=O)	Chinon	
	v (CN ₃ H ₅) ^{sym}	Arg	
	v ₃₇	Häm	Cyt <i>c</i> ₁
1620 (+)	δ (NH ₂)	Gln, Asn	
1612 (+)	v (C=C)	Chinon	
1596 (+)	v ₃₇	Häm	Cyt <i>b</i>
1566 (+)	Amid II		
	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionate	Cyt <i>b</i> und/oder <i>c</i> ₁
1556 (+)	v ₃₈	Häm	Cyt <i>b</i> oder Cyt <i>c</i> ₁
1548 (+)	v ₃₈	Häm	Cyt <i>b</i> oder Cyt <i>c</i> ₁
1536 (-)	Amid II		
	v (COO ⁻) ^{as}	Asp/Glu	
	v (COO ⁻) ^{as}	Hämpropionate	Cyt <i>b</i> , <i>c</i> ₁
1518 (+)	v ₁₉ (CC) Ring	Tyr-OH	
1506 (+)	Amid II		
1496 (-)		Chinolring	
	v ₁₉ (CC) Ring	Tyr-O ⁻	
1468 (-)		Chinolring	
1410 (-)		Chinolring	
	v (COO ⁻) ^{sym}	Hämpropionate	Cyt <i>b</i> , <i>c</i> ₁
1288 (+)	v (C-O)	Methoxygruppen	
		Chinon	
1258 (+)	v ₄₂	Häm	Cyt <i>b</i> , <i>c</i> ₁
	v _{7a} (C-O ⁻)	Tyr	
1237 (-)	δ (COH)	Tyr	
1204 (+)		Chinon	
1152 (+)			
1090 (-)	P=O Phosphatpuffer		
1068 (-)			

Tabelle 4-9

Vorläufige Zuordnung der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzbanden des Gesamtspektrums des *bc*₁-Komplex aus *S. cerevisiae* für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer pH 6.9, (+) bezeichnet Banden, die im oxidierten Zustand des Proteins präsent sind, (-) kennzeichnet Banden des reduzierten Zustands

4.1.2.4 Bindung von Inhibitoren

Der Schwerpunkt der Experimente mit dem bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* lag auf dem Studium des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf die FTIR-Differenzspektren. Als Vertreter der Q_i -Inhibitoren wurden Antimycin A und eine als Strukturanalogon beschriebene Substanz, UK-2, untersucht. Als Q_o -Inhibitoren kamen Stigmatellin in herkömmlicher Form, mit veränderter Seitenkette und isotonenmarkiert zum Einsatz. Desweiteren konnten Studien mit HHDBT aus der Gruppe der Hydroxychinone sowie einem von MOA-Stilben abgeleiteten Inhibitor (Methoxyiminoacetamid \equiv MIA) durchgeführt werden.

Bindung von Antimycin A

Abb. 4-40 zeigt das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des Hefe- bc_1 -Komplexes nach Inhibierung mit Antimycin A. Die Inhibitorkonzentration dieser Probe war aufgrund unterschiedlicher Vorgehensweisen während der Inhibierung wesentlich höher als die der bakteriellen Probe (Kapitel 3.3.2 und 4.1.2.6). Dies zeigt sich an den deutlicher ausgeprägten Signalen der C=O-Schwingungen des Antimycins A bei 1764, 1736 und 1666 cm^{-1} . Im farbig unterlegten Bereich der Abbildung finden sich wahrscheinlich zusätzliche Inhibitorbanden. Ringschwingungen des Salicylsäuresubstituenten sowie Banden der Deformationsschwingungen von CH_2 - und CH_3 -Gruppen der Seitenketten des Dilactonrings oder der OH-Gruppe des Salicyläurerings wären möglich (Colthup et al. 1990).

Die stark ausgeprägte Differenzbande bei 1752/1736 cm^{-1} zeigt die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen einer C=O-Gruppe des Antimycins und dem Protein. Die Position der Bande im oxidierten Zustand verschiebt sich im Vergleich zum Lösungsmittelspektrum des Inhibitors um 6 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen. Dieser Effekt wurde schon für den *P. denitrificans*-Komplex beobachtet, wenngleich die Intensität des Signals aufgrund der niedrigeren Inhibitorkonzentration dort wesentlich geringer war. Eine genaue Zuordnung zu einer bestimmten C=O-Schwingung ist bisher nicht möglich. Es wird vermutet, daß die C=O-Gruppe der Formylaminoseitenkette des Salicylsäurerings für die Entstehung der beschriebenen Bande verantwortlich ist.

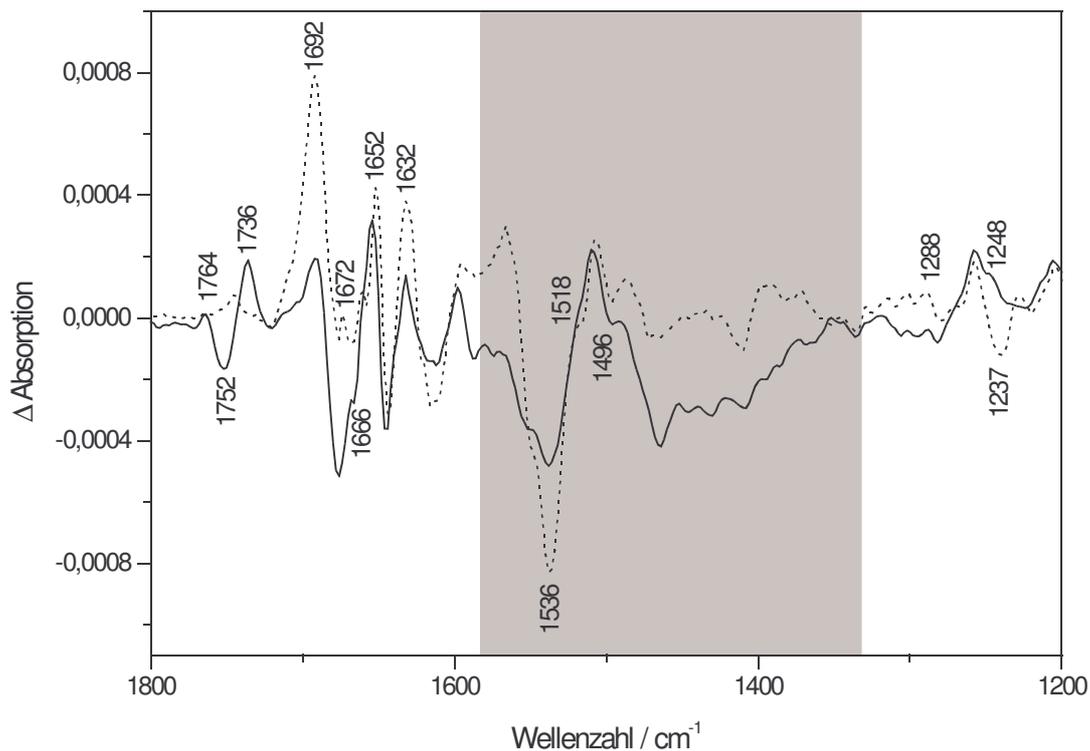


Abbildung 4-40

Elektrochemisch induziertes *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit Antimycin A für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V (durchgezogene Linie) aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Gepunktete Linie: Spektrum des nativen Komplexes.

Auswirkungen des Antimycins im Protein lassen sich sowohl in der Amid I als auch der Amid II-Bande finden. Im Amid I-Bereich kann die Abnahme der Signalintensität einiger Banden beobachtet werden. Eine Bande bei 1672 cm^{-1} im Wildtypspektrum ist nach der Inhibierung vollständig verschwunden. Dieser Veränderungen werden im Folgenden diskutiert. Im Bereich der Amid II-Bande zeigen sich starke Veränderungen der Signalintensität, die zum größten Teil Schwingungen des Antimycins zugeschrieben werden.

Das Signal bei 1692 cm^{-1} wurde zuvor Beiträgen der Amid I-Schwingung des Rieske-Proteins sowie protonierten Hämpropionaten zugeordnet. Veränderungen in der Sekundärstruktur des Rieske-Proteins sind unwahrscheinlich und wurden in Röntgenkristallstrukturen inhibierter bc_1 -Komplexe nicht gefunden (Kim *et al.* 1998). Die Nähe der Inhibitorbindestelle zum Häm b_H macht jedoch eine Veränderung im Protonierungszustand seiner Hämpropionate infolge der Inhibierung möglich. Starke Veränderungen der Signalintensität bei 1566 und 1536 cm^{-1} , die zuvor ebenfalls Beiträgen der Hämpropionate zugeordnet wurden, unterstützen

die Zuordnung zusätzlich. In Abb. 4-41A ist zur Veranschaulichung die Q_i -Bindestelle mit dem gebundenen UQ6 dargestellt. Die Antimycin-Bindetasche scheint nicht identisch mit der des Chinons zu sein, zeigt aber starke Überlappungen, so daß das Chinon verdrängt wird (Kim *et al.* 1998). In der Kristallstruktur des bc_1 -Komplexes aus Hühnerherz-Mitochondrien (Zhang *et al.* 1998) wurde der Salicylsäurering des Inhibitors in ähnlicher Position wie der Ring des Chinons gefunden. Den betreffenden Ausschnitt aus dieser Struktur zeigt Abb. 4-41B. Der Verlust des Chinons zeigt sich im Spektrum in Abb. 4-40 in der Abnahme der Intensität der Banden bei 1652, 1632 und 1288 cm^{-1} .

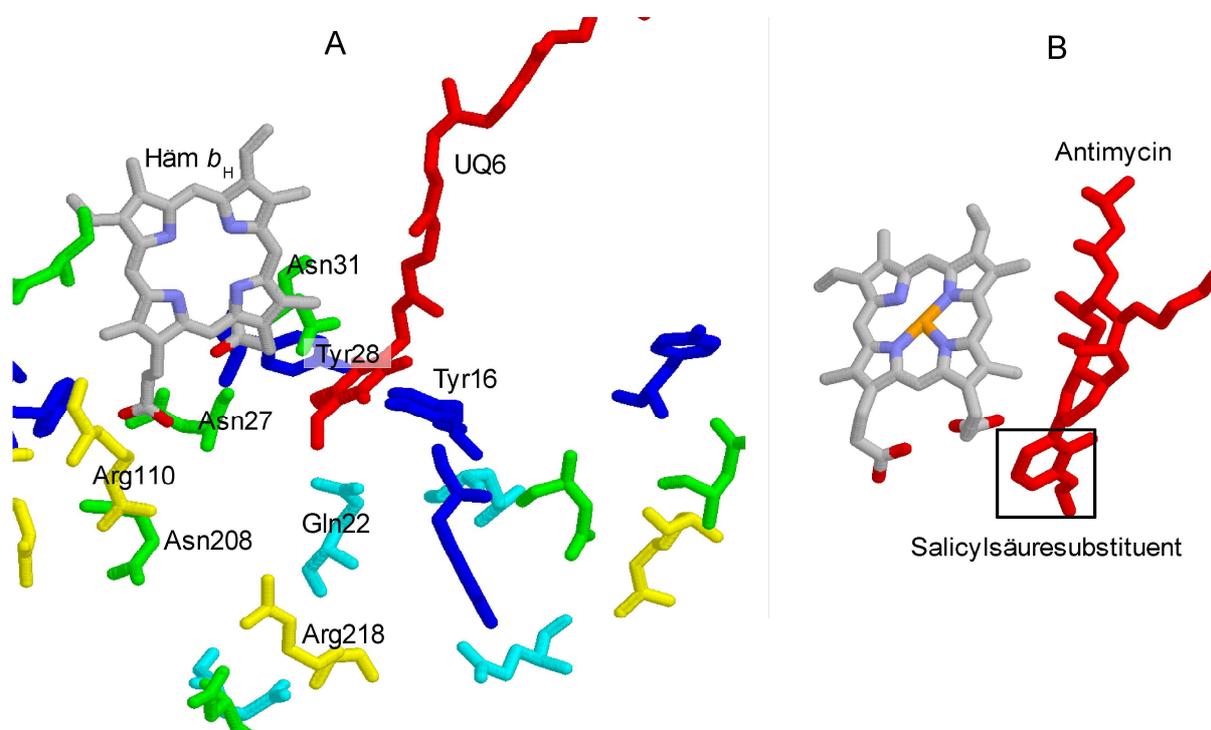


Abbildung 4-41

A: Strukturmodell der Häm b_H -Umgebung und der Q_i -Bindestelle des Hefe- bc_1 -Komplexes mit gebundenem UQ6 und (PDB-Eintrag: 1EZV, Hunte *et al.* 2000). B: Bindung von Antimycin A in Häm b_H -Nähe im Hühnerherz- bc_1 -Komplex (PDB-Eintrag: 3BCC, Zhang *et al.* 1998). Für die Darstellung der Aminosäuren wurden folgende Farbkodierung gewählt: Tyr-blau, Asn-grün, Arg-gelb, Gln-cyan.

Die Bande bei 1632 cm^{-1} setzt sich aus den Beiträgen mehrerer Proteinbestandteile zusammen. Verbunden mit dem Verschwinden des Signals bei 1672 cm^{-1} und einer kleinen Bande bei 1620 cm^{-1} kann die Beeinflussung von Arginin-, Asparagin- und/oder Glutaminsäureseitenketten vermutet werden. Dies wurde schon für den *P. denitrificans*- bc_1 -Komplex diskutiert (Kapitel 4.1.2.6). In Abb. 4-41A ist die Umgebung des Häm b_H im

Bereich der vermuteten Antimycinbindestelle dargestellt. Es finden sich zahlreiche in Frage kommende Aminosäuren. Gln22 und Asn31 sind Bestandteil der Bindetasche des Ubichinons (*Hunte et al. 2000*). Sie sind wahrscheinlich direkt von der Bindung des Antimycins betroffen. Für Asn208 wird eine Beteiligung am Protonenleitsystem der Q_i-Seite diskutiert (*Brasseur et al. 1996, Hunte et al. 2003*). Im Bereich zwischen Arg218, Asn208, dem Häm und der Kopfgruppe des Chinons befindet sich in der Röntgenkristallstruktur ein Netz von Wassermolekülen. Über dieses Netz ist eine direkte Protonenabgabe von Arg218 zum Chinon möglich, das dadurch reduziert werden kann (*Hunte et al. 2003*).

Im Wildtypspektrum des Hefe-*bc*₁-Komplexes konnten charakteristische Tyrosinschwingungen identifiziert werden. Diese Banden werden durch die Antimycin-Inhibierung beeinflusst. Eine vorher im oxidierten Zustand deutlich ausgeprägte Schulterstruktur bei 1518 cm⁻¹, die der Schwingung des protonierten Tyr-OH entspricht, ist kaum noch vorhanden. Das Signal der deprotonierten Form bei 1496 cm⁻¹ wird intensiver. Das Signal der δ(COH)-Schwingung bei 1237 cm⁻¹ verschwindet vollständig. Dafür nimmt die Intensität der Bande bei 1258 cm⁻¹ leicht zu. Diese Veränderungen lassen auf die Deprotonierung von Tyrosinen schließen. Eine zusätzliche Bande entsteht bei 1248 cm⁻¹. Sie resultiert möglicherweise aus der ν_{7a}(C-O)-Schwingung eines Tyrosins, dessen Position oder Umgebung sich verändert hat. Die genannte Schwingung ist abhängig vom Grad der Wasserstoffverbrückung der Aminosäure. Nicht auszuschließen ist auch ein Beitrag des Antimycins selbst, da im Lösungsmittelspektrum eine Bande bei 1262 cm⁻¹ aufweist, die sich durch Bindung im Protein verschieben könnte

Mögliche Kandidaten für die erwähnten Signale finden sich zahlreich in der Häm *b*_H-Umgebung. Eine Auswahl ist in Abb. 4-41A dargestellt. Tyr28 liegt in unmittelbarer Nähe des Asp229, das in der Wildtypstruktur mit dem Chinon in Kontakt ist (*Hunte et al. 2000*). Über Tyr16 ist nicht viel bekannt. Es befindet sich in Nachbarschaft des zweiten Chinonbindeparters, His202. Möglicherweise wird es infolge der Inhibierung durch Antimycin A angesprochen.

Bindung von UK-2

UK-2 ist ein Antibiotikum, das im Mycel von *Streptomyces*-Stämmen gefunden wurde (Ueki et al. 1996, Hanafi et al. 1996, Ueki et al. 2000). Es wird als Strukturverwandter des Antimycins A beschrieben. Abb. 4-42 zeigt die chemische Struktur von UK-2. Die Unterschiede zum Antimycin sind farblich hervorgehoben. In beiden Komponenten gleich ist der 9er-Dilactonring. Der Salicylsäuresubstituent des Antimycins A ist durch einen Pyridinring ersetzt, anstelle der Formylaminogruppe steht eine Methoxygruppe. Eine der Seitenketten des Dilactonrings ist verändert und durch eine Phenylgruppe ausgetauscht. Die Veränderungen führen zu einer geringeren Cytotoxizität im Vergleich zum Antimycin A. Die Potenz als Inhibitor scheint davon nicht unmittelbar beeinträchtigt zu sein. In Hefe-Mitochondrien war die inhibitorische Wirkung des UK-2 ähnlich der des Antimycins. Anhand der Analogien zum Antimycin wird vermutet, daß UK-2 im Bereich der Q_I -Bindestelle wirkt, aber auf eine andere Art. Diese Frage ist noch nicht vollständig geklärt (Takimoto et al. 1999, Ueki et al. 2000).

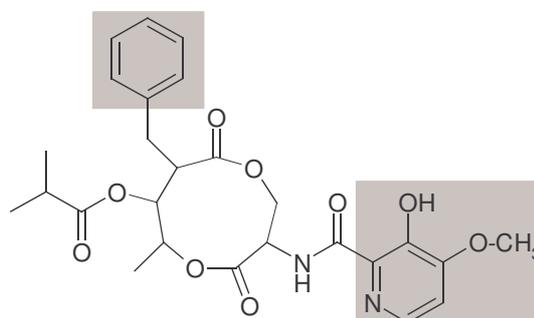


Abbildung 4-42

Chemische Struktur von UK-2 (Ueki et al. 1996). Veränderungen zur Antimycin A-Struktur sind farblich markiert.

Ueki et al. (2000) beschreiben eine Rotverschiebung der α -Bande der reduzierten b -Häme. Dies konnte im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nicht beobachtet werden. Die Positionen der Banden des c -Häms und der b -Häme waren im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Dafür zeigte sich an den VIS-Differenzspektren eine deutlich verlangsamte Redoxreaktion des Häm b_H . Die Äquilibrierungszeit

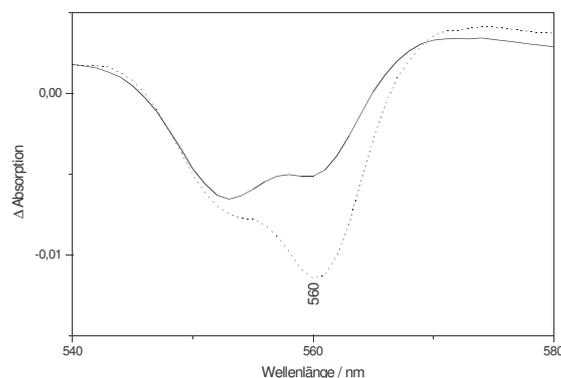


Abbildung 4-43

Verzögerte Ausprägung der α -Bande des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* nach Inhibierung mit UK-2. Durchgezogene Linie :nach 5 min, gepunktete Linie: nach 30 min.

war im Vergleich zu den anderen Inhibitor-Experimenten etwa 7 mal höher. Eine vollständige Ausprägung der α -Bande (vgl. Abb. 4-43) konnte erst nach 30 min erreicht werden. Die Proben waren wesentlich instabiler als üblicherweise vom bc_1 -Komplex aus *S. cerevisiae* bekannt. Denaturierungseffekte wurden schon nach kurzer Zeit beobachtet. Dies wirkt sich auch auf die Qualität des FTIR-Differenzspektrums aus. Es ist an einigen Stellen stark verrauscht, da zu seiner Berechnung nur ein Drittel der sonst üblichen Meßzeit verwendet werden konnte (vgl. Kapitel 3.4). Abb. 4-44 zeigt das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des Hefe- bc_1 -Komplexes nach Inhibierung mit UK-2.

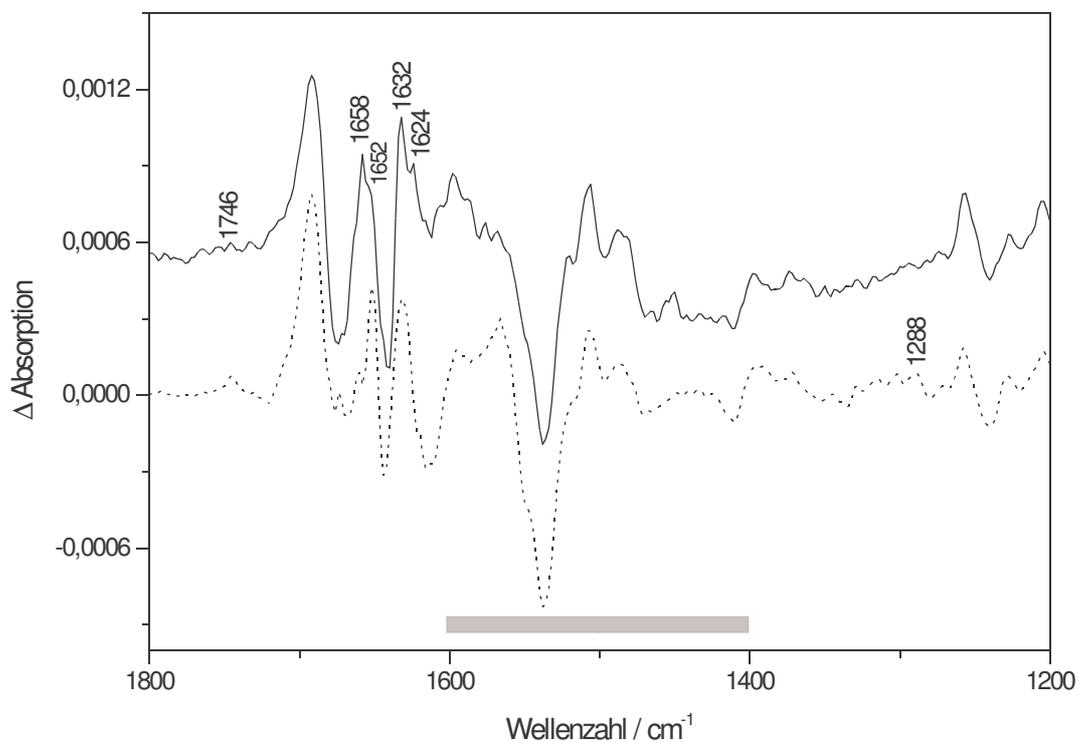


Abbildung 4-44

Elektrochemisch induziertes *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit UK-2 für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V (durchgezogene Linie) aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Gepunktete Linie: Spektrum des nativen Komplexes.

Veränderungen im Vergleich zum Wildtypspektrum lassen sich bei 1746, 1658, 1632, 1624 sowie zwischen 1600 und 1400 cm^{-1} (grau markiert) finden. Sie können den Einfluß des Inhibitors auf das Protein beschreiben, aber auch von Signalen des UK-2 selbst stammen. Von diesem ist bisher kein IR-Differenzspektrum bekannt. Aus der Betrachtung der chemischen Struktur sind Beiträge des Pyridinrings und dessen OH- bzw. OCH_3 -Gruppe, des Phenylrings,

der C=O-Bindungen sowie der Amidbindung zwischen 9-Ring-Struktur und Pyridinring denkbar. Banden der beiden Ringe könnten zwischen 1600 und 1400 cm^{-1} erwartet werden. Die Deformationsschwingung der OH-Gruppe absorbiert im Bereich um 1400 cm^{-1} , während die Kombination aus CN-Streck- und NH-Deformationsschwingung der Amidbindung bei etwa 1550 cm^{-1} auftreten kann (*Colthup et al. 1990*).

Die C=O-Streckschwingungen könnten sich im Bereich der Amid I-Bande oberhalb 1650 cm^{-1} zeigen. Welche Bestandteile tatsächlich beitragen und wo, muß in zukünftigen Experimenten abgeklärt werden.

Da die Studien mit diesem Inhibitor noch nicht abgeschlossen sind, sollen zwei Details im FTIR-Differenzspektrum kurz beschrieben werden. In Abb. 4-44 zeigt sich die Abnahme der Signalintensität einer Banden bei 1746 cm^{-1} , die im Verlauf dieses Kapitels in Verbindung mit der Protonierung einer Glu/Asp-Seitenkette der Q_o -Bindestelle diskutiert wird. Die Beeinflussung dieses Signals würde bedeuten, daß UK-2 nicht ausschließlich im Bereich der Q_i -Bindestelle wirkt.

Ein zweiter Punkt ist die Frage, ob das Chinon durch die Inhibierung aus dem Protein verdrängt wurde. Diese Frage läßt sich nicht klar beantworten. Eine Abnahme der Bandenintensität im Bereich der C=O-Schwingung bei 1652 und 1632 cm^{-1} kann nicht unmittelbar gefunden werden. Dafür ist ein zusätzliches Signal bei 1658 cm^{-1} zu finden. Die Bande bei 1288 cm^{-1} , die den Methoxygruppen zugeordnet wurde, ist dagegen verschoben und verkleinert. Burie et al. (1997) und Nonella et al. (1996) beschreiben, daß die Orientierung der Methoxygruppen die spektroskopischen Eigenschaften des Chinons beeinflussen. Sowohl die Intensität als auch die Position der C=O-Banden können sich bei veränderter Ausrichtung der beiden Methoxygruppen verändern. Dies könnte darauf hinweisen, daß das Chinon noch im Protein gebunden ist, dabei seine Position und Bindung aber verändert wurde.

Bindung von MIA

Methoxyiminoacetamid (MIA) ist ein bisher in der Literatur nicht näher beschriebener Inhibitor. Es existieren ähnliche Substanzen, wie das in der Landwirtschaft eingesetzte Fungizid SSF-129 (Shinogi Co., Ltd. Japan), von dem MIA abgeleitet ist (H. Miyoshi, Universität Kyoto, persönliche Mitteilung). Vom Fungizid ist bekannt, daß es als bc_1 -Inhibitor

wirkt (Tamura *et al.* 1999). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft des MIA zum MOA-Stilben soll es zur Gruppe der Q_o -Inhibitoren zählen. Seine Eigenschaften sind aber noch weitestgehend unbekannt. Es existieren bisher keine Angaben in der Literatur. In Abb. 4-45 ist seine sowie die Struktur des Fungizids und der Referenzsubstanz MOA-Stilben dargestellt.

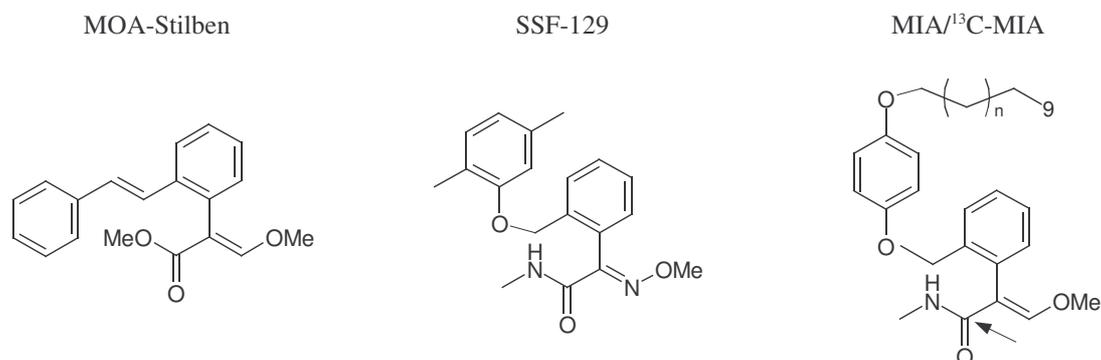


Abbildung 4-45

Chemische Strukturen des Q_o -Inhibitors MOA-Stilben, des Fungizids SSF-129 und Methoxyiminoacetamid (MIA). Der Pfeil zeigt die Position der Isotopenmarkierung im ^{13}C -MIA

Neben MIA stand eine isotopenmarkierte Version dieser Substanz zur Verfügung, bei der das in Abb. 4-45 markierte ^{12}C -Atom durch ein ^{13}C -Atom ersetzt wurde.

Im Gegensatz zur häufig beschriebenen Rotverschiebung im Bereich der α -Bande nach Bindung von Inhibitoren, konnte dies für die elektrochemisch induzierten Differenzspektren des MIA nicht gefunden werden. Die Bindung des Inhibitors beeinflusste sowohl die Position des c - als auch des b -Peaks der α -Bande. Beide waren um 1 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben. Die spektroskopische Trennung der

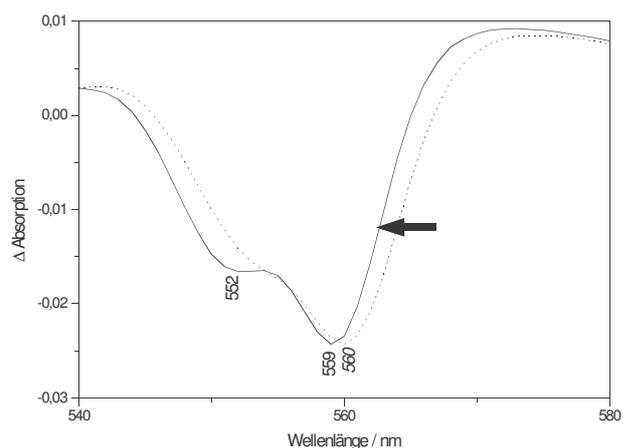


Abbildung 4-46

Beeinflussung der α -Bande des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* nach Bindung von MIA (durchgezogene Linie). Die gepunktete Linie zeigt das native Protein. Die Spektren wurden aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9).

der Hämbeiträge ist ausgeprägter als beim Wildtypspektrum. Die Häm *c*-Bande scheint verbreitert zu sein. Abb. 4-46 verdeutlicht dies. Die Isotopenmarkierung zeigt keinen Einfluß auf das VIS-Differenzspektrum. Es entspricht dem der nicht markierten MIA-Variante (Spektrum nicht gezeigt).

Bei der Aufnahme der elektrochemisch induzierten Differenzspektren sowohl des MIA als auch der isotopenmarkierten Variante fielen sehr kurze Äquilibrierungszeiten auf. Sie lagen mit etwa 2 min unter denen des Wildtyps. Der Grund dafür muß noch näher untersucht werden.

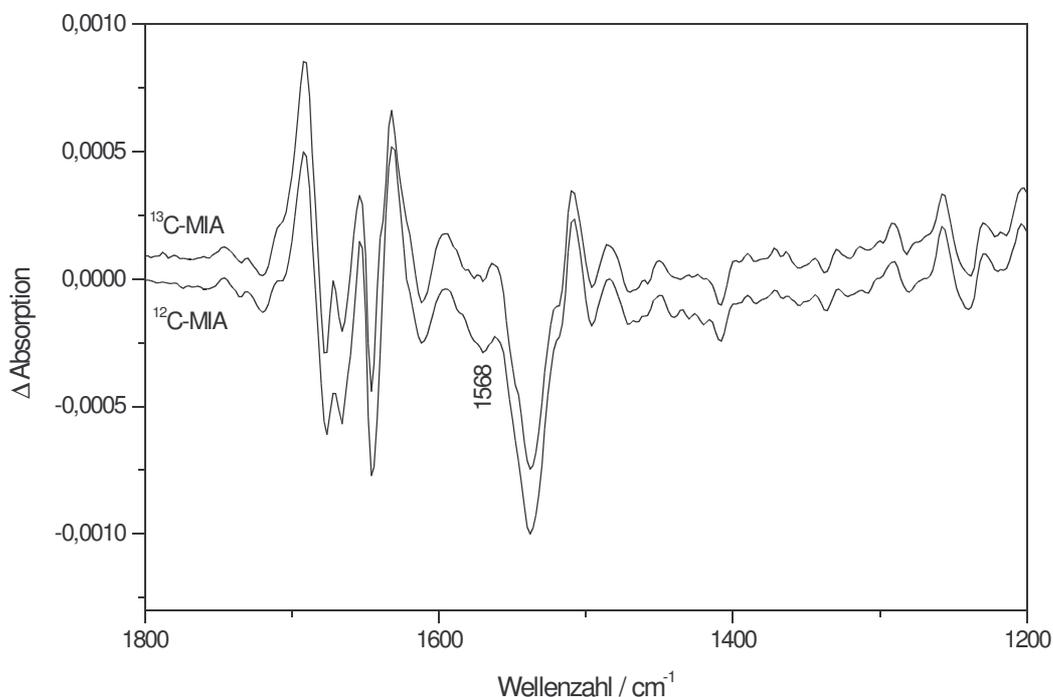


Abbildung 4-47

Elektrochemisch induziertes *ox-minus-red*-FTIR-Differenzspektrum des *bc*₁-Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit MIA (unten) und ¹³C-isotopenmarkierten MIA (oben) für einen Potentialschritt von -0.5 nach +0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9).

Abb. 4-47 zeigt die Differenzspektren beider MIA-Varianten für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V. Beide Spektren unterscheiden sich kaum voneinander. Geringe Veränderungen im Bereich von 1568 cm⁻¹ lassen sich direkt auf Absorptionsunterschiede beider Substanzen zurückführen. Die elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren beider Inhibitoren in Lösungsmittel finden sich im Anhang 7.2. Sie zeigen Signale geringer Intensitäten bei 1710, 1672 und 1658 cm⁻¹. Eine breite negative Bande um 1568 cm⁻¹ verändert ihre Struktur durch

die Isotopenmarkierung, was sich auch auf die Proteinspektren auswirkt. Sie könnte Beiträge der CNH bzw. ^{13}CNH -Schwingung beinhalten. Andere in den Lösungsmittelspektren sichtbare Banden finden sich nicht in Abb. 4-47. Das Fehlen größerer Bandenverschiebungen oberhalb 1700 cm^{-1} läßt darauf schließen, daß die durch isotopenmarkierte C=O-Gruppe des MIA nicht direkt in die Bindung des Inhibitors im Protein involviert ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß einer oder beide Ringe dafür verantwortlich sind.

Im Folgenden soll noch kurz auf die Veränderungen im Spektrum des inhibierten Enzyms im Vergleich zum Wildtyp eingegangen werden. Die Beschreibungen werden anhand der nicht markierten Substanz gegeben. Durch den geringen Einfluß der Isotopenmarkierung gelten sie jedoch auch für beide Spektren in Abb. 4-47. In Abb. 4-48 ist das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des MIA-inhibierten bc_1 -Komplexes im Vergleich zum Wildtypspektrum dargestellt.

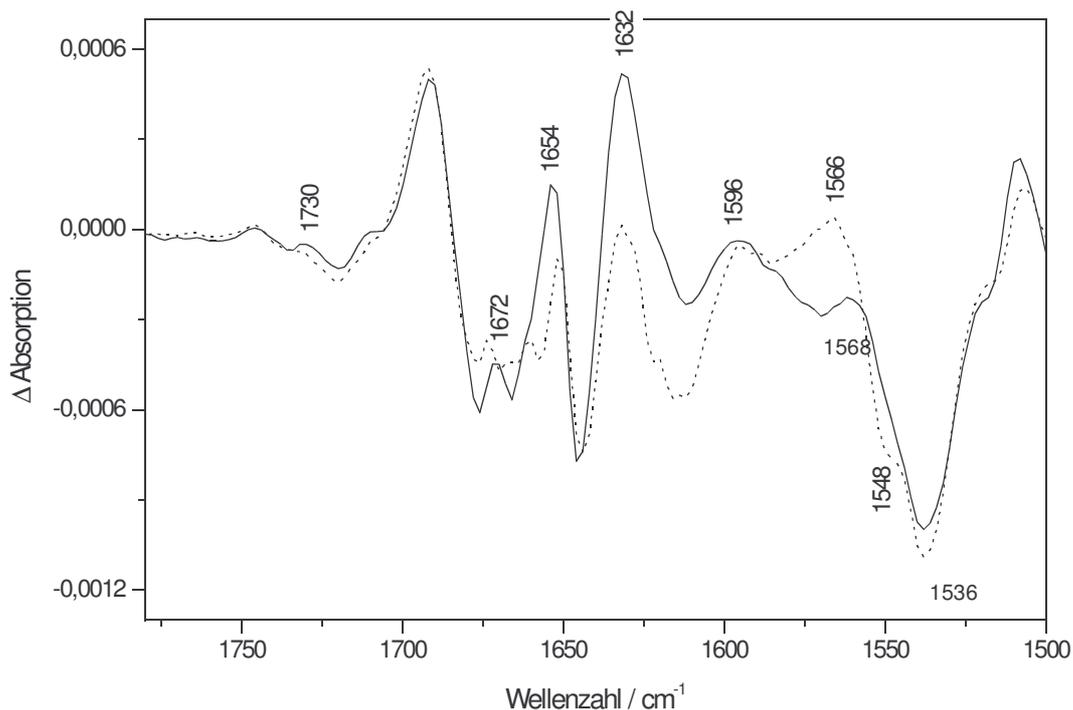


Abbildung 4-48

Elektrochemisch induziertes ox-minus-red-FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit MIA einen Potentialschritt von -0.5 nach $+0.5\text{ V}$ (durchgezogene Linie) aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Die gepunktete Linie zeigt das Spektrum des nativen Komplexes.

Die Unterschiede im Amid I-Bereich bei 1672 und 1654 cm^{-1} resultieren teilweise vom Inhibitor selbst. Die Verschiebung des im Lösungsmittelspektrum bei 1658 cm^{-1} vorhandenen Signals nach 1654 cm^{-1} zeigt die Bindung des MIA im Protein. Veränderungen in der Sekundärstruktur des Proteins sind ebenfalls möglich. Die Position der beiden Banden weist auf konformelle Variationen von α -helikalen bzw. Schleifenstrukturen hin. Erstere könnten von der Cytochrom *b*-Untereinheit herrühren. Bezieht man die Beeinflussung der α -Bande des Häm c_1 im VIS-Differenzspektrum (Abb. 4-46) in die Betrachtung ein, könnten durch die Inhibitorbindung Veränderungen in Schleifenstrukturen der Cytochrom c_1 -Untereinheit hervorgerufen worden sein.

Starker Veränderungen gibt es zwischen 1632 und 1540 cm^{-1} . Dieser Bereich umfaßt die Banden der Amid II-Schwingung sowie Absorptionen der Hämschwingungen ν_{37} und ν_{38} und deprotonierter Hämpropionate. Mögliche Beiträge des MIA bei 1658 cm^{-1} wurden bereits diskutiert. Die Protonierung von Hämpropionaten, die sich in einer Abnahme der Banden bei 1566 und 1536 cm^{-1} äußern würde, läßt sich weitestgehend ausschließen, da die dadurch erwartete Zunahme der Bande bei 1692 cm^{-1} nicht beobachtet werden kann. Eine Beeinflussung der ν_{37} -Hämschwingung, sichtbar an Veränderungen der Signale bei 1632 und 1596 cm^{-1} sowie der ν_{38} -Schwingung bei 1548 cm^{-1} ist jedoch wahrscheinlich.

Im Spektrum in Ab. 4-48 liefert eine Bande bei 1730 cm^{-1} Hinweise auf die Protonierung einer Glu/Asp-Seitenkette infolge der Inhibierung. Die korrespondierende antisymmetrische COO^- -Schwingung trägt vermutlich bei 1536 cm^{-1} bei. Die Identifizierung möglicher Kandidaten muß Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

Bindung von Stigmatellin und HHDBT

Stigmatellin und HHDBT (ein Vertreter des HBDT) sind Q_o -Inhibitoren der Klassen II und III (Kapitel 2.1.4.2), deren Bindung zu starken Strukturveränderungen im Protein führt. Das Rieske-Protein wird in der sogenannten *b*-Position nahe der Cytochrom *b*-Untereinheit fixiert. Es wird diskutiert, daß sie unterschiedliche Zwischenstufen des Semichinons während der Chinoloxidation repräsentieren (Crofts *et al.* 1999a, Hunte *et al.* 2000, Pálsdóttir *et al.* 2003). Stigmatellin steht für das einfach protonierte Semichinon (vgl. Abb. 2-3 Mitte), HHDBT in

seiner ionisierten Form steht für ein vollständig deprotoniertes Semichinon-Anion als Vorstufe des oxidierten Chinons. Abb. 4-49 zeigt die Strukturen beider Inhibitoren sowie die funktionellen Gruppen, über die die Bindung an das Protein erfolgt. Sie sind aus den Kristallstrukturen des Proteins bekannt, die sowohl mit gebundenem Stigmatellin als auch HHBDT existieren (*Hunte et al. 2000, Pálsdóttir et al. 2003*).

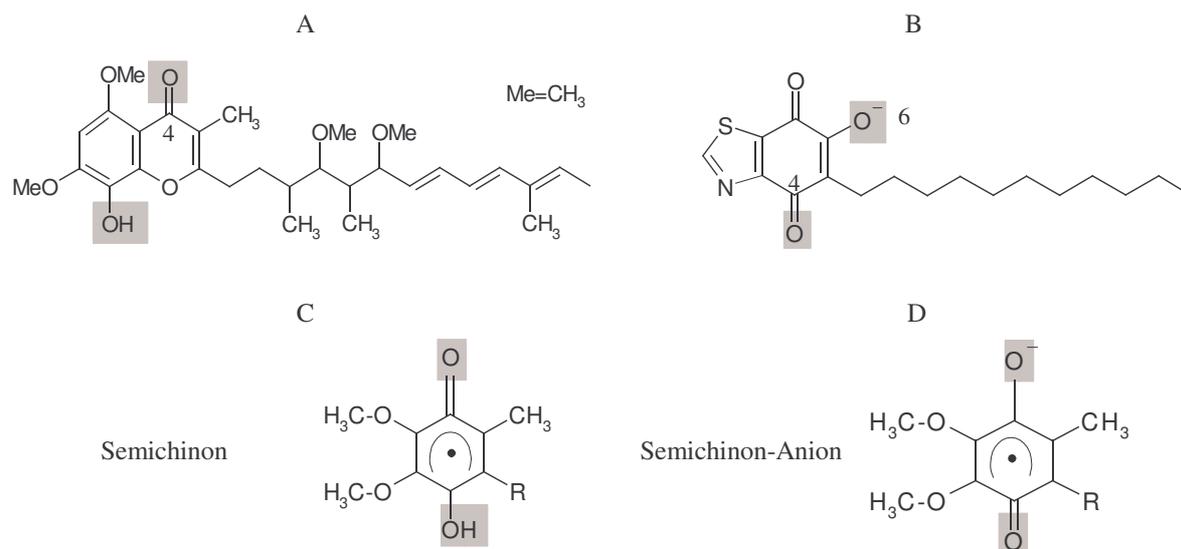


Abbildung 4-49

Strukturen der Q_o-Inhibitoren Stigmatellin (A) und HHBDT, ionisiert (B), die unterschiedliche Zustände des Semichinons (C und D) repräsentieren.

Die Bindestellen von Stigmatellin und HHBDT sind aus den Kristallstrukturen bekannt (*Hunte et al. 2000, Pálsdóttir et al. 2003*). Die für die FTIR-Experimente entscheidenden sollen hier kurz erwähnt werden. Die Ringe beider Inhibitoren binden im distalen Bereich der zweigeteilten Q_o-Bindetasche, wobei HHBDT tiefer in die Tasche reicht. Damit verbunden ist eine Ausdehnung der Tasche, die sich durch Verschiebungen des *ef*-Loops zeigt. Von besonderer Bedeutung sind die Aminosäuren Glu272 und His181. Das Histidin kann in beiden Fällen eine Wasserstoffbrücke zum jeweiligen Inhibitor ausbilden. In der Stigmatellin-Struktur besteht sie zur C4=O-Gruppe, in der HHBDT-Struktur zum O6-Atom (Bezeichnungen siehe Abb. 4-49).

Für Glu272 wird eine direkte Beteiligung am Protonentransfer vom Ubichinol zu einem Propionat des Häm *b_L* diskutiert (*Hunte et al. 2000*). Die beiden Kristallstrukturen des Hefe-*bc₁*-Komplexes zeigen deutliche Veränderungen in der Orientierung dieser Aminosäure. In der Struktur des Stigmatellin-inhibierten Proteins ist die Hydroxylgruppe über eine

Wasserstoffbrücke mit der wahrscheinlich deprotonierten Seitenkette des Glu272 verbunden. Die Seitenkette zeigt dabei in die Q_o -Bindestelle hinein. In der HHDBT-Struktur (Pálsdóttir *et al.* 2003) ist Glu272 nicht in die Bindung des Inhibitors involviert. Die Seitenkette der hier wahrscheinlich protonierten Aminosäure befindet sich in einer anderen Position als in der Stigmatellin-Struktur und zeigt aus der Bindetasche heraus. Über ein Wassermolekül ist die Aminosäure dabei direkt mit dem Propionat des Häm b_L verbunden, so daß ein Protonentransfer dorthin stattfinden könnte. Der Unterschied im Protonierungszustand des Glu272 sollte sich in den FTIR-Differenzspektren nachweisen lassen. Die Beteiligung weiterer Aminosäuren wird im Zusammenhang mit den Differenzspektren diskutiert.

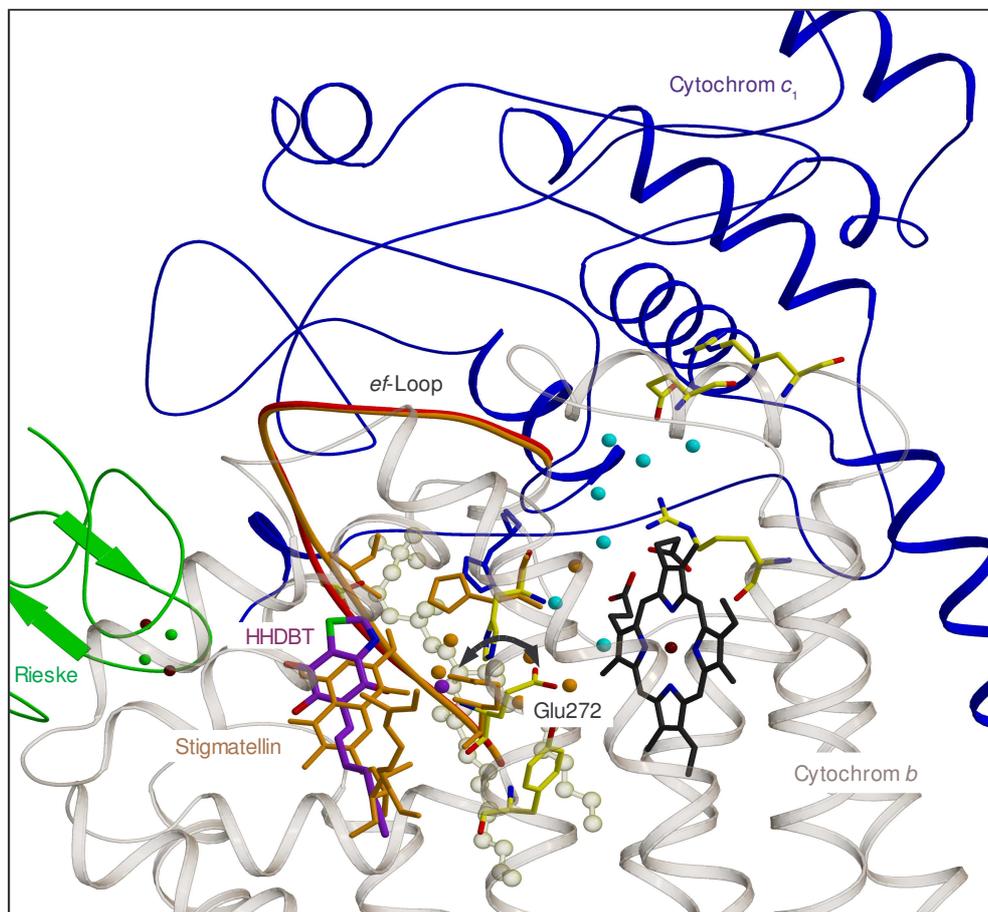


Abbildung 4-50

Q_o -Bindestelle des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* mit gebundenen Inhibitoren und daraus resultierenden Strukturveränderungen (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Pálsdóttir, MPI für Biophysik).

Gelb und violett: HHDBT, orange-braun: Stigmatellin. Die Umorientierung des Glu272 ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Abb. 4-50 illustriert die Bindung von Stigmatellin und HHDBT in der Q_o -Bindestelle. Darstellungen in gelb und violett entsprechen der HHDBT-Struktur, orange-braune Darstellungen der Stigmatellin-Struktur. Die Umorganisation der Aminosäure Glu272 ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Hildur Pálsdóttir (MPI für Biophysik Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

FTIR-Differenzspektren des mit Stigmatellin inhibierten Proteins

Ausgangspunkt der Experimente war die Inhibierung des Proteins mit einer Stigmatellinkonzentration, wie sie unter Kristallisationsbedingungen vorliegt. Dabei liegt der Inhibitor im Überschuß vor. Dies ließ sich auch im elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektrum nachweisen, das in Abb. 4-51 dargestellt ist. Es zeigt die bereits bekannten Banden des ungebundenen Stigmatellins (vgl. Abb. 4-32). Durch die Dominanz des Inhibitors lassen sich über Veränderungen im Komplex in diesem Spektrum keine Aussagen treffen.

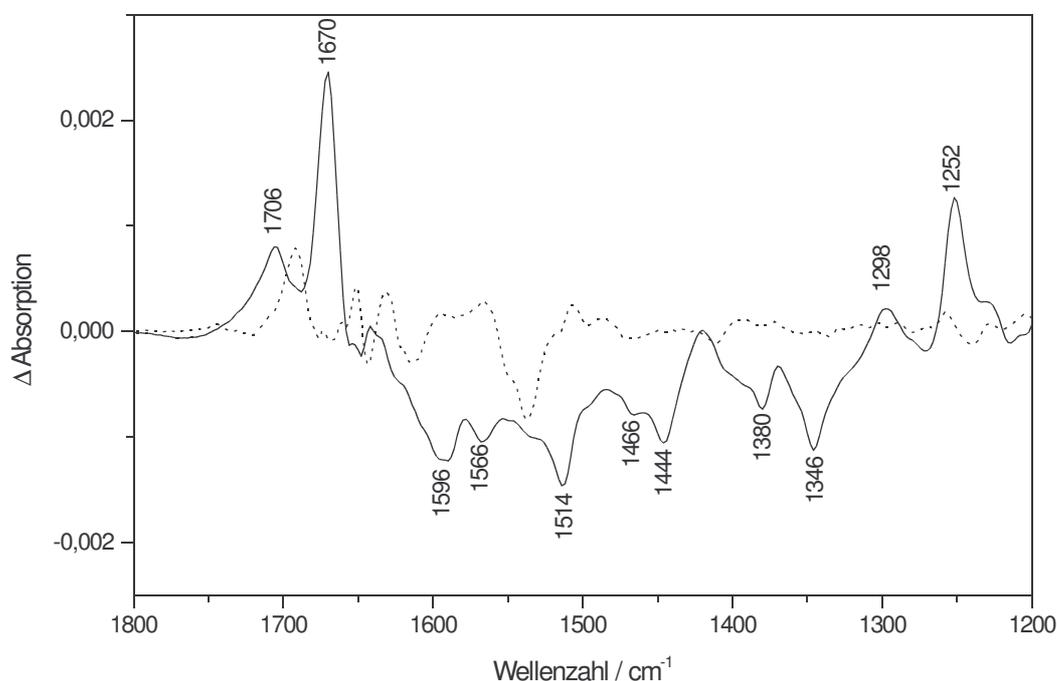


Abbildung 4-51

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit einem Überschuss an Stigmatellin für einen Potentialschritt von -0,5 nach 0,5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6,9). Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Komplexes dar.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit einer zehnfach niedrigeren Stigmatellinkonzentration durchgeführt. Abb. 4-52 zeigt das elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektrum des Hefe- bc_1 -Komplexes mit geringerer Inhibitorkonzentration. Dieses Spektrum zeigt deutliche Abweichungen im Amid I-Bereich zwischen 1690 und 1650 cm^{-1} , die auf Veränderungen in der Sekundärstruktur hinweisen könnten (siehe unten). Weitere Unterschiede finden sich zwischen 1620 und 1400 cm^{-1} sowie im Bereich oberhalb von 1720 cm^{-1} .

Interessant ist die Abnahme der Bandenintensität bei 1746 cm^{-1} , die Schwingungen protonierter Asp/Glu-Seitenketten zugeordnet wurde. Dies würde die Deprotonierung einer solchen Seitenkette bedeuten, wie es für Glu272 beschrieben wurde (*Hunte et al. 2000*). Das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei 1732 cm^{-1} (siehe Inset Abb. 4-52) könnte die Protonierung einer weiteren Glu/Asp-Seitenkette in der Stigmatellinbindestelle bedeuten, deren Identität in Zukunft noch geklärt werden muß.

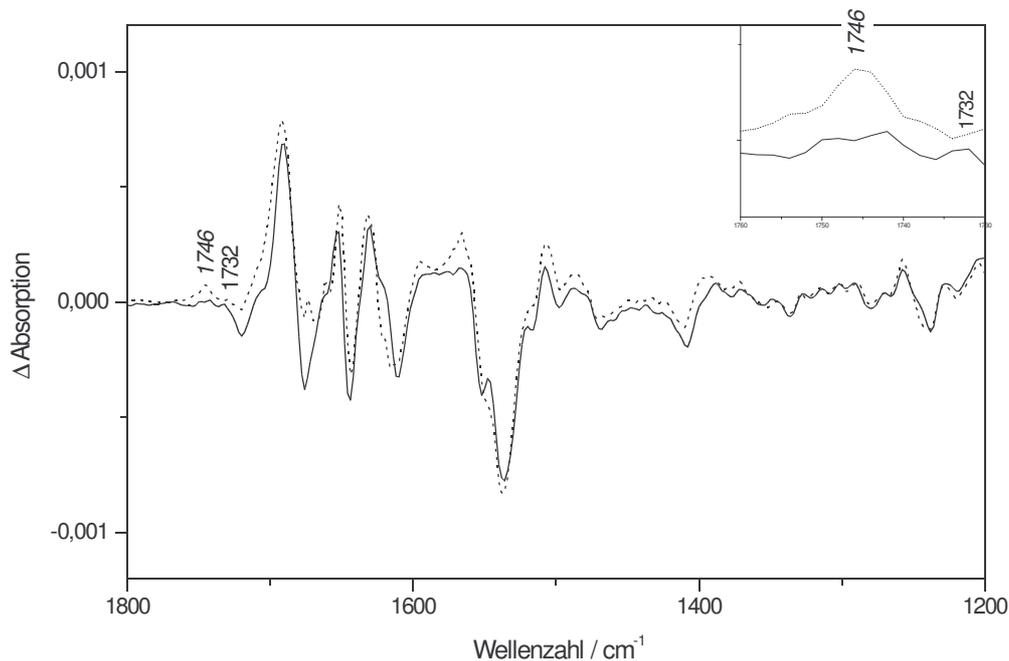


Abbildung 4-52

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit Stigmatellin für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Komplexes dar. Im Bildausschnitt ist der Bereich von 1760 bis 1730 cm^{-1} vergrößert dargestellt.

Die Überlagerungen der Proteinsignale mit denen des Inhibitors erschweren die Zuordnungen. Für eine bessere Unterscheidung der Beiträge stand ein neues Stigmatellin-Derivat (Undecanyl-Stigmatellin, UST) zur Verfügung (H. Miyoshi, Universität Kyoto),

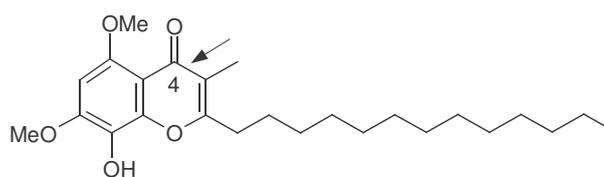


Abbildung 4-53

Struktur des Stigmatellin-Derivates UST. An der mit dem Pfeil markierten Stelle wurde die Isotopenmarkierung des ^{13}C -UST durchgeführt.

dessen Struktur im Bereich der Seitenkette vom natürlichen Stigmatellin abweicht. Sie ist in Abb. 4-53 ersichtlich. Weitere Experimente konnten mit einer isotopenmarkierten Variante (^{13}C -UST) dieses Stigmatellins durchgeführt werden. Die Markierung befindet sich am C4-Atom der C=O-Gruppe, die als Bindungspartner des His181 diskutiert wurde. Die elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren beider Inhibitoren finden sich im Anhang 7.2. Die ^{13}C -Markierung manifestiert sich dort in der Verschiebung der Bande der C=O-Streckschwingung von 1674 nach 1662 cm^{-1} . Diese Schwingung ist offensichtlich stark an die $\nu(\text{C}=\text{C}/\text{C}-\text{C})$ -Ringschwingungen gekoppelt, da für ungekoppelte Schwingungen eine Verschiebung von etwa 35 cm^{-1} erwartet würde (Herzberg 1967). Kleinere Veränderungen im Bereich der Ringschwingungen ergeben sich durch Verschiebungen von Signalen bei $1570/1560\text{ cm}^{-1}$ nach $1548/1538\text{ cm}^{-1}$ (vgl. Abb. 4-57).

Abb. 4-54 zeigt die FTIR-Differenzspektren des Hefe- bc_1 -Komplexes nach Inhibierung mit den Stigmatellin-Derivaten UST (A) und ^{13}C -UST. Diese Spektren weisen Veränderungen in den gleichen Bereichen auf wie die des mit natürlichem Stigmatellin inhibierten Proteins. Insbesondere kann die Abnahme der Bande bei 1746 cm^{-1} und eine zusätzliche Bande bei 1734 bzw. 1732 cm^{-1} beobachtet werden (Inset Abb. 4-54). Dieses Bandenmuster konnte bisher bei allen Spektren des mit Stigmatellin inhibierten Proteins gefunden werden.

Um die durch die Inhibitorenbindung induzierten Banden leichter detektieren zu können, wurden Doppeldifferenzspektren berechnet, die diese reflektieren. Dazu wurde jeweils das Differenzspektrum des nativen Proteins vom Spektrum des inhibierten Protein subtrahiert. Diese Doppeldifferenzspektren sind in Abb. 4-55 dargestellt. Das obere steht für Veränderungen nach Zugabe von natürlichem Stigmatellin, das mittlere zeigt sie für die nichtmarkierte Variante des UST und das untere für Veränderungen nach Inhibierung mit ^{13}C -UST. Die oberen beiden Spektren sind nahezu identisch. Hier wird deutlich, daß eine

Variation in der Seitenkette des Inhibitors keinen großen Einfluß hat und somit die Ringstruktur der Kopfgruppe entscheidend für seine Wirkung ist.

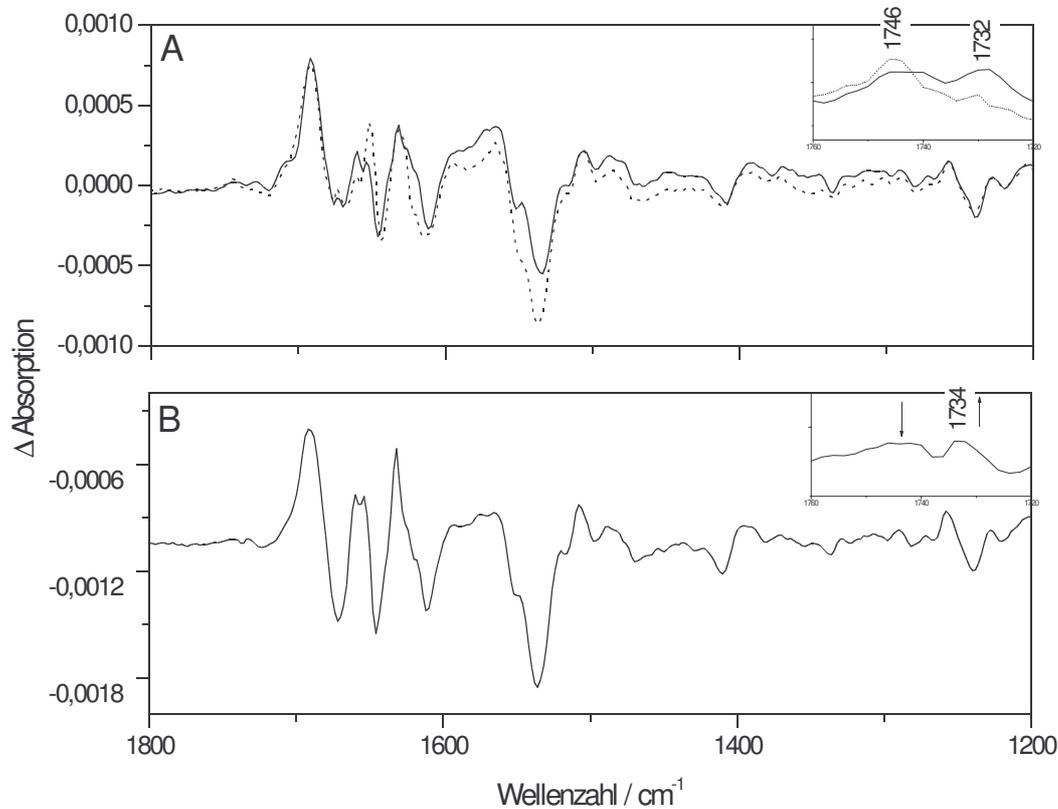


Abbildung 4-54

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit UST (A) und ^{13}C -UST (B) für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Komplexes dar. In den Insets ist der Bereich von 1760 bis 1720 cm^{-1} vergrößert dargestellt.

Ausgeprägte Banden bei 1674 , 1650 und 1622 cm^{-1} weisen auf Veränderungen in der Sekundärstruktur hin. Die Bindung von Stigmatellin bewirkt die Fixierung des Rieske-Proteins in einer Position. Seine Schleifen- und β -Faltblattstrukturen könnten zu den Signalen bei 1674 und 1622 cm^{-1} beitragen. Ebenso denkbar sind Signale durch Variationen in den flexiblen Linker-Region, die die mobile Domäne des Rieske-Proteins mit seinem Membrananker verbindet. Sie besteht aus einer Kombination von verschiedenen Sekundärstrukturmerkmalen. Neben β -Faltblatt- und Schleifen-Anteilen findet sich auch eine helikale Struktur (Hunte *et al.* 2000). Sie wird bei Stigmatellinbindung aufgeweitet und könnte bei 1650 cm^{-1} beitragen. Möglicherweise finden sich im Signal bei 1674 cm^{-1} auch Beiträge des cd_1 - und ef -Loops, die einen Teil der Häm b_L -Bindetasche bilden. Im gesamten

Bereich zwischen 1674 und 1650 cm^{-1} können auch Signale der Inhibitoren erwartet werden (siehe unten), die mit den Amid I-Signalen überlappen.

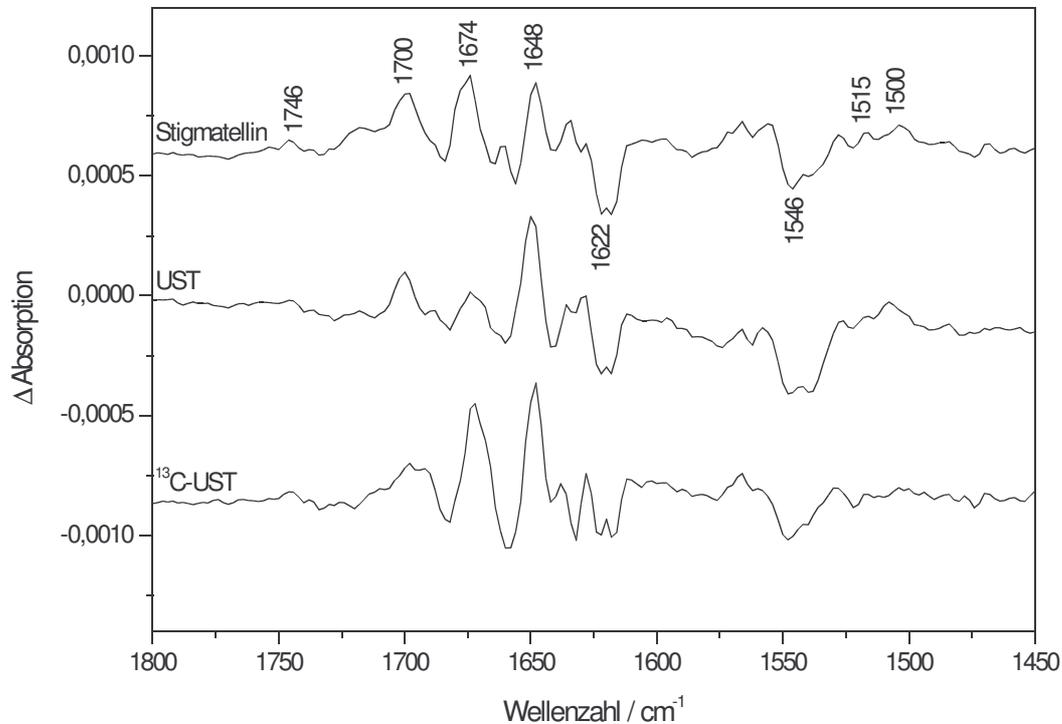


Abbildung 4-55

Doppeldifferenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhiert mit Stigmatellin, UST und ^{13}C -UST berechnet durch Subtraktion des Wildtyp-Differenzspektrum vom Differenzspektrum des mit dem jeweiligen Inhibitor versetzten Proteins.

Die Bande bei 1700 cm^{-1} ist ein Kandidat für Signale der C=O-Schwingung protonierter Hämpropionate, die durch die Inhibitorbindung gestört wird. Das Häm b_L -Propionat D ist nach Strukturangaben wahrscheinlich protoniert, während der Protonentransfer im Rahmen des Redoxzyklusses über das Propionat A erfolgen soll (Hunte *et al.* 2000). Entsprechende Beiträge der deprotonierten Formen sind im Bereich der breiten Bande bei 1546 cm^{-1} zu finden. Hier sind allerdings Überlagerungen mit den weiter unten diskutierten Schwingungsmoden der Inhibitorkopfgruppe und anderer deprotonierter Säuregruppen wie Glu/Asp-Seitenketten wahrscheinlich. Veränderungen in deren Protonierungszustand zeigen sich wie schon beschrieben in der Bande bei 1746 cm^{-1} . Die Differenzspektren der Abb. 4-52 und 4-54 lassen deutlich eine Abnahme der Signalintensität in diesem Bereich erkennen, die der Deprotonierung einer Glu/Asp-Seitenkette zuzuschreiben ist. Als Kandidat wurde hierfür bereits Glu272 diskutiert.

Zwei Signale bei 1500 und 1515 cm^{-1} lassen Protonierungsreaktionen und/oder Veränderungen im Bindungsumfeld von Tyrosinen erwarten. Im Bereich der Stigmatellinbindestelle finden sich mehrere in Frage kommende Tyrosine. Tyr274 als Teil des PEWY-Loops befindet sich in unmittelbarer Nähe zu Glu272 und ist über ein Netz von Wassermolekülen und zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Inhibitor verbunden (vgl. Abb. 4-56). Tyr132 ist Teil der Häm b_L -Bindetasche. Beide Aminosäuren liegen in der Kristallstruktur sich zwischen Stigmatellin und dem Häm b_L (Hunte *et al* 2000). Sie sind hochkonserviert in vielen bc_1 -Komplexen, was für eine funktionelle Bedeutung im Rahmen der Chinoloxidation spricht. Mutationen an homologen Stellen in bakteriellen Komplexen führten zu einer starken Verlangsamung oder Verhinderung der Chinoloxidation (Brasseur *et al.* 1996). Im Bereich zwischen dem Inhibitor und seinem zweiten Bindungspartner, His181, befindet sich Tyr279, das entscheidend in die Positionierung des Chinols in der Q_o -Bindestelle eingebunden sein soll (Pálsdóttir *et al.* 2003).

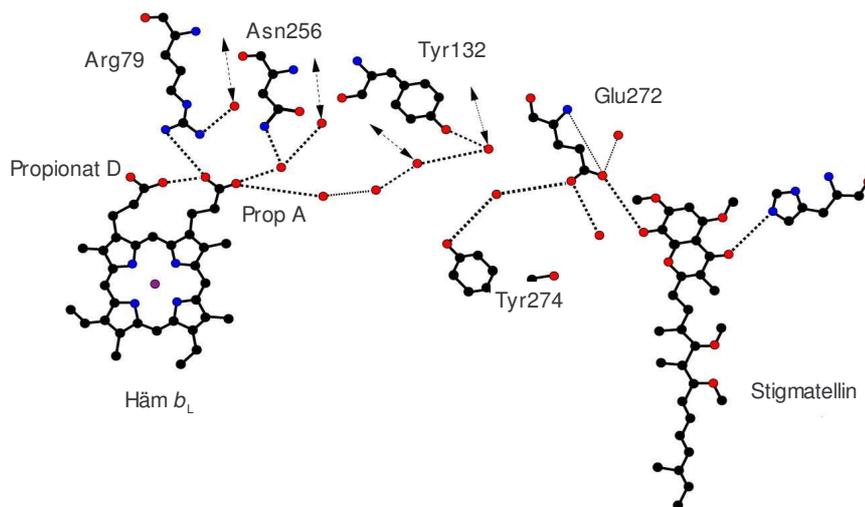


Abbildung 4-56

Bereich der Q_o -Bindestelle zwischen Stigmatellin und Häm b_L mit einem Netz von Wasserstoffbrücken (aus Hunte *et al.* 2000). Rot: Sauerstoffatome, gestrichelt: Wasserstoffbrückenbindungen, blau: Stickstoffatome:

Zur Identifizierung der Inhibitorsignale im Proteinspektrum wurde die ^{13}C -Markierung der UST-Inhibitoren ausgenutzt. Ein Doppeldifferenzspektrum berechnet aus den Differenzspektren der markierten und der unmarkierten Version reflektiert Verschiebungen der Inhibitormoden durch die Isotopenmarkierung und ermöglicht somit die Zuordnung der Inhibitorsignale. Zunächst wurde ein Doppeldifferenzspektrum aus den Differenzspektren der

Inhibitoren in Lösung (siehe Anhang 7.2) berechnet, die nur die ^{13}C -induzierten Veränderungen zeigen. Ein zweites Doppeldifferenzspektrum wurde aus den Differenzspektren der mit beiden Substanzen inhibierten Proteine berechnet. Es zeigt zusätzlich die Verschiebung der Inhibitorbanden durch Bindung im Komplex. Dabei lassen sich auch Anteile gebundenen und ungebundenen Inhibitors unterscheiden. Beide Spektren sind in Abb. 4-57 dargestellt.

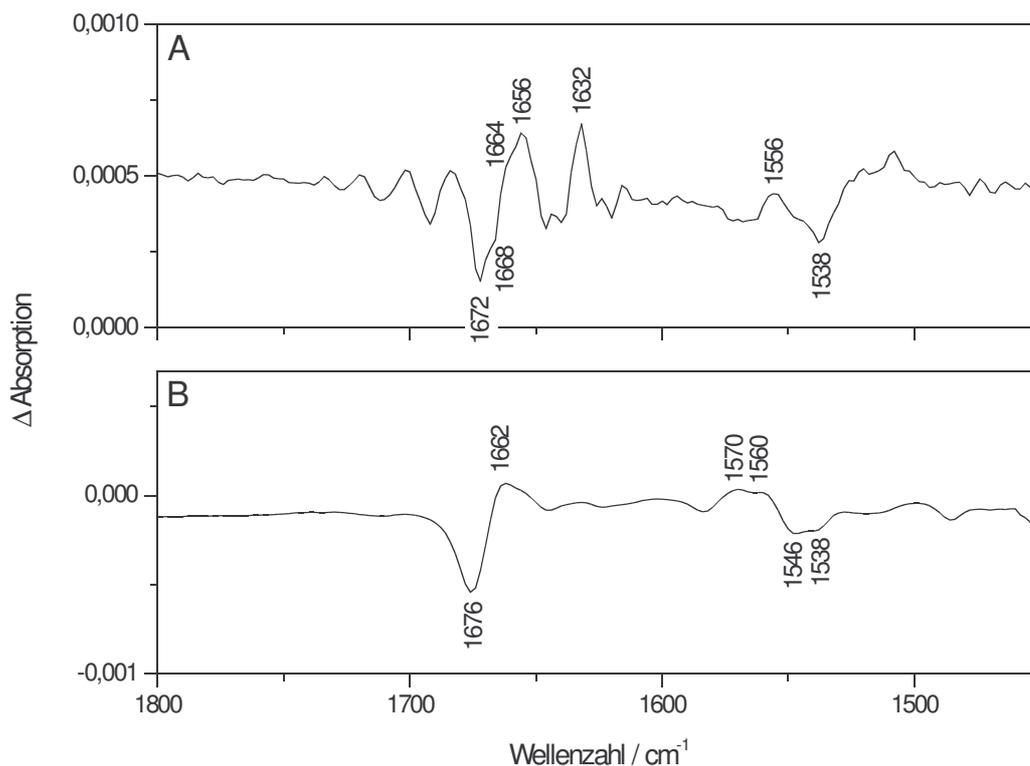


Abbildung 4-57

Doppeldifferenzspektren des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae*, die den Einfluß der ^{13}C -Markierung zeigen. A: berechnet durch Subtraktion des UST-Differenzspektrums vom ^{13}C -UST-Differenzspektrum im Protein. B: berechnet durch Subtraktion des UST-Differenzspektrums vom ^{13}C -UST-Differenzspektrum in Lösung).

Das Doppeldifferenzspektrum berechnet aus den Lösungsmittelspektren (B) zeigt die Verschiebung der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung von 1676 nach 1662 cm^{-1} . Im Protein-Doppeldifferenzspektrum (A) läßt sich die entsprechende Bande der UST-Form bei 1672 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1668 cm^{-1} identifizieren, die sich dem ungebundenen bzw. gebundenen Inhibitor zuordnen lassen. Die Bande bei 1656 cm^{-1} reflektiert Schwingungen der gebundenen ^{13}C -UST-Form. Die Schulter bei 1664 cm^{-1} könnte von ungebundenem ^{13}C -UST stammen.

Die Bindung des Inhibitors im Protein führt zu einer Verschiebung der Banden um 8 cm^{-1} , was auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke schließen läßt. Laut der Kristallstruktur wäre dies zum protonierten Imidazolring des His181 möglich (*Hunte et al. 2000*).

Umorganisationen in der Ringstruktur des Inhibitors aufgrund seiner Redoxreaktion finden sich zwischen 1570 und 1530 cm^{-1} . Die ^{13}C -Markierung führt zu einer Verschiebung der Banden bei 1570 und 1560 cm^{-1} im unmarkierten UST nach 1546 und 1538 cm^{-1} . Im Proteinspektrum zeigen sie sich in der Differenzbande bei $1556/1538\text{ cm}^{-1}$.

FTIR-Differenzspektren des mit HHDBT inhibierten Proteins

HHDBT ist ein Vertreter der im Kapitel 2.1.4.2 erwähnten Hydroxydioxobenzothiazole. Die Kristallstruktur des Hefe-*bc*₁-Komplexes mit gebundenem HHDBT wurde bereits aufgelöst (*Pálsdóttir et al. 2003*). Sie zeigt als wesentlichen Unterschied zur Stigmatellin-Struktur die Protonierung des Glu272 und die Rotation seiner Säuregruppe aus der Q_o-Bindetasche heraus. In dieser Position kann es direkt ein Proton an ein Propionat des Häm *b*_L übertragen. Der Inhibitor ist über die C4=O-Gruppe mit dem vermutlich protonierten Glu272 wasserstoffverbunden (vgl. Abb. 4-58). Da in den FTIR-Differenzspektren des Stigmatellin-inhibierten Proteins die Deprotonierung dieser Gruppe als Grund für die Abnahme einer Bande bei 1746 cm^{-1} vermutet wurde, sollte sich die Protonierung ebenso zeigen lassen.

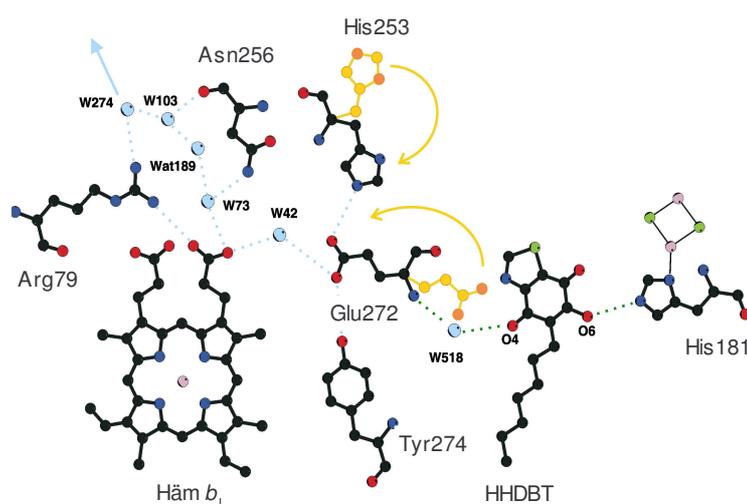


Abbildung 4-58

Bereich der Q_o-Bindestelle nach Bindung von HHDBT (*aus Palsdottir et al. 2003*). Gelb: Veränderungen zur Kristallstruktur des Stigmatellin-inhibierten Komplexes

HHDBT (Abb. 4-49) bindet in ionisierter Form im Protein. Es ist redoxaktiv. Das dem HHDBT nah verwandte UHDBT weist bei pH 7 ein Mittelpunktspotential von -248 mV (vs. Ag/AgCl) auf (Trumpower & Haggerty 1980). Das bedeutet, es könnte zu den elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren des inhibierten Proteins beitragen. Um seine Signale zu detektieren, wurde das Protein mit einem HHDBT-Überschuß, wie er unter Kristallisationsbedingungen verwendet wird, vermessen. Dieses Differenzspektrum ist in Abb. 4-59 dargestellt.

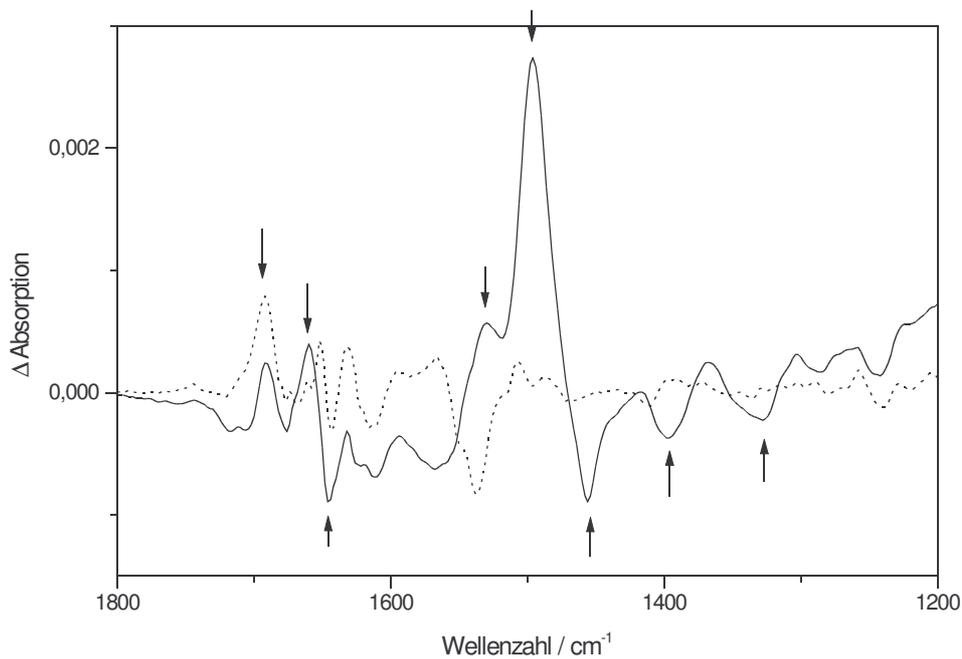


Abbildung 4-59

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit einem Überschuß an HHDBT für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Komplexes dar. Pfeile markieren Beiträge des HHDBT.

Ausagen über Veränderungen im Protein sind bei dieser Konzentration durch die Dominanz der Inhibitorbanden (durch Pfeile gekennzeichnet) schwierig. Deshalb wurde ein weiteres Differenzspektrum mit einem Zehntel der ursprünglichen HHDBT-Konzentration aufgenommen, das in Abb. 4-60 zu sehen ist. Dieses Spektrum zeigt im Wesentlichen nur noch durch HHDBT im Protein induzierte Veränderungen, auf die hier nicht detailliert eingegangen werden soll. Der für die Protonierungsreaktion des Glu272 in Frage kommende Bereich ist in Abb. 4-61 vergrößert dargestellt.

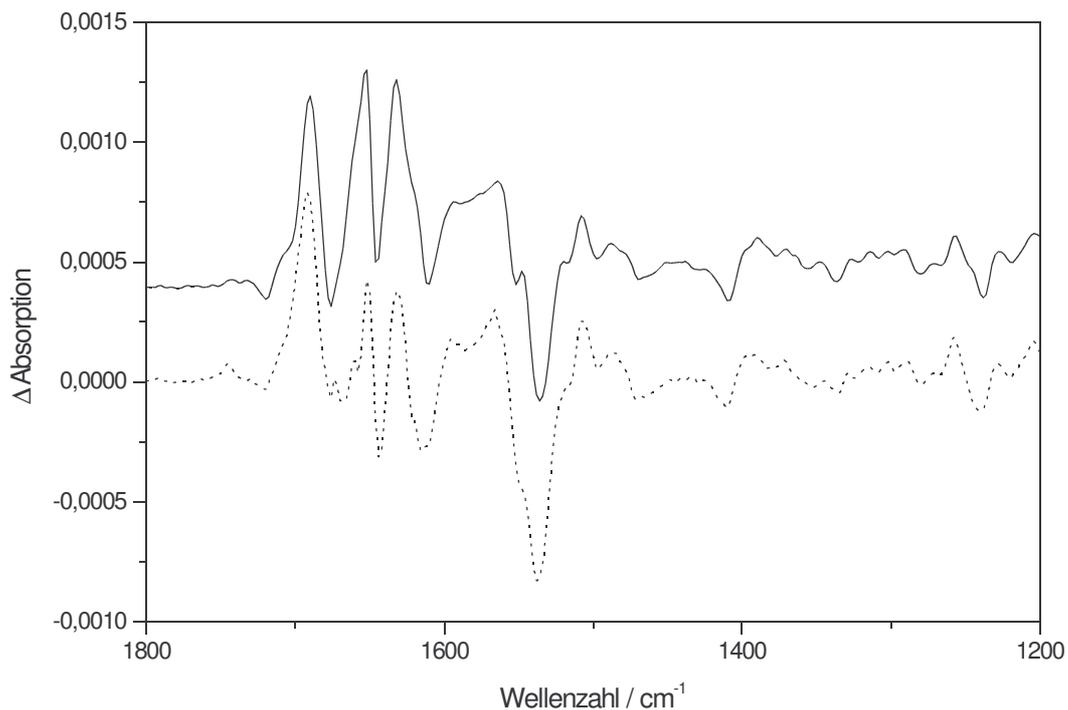


Abbildung 4-60

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit HHDBT für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Komplexes dar.

Es zeigt sich eine breite Bande bei 1742 cm^{-1} . Sie wird der C=O-Streckschwingung der protonierten Säuregruppe zugeordnet. Im Vergleich zum Wildtypspektrum ist sie um 4 cm^{-1} verschoben, was auf eine schwache Wasserstoffverbrückung der Säuregruppe zurückführbar ist. Wie schon in den Stigmatellin-Spektren zeigt sich ein zusätzliches Signal bei 1732 cm^{-1} , das auf die Beeinflussung einer weiteren Säuregruppe schließen läßt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Glu66, das in beiden Kristallstrukturen über Wasserstoffbrücken erreichbar ist. Abb. 4-62 illustriert die Lage dieser Aminosäure. Zur Zuordnung sind weiterführende Experimente erforderlich.

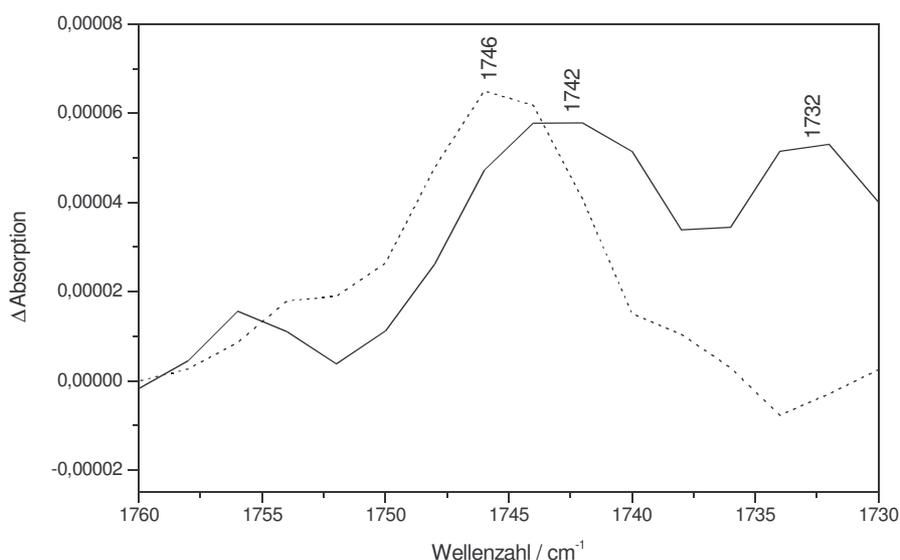


Abbildung 4-61

Elektrochemisch induziertes FTIR-Differenzspektrum des bc_1 -Komplexes aus *S. cerevisiae* inhibiert mit HHDBT für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V aufgenommen in Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9) im Spektralbereich von 1760 bis 1730 cm^{-1} . Die gepunktete Linie stellt das Spektrum des nativen Komplexes dar.

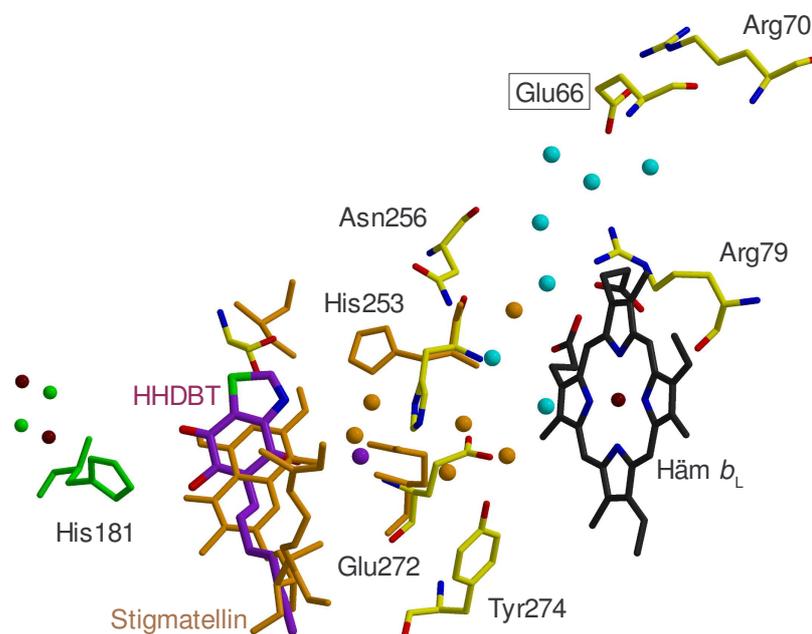


Abbildung 4-62

Lage von Glu66 in den Kristallstrukturen des Hefe- bc_1 -Komplexes mit Stigmatellin (orange) und HHDBT (violett). Orange Kreise zeigen Wassermoleküle, die in der Stigmatellin-Struktur vorhanden sind, violette in der HHDBT-Struktur. Blaue Kreise bezeichnen H_2O -Moleküle, die sich in beiden Strukturen finden (Abbildung zur Verfügung gestellt von H. Palsdottir, MPI für Biophysik, Frankfurt/Main)

4.3 Vergleich der Wildtyp-FTIR-Differenzspektren der bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* und *S. cerevisiae* und Ausblick

In den im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren der bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* und *S. cerevisiae* wurden die Beiträge zahlreicher an der Redoxreaktion des Proteins beteiligter Proteinbestandteile ermittelt. Obwohl sich beide Komplexe in ihrer Größe unterscheiden, weisen sie viele Parallelen im Bereich der katalytischen Untereinheiten Cytochrom *b*, c_1 und Rieske-Protein auf. Beide Komplexe erfüllen die gleiche Funktion. Die an den Elektronentransfer gekoppelte Protonentranslokation erfolgt über den Q-Zyklus-Mechanismus (Mitchell 1976). Die funktionellen Gemeinsamkeiten spiegeln sich in den FTIR-Differenzspektren wider. Abb. 4-63 verdeutlicht dies anschaulich. Alle Banden, die Beiträgen korrespondierender Proteinbestandteile zugeordnet wurden, sind markiert. In Tabelle 4-10 sind die Zuordnungen im Einzelnen aufgelistet. Details dazu finden sich in den Kapiteln 4.1.2.2 und 4.2.2.2.

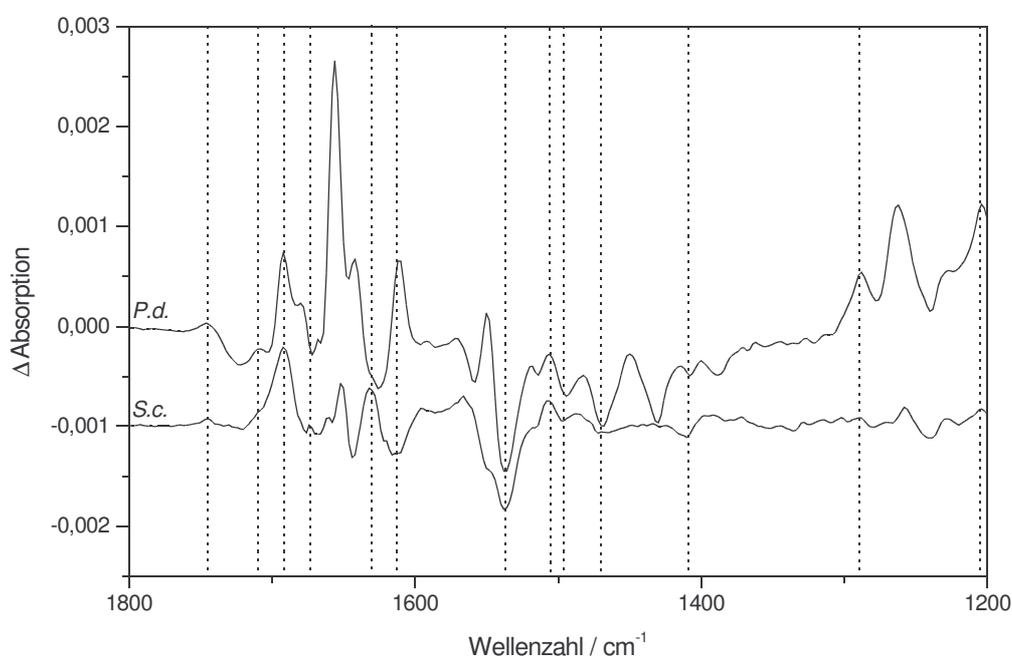


Abbildung 4-63

Vergleich der elektrochemisch induzierten ox-minus-red-FTIR-Differenzspektren der bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* (*P.d.*) und *S. cerevisiae* (*S.c.*) für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V. Die gepunkteten Linien kennzeichnen Banden, für die gleiche Zuordnungen getroffen wurden (siehe Tabelle 4-10, fettgedruckt)

<i>P. denitrificans</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
Bandenposition / cm ⁻¹	Zuordnung	Bandenposition / cm ⁻¹	Zuordnung
1746 (+)	Asp/Glu	1746 (+)	Asp/Glu
1710 (+)	Asp/Glu	1710 (+)	Asp/Glu
1692 (+)	Amid I (Rieske-Protein) Hämpropionat	1692 (+)	Amid I (Rieske-Protein) Hämpropionat
1680 (+)	Gln, Asn		
1670 (+)	Arg	1672 (+)	Arg, Gln, Asn
1656 (+)	Amid I (α -Helices, Cyt <i>b</i>) Chinon	1652 (+)	Amid I (α -Helices, Cyt <i>bbbb</i> <i>b</i>) Chinon
1642 (+)	Chinon	-	
1630 (+)	Amid I (Rieske-Protein) Arg	1632 (+)	Amid I (Rieske-Protein) Arg
-		1620 (+)	Gln, Asn
1610 (+)	Chinon	1612 (+)	Chinon
1592 (+)	-	1596 (+)	Häm
1570 (+)	Amid II Häm	1566 (+)	Amid II
1558 (-)	Hämpropionat	-	
1550 (+)	Amid II Häm	1548 (+)	Häm
1536 (-)	Hämpropionat	1536 (-)	Hämpropionat
1518 (+)	Amid II	1518 (+)	Tyr
1506 (+)	Amid II	1506 (+)	Amid II
1496 (-)	Chinol	1496 (-)	Tyr Chinol
1468 (-)	Chinol	1468 (-)	Chinol
1408 (-)	Chinol	1410 (-)	Hämpropionat Chinol
1288 (+)	Chinon	1288 (+)	Chinon
1262 (+)	Chinon Häm	1258 (+)	Häm Tyr Chinon
1240 (-)	Häm	1237 (-)	Tyr
1204 (+)	Chinon	1204 (+)	Chinon

Tabelle 4-10

Vergleich der vorläufigen Bandenzuordnungen der elektrochemisch induzierten ox-minus-red-FTIR-Differenzspektren der *bc*₁-Komplexe aus *P. denitrificans* und *S. cerevisiae*

Unterschiede zwischen den Spektren beider Organismen ergeben sich hauptsächlich durch den höheren Chinongehalt des *P. denitrificans-bc*₁-Komplexes.

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Grundlage für weiterführende Experimente dar. Die Meßbedingungen zur Aufnahme der elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren für eine vollständige Redoxreaktion wurden für die Proteinkomplexe beider Organismen etabliert. Nahziele zukünftiger Arbeiten sollte die Optimierung des zum Einsatz gekommenen Mediatorcocktails sein, um eine Verkürzung der Äquilibrierungszeiten zu erreichen. Damit wird die Bestimmung der Mittelpunktspotentiale der einzelnen Kofaktoren des Hefeproteins im sichtbaren Spektralbereich möglich, wie sie für den bakteriellen bc_1 -Komplex bereits durchgeführt wurden. Sie scheitern bisher an Denaturierungseffekten aufgrund der langen Äquilibrierung. Die Beiträge der Kofaktoren zum FTIR-Gesamtspektrum können anhand der Mittelpunktspotentiale separiert werden. Die Verkürzung der Äquilibrierungszeiten ist auch notwendig, um Potentialtitrationen im infraroten Spektralbereich durchführen zu können, die die Ermittlung der Mittelpunktspotentiale der Chinone ermöglicht.

Die Zuordnung von Beiträgen einzelner Aminosäureseitenketten an der Redoxreaktion des Proteins sollte durch ortsgerichtete Mutagenese an entsprechenden Stellen des Genoms abgesichert werden. Der Schwerpunkt könnte hier auf der Untersuchung von Mutanten des Glu272 und Glu66 liegen. Zuordnungen von Beiträgen der Hämpropionate und Chinone können durch den Einsatz isotoopenmarkierter Substanzen untermauert werden. Die Untersuchungen mit den verschiedenen Inhibitoren, die sich teils noch im Anfangsstadium befinden, bieten gute Möglichkeiten weitere Erkenntnisse über die molekularen Details des Redoxmechanismus des bc_1 -Komplexes zu erfahren und sollten weitergeführt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der elektrochemischen und spektroskopischen Eigenschaften der bc_1 -Komplexe aus dem Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* im sichtbaren und infraroten Spektralbereich. Das redoxaktive Protein ist Bestandteil der Atmungskette und trägt entscheidend zum Aufbau eines Protonengradienten bei, der zur Bildung des universellen Energieträgers ATP genutzt wird. Der bakterielle *P. denitrificans*-Komplex besteht aus den drei katalytischen Untereinheiten Cytochrom *b*, Cytochrom c_1 und Rieske-Protein. Der mitochondriale Hefe- bc_1 -Komplex besitzt neben diesen drei noch acht weitere Untereinheiten, die anscheinend für die Stabilität des Enzyms bedeutsam sind.

Um Konformationsänderungen des Proteins infolge von Elektronen- und daran gekoppelten Protonentransferreaktionen zu dokumentieren, wurde der Komplex elektrochemisch in definierte Redoxzustände versetzt. Aus den in diesen Zuständen aufgenommenen Absorptionsspektren berechnen sich Differenzspektren, deren Banden auf die Redoxreaktion zurückzuführende Veränderungen im Protein widerspiegeln. Durch Vergleiche mit Modellspektren isolierter Proteinbestandteile, Spektren ähnlicher Proteine und Informationen aus Kristallstrukturen konnten Beiträge der verschiedenen Kofaktoren, des Proteinrückgrates und einzelner Aminosäuren zu diesen Banden zugeordnet werden.

Die elektrochemisch induzierten FTIR-Differenzspektren des *P. denitrificans*- bc_1 -Komplexes zeigten vor allem Beiträge der im Komplex gebundenen Chinone, die durch den Vergleich mit Differenzspektren isolierter Chinone identifiziert werden konnten. Ein wichtiges Ergebnis war die Abschätzung der Chinonkonzentration im Protein anhand einer charakteristische Bande bei 1262 cm^{-1} resultierend aus Schwingungen der Chinon-Methoxygruppen. Das Ergebnis von durchschnittlich 3 Molekülen Chinon pro Protein-Monomer unterstützt das zur Zeit für die Q_o -Bindestelle diskutierte *double-occupancy*-Modell. Interessanterweise konnte die Protonierung einer Glu/Asp-Aminosäureseitenkette in Abhängigkeit vom Chinongehalt beobachtet und daraus abgeleitet Signale eines an der Q_o -Bindestelle gebundenen Chinons differenziert werden.

Die Beiträge der Cytochrom *b* und *c*-Untereinheiten relativ zum Gesamtspektrum des *P. denitrificans*- bc_1 -Komplexes wurden mittels Differenzspektren der einzelnen Kofaktoren unterschieden. Anhand ihrer Mittelpunktpotentiale, die zuvor durch Potentialtitrationen im

sichtbaren Spektralbereich bestimmt wurden (Häm b_L : $E_{m7} = -292$ mV vs. Ag/AgCl, Häm b_H : -144 mV, Häm c_1 : 89 mV), konnten die Differenzsignale des jeweiligen Kofaktors und seiner durch die Redoxreaktion beeinflussten Umgebung durch Wahl geeigneter Potentialschritte separiert werden. Die Zuordnungen der Signale des Cytochrom c_1 und des Rieske-Proteins, die spektroskopisch nicht getrennt werden können, wurden durch Messungen an wasserlöslichen Fragmenten dieser Untereinheiten abgesichert. In allen Spektren konnten typische Beiträge des Proteingrundgerüsts, Schwingungen der Häme und ihrer Substituenten sowie einzelner Aminosäuren vorläufig zugeordnet werden.

Die Bindung von Inhibitoren führte zu deutlichen Veränderungen im FTIR-Differenzspektrum. Der Q_I -Inhibitor Antimycin A zeigt eigene Differenzsignale im Bereich oberhalb 1734 cm^{-1} , an denen die Bindung des Inhibitors im Protein nachvollzogen werden konnte. Sie führte zur Abnahme der Signalintensität einer Bande, die die Beeinflussung eines protonierten Hämpropionates oder Arginin- bzw. Asparaginseitenketten vermuten lassen. Die Bindung des Q_o -Inhibitors Stigmatellin, der selbst redoxaktiv ist, äußerte sich in Veränderungen im Amid I-Bereich des Differenzspektrums. Die Deprotonierung einer Glu/Asp-Seitenkette infolge der Stigmatellinbindung wurde diskutiert.

Die FTIR-Differenzspektren des *S. cerevisiae*- bc_1 -Komplexes gleichen denen des bakteriellen Komplexes in Bezug auf die Bandenpositionen weitestgehend. Die Signalintensitäten sowie die Größenverhältnisse der Banden zueinander unterscheiden sich jedoch. Dies wird durch den geringeren Chinongehalt des Hefeproteins nach der Präparation bedingt.

Der Einfluß fünf verschiedener Inhibitoren der Q_I - und Q_o -Bindestelle auf die Differenzspektren wurde untersucht. Dabei standen von zwei Substanzen isotopenmarkierte Varianten zur Verfügung, die tieferen Einblick in die genaue Wechselwirkung bei der Inhibitorbindung bringen sollte. Die Bindung der Inhibitoren führte zu Veränderungen in den Spektren. Sie wurden vor dem Hintergrund der Kristallstruktur betrachtet, die aufgrund ihrer Auflösung keine exakten Aussagen über den Protonierungszustand einzelner Proteinbestandteile liefern kann. Der Schwerpunkt der Studien lag auf den Vergleich der Q_o -Inhibitoren Stigmatellin und HHDBT. Die Bindung von Stigmatellin führte wie im *P. denitrificans*-Komplex zur Deprotonierung einer Glu/Asp-Seitenkette. Die Inhibierung mit HHDBT resultierte in der Protonierung vermutlich der gleichen Glu/Asp-Seitenkette. Die Auswirkungen des unterschiedlichen Protonierungszustandes der Aminosäure in Anwesenheit dieser beiden Inhibitoren wurde im Kontext eines vermuteten Chinoloxidations-Mechanismus beleuchtet.

Abe, M., Kitagawa, T., Kyogoku, Y. (1978) Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and ^{15}N -substituted derivatives. II. A normal mode analysis. *J. Chem. Phys.* **69**, 4526-4534

Adam, G., Luger, P., Stark, G. (1995) "Physikalische Chemie und Biophysik", 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Anderka, O. (1999) Expression und Charakterisierung eines chimeren Cytochrom bc_1 -Komplexes. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universitat Frankfurt/Main

Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J., Goni, F.M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23-56

Barth, A. (2001) The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 141-173

Bartoschek, S., Johansson, M., Geigerstanger, B.H., Okun, J.G., Lancaster, R. Humpfer, E., Yu, L., Yu, C.A., Griesinger, C., Brandt, U. (2001) Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **276**(38), 35231-35234

Bauscher, M., Mantele, W. (1992) Electrochemical and infrared-spectroscopic characterization of redox reactions of p -quinones. *J. Phys. Chem.* **96**(26), 11101-11108

Baymann, F. (1991) Mechanismen des Elektronentransportes bakterieller Cytochrome c . Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universitat Freiburg

Baymann, F. (1995) Der Cytochrom bc_1 -Komplex des Purpurbakteriums *Rhodobacter capsulatus*. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universitat Freiburg

Baymann, F., Robertson, D.E., Dutton, P.L., Mantele, W. (1999) Electrochemical and spectroscopic investigations of the cytochrome bc_1 complex from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* **38**(40), 13188-13199

Bellamy, L.J. (1958) The infrared spectra of complex molecules. 2.Auflage, Chapman & Hall London

Behr, J., Hellwig, P., Mantele, W., Michel, H. (1998) Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Direct evidence from

FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate ^{13}C labelling. *Biochemistry* **37**(20), 7400-7406

Behr, J., Michael, H., Mäntele, W., Hellwig, P. (2000) Functional properties of the heme propionates in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence from FTIR difference spectroscopy and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**, 1356-1363

Berden, J.A., Slater, E.C. (1970) The reaction of antimycin with a cytochrome *b* preparation active in reconstitution of the respiratory chain. *BBA* **216**(2), 237-249

Berden, J.A., Slater, E.C. (1972) The allosteric binding of antimycin to cytochrome *b* in the mitochondrial membrane. *BBA* **256**, 199-215

Berry, E.A., Guergova-Kuras, M, Huang, L., Crofts, A.R. (2000a) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 1005-1075

Berry, E.A., Huang, L., DeRose, V. (1991) Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase of higher plants. Isolation and characterization of the *bc*₁ complex from potato tuber mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**(15), 9064-9077

Berthomieu, C., Boussac, A., Mäntele, W., Breton, J., Navedryk, E. (1992) Molecular changes following oxidation of cytochrome *b*₅₅₉ characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Electron Paramagnetic Resonance: Photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome *b*₅₅₉ and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds. *Biochemistry* **31**, 11460-11471

Brandt, U., von Jagow, G. (1991) Analysis of inhibitor binding to the mitochondrial cytochrome *c* reductase by fluorescence quench titration. Evidence for a catalytic switch at the Q_o center. *Eur. J. Biochem.* **195**, 163-170

Brandt, U. (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome *bc*₁ complex by proton-gated charge transfer. *FEBS Letters* **387**, 1-6

Brandt, U. (1998) The chemistry and mechanics of ubihydroquinone oxidation at center P (Q_o) of the cytochrome *bc*₁ complex. *BBA* **1365**, 261-268

Brandt, U. (1999) Control of ubiquinol oxidation at center P (Q_o) of the cytochrome *bc*₁ complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**(3), 243-249

Brandt, U. (1999) Proton translocation in the respiratory chain involving ubiquinone-a hypothetical semiquinone switch mechanism for complex III. *Biofactors* **9**(2-4), 95-101

Brandt, U., Okun, J.G. (1997) Role of deprotonation events in ubihydroquinone: cytochrome *c* oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry* **36**, 11234-11240

Brandt, U., Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q-cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**(3), 165-197

Brasseur, G., Saribas, A.S., Daldal, F. (1996) A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit of the bacterial and mitochondrial *bc*₁ complex. *BBA* **1275**, 61-69

Breton, J., Boullais, C., Berger, G., Mioskowski, C., Nabedryk, E. (1995) Binding sites of quinones in photosynthetic bacterial reaction centers investigated by light-induced FTIR difference spectroscopy: symmetry of the carbonyl interactions and close equivalence of the Q_B vibrations in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas viridis* probed by isotopic labeling. *Biochemistry* **34**, 11606-11616

Breton, J., Boullais, C., Burie, J.-R., Nabedryk, E., Mioskowski, C. (1994) Binding sites of quinones in photosynthetic bacterial reaction centers investigated by light-induced FTIR difference spectroscopy: assignment of the interactions of each carbonyl of Q_A in *Rhodobacter sphaeroides* using site-specific ¹³C-labelled ubiquinone. *Biochemistry* **33**, 14378-14386

Breton, J., Burie, J.-R., Boullais, C., Berger, G., Nabedryk, E. (1994) Binding sites of quinones in photosynthetic bacterial reaction centers investigated by light-induced FTIR difference spectroscopy: binding of chainless symmetrical quinones to the Q_A site of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **33**, 12405-12415

Breyton, C. (2000) The cytochrome *b₆f* complex: structural studies and comparison with the *bc*₁ complex. *BBA* **1459**, 467-474

Buchanan, S., Michel, H., Gerwert, K. (1992) Light-induced charge separation in *Rhodospseudomonas viridis* reaction centers monitored by Fourier-transform infrared difference spectroscopy: the quinone vibrations. *Biochemistry* **31**(5), 1314-1322

Bühler, H., Baumann, R. (1982) Redoxmessung - Grundlagen und Probleme. Ingold-Meßtechnik AG

Burie, J.-R., Boullais, C., Nonella, M., Mioskowski, C., Nabedryk, E., Breton, J. (1997)

Importance of the conformation of the methoxy groups on vibrational and electrochemical properties of ubiquinones. *J. Phys. Chem. B* **101**, 6607-6617

Carrell, C.J., Zhang, H., Cramer, W.A., Smith J.L. (1997) Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure* **5**(12), 1613-1625

Chirgadze, Y.U., Fedorov, O.V., Trushina, N.P. (1975) Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers* **14**, 679-694

Choi, S., Spiro, T.G., Langry, K.C., Smith, K.M., Budd, D.L., La Mar, G.N. (1982) Structural correlations and vinyl influences in resonance Raman spectra of protoheme complexes and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4345-4357.

Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberly, S.E. (1990) "Introduction to infrared and Raman spectroscopy", 3.Auflage, Academic Press London

Crofts, A.R., Barquera, B., Gennis, R.B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., Berry, E. (1999a) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: Different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* **38**, 15807-15826

Crofts, A.R., Berry, E.A. (1998) Structure and function of the cytochrome bc_1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 501-509

Crofts, A.R., Guergova-Kuras, M., Huang, L., Kuras, R., Zhang, Z., Berry, E. (1999b) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: Role of the iron-sulfur protein and its mobility. *Biochemistry* **38**, 15791-15806

Crofts, A.R., Guegova-Kuras, M., Kuras, R. Ugulava, N., Li, J., Hong, S. (2000) Proton-coupled electron transfer at the Q_o site: What type of mechanism can account for the high activation barrier? *BBA* **1459**, 456-466

Crofts, A.R., Hacker, B., Barquera, B., Yun, C., Gennis, R. (1992) Structure and function of the bc_1 complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *BBA* **1101**, 162-165

Crofts, A.R., Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M., Berry, E. (1999) Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the bc_1 complex. *PNAS USA* **96**, 10021-10026

Crofts, A.R., Hong, S., Zhang, Z., Berry, E. (1999c) Physicochemical aspects of the movement of the Rieske iron sulfur protein during quinol oxidation by the *bc*₁ complex from mitochondria and photosynthetic bacteria. *Biochemistry* **38**, 15827-15839

Crofts, A.R., Shinkarev, V.P., Dikanov, S.A., Samoilova, R.I., Kolling, D. (2002) Interactions of quinone with the iron-sulfur protein of the *bc*₁ complex: is the mechanism spring-loaded? *BBA* **1555**, 48-53

Crofts, A.R., Wang, Z. (1989) How rapid are the internal reactions of the ubiquinol: cytochrome *c*₂-oxidoreductase? *Photosynth. Res.* **22**, 69-87

Degli-Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., Meyer, A. (1993) Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *BBA* **1143**, 243-271

Desbois, A. (1994) Resonance Raman Spectroscopy of *c*-type cytochromes. *Biochimie* **76**, 693-707

Dhamelincourt, P., Ramirez, F.J. (1993) Polarized micro-Raman and FT-IR spectra of L-glutamine. *Applied Spectroscopy* **47**, 446-451

Diedrich, G., Hundt, R., Koppasch, G., Kummer, G., Lobeck, K., Meincke, I., Stade, R., Theuerkauf, H. (1979) "Wissenspeicher Biologie", 6. Auflage, Volk und Wissen Verlag, Berlin

Ding, H., Moser, C.C., Robertson, D.E., Tokito, M.K., Daldal, F., Dutton, P.L. (1995) Ubiquinone pair in the Q_o site central to the primary energy conversion reactions of cytochrome *bc*₁ complex. *Biochemistry* **34**, 15979-15996

Ding, H., Robertson, D.E., Daldal, F., Dutton, P.L. (1992) Cytochrome *bc*₁ complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Q_o site: A double-occupancy Q_o site model. *Biochemistry* **31**, 3144-3158

Dutton, P.L. (1978) Redox potentiometry: Determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron transfer systems. *Meth.Enzym.* **LIV**, Academic Press, 411-435

Eichhorn, A. (2003) Konstruktion und funktionelle Charakterisierung löslicher Fragmente des Cytochrom *c*₁ aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main

Fabian, H., Schultz, C., Backmann, J., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H.H., Naumann, D. (1994) Impact of point mutations on the structure and stability of ribonuclease T1 in aqueous solution probed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 10725-10730

Gao, F., Qin, H., Knaff, D.B., Zhang, L., Yu, L., Yu, C.A., Ondrias, M.R. (1998) Q-band Resonance Raman spectra of oxidized and reduced mitochondrial bc_1 complexes. *Biochemistry* **37**, 9751-9758

Gao, F., Qin, H., Simpson, M.C., Shelnut, J.A., Knaff, D.B., Ondrias, M.R. (1996) Isolation and characterization of vibrational spectra of individual heme active sites in cytochrome bc_1 complexes from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry* **35**, 12812-12819

Gennis, R.B., Barquera, B., Hacker, B., van Doren, S.R., Arnaud, S., Crofts, A.R., Dawidson, E., Gray, K.A., Daldal, F. (1993) The bc_1 complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**(3), 195-209

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruyschaert, J.M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy; II. experimental aspects, side chain structure and H/D exchange. In Hilderson, H.J., Ralston *Subcellular Biochemistry* **23: Physicochemical Methods in the study of biomembranes**, chapter 9, 363-403, Plenum Press New York

Gottwald, W., Wachter, G. (1997) "IR-Spektroskopie für Anwender", Wiley-VCH Weinheim, Berlin

Hanafi, M., Shibata, K., Ueki, M., Taniguchi, M. (1996) UK-2A, B, C und D, novel antifungal antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02. II. Structural elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* **49**(12), 1226-1231

Hasegawa, K., Ono, T.-A., Noguchi, T. (2000) Vibrational spectra and ab initio DFT calculations of 4-methylimidazole and its different protonation forms: Infrared and Raman markers of the protonation state of a histidine side chain. *J. Phys. Chem. B* **104**, 4253-4265

Haris, P.I., Chapman, D. (1994) Analysis of polypeptide and protein structures using Fourier transform infrared spectroscopy. In *Methods in Molecular Biology*, Hrsg.: Mulloy, J.B., Thomas, A.H., Human Press Inc, Totowa, N.J.

Heinze, J. (1984) Cyclovoltammetrie-die "Spektroskopie" des Chemikers. *Angewandte Chemie* **11**, 823-916

Hellwig, P. (1998) Elektronen- und Protonentransfer in der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., Mäntele, W. (1998b) Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans* investigated by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 7390-7399

Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., Mäntele, W. (1999a) Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme *a* and *a*₃ redox reactions in the cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*: Separation of heme *a* and *a*₃ contributions and assignment of vibrational modes. *Biochemistry* **38**(6), 1685-1694

Hellwig, P., Mogi, T., Tomson, F., Gennis, R., Iwata, J., Miyoshi, H., Mäntele, W. (1999b) Vibrational modes of ubiquinone in cytochrome *bo*₃ from *E. coli* identified by FTIR difference spectroscopy and specific ¹³C labeling. *Biochemistry* **38**, 14683-14689

Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., Mäntele, W. (1996) Carboxyl group protonation upon reduction of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy. *FEBS Letters* **385**, 53-57

Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mäntele, W., Friedrich, T. (2000) FTIR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *E. coli*: Oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain. *Biochemistry* **39**, 10884-10891

Hellwig, P. (1995) Elektrochemische und FTIR-spektroskopische Untersuchungen an Ubichinonen, Semichinonanionen und ihren Protonierungsprodukten. Diplomarbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Herzberg, G. (1967) in *Molecular spectra and molecular structure: II Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules*. D. van Nostrand Company Inc. Princeton NJ, 227-238.

Howell, N., Robertson, D.E. (1993) Electrochemical and spectral analysis of the long-range interactions between the Q_o and Q_i sites and the heme prosthetic groups in ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase. *Biochemistry* **32**, 11162-11172

Hu, S., Morris, I.K., Singh, J.P., Smith, K.M., Spiro, T.G. (1993) Complete assignment of cytochrome *c* resonance Raman spectra via enzymatic reconstitution with isotopically labeled hemes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12446-12458

Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Roßmanith, T., Michel, H. (2000) Structure at 2,3 Å resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody fragment. *Structure* **8**(6), 669-684

Hunte, C. (2001) Insights from the structure of the yeast cytochrome *bc*₁ complex: crystallization of membrane proteins with antibody fragments. *FEBS Letters* **504**(3), 126-132

Hunte, C., Solmaz, S., Lange, C. (2002) Electron transfer between yeast cytochrome *bc*₁ complex and cytochrome *c*: a structural analysis. *BBA* **1555**, 21-28

Iwaki, M., Giotta, L., Akinsiku, A.O., Schägger, H., Fisher, N., Breton, J., Rich, P. (2003) Redox-induced transitions in bovine cytochrome *bc*₁ complex studied by perfusion induced ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **42**(38), 11109-11119

Iwata, M., Björkman, J., Iwata, S. (1999) Conformational change of the Rieske [2Fe-2S] protein in cytochrome *bc*₁ complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**(3), 169-175

Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Science* **281**, 64-71

Iwata, S., Saynovits, M., Link, T.A., Michel, H. (1996) Structure of a water soluble fragment of the Rieske iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial *bc*₁ complex determined by MAD phasing at 1,5 Å resolution. *Structure* **4**, 567-579

Jagow, G. von, Link, T.A. (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc*₁ complex. *Methods Enzymol.* **126**, 253-271

Jagow, G. von, Ohnishi, T. (1985) The chromone inhibitor stigmatellin-binding to the ubiquinol oxidation center at the c-side of the mitochondrial membrane. *FEBS* **2592**(185), 311-315

Jagow, G. von, Geier, B.M., Link, T.A. (1997) The mammalian mitochondrial respiratory chain. In Gräber, P., Milazzo, G. *Bioenergetics*, chapter 6, 273-309, Birkhäuser Verlag Basel

Jünemann, S., Heathcote, P., Rich, P.R. (1998) On the mechanism of quinol oxidation in the *bc*₁ complex. *J. Biol. Chem.* **273**(34), 21603-21607

Kim, H., Xia, D., Yu, C., Xia, J., Kachurin, A., Zhang, L., Yu, L. (1998) Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial *bc*₁ complex from bovine heart. *PNAS USA* **95**, 8026-8033

Knippers, R. (1997) "Molekulare Genetik", 7. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Korn, M. (1994) Doppeldeletion der Cytochrom *c* Oxidase und -Reduktase (*cta*- und *fbc*-Operon) in *Paracoccus denitrificans*. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Kurowski, B., Ludwig, B. (1987) The genes of the *Paracoccus denitrificans bc*₁ complex. *J. Biol. Chem.* **262**(28), 13805-13811

Lange, C., Hunte, C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome *bc*₁ complex with its bound substrate cytochrome *c*. *PNAS USA* **99**(5), 2800-2805

Lange, C., Nett, J.H., Trumpower, B.L., Hunte, C. (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome *bc*₁ complex structure. *EMBO J.* **20**(23), 6591-6600

Link, T.A. (1997) The role of the Rieske iron-sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_P) site of the cytochrome *bc*₁ complex. *FEBS Letters* **412**, 257-264

Li, X.Y., Czernuszewicz, R.S., Kincaid, J.R., Su, Y.O., Spiro, T.G. (1990) Consistent porphyrin force field 1. Normal mode analysis for Nickel porphine and Nickel tetraphenylporphine from resonance Raman and infrared spectra and isotope shifts. *J. Phys. Chem.* **94**, 31-47.

Link, T.A. (1999) The structures of Rieske and Rieske-type proteins. *Advances in Inorganic Chemistry* **47**, 83-157.

Link, T.A., Hatzfeld, O.M., Unalkat, P., Shergill, J.K., Cammack, R., Mason, J.R. (1996) Comparison of the Rieske-[2Fe-2S] center in the *bc*₁ complex and in bacterial dioxygenases by circular dichroism spectroscopy and cyclic voltammetry. *Biochemistry* **35**, 7546-7552

Link, T.A., Saynovits, M., Assmann, C., Iwata, S., Ohnishi, T., Jagow, G. von (1996) Isolation, characterization and crystallisation of a water-soluble fragment of the Rieske iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial *bc*₁ complex. *Eur. J. Biochem.* **237**, 71-75

Ljungdahl, R.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E., Trumpower, B.L. (1987) Purification of highly active cytochrome *bc*₁ complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *BBA* **891**, 227-241

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275

Ludwig, B., Suda, K., Cerlett, N. (1983) Cytochrome *c*₁ from *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **137**, 597-602

Mäntele, W. (1993) Infrared vibrational spectroscopy of the photosynthetic reaction center. In: *The photosynthetic reaction center*, Volume 2, chapter 10, 239-283, Academic Press

Mäntele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **18**(6), 197-202

Martinez, S.E., Huang, D., Szczepaniak, A., Cramer, W.A., Smith J.L. (1994) Crystal structure of chloroplast cytochrome *f* reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure* **2**(2), 95-105

Meinhardt, S.W., Yang, X.m Trumpower, B.L., Ohnishi, T. (1987) Identification of a stable ubisemiquinone and characterization of the effects of ubisemiquinone oxidation-reduction status on the Rieske iron-sulfur protein in the three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **262**(18), 8702-8706

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144

Mitchell, P. (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* **59**, 137-139

Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. theor. Biol.* **62**, 327-367

Miyoshi, H. Tokutake, N., Imaeda, T., Akagi, T., Iwamura, H. (1995) A model of antimycin A binding based on structure-activity studies of synthetic antimycin A analogues. *BBA* **1229**, 149-154

Le Moigne, C., Schoepp, B., Othman, S., Vermeglio, A., Desbois, A. (1999) Distinct structures and environments for the three hemes of the cytochrome *bc*₁ complex from

Rhodospirillum rubrum. A resonance Raman study using B-band excitations. *Biochemistry* **38**, 1066-1076

Moore, G.R., Pettigrew, G.W. (1990) "Cytochromes *c*", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., Mäntele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. *Eur. J. Biochem.* **187**, 565-572

Nabedryk, E., Breton, J., Okamura, M.Y., Paddock, M.L. (1998) Proton uptake by carboxylic acid groups upon photoreduction of the secondary quinone (Q_B) in bacterial reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: FTIR studies on the effects of replacing Glu H173. *Biochemistry* **37**, 14457-14462

Nett, J.H., Hunte, C., Trumppower, B.L. (2000) Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome *bc*₁ complex. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5777-5782

Nonella, M., Brändli, C. (1996) Density functional investigation of methoxy-substituted p-benzoquinones: conformational analysis and harmonic force fields of 2-methoxy- and 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinone. *J. Chem. Phys.* **100**, 14549-14559

Ogoshi, H., Saito, Y., Nakamoto, K. (1972) Infrared spectra and normal mode coordinate analysis of metalloporphyrines. *J. Chem. Phys.* **57**, 4194-4202

Ohnishi, T., Brandt, U., Jagow, von G. (1988) Studies on the effect of stigmatellin derivatives on cytochrome *b* and the Rieske iron-sulfur cluster of cytochrome *c* reductase from bovine heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **176**, 385-389

Pálsdóttir, H., Hunte, C. (2002) Purification of the Cytochrome *bc*₁ Complex from Yeast. In *Membrane Protein Purification and Crystallization 2/e: A Practical Guide*, chapter 11, 191-203. Elsevier Science

Pennock, J.F. (1965) Spectroscopy of quinones and related substances. II. Infrared absorption spectra and nuclear magnetic resonance spectra. In *Biochemistry of quinones* (Morton, R.A., ed.), Academic Press New York, 67-87

Pfützner, U. (2000) Protonentranslokation in der Häm-*aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*-eine Mutagenesstudie. Dissertation, Johann Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt/Main

Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O.M. (1998) Cytochrome *c* oxidase (heme *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *J Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97

Remy, A., Boers, R.B., Egorova-Zachernyuk, T., Gast, P., Lugtenburg, J., Gerwert, K. (2003) Does different orientation of the methoxy groups of ubiquinone-10 in the reaction centre of *Rhodobacter sphaeroides* cause different binding at QA and QB? *Eur. J. Biochem.* **270**(17), 3603-3609

Rich, P.R. (1984) Electron and proton transfer through quinones and cytochrome *bc* complexes. *BBA* **768**, 53-79

Rich, P.R., Jeal, A.E., Madgwick, S.A., Moody, A.J. (1990) Inhibitor effects on redox-linked protonations of the *b* haems of the mitochondrial *bc*₁ complex. *BBA* **1018**, 29-40

Ritter, M., Anderka, O., Ludwig, B., Mäntele, W., Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the *bc*₁ complex from *Paracoccus denitrificans*: Evidence for protonation reactions coupled to quinone binding. *Biochemistry* **42**, 12391-12399

Rothschild, K.J., He, Y., Gray, P., Roepke, P.D., Pelletier, S.L., Brown, R.S., Herzfeld, J. (1989) Fourier transform infrared evidence for proline structural changes during bacteriorhodopsin photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9832-9835

Salerno, J.C., Xu, Y., Osgood, M.P., Kim, C.H., King, T.E. (1989) Thermodynamic and spectroscopic characteristics of the cytochrome *bc*₁ complex. *J. Biol. Chem.* **264**(26), 15398-15403

Scholes, P.B., McLain, G., Smith, L. (1971) Purification and properties of a *c*-type cytochrome from *Micrococcus denitrificans*. *Biochemistry* **10**, 2072-2076

Schröter, T., Hatzfeld, O., Gemeinhardt, S., Korn, M., Friedrich, T., Ludwig, B. (1998) Mutational analysis of residues forming hydrogen bonds in the Rieske [2Fe-2S] cluster of the cytochrome *bc*₁ complex in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 100-106

Sharp, R.E., Chapman, S.K. (1999) Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins. *BBA* **1432**, 143-158

Sharp, R., Moser, C., Gibney, B., Dutton, P. (1999) Primary steps in the energy conversion reaction of the cytochrome *bc*₁ complex Q_o site. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**(3), 225-233

Siedow, J.N., Power, S., de la Rosa, F., Palmer, G. (1978) The preparation and characterization of highly purified enzymically active complex III from bakers yeast. *J. Biol. Chem.* **253**(7), 2392-2399

Slater, E.C. (1973) The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin. *BBA* **301**, 129-154

Soriano, G., Ponamarev, M., Carell, C., Xia, D., Smith, J., Cramer, W. (1999) Comparison of the cytochrome bc_1 complex with the anticipated structure of the cytochrome b_6f complex: de plus ça change de plus c'est la même chose. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**(3), 201-213

Speiser, B. (1981) Elektrodenreaktionen und Chronoamperometrie. *Chemie in unserer Zeit* **1**, 21-26

Spiro, T.G., Stong, J.D., Stein, P. (1979) Porphyrin core expansion and doming in heme proteins. New evidence from resonance Raman spectra of six coordinate iron (III) hemes. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 2648-2655.

Takimoto, H., Machida, K., Ueki, M., Tanaka, T., Taniguchi, M. (1999) UK-2A, B, C and D, novel antifungal antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02. IV. Comparative studies of UK-2A with antimycin A3 on cytotoxic activity and reactive oxygen species generation in LLC-PK1 cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **52**(5), 480-484

Tamura, H., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K., Masuko, M. (1999) Effect of methoxyiminoacetamide fungicide, SSF-129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science* **55**(7), 681-686

Tautu, O. (2000) Untersuchung des Einflusses der Proteinumgebung auf die Häm b Zentren des mitochondrialen bc_1 -Komplexes. Eine spektroskopische und elektrochemische Studie. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Thierbach, G., Kunze, B., Reichenbach, H., Höfle, G. (1984) The mode of action of stigmatellin, a new inhibitor of the cytochrome bc_1 segment of the respiratory chain. *BBA* **765**, 227-235

Tian, H., White, S., Yu, L., Yu, C. (1999) Evidence for the head domain movement of the Rieske iron-sulfur protein in electron transfer reaction of the cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **274**(11), 7146-7152

Tonge, P., Moore, G.R., Wharton, C.W. (1989) Fourier-transform infrared studies of the

alkaline isomerization of mitochondrial cytochrome *c* and the ionization of carboxylic acids. *Biochem. J.* **258**, 599-605

Tokutake, N., Miyoshi, H., Satoh, T., Hatano, T., Iwamura, H. (1994) Structural factors of antimycin A molecule required for inhibitory action. *BBA* **1185**, 271-278

Trumpower, B.L. (1990) Cytochrome *bc*₁ complexes of microorganism. *Microbiol. Rev.* **54**(2), 101-129

Trumpower, B.L. (1991) The three-subunit cytochrome *bc*₁ complex of *Paracoccus denitrificans*. Its physiological function, structure, and mechanism of electron transfer and energy transduction. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**(2), 241-255

Trumpower, B.L. (2002) A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by dimeric cytochrome *bc*₁ complex. *BBA* **1555**, 166-173

Trumpower, B.L., Haggerty, J.G. (1980) Inhibition of electron transfer in the cytochrome b-c, segment of the mitochondrial respiratory chain by a synthetic analogue of ubiquinone. *J. Bioenerg. Biomembr.* **12**(3-4), 151-164

Tsai, A.L., Palmer, G. (1983) Potentiometric studies on yeast complex III. *BBA* **722**, 349-363

Ueki, M., Abe, K., Hanafi, M., Shibata, K., Tanaka, T., Taniguchi, M. (1996) UK-2A, B, C and D, novel antifungal antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02. I. Fermentation, isolation, and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* **49**(7), 639-43

Ueki, M., Machida, K., Taniguchi, M. (2000) Antifungal inhibitors of mitochondrial respiration: discovery and prospects for development. *Curr. Opin. Anti-infective investigational drugs* **2**(4), 387-398

Vanneste, W.H. (1966) Molecular proportions of the fixed cytochrome components of the respiratory chain of Keilin-Hartree particles and beef heart mitochondria. *BBA* **113**, 175-178

Venyaminov, S., Kalnin, N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water solutions. I: Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* **30**, 1243-1257

Venyaminov, S., Kalnin, N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α -, β -,

and random coil conformations. *Biopolymers* **30**, 1259-1271

Voet, D., Voet, J.G. (1994) "Biochemie", VCH Weinheim

de Vries, S. (1986) The pathway of electron transfer in the dimeric QH₂:cytochrome *c* oxidoreductase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**(3), 195-224

de Vries, S., Berden, J.A., Slater, E.C. (1980) Properties of a semiquinone anion located in the QH₂:cytochrome *c* oxidoreductase segment of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Letters* **122**(1), 143-148

de Vries, S., Marres, C.A.M. (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *BBA* **895**, 205-239

de Vries, S., Cherepanov, A., Berg, A., Canters, G.W. (1998) Spectroscopic investigations on the water-soluble fragment of the Rieske [2Fe-2S] protein from *Paracoccus denitrificans*. *Inorg. Chim. Acta* **275/276**, 493-499

Wilson, G.S. (1978) Determination of oxidation-reduction potentials. *Meth. Enzym.* **LIV**, Academic Press, 396-410

Wikström, M.K.F., Berden, J. (1972) Oxidoreduction of cytochrome *b* in the presence of antimycin. *BBA* **283**, 403-420

Wolpert, M., Maneg, O., Soulimane, T., Ludwig, B., Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the Cu_A center in the cytochrome *c* oxidase from *T. thermophilus* for the spectral range from 1800-450 cm⁻¹. In Vorbereitung

Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc*₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60-67

Xiao, K., Yu, L., Yu, C.A. (2000) Conformation of the involvement of protein domain movement during the catalytic cycle of the cytochrome *bc*₁ complex by the formation of an intersubunit disulfide bond between cytochrome *b* and the iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.* **275**(49), 38597-38604

Yang, X., Trumppower, B.L. (1986) Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **261**(26), 12282-12289

Yang, X., Trumpower, B.L. (1988) Protonmotive Q-cycle pathway of electron transfer and energy transduction in the three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **263**(24), 11962-11970

Yu, C.A., Yu, L., King, T.E. (1974) Soluble cytochrome *bc*₁ complex and the reconstitution of succinate-cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* **249**(15), 4905-4910

Yu, C., Zhang, L., Deng, K., Tian, H., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., Yu, L. (1999) Structure and reaction mechanisms of multifunctional mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Biofactors* **9**, 103-109

Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, L.W., Huang, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc*₁. *Nature* **392**, 677-682

Zhang, Z., Snyder, C., Trumpower, B.L., Yu, L., Yu, C.A. (1999) Determination of the binding rate constants of stigmatellin and UHDBT to bovine cytochrome *bc*₁ complex by cytochrome *c*₁ oxidation. *FEBS Letters* **460**, 349-352

7.1 Aminosäuresequenzen der bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* und *S. cerevisiae*

(A) Vergleich der Sequenzen der bc_1 -Komplexe aus *P. denitrificans* und *Rb. capsulatus* (nach Kurowski & Ludwig 1987):

Cytochrom *b*

```

          30              60              90              120
MAGIPHDHYEPTKGFERWLHRRRLPIVSLVYDTLMIPTPKNLNWWWIWIWGLVLAFLVLAQIATGIVLVMHYTPHVDLAFASVEHIMRDVNGGYMLRYLHANGASLFFLAVYIHIFRGLYYGS
MSGIPHDHYEPTKGFIEKWLHRRRLPIVGLVYDTIMIPTPKNLNWWWIWIWGLVLAFLVLAQIATGIVLVAIDYTPHVDLAFASVEHIMRDVNGGWAMRYIHANGASLFFLAVYIHIFRGLYYGS

          150              180              210              240
YKAPREVTWIVGMLIYLLMMGTAFMGYVLPWQMSFWGATVITGLFGAIPGVGEAIQTWLLGGPAVDNPTLNRFFSLHYLLPFVIAALVVVHIWAFHTTGNNNPTGVEVRRGSKEEAKKD
YKAPREITWIVGMVYIYLLMMGTAFMGYVLPWQMSFWGATVITGLFGAIPGIGPSIQAWLLGGPAVDNPTLNRFFSLHYLLPFVIAALVAIHIWAFHTTGNNNPTGVEVRRTSKADAEDK

          270              300              330              360
TLFPWFYFVVKDLFALAVLVVFFAIVGFMPNYLGHDPNYIEANPLVTPAHIVPEWYFLPFYAILRAFTADVWVVMVWLSFGIIDAKFFGVIAMFGAILVMALVPWLDTSRVRSGQYR
TLFPWFYFVVKDLFALAVLVVFFAIVGFMPNYLGHDPNYIQANPLSTPAHIVPEWYFLPFYAILRAFAADVVVVIIVDGLTFGIVDAKFFGVIAMFGAIVMALVPWLDTSKVRSGAYR

          390              440
PLFKWVWVLLAVDFVVMWVGAMPAEAGIYPIYIALAGSAYWFAYFLIILPLLGIIEKPDAMPQTIEEDFNHYGPEVTHPAE
PKFRMWFVWVLLVDFVVMWVGAMPEEYPIYIYSLIASTYWFAYFLIILPLLGATEKPEPIPASIEEDFNHYGN---PAE
P. denitrificans
Rh. capsulatus

```

Cytochrom *c*₁

```

          30              60              90              120
MTLRNASLTVAALTVLAVAGGAVADASTAPGTTAPAGSSYHTNEAAPAAADTAPAAEADEPAEEEAAGEAEVTEEPAATETPAEEPADEPAATEEPADEAAEPAEEEAQATTEEAPA
P. D.

          150              180              210              240
EPEAAEPAEAEPAEPAADAPAEAAAEEPAEPEAAAEEPAEEPEATEEEPAEAAAEEPAEVEVEDEAAAADHGDAAAQAGDASHAAHIEDISFSFEGPFCKFDQHQLQRGLQV
P. D.
MKLLIISAVSALVILGSGAALANSNVQDHAFSFEIGFVKFDQQLRRGFQV
R. C.

          270              300              330              360
YTEVCSACHGLRYVPLRLTADDEGGPQLPEDQVRAAYANFD-ITDPEETEEDRPRVPIIDHFTVSGEGMG-----PDSLMAKARAGFHGYPYGTGLSGLFNGLGPEYIHAVLTGYDG
YSEVCSACHGMKFPVIRTLSDGGPQLDPTFVREYAAGLDTIIDKDSGEERDRKETDMFPTRVGDGMG-----PDSLVMKARAGFSGPAGSGMNQLFKGIGGPEYIYRYVTGFPE

          360              380              410              450
EEKEEAGA---VLYHNAAF-----AGNWIQMAAPLSDQVTVYEDGTPATVDQMATDVAFLMWTAEPKMMDRQVGFVSVIFLIVLAALLYLTNKKLWQPIKHPRKPE
ENPACAPEGIDGYYYNEVFQVGGVPTCKDAAGIKTHGSWAQMPALFDDLVTYEDGTPATVDQMGQDVASFLMWAAPKLVARKQMGVAVVMLGLLSVMLYLTNKKLWQPIKHPRKPE

```

Rieske-Protein

```

P. denitrificans      1              40              70
MSHADEHAGDHGATRRDFLYYATAGAGTV--AAGAAA--WTLVNQMNPSADVQALASIQVDVSGVETGTQLTVK
Rh. capsulatus      MSHAEDNAG----TRRDFLYHATAATGVV-VTGAAV--WPLINQMNASADVQAMSSIFIVDVSVEGTVQLTVK

          100              130              160              190
WLKGPVFIRRRTEDEIQAGREVLDLQGLIDRSAQNSNKPDPATDENRTMDEA-----GEWLVMIIGVCTHLGCVPVIGDGAGDFGGWFCPCCHGSHYDTSGRIRRGAPQNLHIPVAEFLDDTTIKLG
WRKGPVFIRRRDEKIELARSVPLGALRDTSAENANKPGAETDENRSLAADFCTNTGEWLVMIIGVCTHLGCVPMDGKSGDFGGWFCPCCHGSHYSAGRIRKGPAPRNLDIPVAEFDVETTIKLG

```

(B) Vergleich der Gensequenzen der katalytischen Untereinheiten der bc_1 -Komplexe aus *S. cerevisiae* und *Rh. capsulatus* (nach Brandt & Trumpower 1994):Cytochrom *b*

```

1-----10-----30-----60-----90
MA-----FRKSNVYLSLVNSYIIDSPQPSSINYNWMMGSLGLCLVIQIVTGIFMAMHYSSNIELAFSSVEHIMRDVHNGYILRYLHANGASFFFMVFMHMAKGLYYGSYRSPRVTLW
MSGIPHDIHYEPEKTKIEKWLHDLRPIVGLVYDTIM-IPFPKLNWNIWGIWLAFTVLVQIVTGIVLAIDYTPHVDLAFASVEHIMRDVNGGWAMRYIHANGASLFFLAVYIHFRLGLYYGSYKAPREITW
1-----30-----60-----90-----120
120-----150-----180-----210-----230
NVGVIIIFILTIATAFLGYCCVYGQMSHWGATVITNLSAIPFVGNDIVSWLWGGFVSNSPTIQRFALHLYVFPFIIAAMVIMHLMALHIGSSNPLGIT-----GNLDRIPMHSYFIFKDLVTVFLF
IVGMVYLLMMGTAFMGVLPWQMSFWGATVITGLFGAIPGIGPSIQAWLLGGPAVDNPTLNRFSLHLYLFPVIAALVAIHIAWAFHTGNNNPTGVEVRRTSKADAEDTLFPWFYVFIKDLFALALV
150-----180-----210-----240
MLILALFVYSPNTLGHDPNYIPGNLVTASIVPEWYLLPFYAILRS-----IPDKLLGVITMFAAILVLLVLPFTDRSVVRGNTFKVLSKFFFFIFVFNFVLLGQIGACHVEVPY
LLGFFAVVAYMNPYLGHDPNYIQANPLSTPAHIVPEWYFLPFYAILRAFAADVWVVLVDGLTFGIVDAKFFGVIAMFGATAVMALAPWLDTSKVRSGAYRPFKRMWFWFLVLDVVLTVWGAMPEYEPY
270-----300-----330
VLMGQIATFIYFAYFLIIVPVIETIENLVFYIGRVNK S.C.-Numerierung
DWISLIASTYWFAYFLIILPLLGAATEKPEPIPASIEEDFNSHYGN---PAE S. cerevisiae
400-----430 Rh. capsulatus
R.C.-Numerierung

```

Cytochrom c_1

```

1-----30-----60-----90-----120
MFSNLSKRWAQRTLSKSFYSTATGAASKSGKLTQKLVTAGVAAAGITASTLLYADSLTAEMATAEHGLHAPAYAWSHNGPFETFHDHASIRRGYQVYREVCAACHSLDRVAWRTLVSHTNEE VRN
MKKLLISAVSAL VLGSGAALANS NVQDHAFSFEFIFGKFDQAQLRRGFQVYSEVCSCHKMKFVPIRTLSDGGPQLDPTFVRE
1-----30-----60
MAEEFE YDEPDEQGNPKKR PGKLSDYIPGYPNEQAARAANQALPPDLSLIVKARHGGCDYIFSLLTGYPDEPPAGVALPPGSYNPYEPGGGISA MARVLFDDMV
YAAGLDTIIDKDSGEERDRKETDMFPTRVGDGMGPDLSVMAKARAGFSGPAGSGMNQLFKGM GGPEYIYNYVIGFEENPECAPEGIDGYYNKTFFQIGGVDPDCKDAAGVKITHGSWARMPPPLVDDQV
90-----120-----150-----180-----210
240-----270-----300
EYEDGTPATTSQMAKDVTTFLNWCAEPEHDERKRLGLKTVIILSSLYLLSIWVKFKWAGIKTRKVFVNPPKPRK S. cerevisiae
TYEDGTPATVDQMAQDVSAFLMWAAPKLVARKQMLVAMVMLGLLSVMLYLTNKRLWAPYKGHKA Rh. capsulatus
230-----260

```

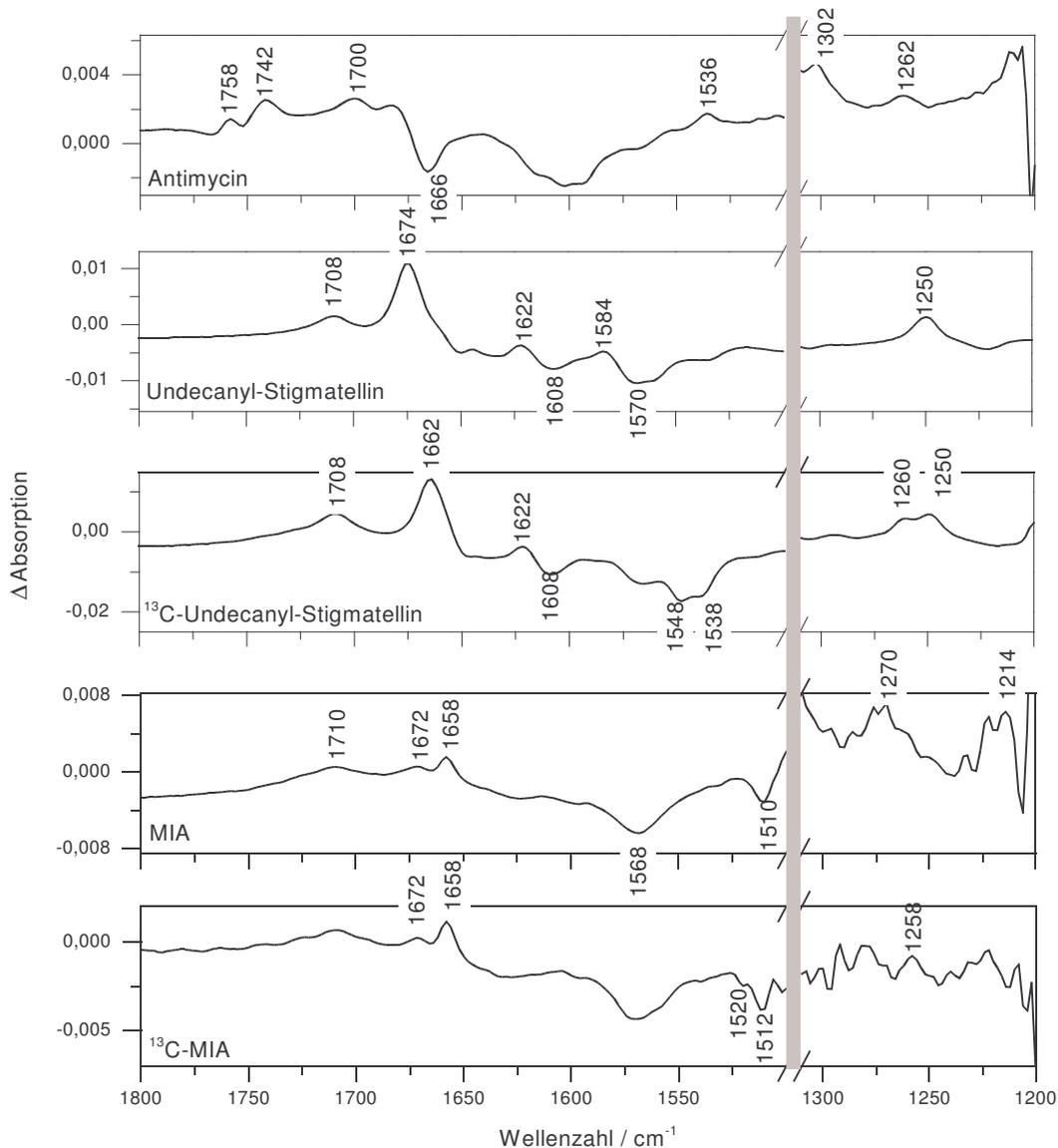
Rieske-Protein

```

1-----30-----60-----90
S. cerevisiae MLGIRSSVKTCFKPMSTLSKRLISTSLASKSTYRTPNFDVLEKENDADKGRSYAYFMVGMGLSSAGAKSTVETFISSMTATADVLMAMKEVNLAAPLKG
Rh. capsulatus MSHAEDN AGTRRDFLYHATAATGVVVGTAA VWPLINQMNASADV KAMASIFVDVSAVEVGT
1-----30-----60
NVVVKWQKPVFIRHRTPEIQEANSVDMSALKDPQTDADRVDKP QWLLIMLGICTHLGCVP IGE AGDFGGQFCPCCHGSHYDISGRIRKGPAPINLEIPAYEF DGDKVIIVG
QLTVKWRGKPVFIRRRDEKDIELARSVPLGALRDTSAENANKPGAETDENRTLPAFDGTNTGEWLVMVGLVCTHLGCVPMGDKSGDFGGWFPCCHGSHYSAGRIRKGPAPRNLDIPVAADFVDETTIKLG
90-----120-----150-----180-----210

```

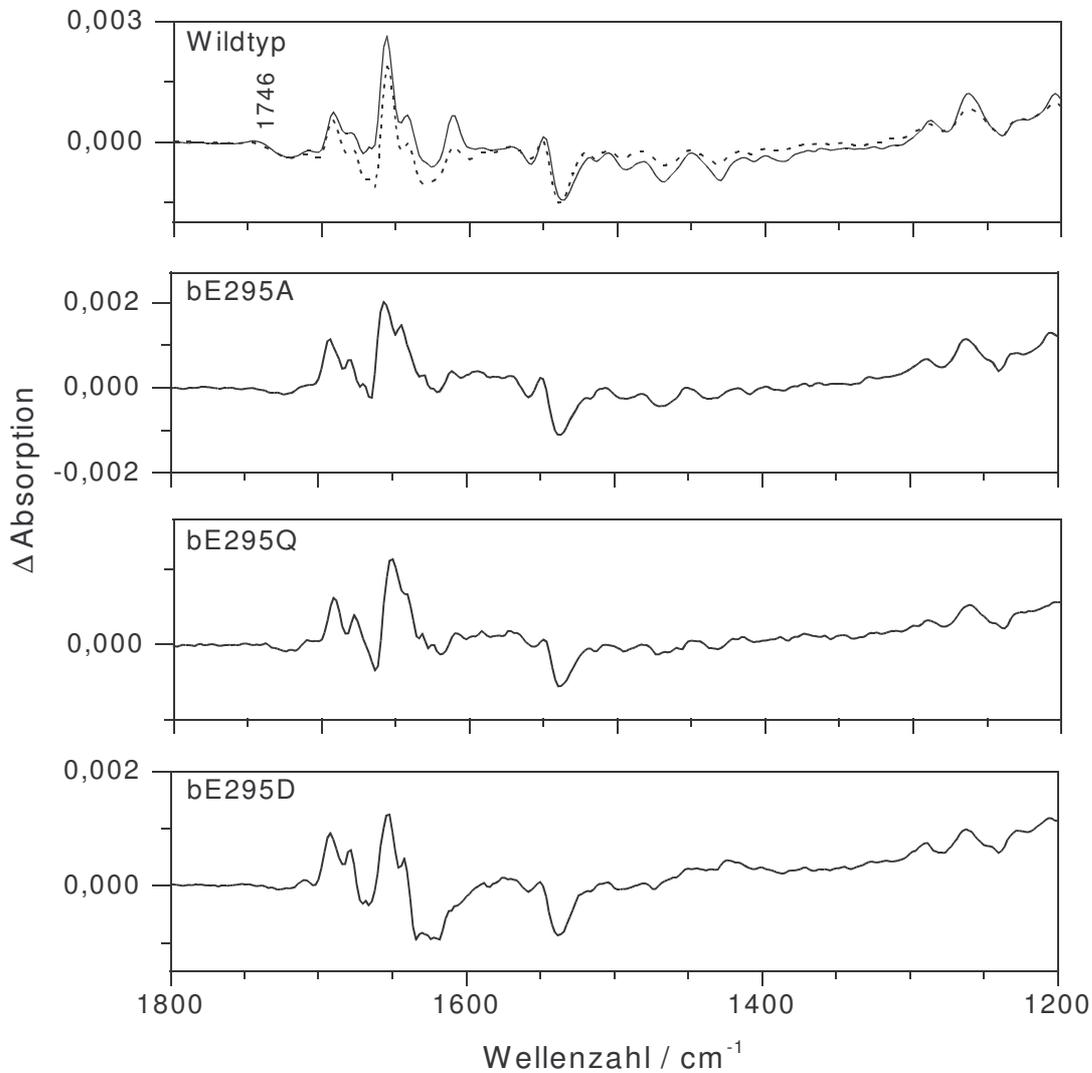
7.2 FTIR-Differenzspektren ausgewählter Inhibitoren



Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren der Inhibitoren Antimycin A, Undecanyl-Stigmatellin, ¹³C-Undecanyl-Stigmatellin, MIA und ¹³C-MIA aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V.

Die Inhibitoren wurden mit einer 2 mM Lösung in Monodeutero-Ethanol (CH₃-OD) vermessen, das im Bereich von 1800 bis 1500 und 1300 bis 1200 cm⁻¹ keine eigenen Infrarotsignale aufweist. Zwischen 1500 und 1200 cm⁻¹ werden die Inhibitorsignale von Beiträgen des Lösungsmittels überlagert. Dieser Bereich wurde in den Spektren ausgeblendet (grauer Kasten).

7.3 FTIR-Differenzspektren der *P. denitrificans*- bc_1 -Komplex Mutanten E295A, E295Q und E295D

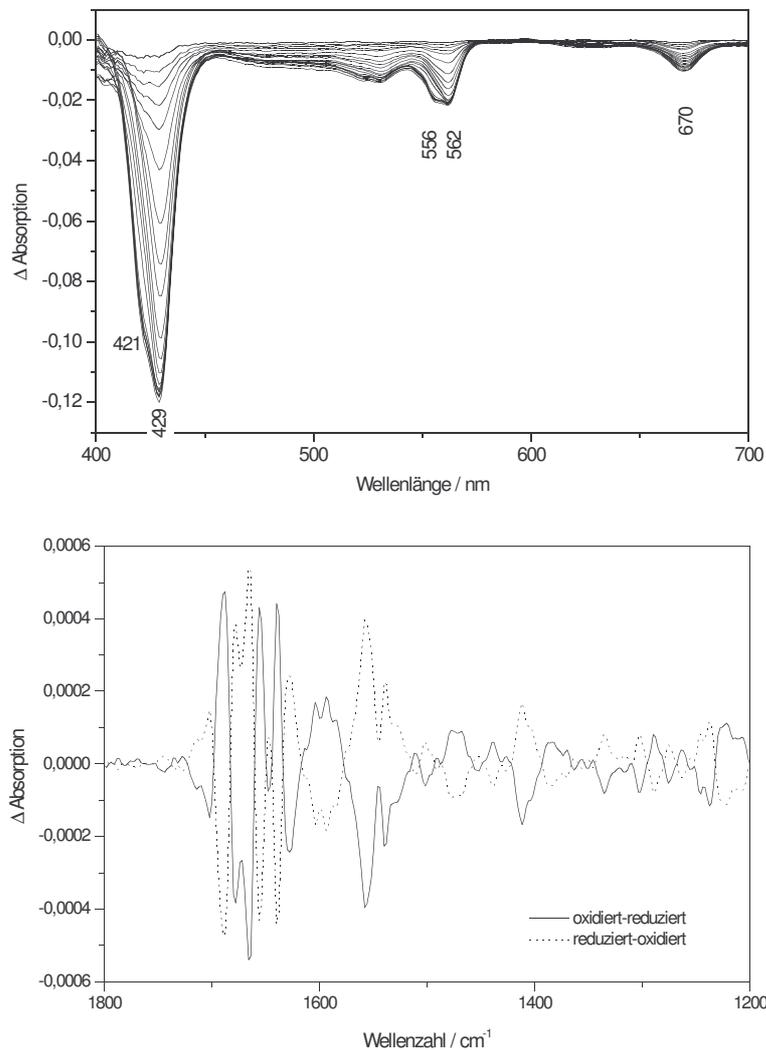


Die Zuordnung der Beiträge von Aminosäureseitenketten kann nur durch ortsgerichtete Mutagenese der betreffenden Aminosäure abgesichert werden. Im Rahmen der Arbeit wurde damit begonnen, drei *P. denitrificans*-Mutanten des in Kapitel 4.1 diskutierten Glu295 aus der Cytochrom *b*-Untereinheit zu untersuchen. Dabei wurde die Glutaminsäure durch Alanin (A), Glutamin (Q) bzw. Asparaginsäure (D) ersetzt (A. Stöcker, Institut für Biochemie der J.W.-Goethe-Universität Frankfurt/Main). Alle Mutanten zeigten einen deutlichen Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp.

In der Abbildung sind die elektrochemisch induzierten Differenzspektren der drei Mutanten und des Wildtypes dargestellt. Die durchgezogene Linie im Wildtypspektrum zeigt das aus der Diskussion bekannte Spektrum des bc_1 -Komplexes, die gepunktete Linie ein Wildtypspektrum unter modifizierten Präparationsbedingungen. Die beiden Spektren unterscheiden sich im Bereich der Amid I-Bande und der Signale der gebundenen Chinone. Der Grund für die

Unterschiede muß noch geklärt werden. Da auch die Mutanten nach einem leicht veränderten Präparationsprotokoll isoliert wurden, wurden sie im Rahmen der Diskussion noch nicht ausgewertet. Es zeigen sich jedoch klare Veränderungen im Bereich der dem mutierten Glu zugeordneten Bande bei 1746 cm^{-1} . Ihre Intensität ist in allen Spektren der Mutanten deutlich verringert. Auch die Signale der C=O- und C=C-Schwingungen des Chinons bei 1642 und 1610 cm^{-1} sowie ein Signal bei 1680 cm^{-1} , das Beiträgen protonierter Hämpropionate zugeordnet wurde, werden beeinflusst. Für eine Interpretation der Spektren sind allerdings noch weitere Experimente notwendig.

7.4 FTIR-Differenzspektren des b_6f -Komplexes



Elektrochemisch induzierte Differenzspektren des b_6f -Komplexes des Cyanobakteriums *Synechocystis* PCC 6803 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Rögner, Ruhr-Universität Bochum) im sichtbaren (oben) und infraroten Spektralbereich (unten).

Die obere Abbildung zeigt eine oxidative Potentialtitration zur Bestimmung der Mittelpunktspotentiale der Kofaktoren im Bereich von -0.5 nach 0.5 V in 50 mV-Schritten. Die Differenzsignale der Cyt f -Untereinheit und ihres Häm finden sich im Bereich der Soretbande als Schulterstruktur bei 421 und im Bereich der α -Bande bei 556 nm. Die Cyt b_6 -Untereinheit trägt bei 562 nm bei. Bei 670 nm wird das im Komplex gebundene Chlorophyll-Molekül (Kapitel 2.1.4.1) angeregt.

Die untere Abbildung zeigt das FTIR-Differenzspektrum des b_6f -Komplexes aufgenommen für einen Potentialschritt von -0.5 nach 0.5 V und zurück. Auf die Interpretation des Spektrums wird hier nicht eingegangen, da sich die Experimente zu Zeit noch im Anfangsstadium befinden.

7.5 Chemikalien und Geräte

7.5.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien	bezogen von:
------------------------	--------------

Mediatoren:

Ferrocenylmethyltrimethylammoniumjodid	Strem Chemicals
1,1'-Ferrocendicarbonsäure	Fluka
Kaliumhexacyanoferrat-II-Trihydrat	Aldrich
1,1'-Dimethylferrocen	Aldrich
Tetrachloro-p-Benzochinon (p-Chloranil)	Sigma
Quinhydrin	Sigma
Tetramethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid	Fluka
2,6-Dichloroindophenol-Natriumsalz-Hydrat	Sigma
Ruthenium (II)-hexaminchlorid	Aldrich
1,4-Naphtochinon-Hydrat	Aldrich
Trimethylhydrochinon	Aldrich
2-Methyl-1,4-Naphtochinon (Menadion)	Aldrich
2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon	Aldrich
Anthrachinon-2-Sulfonsäure-Natriumhydra	Aldrich
Neutralrot	Fluka
Benzylviologen	Aldrich
Methylviologen	Sigma

Inhibitoren:

Stigmatellin	Fluka
UST, ¹³ C-UST, MIA, ¹³ C-MIA, UK-2	H. Myoshi, Universität Kyoto Japan
Antimycin A	Sigma
HHDBT	B. Trumpower, Dartmouth Medical School, Hanover, USA

Sonstige Chemikalien:

Borat	Sigma
Borsäure	Sigma
Cacodylat	Fluka
Chinon UQ10	Sigma
Cysteamin	Fluka
Diethylether	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
D ₂ O	Merck
Dodecylmaltosid	Fluka
HCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Aldrich
KCl	Roth
Mercaptopropionsäure	Fluka

THF
Undecylmaltosid

Merck
freundlicherweise vom Arbeitskreis von C. Hunte, MPI für
Biophysik Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt

7.5.2 Geräte/Materialien

Gerät/Material	bezogen von:
Goldnetz	Buckbee-Mears, St. Paul, USA
CaF ₂ -Fenster	Korth Kristalle Altenholz, Crystal GmbH Berlin
IR-Spektrometer	IFS 25, Bruker Karlsruhe
UV/vis-Spektrometer, Potentiostat	Werkstatt Universität Freiburg
Thermostat	Haake F3
Biofuge 13, Megafuge 1.0R	Heraeus
Micron/Centricon Y50, Y100- Mikrokonzentratoren	Amicon Bioseparations, Millipore Corporation

ICH DANKE:

Prof. Dr. Werner Mäntele

für die Vergabe des interessanten und ergiebigen Themas, die Hilfestellungen bei der Bearbeitung desselben, zugleich aber auch für die experimentelle Freiheit, die es mir ermöglichte selbständig arbeiten zu lernen sowie für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe.

PD Dr. Petra Hellwig

für die hervorragende Betreuung in allen proteintechnischen, experimentellen und theoretischen Fragen, die Hilfestellung und Unterstützung beim Verfassen meiner ersten Publikationen sowie die stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft in und außerhalb des Institutslebens.

meinen Kooperationspartnern

Prof. Dr. Bernd Ludwig und seinem Arbeitskreis am Institut für Biochemie der Universität Frankfurt,

Dr. Carola Hunte und ihrem Arbeitskreis am Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt,

Prof. Dr. Gerhard Hübner und Georg Wille vom Institut für Biochemie der Universität Halle-Wittenberg,

Prof. Dr. Hideto Miyoshi und seinen Mitarbeitern (Universität Kyoto)

für ihre Unterstützung, für die rege Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Proben und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

*Mein besondere Dank gilt Oliver Anderka vom Institut für Biochemie und Hildur Pálsdóttir vom MPI für Biophysik für ihre erstklassischen Präparationen der bc₁-Komplexe aus *P. denitrificans* und *S. cerevisiae*.*

Weiterhin möchte ich danken:

Prof. Dr. Dieter Schubert, Dr. Ute Pfitzner und Gülöz Yurt für die Unterstützung und Aufmunterung in allen Lebenslagen und dem gesamten Institut für Biophysik, besonders Oliver Klein für die Hilfe bei zahlreichen Computerproblemen und der wechselnden Besetzung des Großraumbüros, Martina Wolpert, Gamze Hosafci, Carsten Kreijtschi, sowie den „Ehemaligen“ Tatiana Nazarova, Andreas Böhm und Andreas Barth.

Zum Schluß geht ein großes Dankeschön an meinen Mann Markus sowie die Familien Obert und Ritter, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und stehen.

Die Anfertigung dieser Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 472 gefördert. Für die gewährte finanzielle Unterstützung bedanke ich mich.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Michaela Andrea Ritter
Geburtsdatum und -ort 02.07.1972 in Gotha/Thüringen
Familienstand verheiratet
Anschrift Hügelstraße 21, 64283 Darmstadt

Schulbildung

September 1979-Juli 1989 Polytechnische Oberschule, Abschluß 10. Klasse
September 1989-Juli 1991 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium (IVA), Abschluß: Abitur

Ausbildung

Oktober 1991- Februar 1992 TH Ilmenau, Studium Elektrotechnik
März 1992 - September 1992 freiwilliges Praktikum bei Firma Schunck-Werth-Meßtechnik Gießen
Oktober 1992 - Februar 1999 Studium der Physik an der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Abschluss Diplom (Note: sehr gut)
Diplomarbeitsfach Biophysik, Nebenfach Genetik
Diplomarbeit: „Genetische Veränderungen in kontinuierlichen Hefekulturen nach ultravioletter Bestrahlung niedriger Fluenzleistung“ angefertigt am Institut für Biophysik unter Anleitung von Prof. Dr. Jürgen Kiefer
April 1999 - Juli 1999 Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
seit Juli 1999 Promotionsstudium am Institut für Biophysik der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main
Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Thema: „Cytochrom *bc₁*: Eine Studie zum Elektronentransfer der *bc₁*-Komplexe des Bakteriums *Paracoccus denitrificans* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mittels elektrochemisch induzierter Differenzspektroskopie“ unter Anleitung von Prof. Dr. Werner Mäntele und PD Dr. Petra Hellwig

Beruflicher Werdegang

April 1997 - Februar 1999	studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik der Universität Gießen Praktikumsbetreuung „Physikalisches Grundpraktikum für Naturwissenschaftler“
seit Juli 1999	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biophysik der Universität Frankfurt Praktikumsbetreuung „Physik für Mediziner“ und „Biophysikalisches Praktikum für Physiker“

Weiterbildungen

Februar 1999	Grundkurs Strahlenschutz nach der Strahlenschutz- und Röntgenverordnung, Universität Gießen
seit Oktober 2002	Aufbaustudiengang „Medizinische Physik und Technik“, Universität Kaiserslautern
März 2003	Kurs „Sicherheitsbeauftragter Medizinprodukte“, Universität Kaiserslautern
September 2003	Grundkurs Strahlenschutz nach der Strahlenschutz- und Röntgenverordnung, Universität Kaiserslautern

Sonstiges

Fremdsprachen	Englisch, Polnisch (Umgangs- und Fachsprache) Französisch, Russisch (Umgangssprache, Schulkenntnisse nach 6 jährigem Schulunterricht) Finnisch (Grundkenntnisse Umgangssprache, Sprachkurs Sommeruniversität Oulu)
---------------	---