

# **Elektronentransfer zwischen Redoxkomplexen aus *Thermus thermophilus* und *Paracoccus denitrificans***

- Interaktion löslicher Module und Membranproteinexpression -

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften



von Oliver Maneg  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2003)

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann  
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig, Prof. Dr. H. Rüterjans

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

„Only entropy comes easy.“

Lewis Mumford

meiner Mutter

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das thermophile Bakterium <i>Thermus thermophilus</i>	1
1.2	Die Atmungskette von <i>Thermus thermophilus</i>	3
1.3	Die Atmungskette von <i>Paracoccus denitrificans</i>	6
1.4	Cytochrom $c_{552}$ als Elektronendonator	7
1.5	Das $Cu_A$ -Zentrum als primärer Elektronenakzeptor der Oxidase	8
1.6	Transiente Elektronentransferkomplexe	10
1.7	Ziele dieser Arbeit	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Enzyme	15
2.1.3	Lösungen	15
2.1.3.1	Plasmid-Isolierung	15
2.1.3.2	Western-Blot	15
2.1.3.3	Mutagenese	16
2.1.4	Mikroorganismen	16
2.1.4.1	Bakterienstämme	16
2.1.4.2	Anzuchtmedien	17
2.1.4.3	Lagerung	17
2.1.5	Nukleinsäuren	18
2.1.5.1	Plasmide	18
2.1.5.2	Oligonukleotide	20
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>21</b>
2.2.1	Isolierung genomischer DNA	21
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	21
2.2.3	Restriktion und elektrophoretische Auftrennung	22
2.2.4	Ligation	23
2.2.5	Herstellung $CaCl_2$ -kompetenter Zellen und Transformation	23
2.2.6	Elektroporation von <i>T. thermophilus</i>	24
2.2.7	Polymerasekettenreaktion	24
2.2.8	Mutagenese	25
2.2.8.1	Denaturierung der doppelsträngigen DNA	25
2.2.8.2	Konstruktion und Phosphorylierung der Oligonukleotide	25
2.2.8.3	Annealing- und Synthesereaktion	26
<b>2.3</b>	<b>Proteinchemische Arbeiten</b>	<b>27</b>
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.3.2	Western-Blot	27
<b>2.4</b>	<b>Proteinpräparationen</b>	<b>28</b>
2.4.1	$Cu_A$ -Domäne aus <i>P. denitrificans</i>	28
2.4.2	Cytochrom $c_{552}$ -f aus <i>P. denitrificans</i>	29
2.4.3	$Cu_A$ -Domäne aus <i>T. thermophilus</i>	30
2.4.3.1	Anzucht auf LB-Medium	30

# Inhaltsverzeichnis

---

2.4.3.2	Anreicherung mit $^{15}\text{N}$ -Stickstoff	31
2.4.4	Cytochrom $c_{552}$ aus <i>T. thermophilus</i>	31
2.4.4.1	Heterologe Expression	31
2.4.4.2	Homologe Expression des Histidin-markierten Proteins	32
2.4.5	Cytochrom $c_1$ aus <i>T. thermophilus</i>	32
2.4.6	$ba_3$ -Oxidase aus <i>T. thermophilus</i>	33
<b>2.5</b>	<b>Spektroskopische Methoden</b>	<b>34</b>
2.5.1	Optische Spektren	34
2.5.1.1	Redoxspektren	34
2.5.1.2	Pyridinhämochrom-Spektren	34
2.5.2	Kohlenmonoxid-Bindungsspektren	34
2.5.3	Redoxtitration	35
2.5.4	Stopped-flow-Kinetiken	35
2.5.5	NMR-Spektroskopie	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Cytochrom <math>c_{552}</math> und <math>\text{Cu}_A</math> aus <i>P. denitrificans</i></b>	<b>37</b>
3.1.1	Expressionssteigerung des löslichen $\text{Cu}_A$ -Fragmentes	37
3.1.2	Elektronentransferkinetiken	39
3.1.2.1	Vorversuche	39
3.1.2.2	Die Reaktion von Cytochrom $c_{552}$ mit $\text{Cu}_A$	41
3.1.2.3	Ionenstärkeabhängigkeit	44
3.1.2.4	Temperaturabhängigkeit	45
3.1.2.5	Weiterführende Analyse der bimolekularen Reaktion	47
3.1.3	Die Interaktionsfläche des Cytochrom $c_{552}$	49
<b>3.2</b>	<b>Cytochrom <math>c_{552}</math> und <math>\text{Cu}_A</math> aus <i>T. thermophilus</i></b>	<b>53</b>
3.2.1	Klonierung und Expression des Cytochrom $c_{552}$	53
3.2.2	Klonierung und Expression des $\text{Cu}_A$	54
3.2.3	Elektronentransferkinetiken	55
3.2.3.1	Vorversuche	55
3.2.3.2	Reaktion von Cytochrom $c_{552}$ mit $\text{Cu}_A$	56
3.2.3.3	Ionenstärkeabhängigkeit	57
3.2.4	Redoxpotential des $\text{Cu}_A$	58
3.2.5	Mutagenese am Elektroneneintrittspunkt des $\text{Cu}_A$	59
3.2.6	Interaktionsfläche des $\text{Cu}_A$ aus <i>T. thermophilus</i>	61
<b>3.3</b>	<b>Cytochrom <math>c_1</math> aus <i>T. thermophilus</i></b>	<b>64</b>
3.3.1	Identifizierung des $bc_1$ -Operons	64
3.3.2	Klonierung und Aufreinigung des löslichen Cytochrom $c_1$	65
3.3.3	Spektrale Charakterisierung des Cytochrom $c_1$	66
3.3.4	Elektronentransferkinetiken	68
3.3.4.1	Vorversuche	68
3.3.4.2	Der Elektronentransfer vom Cytochrom $c_1$ zum $c_{552}$	69
3.3.4.3	Ionenstärkeabhängigkeit	70
3.3.4.4	Temperaturabhängigkeit	71
<b>3.4</b>	<b>Expression in <i>T. thermophilus</i></b>	<b>72</b>
3.4.1	Konstruktion eines Expressionsvektors	72
3.4.2	$\text{His}_6$ -markiertes Cytochrom $c_{552}$	73
3.4.3	$\text{His}_6$ -markierte $ba_3$ Cytochrom $c$ Oxidase	74
3.4.3.1	Expression und Aufreinigung	74
3.4.3.2	Spektrale Charakterisierung	75

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Kinetische Untersuchungen</b>	<b>79</b>
<b>4.2</b>	<b>Kontaktflächen durch NMR-Interaktionsmessungen</b>	<b>83</b>
<b>4.3</b>	<b>Elektroneneintrittspunkt in die <i>ba</i><sub>3</sub>-Oxidase</b>	<b>88</b>
<b>4.4</b>	<b>Abweichung vom linearen Verhalten</b>	<b>89</b>
<b>4.5</b>	<b>Der <i>bc</i><sub>1</sub>-Komplex aus <i>T. thermophilus</i></b>	<b>91</b>
<b>4.6</b>	<b>Expression in <i>T. thermophilus</i></b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>115</b>

# 1 Einleitung

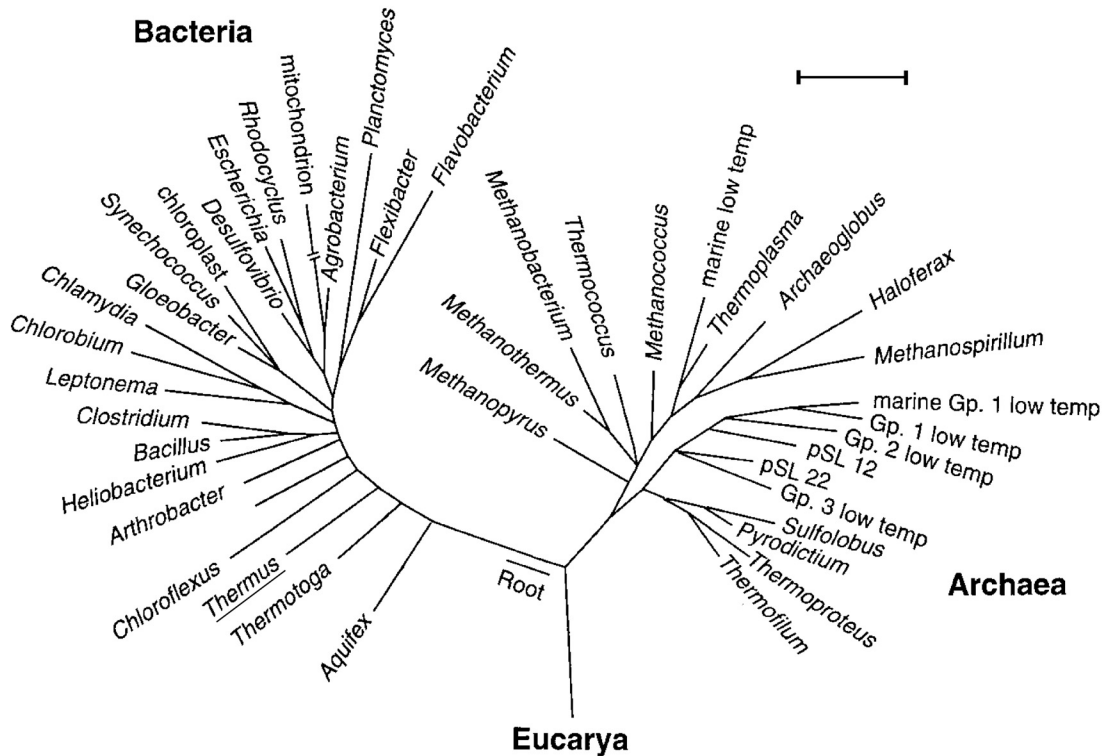
## 1.1 Das thermophile Bakterium *Thermus thermophilus*

*Thermus thermophilus* ist ein gram-negatives, extrem thermophiles Bakterium mit Wachstumstemperaturen zwischen 50 – 80 °C [1]; es wird taxonomisch aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen innerhalb des Reiches der Eubakterien dem Phylum *Deinococcus-Thermus* zugeordnet [2]. Die erste Spezies dieses Genus, *Thermus aquaticus*, wurde 1969 aus einer heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark (USA) isoliert [3]. Die ersten Kulturen von *T. thermophilus* wurden 1971 in Japan von Oshima und Imahori [4] isoliert und zunächst als *Flavobakterium thermophilum* bezeichnet, später aber in *T. thermophilus* umbenannt [5]. Die Zellen wachsen als unbewegliche Stäbchen, welche durch die Synthese von Carotinoiden gelb oder orange gefärbt sein können [6] und lange Filamente ausbilden.

Die Erstellung von taxonomischen Stammbäumen durch rRNA-Vergleiche, führt zu der Beobachtung, daß innerhalb der Bakterien nur *Aquifex* ( $t_{\max}=95$  °C) und *Thermotoga* ( $t_{\max}=90$  °C) evolutionär tiefer verwurzelt sind als das Genus *Thermus* ( $t_{\max}=80$  °C), welches damit nah zum letzten gemeinsamen Vorfahren angesiedelt wird [11, 12] (siehe auch Abbildung 1). Die einfachste Erklärung für einen solchen zentralen Verzweigungspunkt des phylogenetischen Stammbaums ist die Entstehung des ersten lebenden Organismus unter hohen Temperaturen im Verlauf der Erdgeschichte.

Thermophile Bakterien rücken zunehmend in den Fokus aktueller Forschung, da ihre Enzyme aufgrund ihrer hohen Stabilität ein enormes biotechnologisches Potential bergen. Die *Taq*-Polymerase aus *T. aquaticus* [7] ist das wohl bekannteste Beispiel und wird mittlerweile in vielen molekularbiologischen Laboratorien für die Durchführung der Polymerasekettenreaktion verwendet [8].

Mit thermophilen Organismen ist generell die Frage nach den Mechanismen ihrer Anpassung an extreme Temperaturen verknüpft. Unter anderem müssen die Zellmembranen auch bei hohen Temperaturen ihre abgrenzende Wirkung aufrecht - aber zugleich auch ihre Fluidität - erhalten. Thermoadaptationen der Membranen werden in Bakterien durch Verlängerung, Sättigung, Verzweigung und/oder Zyklisierung der Acylseitenketten erreicht [9]. In *T. thermophilus* wurden außerdem Thermozeaxanthine (Carotinoid-Glucosid-Ester) nachgewiesen, die zur Stabilisierung der Membranen bei hohen Temperaturen führen sollen [10].



**Abbildung 1:** Phylogenetischer Stammbaum basierend auf rRNA-Sequenzen; modifiziert nach N. Pace [11]. Der Maßstab entspricht 0,1 Änderungen pro Nukleotid.

Eine erhöhte Proteinstabilität kann durch Einführen zusätzlicher Ionenpaarbindungen, Optimierung von Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Wechselwirkungen und hydrophober Effekte erreicht werden. Trotzdem muß die Flexibilität eines Enzyms gewährleistet sein, um die katalytische Funktion erhalten zu können, so daß Proteine häufig dazu tendieren, bereits knapp über ihrem Temperaturoptimum zu denaturieren [12].

Ein weiterer Vorteil von Proteinen aus thermophilen Organismen ist eine generell erhöhte Stabilität, auch gegen extreme pH-Werte und Proteasen [13]. Dies ermöglicht eine einfachere Handhabung dieser Proteine und macht sie auch der Kristallisation durch ihre erhöhte Rigidität bei niedrigen Temperaturen besser zugänglich. Am RIKEN Institut in Japan wird sogar ein umfassender Ansatz zur Lösung möglichst aller dreidimensionalen Proteinkristallstrukturen aus *T. thermophilus* verfolgt, dem sogenannten „Strukturom“. Zwei herausragende Beispiele für die erfolgreiche Kristallisation von Proteinen aus *Thermus* sind die Aufklärungen der Strukturen der 30S Untereinheit des Ribosoms [14, 15] und der membranständigen *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom c Oxidase aus *T. thermophilus* [16].

Durch die Sequenzierung der sehr GC-reichen (~64 Molprozent, [1]) Genome der Stämme *T. thermophilus* HB8 (Japan) und HB27 (Göttigen Genomics Laboratory,

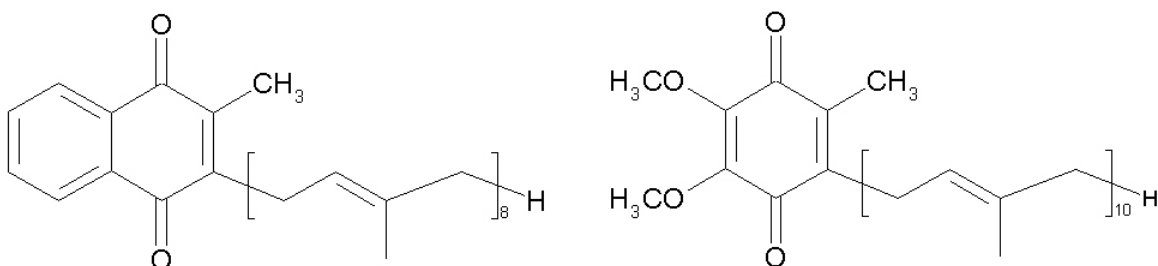


Deutschland) ergeben sich aus den in naher Zukunft zugänglichen Daten neue Möglichkeiten bei der Erforschung der Struktur-Funktionsbeziehung thermophiler Proteine. Die Entwicklung von *E. coli*-*Thermus* shuttle Vektoren [17] und einer hitzestabilen Kanamycinresistenz [18] in den vergangenen Jahren ermöglicht nun auch die molekulargenetische Manipulation dieser weit verbreiteten Bakterien.

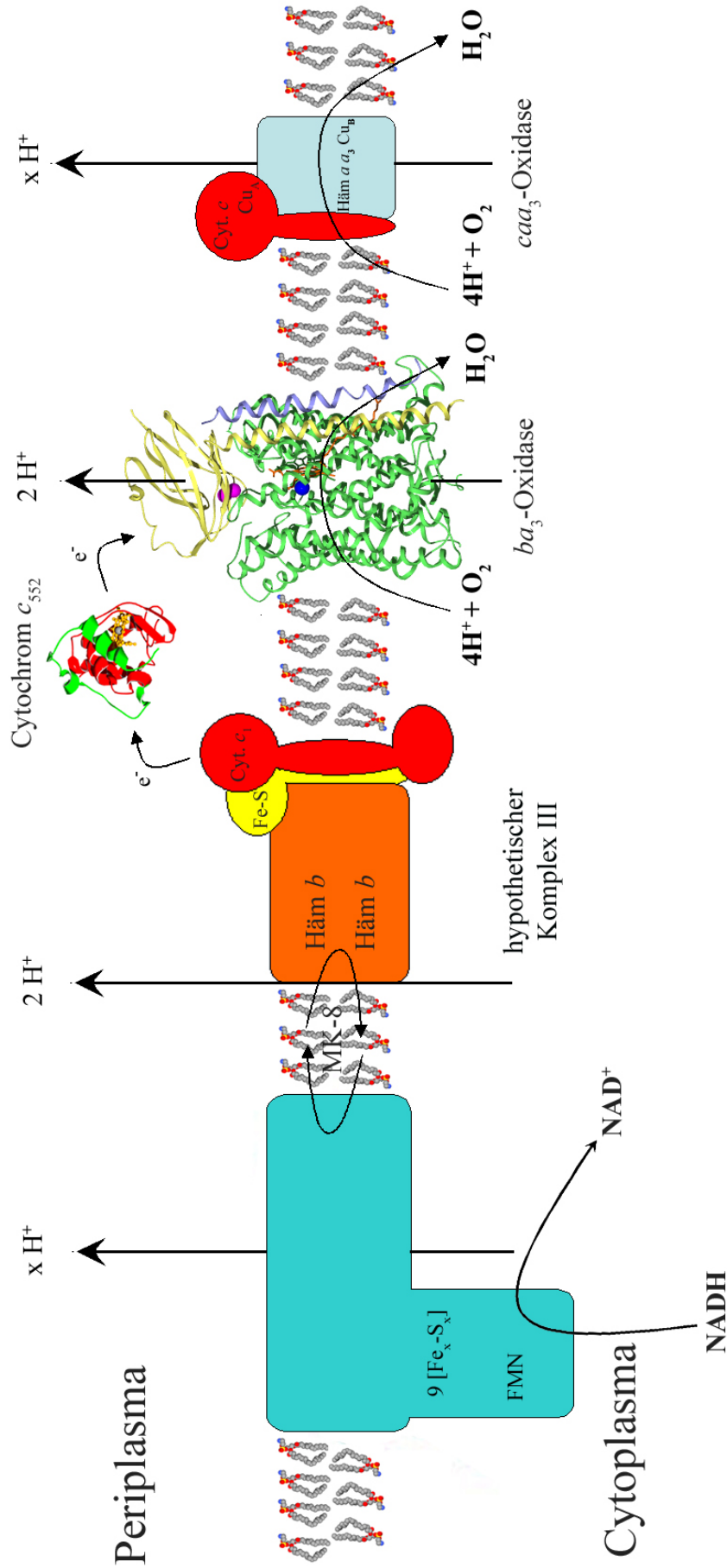
### 1.2 Die Atmungskette von *Thermus thermophilus*

In der Atmungskette von *T. thermophilus* wurden mehrere den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen homologe Enzyme identifiziert: (i) ein aus 14 Untereinheiten bestehender Komplex I [19], (ii) ein Rieske-Protein als möglicher Bestandteil eines  $bc_1$ -Komplexes [20], (iii) ein Cytochrom  $c_{552}$ , sowie (iv) zwei terminale Oxidasen, eine vom  $caa_3$ -Typ und eine  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase (siehe Abbildung 3). Weiterhin wurde ein  $c$ -Typ Cytochrom mit gespaltener  $\alpha$ -Bande und unbekannter Funktion beschrieben; sowie Menachinon-8 (siehe Abbildung 2) als einziges in *Thermus*-Membranen vorkommendes Chinon [21].

Gegenüber dem Redox-Paar Ubichinon/Ubichinol ( $E'_m = +100$  mV) ist das Mittelpunktspotential von Menachinon/Menachinol ( $E'_m = -75$  mV) erniedrigt. Dies ist aus bioenergetischer Sicht ein Nachteil, da die freiwerdende Energie bei der Elektronenübertragung von NADH auf Menachinon damit geringer ist als unter Verwendung von Ubichinon [22]. Es wird aber angenommen, daß ein Urtyp des  $bc_1$ -Komplexes Menachinon oxidierte, da die meisten Spezies nahe dem Ursprung des phylogenetischen Stammbaums einen Komplex des Niedrigpotential/Menachinon-Typs aufweisen [23]. Dies liegt in einer argumentativen Linie mit den im Laufe der Erdgeschichte zunächst geringen Sauerstoffkonzentrationen in der Atmosphäre [24].



**Abbildung 2:** Strukturformeln von Menachinon-8 (MK-8, links) und Ubichinon (Q<sub>10</sub>, rechts)



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Atmungskette von *T. thermophilus*. Menachinon-8 (MK-8) dient als Elektronenüberträger zwischen Komplex I (türkis) und dem  $bc_1$ -Komplex (orange: Cytochrom  $b_{562}$ , gelb: Rieske Eisen-Schwefelprotein, rot: Cytochrom  $c_1$ ). Cytochrom  $c_{552}$  (mit der in grün dargestellten Thermoklammer) fungiert als Substrat der  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase (gelb: Untereinheit II mit den beiden Kupferatomen des  $\text{Cu}_A$ -Zentrums in purpur, grün Untereinheit I mit den beiden Häm-Kofaktoren und  $\text{Cu}_B$  in dunkelblau, hellblau: Untereinheit IIa). Die Pumpstöchiometrien wurden bisher nur für die  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase experimentell bestimmt. Der Elektronendonator für die  $caa_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase (ganz rechts, rot: Untereinheit II mit dem Kofaktoren Cytochrom  $c$  und  $\text{Cu}_A$ , hellblau: Untereinheit I mit den beiden Häm-Kofaktoren und  $\text{Cu}_B$ ) wurde bisher nicht ermittelt.

## Einleitung

---

Im weiteren Verlauf der Evolution entwickelten sich dann Systeme, die einen Chinonpool mit höheren Mittelpunktspotentialen verwenden und die damit dem in zunehmenden Maße verfügbaren Sauerstoff Rechnung trugen. Hierbei entwickelten sich drei Lösungen: (i) die Verwendung von Ubichinon bei den Proteobakterien, (ii) Plastochinon (Cyanobakterien) und (iii) Caldariellachinon bei den Sulfolobales (Archaea). In der Gruppe der Proteobakterien hat der Übergang von Mena- zu Ubichinon wahrscheinlich bei der Entwicklung stattgefunden, die zu den  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untergruppen geführt hat [23]. So kann das zur  $\gamma$ -Untergruppe gehörende Bakterium *E. coli* sowohl Mena- als auch Ubichinon nutzen.

Das Menachinol wird in *T. thermophilus* mit großer Wahrscheinlichkeit von einem  $bc_1$ -Komplex umgesetzt, jedoch wurde bisher nur ein Rieske Eisen-Schwefelprotein als mögliche Komponente beschrieben [20]. Cytochrom  $bc$ -Komplexe scheinen sich sehr früh in der Evolution entwickelt zu haben, da sie in allen respiratorischen und photosynthetischen Elektronentransportketten gefunden werden [23].

Von diesem bisher unbekanntem Menachinol-oxidierenden Komplex würden die Elektronen dann auf Cytochrom  $c_{552}$  oder direkt auf die Oxidase vom  $caa_3$ -Typ übertragen. Cytochrom  $c_{552}$  ist das Substrat für die  $ba_3$ -Typ Cytochrom  $c$  Oxidase [25], welche bevorzugt bei geringem Sauerstoffpartialdruck exprimiert wird [26].

Diese Oxidase weist gegenüber den gut untersuchten Oxidasen des  $aa_3$ -Typs ungewöhnliche strukturelle [16] und funktionelle [27, 28, 29] Eigenschaften auf: (i) sehr geringe Sequenzidentitäten (weniger als 20 % gegenüber Untereinheiten I und II der drei anderen strukturell bekannten Cytochrom  $c$  Oxidasen) [30], (ii) einen modifizierten Kanal für das Protonenpumpen, (iii) Austausch des ansonsten hochkonservierten Glu278 (*Paracoccus*-Nummerierung) zu Isoleucin, möglicherweise zur Optimierung des  $O_2$ -Kanals [16], und (iv) eine verringerte Pumpleistung von nur  $\sim 0,5 H^+/e^-$  (gegenüber  $\sim 1 H^+/e^-$  für die *P. denitrificans* Oxidase) [31]. Über die Stöchiometrie des Protonentransfers der anderen Atmungskettenkomplexe in *Thermus*-Membranen ist bisher nichts bekannt.

Außerdem weist diese Oxidase eine sehr einfache Untereinheitenstruktur aus nur zwei Untereinheiten auf, was die Vermutung aufkommen läßt, daß es sich um eine dem Urenzym nahe kommende „Minimal“-Oxidase handeln könnte. Es findet sich zwar eine zusätzliche Untereinheit IIa, diese besteht jedoch nur aus einer kurzen transmembranen  $\alpha$ -Helix und nimmt den gleichen Platz ein wie die erste Transmembranhelix der Untereinheit II der  $aa_3$ -Oxidase aus *P. denitrificans*. Die Untereinheit II trägt die Bindungsstelle für das Substrat Cytochrom  $c_{552}$  und enthält das  $Cu_A$ -Zentrum als primären, elektronenakzeptierenden Kofaktor [32, 33]. Von hier werden die Elektronen, wie für die mitochondriale  $aa_3$ -Oxidase gezeigt wurde [34],

über Häm *a* (Häm *b* in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase) zum binukleären Zentrum (Häm *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>) der Untereinheit I transferiert, wo die terminale Reaktion, die Reduktion von molekularem Sauerstoff, stattfindet. Insgesamt werden für die vollständige Reduktion eines Sauerstoffmoleküls vier Elektronen und vier Protonen, welche von der cytoplasmatischen Seite aufgenommen werden, verbraucht.

Die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus* enthält im binukleären Zentrum ein Häm *a*<sub>S3</sub>, das aus Archaeobakterien bekannt ist und durch Austausch der Farnesylseitenkette am Häm *a* durch eine Geranylgeranylgruppe entsteht [35].

### 1.3 Die Atmungskette von *Paracoccus denitrificans*

Aufgrund seiner metabolischen Flexibilität findet das gram-negative Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* Beachtung als Modellorganismus für die Untersuchung von Atmungskettenenzymen. Insbesondere die Komplexe der Elektronentransportkette dienen häufig als Modell für die mitochondriale Atmungskette, da in *P. denitrificans* unter aeroben Anzuchtbedingungen homologe Proteine aus den Membranen isoliert werden können. Die unkomplizierte mikrobiologische Handhabung, der einfachere Aufbau der bakteriellen Elektronentransferkomplexe aus weniger Untereinheiten, und die gegenüber Eukaryoten wesentlich einfachere genetische Manipulation führen zu einer hohen Attraktivität von *P. denitrificans* als Labororganismus für die Erforschung von Enzymen der Atmungskette.

Im Rahmen der Endosymbiontentheorie [36] über die Entstehung der eukaryontischen Zelle wurde für Mitochondrien ein Vorfahr aus der  $\alpha$ -Untergruppe der Purpurbakterien vorgeschlagen [37]. Aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen wird auch *P. denitrificans* taxonomisch in diese Gruppe eingeordnet [38], eine Erklärung für die hohen Homologien der Atmungskettenkomplexe.

Bei der Glykolyse und im Citratzyklus entstehen die energiereichen Verbindungen NADH und FADH<sub>2</sub>, die ein hohes Elektronenübertragungspotential besitzen und in der Zelle fortlaufend regeneriert werden müssen. Die bei der Oxidation freigesetzten Elektronen werden über eine Reihe von asymmetrischen Transmembrankomplexen auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff unter Bildung von H<sub>2</sub>O übertragen. Zunächst werden sie von NADH durch den Komplex I (NADH : Ubichinon Oxidoreduktase [39]) auf Ubichinon (Coenzym Q) übertragen. Vom entstehenden Ubichinol werden die Elektronen durch den Komplex III (Ubichinol : Cytochrom *c* Oxidoreduktase [50]) auf Cytochrom *c* transferiert. Dieses dient als Substrat für die Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV, [40]), welche die terminale Reaktion, die Reduktion des molekularen

Sauerstoffs, katalysiert. Die in verschiedenen Teilreaktionen freiwerdende Redoxenergie wird zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt, welcher durch den Komplex V (ATP-Synthase) genutzt wird, um Adenosintriphosphat durch Phosphorylierung von ADP zu synthetisieren [41]. Die erfolgreiche Aufklärung der Kristallstruktur der *aa*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase aus Mitochondrien [42] und des bakteriellen Komplexes aus *P. denitrificans* [43] zeigen große Übereinstimmungen in den Strukturen für die drei zentralen Untereinheiten auf.

*P. denitrificans* verfügt über alternative Elektronentransportwege, um auf wechselnde Umweltbedingungen flexibel reagieren zu können. So verfügt *P. denitrificans* im Gegensatz zu Mitochondrien über zwei weitere terminale Oxidasen [44]: (i) eine *cbb*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase, die bei geringem Sauerstoffpartialdruck bevorzugt exprimiert wird und sich durch eine erhöhte Affinität zu Sauerstoff auszeichnet; sowie (ii) eine Chinoloxidase des *ba*<sub>3</sub>-Typs, die zur direkten Oxidation von Ubichinol unter O<sub>2</sub>-Verbrauch eingesetzt wird [45].

Ein weiterer alternativer Stoffwechselweg ist die Denitrifikation, die zur Namensgebung von *P. denitrificans* führte und diesem Organismus bei sehr geringer Sauerstoffkonzentration oder unter anaeroben Bedingungen ein Wachstum auf entsprechenden Medien ermöglicht. Es werden Stickstoff-Sauerstoffverbindungen als alternative Elektronenakzeptoren zu molekularem Sauerstoff verwendet. Darüber hinaus ist es *P. denitrificans* möglich, die C<sub>1</sub>-Verbindungen Methanol und Methylamin als Kohlenstoffquellen zu nutzen, wenn im Medium keine höherwertigen Substanzen vorhanden sind [46].

### 1.4 Cytochrom *c*<sub>552</sub> als Elektronendonator

In *P. denitrificans* wurden zwei *c*-Typ Cytochrome vorgeschlagen als Elektronenmediator zwischen dem *bc*<sub>1</sub>-Komplex und den terminalen elektronenakzeptierenden Enzymen, den beiden Cytochrom *c* Oxidasen (*cbb*<sub>3</sub>- und *aa*<sub>3</sub>-Typ), sowie der Nitrit- und N<sub>2</sub>O-Reduktase aus dem Nitratstoffwechsel. Vom löslichen Cytochrom *c*<sub>550</sub> wird angenommen, daß es als Elektronendonator bei der Methanol- und Methylamin-Oxidation sowie bei der Denitrifikation bevorzugt verwendet wird [47]. Die Reaktionskinetiken dieses Cytochroms mit einem löslichen Cu<sub>A</sub>-Fragment der *aa*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase wurden durch *stopped-flow*-Spektroskopie untersucht [48], jedoch gibt es mehrere Anhaltspunkte, daß der bevorzugte Elektronendonator für die Oxidase das membranständige Cytochrom *c*<sub>552</sub> ist. Dieses 18 kD Protein [49] besteht aus drei funktionellen Domänen: (i) einem N-terminalen Membrananker, (ii) einer überwiegend negativ geladenen mittleren Region

und (iii) einer zum Periplasma gerichteten typischen Klasse I *c*-Typ Häm tragenden Domäne. Zur Annahme, daß es sich um den nativen Donor für die *aa*<sub>3</sub>-Oxidase handelt, führten mehrere Beobachtungen: (i) es ist möglich, unter bestimmten Bedingungen durch Solubilisierung von *P. denitrificans*-Membranen einen ternären Superkomplex aus *bc*<sub>1</sub>, Cytochrom *c*<sub>552</sub> und *aa*<sub>3</sub> Cytochrom *c* Oxidase zu isolieren [50]; (ii) der Elektronentransport vom NADH zum Sauerstoff wird in Deletionsmutanten für das *c*<sub>552</sub>-Gen unterbrochen, kann aber durch Zugabe von mitochondrialem Cytochrom wieder aufgenommen werden [51]; (iii) spezifische Antikörper gegen gereinigtes Cytochrom *c*<sub>552</sub> können den Elektronentransport zum Sauerstoff in Membranaktivitätstests blockieren [49].

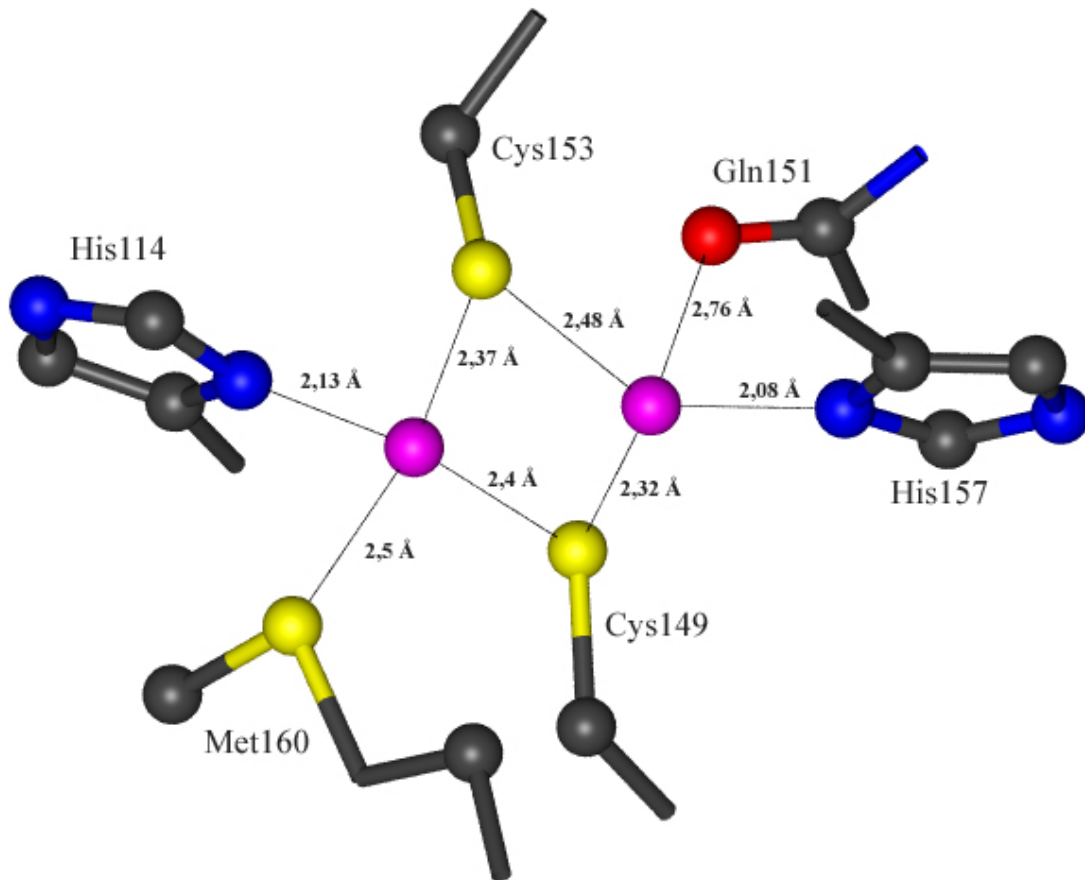
Für die *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* wurde ein lösliches Cytochrom *c*<sub>552</sub> als Elektronendonator identifiziert, und es wurde keine Reaktivität mit der *caa*<sub>3</sub>-Typ Oxidase festgestellt [52]. Es handelt sich um ein Monohämprotein mit einer für ein Klasse I *c*-Typ Cytochrom ungewöhnlich großen Masse von 14,2 kD (131 Aminosäuren), welche durch eine C-terminale Verlängerung bedingt ist. Aus der Kristallstruktur des Proteins [53] wird deutlich, daß diese Verlängerung eine Klammer um das Protein bildet. Es wird angenommen, daß dieses Merkmal zur sehr hohen Thermostabilität des Cytochroms [54] beiträgt.

### **1.5 Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum als primärer Elektronenakzeptor der Oxidase**

Das ladungsdelokalisierte, binukleäre Cu<sub>A</sub>-Zentrum wird von Cytochrom *c* Oxidasen und N<sub>2</sub>O-Reduktasen denitrifizierender Bakterien als erster Elektronenakzeptor verwendet [55]. Es ist periplasmatisch lokalisiert und befindet sich im schnellen Redoxgleichgewicht mit dem in der Untereinheit I lokalisierten Kofaktor Häm *a* (Häm *b* im Falle der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase) [56]. Die formale Ladungszahl des Kupfers wechselt während der Reaktion zwischen Cu<sup>+1,5</sup> und Cu<sup>+</sup>. Bei Reduktion der isolierten löslichen Domäne tritt ein Verlust des charakteristischen purpurfarbenen Spektrums auf [57]. Bis heute wurden von mehreren bakteriellen Cytochrom *c* Oxidasen lösliche Module des Cu<sub>A</sub>-Zentrums hergestellt; unter anderem von *Bacillus subtilis* [58], *P. denitrificans* [57] und *T. thermophilus* [59], um die Eigenschaften dieser Domänen ohne störende Einflüsse der Cytochrome untersuchen und detergenzfrei arbeiten zu können. Die beiden Kupferatome sind durch zwei Cysteine miteinander über Thiolatbrücken verbunden und werden zusätzlich von zwei Histidinen, einem Methionin-Schwefelatom und einem Sauerstoffatom einer Peptidcarbonylfunktion ligandiert (siehe Abbildung 4). Es wird vermutet, daß die Funktion eines solchen

## Einleitung

Kupferzentrums darin liegt, das Redoxpotential gegenüber mononukleären Kupferproteinen abzusenken und eine Verminderung der Reorganisationsenergie herbeizuführen [60].



**Abbildung 4:** Struktur des oxidierten  $\text{Cu}_A$ -Zentrums der  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase aus *T. thermophilus* (PDB: 1EHK). Kupferatome sind in Magenta gehalten, Stickstoffatome (blau), Sauerstoffatome (rot), Kohlenstoffatome (grau). Der Abstand der beiden Kupferatome beträgt 2,44 Å.

Da die Untereinheit II den primären Elektronenakzeptor der Cytochrom  $c$  Oxidasen enthält, findet sich auf diesem Protein ebenfalls die Bindungsstelle für das Substrat Cytochrom  $c_{552}$ . So zeigt sich auf der Oberfläche der  $aa_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase aus *P. denitrificans* eine Region mit negativ geladenen Resten [43] um den Elektroneneintrittspunkt Trp121 [61]. Diese treten mit den positiven Ladungen der Lysinseitenketten des Cytochroms  $c_{552}$  in elektrostatische Wechselwirkung und vermitteln so die initiale Anziehung zwischen den beiden Proteinen [62, 63] (siehe auch 1.6). Im Gegensatz hierzu finden sich fast keine geladenen Aminosäurereste auf den vermuteten Interaktionsflächen von Cytochrom  $c_{552}$  und  $ba_3$ -Oxidase aus *T. thermophilus* [16, 53]. Daher ergibt sich, daß diese Wechselwirkung auf hydrophoben Kontakten basiert. Dies würde mit der generellen Beobachtung übereinstimmen, daß bei höheren Temperaturen elektrostatische Wechselwirkungen geschwächt werden.

### 1.6 Transiente Elektronentransferkomplexe

Protein-Protein-Wechselwirkungen sind ein wichtiger Bestandteil der meisten biologischen Prozesse und reichen von statischen bis zu äußerst dynamischen Komplexen. Statische Komplexe zeichnen sich hierbei durch eine sehr langsame Dissoziationsrate aus, und die beiden Partnerproteine bilden über eine festgelegte Bindungsstelle einen festen Komplex mit einer definierten Struktur aus (z.B. Antigen-Antikörper-Komplex). Im Gegensatz dazu findet man transiente Komplexe, wenn hohe Umsatzraten für eine biologische Reaktion notwendig sind, wie es bei Elektronentransferreaktionen der Fall ist. Dies wird durch eine geringe Bindungsstärke der beiden Partner zueinander erreicht. Gleichzeitig ist es jedoch notwendig, eine ausreichend hohe Spezifität der beiden Reaktionspartner zueinander zu gewährleisten. In vielen Fällen, wie auch bei der Reaktion der *P. denitrificans* *aa*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase mit ihrem Elektronendonator, führen zunächst elektrostatische Wechselwirkungen (proportional zu  $1/r^2$ ) über größere Entfernungen zu einem „Encounter“-Komplex [61]. Dieser initiale Komplex zeigt keine definierte Struktur und besteht aus einem Ensemble verschiedener Orientierungen der beiden Proteine zueinander. Vermittelt durch hydrophobe Kontakte, Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Kontakte erfolgt eine Reorientierung, und es kann sich ein produktiver Elektronentransferkomplex ausbilden [64].

Die erste Kristallstruktur eines Interprotein-Elektronentransferkomplexes beschreibt die Bindung von Iso-1-Cytochrom *c* aus Hefe an Cytochrom *c* Peroxidase [65] und enthüllt nur eine kleine Kontaktfläche aus Wasserstoffbrücken, hydrophoben und van-der-Waals-Kontakten, obwohl auf beiden Proteinen geladene Reste mit entgegengesetzter Ladung vorhanden sind. Diese sind jedoch nicht an direkten Kontakten beteiligt. Zu einer vergleichbaren Beobachtung für zwei membranständige Komplexe, dem *bc*<sub>1</sub>-Komplex aus Hefe und dem Reaktionszentrum aus *Rhodobacter sphaeroides*, führten die vor kurzem gelösten „Docking“-Strukturen mit dem jeweiligen Substrat [66, 67]. Um der dynamischen Natur dieser Komplexe und der Kritik über die statische Sicht in einem Ko-Kristall gerecht zu werden, wurden Redoxproteinkomplexe in Lösung mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden Experimente mit Isotopen-angereichertem [<sup>15</sup>N]-Cytochrom *c* durchgeführt [68, 69]. Durch Änderungen der chemischen Verschiebungen aufgrund der Komplexbildung kann eine Aussage über die Natur der Bindungsstelle auf dem markierten Protein getroffen werden [70]. Durch diese Technik wird zwar keine Information über die Seitenketten erhalten, aber die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen, die durch Zugabe des Partnerproteins betroffen sind, geben Auskunft darüber, welche Aminosäuren in die Komplexbildung involviert sind. Bisher wurden jedoch nur wenige



## Einleitung

---

Redoxkomplexe von nativen Partnern durch *<sup>15</sup>N-Chemical-Shift-Perturbation-Mapping* untersucht [68, 69]. In einer Arbeit mit <sup>15</sup>N-angereichertem Iso-1-Cytochrom *c* und Peroxidase aus Hefe wurde eine kleine Region aus hydrophoben und einigen polaren Resten um die Hämspalte identifiziert, die an der Ausbildung der Kontaktstelle beteiligt ist. Im Großen und Ganzen wurden die gleichen Reste wie durch die Ko-Kristallisation identifiziert, obwohl Unterschiede zwischen der oxidierten und der reduzierten Form in Anzahl und Stärke der Verschiebung der chemischen Shifts beobachtet werden konnten. So wurde auch für diese Elektronentransferreaktion ein mehrstufiger Mechanismus vorgeschlagen: (i) durch elektrostatische Wechselwirkung werden die beiden Partner zunächst in räumliche Nähe gebracht, um dann (ii) durch Feinjustierung, vermittelt durch hydrophobe und van-der-Waals-Kontakte, einen produktiven Elektronentransferkomplex zu erreichen.

### 1.7 Ziele dieser Arbeit

Nach Aufklärung der Lösungsstruktur des Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* durch Reincke *et al.* [71] soll im Rahmen dieser Arbeit die Kontaktfläche dieses Proteins mit seinem Partner, der  $aa_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase, durch NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Durch Analyse von Änderungen der chemischen Verschiebungen bei Zugabe des Bindungspartners sollen einzelne Aminosäuren identifiziert werden, die an direkten Kontakten beteiligt sind.

Da die Oxidase als membranständiger Komplex aus mehreren Untereinheiten nicht über eine geeignete Löslichkeit und Größe verfügt, um als Bindungspartner für das Cytochrom  $c_{552}$  in der NMR-Spektroskopie eingesetzt werden zu können, soll das lösliche  $Cu_A$ -Fragment zur Komplexbildung verwendet werden.

Zur vollständigen Charakterisierung dieses transienten Elektronentransferkomplexes soll auch die Interaktionsfläche auf der  $Cu_A$ -Domäne aufgeklärt werden. Hierzu muß jedoch zunächst seine Expression verbessert werden, um eine Isotopenmarkierung mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff effizient zu ermöglichen, eine Voraussetzung für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und die Interpretation der Resultate aus Bindungsstudien durch kernmagnetische Resonanz.

Durch in den letzten Jahren veröffentlichte Arbeiten [16, 29, 53] kristallisierte sich zunehmend heraus, daß es sich im Gegensatz zum stark elektrostatisch beeinflussten Paar aus *P. denitrificans*, bei der Interaktion der thermooptimierten  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase aus *T. thermophilus* mit ihrem Substrat um einen anderen Modus der Interaktion handeln könnte.

Um eine eingehende Untersuchung dieser Interaktion zu ermöglichen, soll das Gen für die  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase und ihr Substrat Cytochrom  $c_{552}$  zugänglich gemacht werden. Durch Klonierung und Expression eines löslichen  $Cu_A$ -Fragmentes dieser Oxidase sollen zunächst die Voraussetzungen für Bindungsstudien an diesem Elektronentransferprotein erbracht werden.

Isotopen-Markierung und Zuordnung der chemischen Verschiebungen sollen dann auch Interaktionsstudien am  $Cu_A$ -Fragment von *T. thermophilus* ermöglichen.

In weiteren Experimenten sollen auch die kinetischen Aspekte (Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, Gleichgewichtskonstanten, Temperaturabhängigkeit, Ionenstärkeabhängigkeit) dieser sehr schnellen Elektronentransferreaktionen der Redoxproteine von beiden Spezies (*P. denitrificans* und *T. thermophilus*) vergleichend betrachtet werden, um ein tieferes Verständnis für die unterschiedlichen Interaktionsarten zu entwickeln.

## Einleitung

---

Durch das Sequenzierprojekt von *T. thermophilus* sind zunehmend molekular-genetische Daten vorhanden, die zur Identifizierung des Elektronendonors für das Cytochrom  $c_{552}$  genutzt werden sollen. Der Fokus auf der Suche nach einem bisher unbekanntem Komplex III ( $bc_1$ -Komplex) in der thermophilen Atmungskette soll die Klonierung einer weiteren löslichen Redoxkomponente (Cytochrom  $c_1$ ) ermöglichen. Durch spektroskopische und kinetische Messungen soll nach heterologer Expression eine Charakterisierung dieses Elektronendonors zum Cytochrom  $c_{552}$  erfolgen.

Weiterhin soll versucht werden, ein Plasmid-basiertes System für die Expression von membranständigen Proteinkomplexen aus thermophilen Organismen zu etablieren, da die heterologe Expression dieser Proteine in *E. coli* häufig nicht möglich ist. Der Einbau von Cofaktoren und die geringe Löslichkeit der Membranproteine sind hierbei kritische Faktoren. Ein geeignetes Expressionssystem sollte Zugang zu einer ganzen Reihe von membranständigen Proteinkomplexen aus verschiedenen thermophilen Organismen verschaffen und *T. thermophilus* als einfach handhabbaren Expressionsorganismus nutzen.

Hierzu soll zunächst ein geeigneter Vektor kloniert und ein Transformationsprotokoll ausgearbeitet werden. Das System soll daraufhin auf seine Funktionsfähigkeit mit einem einfach aufgebauten, löslichen Protein überprüft und dann zur Expression einer Histidin-markierten  $ba_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase, mit allen Untereinheiten und Cofaktoren, verwendet werden.

Dies würde die Mutagenese dieses membranständigen Komplexes und eine genauere Analyse der ungewöhnlichen Eigenschaften dieser Oxidase ermöglichen. Ein Histidin-Tag soll die Aufreinigung des aus Membranen solubilisierten Komplexes über Metallaffinitätschromatographie vereinfachen und die Abtrennung der endogen gebildeten  $ba_3$ -Oxidase ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agar Agar	Merck
Agarose	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	Applichem
Bacto-Trypton	Becton-Dickinson
Chloramphenicol	Sigma
Dithiothreitol	BTS
Desoxyribonukleosidtriphosphate	MBI Fermentas
Hefeextrakt	Gibco BRL
Histidin	Roth
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Biomol
Kanamycindisulfat	Merck
Kupferchlorid	Merck
Natriumascorbat	Merck
Ni-NTA	Qiagen
Oligonukleotide	Biospring
RNase	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Pefabloc SC	Biomol
Penta-His-Antikörper	Novagen
Thiaminchloridhydrochlorid	Merck
Ththc1-Antikörper	Eurogentec
Thba3-Antikörper	Eurogentec
Triton X-100	Serva
Standardchemikalien in p.a. Qualität	Merck, Roth

### 2.1.2 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs oder MBI Fermentas bezogen.

### 2.1.3 Lösungen

#### 2.1.3.1 Plasmid-Isolierung

Lösung I:	Glukose Tris/HCl EDTA pH 8,0	50 mM 25 mM 10 mM
Lösung II:	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)
Lösung III:	Kaliumacetat Eisessig pH 5,0	3 M 11,5 % (v/v)
TE-Puffer:	Tris/HCl EDTA pH 7,5	10 mM 1 mM

#### 2.1.3.2 Western-Blot

Ponceau S-Lösung:	Ponceau S in Trichloressigsäure	0,1 % 0,2 % (w/v)
NCS-Lösung:	New born calf serum in TBS	5 %
Antikörper-Lösung:	spezifische Antikörper in NCS-Lösung	10 µl 10 ml
Protein A-AP-Lösung:	Protein A-AP- Stammlösung	1:1000 in NCS
Protein A-AP- Stammlösung	Protein A-AP TBS BSA Glyzerin	0,1mg 2 ml 1 mg 50 % (w/w)
TBS/Triton	Triton X-100 in TBS	0,3 % (w/v)
TBS-Lösung	Tris/HCl pH 7,5 NaCl Azid	10 mM 140 mM 0,05 % (w/v)

## Material und Methoden

---

TNM-Lösung:	Tris/HCl pH 9,5 NaCl MgCl <sub>2</sub>	100 mM 100 mM 50 mM
BCIP-Stammlösung:	BCIP in DMF	50 mg/ml
NBT-Stammlösung:	NBT in 70 % DMF	50 mg/ml
EDTA-Lösung:	EDTA pH 8,0	100 mM

### 2.1.3.3 Mutagenese

Annealing-Puffer (10x)	Tris/HCl (pH 7,5) MgCl <sub>2</sub> NaCl	200 mM 100 mM 500 mM
Synthese-Puffer (10x)	Tris/HCl (pH 7,5) dNTPs ATP DTT	100 mM 5 mM 10 mM 20 mM

### 2.1.4 Mikroorganismen

#### 2.1.4.1 Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Herkunft
<u><i>E. coli</i></u> :		
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi supE</i> Δ( <i>lac-pro AB</i> ) [ <i>mutS</i> ::Tn10] [F' <i>proA</i> +B+ <i>lacIqZ</i> ΔM15]	Kramer <i>et al.</i> [72] Zell und Fritz [73]
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>B</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Novagen, Wisconsin
DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Res.Lab., Inc. [74]
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>k</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , Δ( <i>lac-proAB</i> ), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup>Z</i> ΔM15]	Hanahan [75]
<u><i>T. thermophilus</i></u> :		
HB8		DSM Nr. 579
HB27		DSM Nr.7039

### 2.1.4.2 Anzuchtmedien

#### Luria-Bertani Medium (LB)

Bacto-Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)

#### TCM-Medium

Tris	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
pH 7,0 bei 0 °C	

#### Fermentermedium

Glycerin	40 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	5,3 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	2 g/l
Glukose	1 g/l
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 mM
Spurenelementelösung 1	10 ml/l
Thiamin	0,2 µM
pH 7,0	

#### Spurenelementelösung 1

EDTA	5 g/l
FeCl <sub>3</sub>	0,5 g/l
ZnO	0,05 g/l
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
CoCl <sub>2</sub>	0,01 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
pH 7,0	

### 2.1.4.3 Lagerung

Flüssigkulturen von *E. coli* werden bei 37 °C und 240 rpm angezogen. Agar-Platten können bei 4 °C für eine gewisse Zeit gelagert werden. Flüssigkulturen von *T. thermophilus* werden bei 70 °C und 220 rpm im Wasserbadschüttler angezogen. Die Anzucht auf Agar-Platten erfolgt bei gleicher Temperatur im Brutschrank. Um eine Austrocknung der Platten zu verhindern, sollten diese zusammen mit einem Wasserreservoir in einer Plastiktüte in dem Brutschrank inkubiert werden.

Für eine Lagerung von mehr als vier Wochen wird eine Gefrierkultur hergestellt. Hierzu werden die Zellen einer 2 ml Übernachtskultur bei 6000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten sedimentiert und anschließend in 2 x LB-Medium mit 15% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspensionen werden bei -80 °C eingefroren und gelagert.

## 2.1.5 Nukleinsäuren

### 2.1.5.1 Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Herkunft
pAlter-Ex1	Tet <sup>r</sup> , Amp <sup>s</sup> , f1 origin, Mutagenesevektor	Promega
pBR2	Amp <sup>r</sup> , <i>P. denitrificans</i> Cytochrom c <sub>552</sub> (funktionelle Domäne) in pET-22b (+) <i>NcoI/BamHI</i>	Reincke, 1996
pBScbaX	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus ba</i> <sub>3</sub> -Operon in ΔpBlueskript <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pEC86	Amp <sup>r</sup> , <i>ccm</i> ABCDEFGH in pACYC184	Arslan <i>et al.</i> [86]
pET3d	Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> -Operator	Novagen
pET22b(+)	Amp <sup>r</sup> , <i>lac</i> -Operator, <i>peI</i> B Leader-Sequenz	Novagen
pQE-30	Amp <sup>r</sup> , T5-Promotor, <i>lac</i> -Operator	Qiagen
pQE-Cu <sub>A</sub>	Amp <sup>r</sup> , T5-Promotor, <i>lac</i> -Operator	diese Arbeit
pRK603	Km <sup>r</sup> , λ-Promotor, <i>tetO2</i> -Operator, TEV-Protease	Kapust und Waugh, [76]
pUC18	Amp <sup>r</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> [77]
pUCcycA	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus</i> Cytochrom c <sub>552</sub> in ΔpUC18 <i>XbaI/PstI</i>	diese Arbeit
pMA6	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus</i> Cytochrom c <sub>552</sub> in ΔpET22b(+) <i>NcoI/XhoI</i> , C-term. His <sub>6</sub>	diese Arbeit
pMA7	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus</i> Cytochrom c <sub>552</sub> in ΔpET22b(+) <i>NcoI/HindIII</i>	diese Arbeit
pMA10	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus</i> Cu <sub>A</sub> lösliches Fragment in ΔpET3d <i>NcoI/BamHI</i> , ab Aminosäureposition 34	diese Arbeit
pMA11	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus</i> Cu <sub>A</sub> lösliches Fragment in ΔpET3d, <i>NcoI/BamHI</i> , ab Aminosäureposition 44	diese Arbeit



## Material und Methoden

---

pMA12	Amp <sup>r</sup> , <i>Thermus</i> Cu <sub>A</sub> lösliches Fragment aus pMA10 <i>NcoI/BamHI</i> in ΔpAlter-Ex1	diese Arbeit
pMA28	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , HTK (hochthermostabile Kanamycin-resistenz) <i>BamHI/KpnI</i> in ΔpNTsp2 <i>BglII/KpnI</i>	diese Arbeit
pMA29	Amp <sup>r</sup> , <i>XbaI/XhoI</i> -Fragment der <i>Thermus ba</i> <sub>3</sub> in ΔpUC18 <i>SalI/XbaI</i>	diese Arbeit
pMA30	Amp <sup>r</sup> , Kanamycin-Promotor <i>XbaI/KpnI</i> vor <i>Thermus ba</i> <sub>3</sub> in ΔpMA29	diese Arbeit
pMA31	Amp <sup>r</sup> , <i>KpnI/PstI</i> -Fragment aus pMA30 in ΔpBlueskript	diese Arbeit
pMA32	Amp <sup>r</sup> , <i>KpnI/SpeI</i> -Fragment aus pMA31 in ΔpUC18 <i>KpnI/XbaI</i>	diese Arbeit
pMA33	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>KpnI/SalI</i> -Fragment aus pMA32 in ΔpMA34 <i>KpnI/XhoI</i>	diese Arbeit
pMA34	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , 700 bp- <i>XhoI</i> -Fragment aus pMA32 in ΔpMA28 <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pMA35	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , pMA34, Deletion der <i>PstI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pMA36	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>KpnI/SalI</i> -Fragment aus pMA32 in ΔpMA35 <i>KpnI/XhoI</i>	diese Arbeit
pMA38	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>Thermus ba</i> <sub>3</sub> N-term. His <sub>6</sub> an Untereinheit I in ΔpMA36 <i>XbaI/PstI</i>	diese Arbeit
pMA39	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>Thermus ba</i> <sub>3</sub> C-term. His <sub>6</sub> an Untereinheit I in ΔpMA36 <i>XbaI/PstI</i>	diese Arbeit
pMA40	Amp <sup>r</sup> , <i>BglII/PstI</i> -Fragment aus pMA6 in ΔpUCcycA <i>BglII/PstI</i>	diese Arbeit
pMA42	Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , <i>XbaI/PstI</i> -Fragment aus pMA40 in ΔpMA38	diese Arbeit

### 2.1.5.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz
Amp-Repair	5'- GTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTG-3'
Th552-F	5'- ACTGTCTAGATTAACCCCTTCCCCTTGACG-3'
Th552-R	5'- CAGTCTGCAGTCCAGCACCCCTCCATTAAAC-3'
Th-552Nco-F	5'- CATGGCCATGGCCCAGGCGGACG-3'
Th-552Xho-R	5'- GTCACTCGAGCTTCAGGCCGAGCTTC-3'
Th-552Hind-R	5'- CAGTAAGCTTACTTCAGGCCGAGCTT-3'
Th-Mut3	5'- GGTCTACGTCCTGGCGYTMGCCYTCGGGTACCAGCCGAACC-3'
ThSUI-C-His.	5'- CGGGGTGGCGGCTCTGGCATCACCATCACCATCACTAGCTGCAGTCGAT-3'
HTK-F	5'- ACTGGGTACCTCGAGTTGACGGCGGATATGG-3'
HTK-R	5'- AGTCGGATCCATGATTAACAATTATTAGAGG-3'
Cba-F	5'- TTCTACAACGCAAGCCGCAAGC-3'
Cba-R	5'- ATTCGCTCACGAGGCCGTACC-3'
Cba-2F	5'- ACTGTCTAGATTTCCGCTACCATGGAGG-3'
Cba-2R	5'- AGCTCTGCAGCGGGCGAGGAGCATCC-3'
Cta-Hind	5'- GCGCGAAGCTTTTAGGCGGCGAATTCCTCTTTTCGC-3'
Thermus-C1-F	5'- AGTCCCATGGAGAAGGGCAAGGC-3'
Thermus-C1-R	5'- ATGCAAGCTTACTCCACGGGGCCG-3'
Th-CuA-34-F	5'- ACTGCCATGGCCTACACCCTGGCC-3'
Th-CuA-R	5'- GTACGGATCCTTCACTCCTTCACCACG-3'
Thermus 6-R	5'- AGCTCTCGAGCTGCAGCGGGCGAGGAGCATCC-3'
Thermus 9-F	5'- ACTGGGTACCGTACTACCCCCAGAATCCC-3'
Thermus 10-R	5'- GTACTCTAGACATTCCCTTTTCAGATAATTTTAG-3'
Thermus 11-F	5'- ACTGTCTAGAATGGAAGAAAAGCCCAAAGG-3'
SUII-BamHI-TEV	5'- ACTGGGATCCGAAAACCTATACTTCCAAAGCCAGGAGATGCC GAACG-3'

## **2.2 Molekularbiologische Arbeiten**

### **2.2.1 Isolierung genomischer DNA**

Zur Präparation genomischer DNA aus *T. thermophilus* HB8 werden ca. 1 Gramm Biomasse in 20 ml Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM EDTA) resuspendiert und durch Zugabe von 2 ml SDS-Lösung (20%) lysiert. Es wird eine Proteinase K-Lösung zugegeben (0,5 mg/ml), vorsichtig durchmischt und für 3 Stunden bei 50 °C inkubiert. Es folgen drei Extraktionsschritte mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und mit zwei Extraktionen durch Chloroform/Isoamylalkohol wird restliches Phenol entfernt. Die Phasentrennung wird jeweils durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 10 min herbeigeführt. Nach der letzten Extraktion wird der Überstand auf 0,3 M Natriumacetat eingestellt und durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol wird die DNA gefällt. Die DNA wird sedimentiert (6000 rpm, 10 min, Heraeus Megafuge), mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3 ml TE-Puffer (siehe 2.1.3.1) aufgenommen.

### **2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab**

1,5 ml einer Übernachtskultur werden bei 13000 rpm für 2 min (Heraeus, Biofuge 13) abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgesaugt und das Pellet in 100 µl eiskaltem TEG-Puffer (Lösung I, siehe 2.1.3.1) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II erfolgt die alkalische Lyse der Zellen [78] und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes wird die Lösung vorsichtig durchmischt.

Die genomische DNA und Protein wird durch Zugabe von 150 µl eiskalter Lösung III und vorsichtiges Durchmischen des Ansatzes gefällt und bei 13000 rpm für 10 Minuten (Heraeus, Biofuge 13) sedimentiert. Der klare Überstand wird abgenommen und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gut durchmischt. Die Phasentrennung wird durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur herbeigeführt. Der Überstand wird abgenommen und die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol<sub>abs</sub>. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 10 Minuten wird der Überstand vollständig abgesaugt und das Pellet wird bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Das Pellet wird in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, bei Plasmiden mit hoher Kopienzahl auch in bis zu 100 µl. Dem Ansatz wird noch 20 µg/ml RNase zugesetzt und für 25 Minuten bei 37 °C inkubiert, um noch vorhandene RNA abzubauen.

### **2.2.3 Restriktion und elektrophoretische Auftrennung**

Für die Restriktion werden in der Regel 100-200 ng Plasmid-DNA oder 1 µg chromosomale DNA eingesetzt. Für die unterschiedlichen Enzymkombinationen werden gemäß den Herstellerangaben (MBI Fermentas oder New England Biolabs) die optimalen Pufferbedingungen ermittelt und die entsprechenden Verdünnungen aus den mitgelieferten 10-fach Puffern angesetzt. In der Regel reichen für einen Restriktionsansatz mit DNA-Mengen unter 500 ng 2-3 Units eines Enzyms aus, um in einem 20 µl Ansatz während der einstündigen Inkubation einen vollständigen Schnitt zu gewährleisten. Die Restriktionstemperatur richtet sich nach dem Optimum der verwendeten Enzyme. Die Reaktion wird durch Zugabe von ¼ Volumen DNA-Probenpuffer (5% (v/v) Glycerin in TE-Puffer, 30 mM EDTA, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, pH 7,5) gestoppt.

Zur Analyse der Proben wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden hierbei über die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Für lineare, doppelsträngige DNA zeigt sich eine Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit proportional zum Logarithmus der Fragmentgröße. Die Konformation der DNA beeinflusst ebenfalls die Wanderungsgeschwindigkeit: Treten superhelikale, kreisförmige oder einzelsträngige Moleküle in der Probe auf, so ist ein Abweichen vom oben beschriebenen Verhalten zu beobachten. Der Anteil der Agarose im Gel richtet sich nach den Größen der zu trennenden DNA-Fragmente: von 0,5% (w/v) für sehr große Moleküle (bis 15000 bp) bis zu 2,0% (w/v) für sehr kleine Stücke (~ 100 bp). Die Agarose wird abgewogen, mit TBE-Puffer (100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8) in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf Handwärme mit 2,5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 50 ml versetzt. Die Lösung wird in ein Gelbett gegossen und für 45 min auspolymerisiert. Das Gel wird dann in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die Proben in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard dient mit *EcoRI/HindIII* restringierte λ-DNA. Die Elektrophorese wird durch Anlegen einer konstanten Spannung von 5 V/cm für 45 min durchgeführt. Die Auswertung des Gels erfolgt auf dem Durchlichttisch durch Bestrahlung mit UV-Licht, da das Ethidiumbromid durch Interkalation in die DNA nun zur orangefarbenen Fluoreszenz führt.

### **2.2.4 Ligation**

Zur Ligation werden 40 ng Vektor und in dreifach molarem Überschuß Insert in einem 10 µl Ansatz eingesetzt. Durch Zugabe von 1 µl des mitgelieferten 10-fach Puffers werden pH-Wert und Ionenstärke ein- und das für die Ligationsreaktion notwendige ATP zur Verfügung gestellt. Die bimolekulare Verknüpfungsreaktion wird in der Regel durch 1 U T4-DNA-Ligase katalysiert. Der Ansatz wird für eine Stunde bei 22 °C inkubiert, um eine möglichst vollständige Ligation zu erreichen. Zur Inaktivierung der Ligase wird der Ansatz für 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

### **2.2.5 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen und Transformation**

In der logarithmischen Phase werden Zellen eines geeigneten Stammes von *E. coli* (OD<sub>600</sub>= 0,3 bis 0,4) abgekühlt und dann für 10 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert.

Das Pellet wird mit der Hälfte des ursprünglichen Kulturvolumens in TCM-Medium (siehe 2.1.4.2) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4000 g, 4 °C) wird das Zellpellet nun in <sup>1</sup>/<sub>10</sub> des ursprünglichen Kulturvolumens in einer Mischung aus 80% TCM-Medium und 20% Glycerin aufgenommen. Aliquots von 100 µl werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation werden die gefrorenen Zellen für 30 min auf Eis aufgetaut, mit einem Teil des Ligationsansatzes versetzt (in der Regel sollten 20 ng DNA ausreichen) und durch Pipettieren vorsichtig durchmischt. Die Zellen werden nun für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Um eine größere Transformationseffizienz zu erreichen, werden die Zellen für 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und für kurze Zeit wieder auf Eis gestellt. Zur Erholung und Ausbildung der Antibiotikumresistenz werden die Zellen nun in 900 µl vorgewärmtes LB-Medium überführt und für eine Stunde bei 37 °C und 170 rpm geschüttelt. Zur Selektion transformierter Zellen wird die Kultur auf Antibiotikum-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### **2.2.6 Elektroporation von *T. thermophilus***

Eine Übernachtskultur von *T. thermophilus* wird in frisches LB-Medium überimpft und die Zellen werden bis in die exponentielle Phase ( $OD_{600}=0,8$ ) bei 70 °C angezogen. Ein Milliliter dieser Kultur wird bei 5000 rpm für 5 min (Heraus Biofuge) bei Raumtemperatur abzentrifugiert und einmal mit einer 10%igen Glycerin-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wird erneut in der 10%igen Glycerin-Lösung resuspendiert (100 µl), mit einer geeigneten Menge Plasmid (z.B. 1 µl einer Mini-Präparation eines high-copy Plasmids) versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird dann in eine vorgekühlte Porationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) überführt und mit 12,5 kV/cm poriert. Die Abklingzeit des Pulses sollte hierbei um 5 ms liegen. Zur Erholung werden die Zellen direkt in LB-Medium überführt und für drei Stunden bei 70 °C geschüttelt. Zur Selektion werden die Zellen auf einer LB-Platte (mit 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen.

### **2.2.7 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur selektiven Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet. Hierzu werden zwei Oligonukleotide synthetisiert, die an den Flanken der zu amplifizierenden DNA binden können. In einem 100 µl Ansatz werden jeweils 50 pmol der beiden Primer eingesetzt und ca. 5 ng des Templates. Durch entsprechende Verdünnung des mit dem Enzym mitgelieferten 10-fach Puffers werden für die enzymatische Reaktion optimale Reaktionsbedingungen geschaffen und die für die Reaktion unerlässlichen Magnesiumionen bereitgestellt. Es werden 200 µM Desoxyribonukleosidtriphosphate (Endkonzentration) eingesetzt und die Reaktion wird durch Zugabe der *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* bei 95 °C gestartet. Die Annealing-Temperatur ( $T_a$ ) wird aus dem Gehalt des Primers an Purin- bzw. Pyrimidinbasen errechnet.

Zur Durchführung der PCR wird folgendes Programm im Thermocycler durchlaufen:

- 1. Zyklus: 5 Minuten Denaturierung bei 95 °C
- 30 Zyklen: 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C  
30 Sekunden Annealing bei  $T_a$   
Polymerisation, 1 Minute /500 bp bei 72 °C

31. Zyklus: 30 Sekunden Denaturierung bei 95 °C  
30 Sekunden Annealing bei  $T_a$   
10 Minuten Polymerisation bei 72 °C

### **2.2.8 Mutagenese**

#### **2.2.8.1 Denaturierung der doppelsträngigen DNA**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesen am  $Cu_A$ -Fragment von *T. thermophilus* wurden nach dem „Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis“ Kit von Promega durchgeführt. Hierzu wird zunächst das doppelsträngige DNA-Template (pMA12) durch Natronlauge denaturiert:

Plasmid	2 µg
2 M NaOH, 2 mM EDTA	2 µl
H <sub>2</sub> O (deionisiert, steril)	auf 20 µl

Der Ansatz wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann mit 2 µl Ammoniumacetat (pH 4,6) versetzt und durch Zugabe von 75 µl Ethanol<sub>abs</sub> wird die DNA für 30 min bei -70 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 10 min) wird das Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl TE-Puffer gelöst.

#### **2.2.8.2 Konstruktion und Phosphorylierung der Oligonukleotide**

Zur Einführung der gewünschten Mutationen wurde ein degeneriertes Oligonukleotid (Th-Mut3) konstruiert, das beide Mutationen (F86L, F88L) sowie die Doppelmutation einführen kann. Gleichzeitig wurden Restriktionsschnittstellen eingeführt, die zur Überprüfung der Mutagenesereaktion eingesetzt werden können. So wird eine *NheI*-Schnittstelle eingeführt wenn Phenylalanin-86 zu Leucin mutiert wird oder durch die Mutation von Phenylalanin-88 zu Leucin wird eine *AvaI*-Erkennungssequenz generiert. Die Primer wurden so synthetisiert, daß eine Sequenz von 16 Basen sich auf jeder Seite der zu mutagenisierenden Stelle an das Template anlagern kann.

Um die Anzahl der Mutanten zu erhöhen werden die Primer phosphoryliert, da so der Ringschluß während der Synthesereaktion gewährleistet wird. Hierzu wird folgender Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert:

Oligonukleotid	100 pmol
Kinase-Puffer (10-fach)	2,5 µl
T4-Polynukleotidkinase	5 U
ATP (10 mM)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O (deionisiert, steril)	auf 25 µl

Zum Inaktivieren der Kinase wird der Ansatz nach der Phosphorylierungsreaktion für 10 min auf 75 °C erhitzt.

### 2.2.8.3 Annealing- und Synthesereaktion

1 µg denaturierte DNA (siehe 2.2.8.1) wird mit 0,25 pmol Amp-Repair-Oligonukleotid (Phosphoryliert) und 1,25 pmol des mutagenen Primers in einem 20 µl Ansatz (mit 2 µl „Annealing“-Puffer, Promega) versetzt und für 5 min auf 85 °C erhitzt. Um ein spezifisches Annealing zu ermöglichen, wird der Ansatz innerhalb einer Stunde langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Der Ansatz wird auf Eis abgekühlt und die Synthesereaktion wird durch Zugabe der folgenden Komponenten vorbereitet (Endvolumen 30 µl):

H <sub>2</sub> O (deionisiert, steril)	5 µl
Synthese-Puffer (10-fach)	3 µl
T4-DNA-Polymerase	10 U
T4-DNA-Ligase	3 U

Der Reaktionsansatz wird für 90 min bei 37 °C inkubiert und nach Abschluß der Reaktion werden 15 µl zur Transformation (siehe 2.2.5) von *E. coli* BMH 71-18 *mutS*, ein Stamm der nicht zur Mismatch-Reparatur befähigt ist, eingesetzt. Die LB-Kultur wird über Nacht (mit Ampicillin) bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen wird die



Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.2.2). Durch Transformation des mutagenen Plasmids in *E. coli* JM 109 sollen „second-site“-Mutatationen ausgeschlossen werden. Klone aus dieser Transformation werden angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktion und Sequenzierung auf erfolgreiche Mutagenese überprüft.

## **2.3 Proteinchemische Arbeiten**

### **2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgt durch SDS-PAGE nach Laemmli [79] mit einem Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnis von 37:1.

Die Elektrophorese wird in der Regel für ca. 45 min bei 200 V im Mini-Protean II System (BioRad) durchgeführt. Als Proteinstandard wird eine Mischung folgender Proteine verwendet: BSA (66 kD), Ovalbumin (45 kD), Carboanhydrase (31 kD), Trypsin-Inhibitor (21 kD), Lysozym (14 kD), Aprotinin (6,5 kD).

Nach der Elektrophorese werden die Gele für 10 min bei 65 °C mit Coomassie-Färbelösung (Coomassie R 250 0,5% (w/v), Methanol 20% (v/v), Eisessig 10% (v/v)) inkubiert. Die Gele werden bei gleicher Temperatur durch Behandlung mit einer Mischung aus 20% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Eisessig entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich hervortreten.

### **2.3.2 Western-Blot**

Zur immunologischen Detektion von Proteinen werden diese zunächst durch SDS-PAGE (siehe 2.3.1) aufgetrennt und dann auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Der Transfer auf die Membran wird in einer Semi-Dry-Apparatur (Biorad Trans-Blot SD) durchgeführt. Hierzu werden sechs mit Anodenpuffer (300 mM Tris, 100 mM Tricine, pH 8,7) getränkte Filterpapierstücke auf die Anode gelegt, gefolgt von einem der Gelgröße entsprechenden Stück Membran. Darüber wird das Polyacrylamidgel und weitere sechs mit Kathodenpuffer (300 mM 6-Aminocaprinsäure, 30 mM Tris, pH 8,6) getränkte Filterpapiere geschichtet. Nach Schließen der Blotapparatur wird für 90 min eine Spannung von 5 V angelegt. Es folgt die unspezifische Färbung aller Proteine auf der Membran durch Behandlung mit einer Ponceau-S-Lösung (siehe 2.1.3.2) und die Standardbanden können nach Spülen mit H<sub>2</sub>O markiert werden. Durch Inkubation für 30 min mit 20 ml NCS werden alle unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Es folgt die Inkubation über Nacht mit

dem Antikörper (1:1000 Verdünnung in NCS) und anschließend dreimaliges Waschen mit NCS. Um eine spätere Detektion zu ermöglichen, wird der Blot nun mit ProteinA-Alkalische Phosphatase (Stammlösung 0,05 mg/ml in TBS) in NCS (1:1000) für 3 Stunden behandelt. Es folgen weitere Waschschrte (i) 10 min mit NCS, (ii) 30 min mit 0,5% (w/v) Triton X-100 in TBS, (iii) 5 min mit TBS, (iv) 5 min mit TNM (siehe auch 2.1.3.2). Die Färbereaktion wird unter Lichtausschluß in einer Lösung aus je 20 µl/ml NBT- und BCIP- Stammlösungen in TNM durchgeführt. Die Reaktion wird mit 50 mM EDTA (pH 7,0) gestoppt.

## 2.4 Proteinpräparationen

### 2.4.1 Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *P. denitrificans*

Zellen des Stammes *E. coli* JM 109 werden mit den Plasmiden pQE-CuA und pRK603 kotransformiert. Die nun Ampicillin und Kanamycin resistenten Zellen werden in einer 50 ml LB-Übernachtskultur angezogen, am nächsten Morgen abzentrifugiert (4000 g, 4 °C, 10 min) und in 1000 ml Fermentermedium (mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) resuspendiert. Die Kultur wird bis zum nächsten Morgen bei 37 °C (230 rpm) geschüttelt und zum 5%igen Animpfen einer 8 l Kultur im Fermenter (New Brunswick, Microferm) genutzt. Die Kultur wird zunächst bei 37 °C mit 300 rpm gerührt, bei größerer Kulturdichte (OD 3,0 – 4,0) wird mit 600 rpm eine gute Durchlüftung gewährleistet. Bei einer OD von 4,0 erfolgt die Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,2 mM). Nach weiteren 4 Stunden werden die Zellen abgekühlt und durch Zentrifugation bei 5000 rpm (Sorvall RC3C, 10 min, 4 °C) geerntet.

Die Zellen werden in 20 mM Tris/HCl (pH 8,2) resuspendiert und mit Lysozym (0,1 mg/ml), sowie Pefabloc SC (100 µM) versetzt. Die Suspension wird für 30 min auf Eis inkubiert, um die Bakterienzellwand durch das Lysozym zu hydrolysieren und anschließend bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen werden die Zellen nun vollständig durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250, Stufe 4, 40%) lysiert und die DNA fragmentiert. Die Gewinnung der *Inclusion-Bodies* erfolgt durch Ultrazentrifugation bei 35000 rpm (Beckman L-70, 4 °C, 30 min). Der Überstand wird abgeschüttet und die Membranfraktion über dem elfenbeinfarbenen Inclusion-Body Pellet wird mit einem Spatel entfernt.

Die Inclusion-Bodies werden gewaschen (20 mM Tris/HCl pH 8,2; 1,5% Triton X-100) und erneut abzentrifugiert (35000 rpm, 4 °C, 25 min). Das Pellet wird nun in 7 M Harnstoff (in 20 mM Tris/HCl pH 8,2) vollständig gelöst. Sollte die Lösung nun noch

trüb erscheinen, wird ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Rückfaltung des Apoproteins erfolgt durch Dialyse gegen 2 l Harnstoff (2,5 M) in 20 mM Tris/HCl pH 8,2 für 4 Stunden unter Zusatz von 0,5 mM DTT, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Es folgt ein weiterer Dialyseschritt für 4 Stunden gegen 20 mM Tris/HCl pH 8,2 (2 l, ebenfalls mit 0,5 mM DTT). Die Rekonstitution des Kupferzentrums erfolgt über Nacht durch Dialyse gegen 300  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> in 20 mM Tris/HCl pH 8,2. Das nun purpurfarbene Dialysat wird erneut zentrifugiert (35000 rpm, 4 °C, 25 min), um Schwebstoffe zu entfernen. Der Überstand wird auf eine Q-Sepharose-Säule (Amersham Bioscience) aufgetragen, welche zuvor mit 20 mM Tris/HCl (pH 8,2), 300  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> äquilibriert wurde. Die Elution des Proteins erfolgt durch einen Salzgradienten bis 1 M NaCl (in 20 mM Tris/HCl pH 8,2 mit 300  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>). Das Eluat wird ankonzentriert (Vivaspin-Konzentrator, cut-off: 10000) und über eine Sephacryl S-100 HR (Amersham Bioscience) in 20 mM Bis-Tris pH 7, 100 mM NaCl gefiltert.

Zur Abtrennung des noch mit Histidin-Tag versehenen Materials, welches noch nicht durch die koexprimierte TEV-Protease abgespalten wurde, schließt sich ein chromatographischer Schritt über eine Ni-NTA-Säule (Qiagen) in 20 mM Tris/HCl pH 8,2 an. Das Produkt findet sich im Durchlauf.

### **2.4.2 Cytochrom *c*<sub>552</sub>-f aus *P. denitrificans***

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) wird mit dem für die funktionelle Domäne des Cytochrom *c*<sub>552</sub> aus *P. denitrificans* kodierenden Plasmid pBR2 transformiert. In einem Vorversuch werden verschiedene Klone nach der Kotransformation mit dem Hämreifungsvektor pEC86 im 2 ml Maßstab auf gute Expression getestet. Ein gut exprimierender Klon wird ausgewählt und es wird mit diesem eine 200 ml Vorkultur in LB-Medium (100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 60  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) angeimpft. Die Vorkultur wird bei 37 °C und 230 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 geschüttelt und zur Inokulation (1%ig) von 2,5 l Hauptkulturen verwendet. Die Hauptkulturen werden über Nacht wie oben beschrieben inkubiert und am nächsten Morgen bei einer OD<sub>600</sub> von 3 mit 0,4 mM IPTG induziert. Als zusätzliche Kohlenstoffquelle wird Glycerin (0,1% Endkonzentration) angeboten und die Zellen werden für weitere drei Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation bei 5000 rpm (10 min, 4 °C, Sorvall RC3C). Das Zellpellet aus einem Liter Kulturmedium wird in 12 ml Periplasmapuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 500 mM Sucrose) resuspendiert.

Durch Zugabe von Lysozym (0,1 mg/ml) wird des Peptidoglykangerüst der Zellen angedaut (30 min bei 4 °C unter Rühren) und durch Verdünnen mit einem Volumen

destilliertem Wasser wird das Periplasma freigesetzt. Die Zelltrümmer werden durch Ultrazentrifugation (35000 rpm, 4 °C, 60 min) abgetrennt. Der Überstand wird auf pH 8 nachgestellt und auf Q-Sepharose-Fast-Flow (Amersham Bioscience) aufgetragen. Die Säule wird zuvor äquilibriert (50 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) und das Protein wird durch einen Gradienten auf 150 mM NaCl eluiert (3 Volumina). Die roten Fraktionen werden vereinigt, ankonzentriert und über Sephacryl S100 (Amersham Bioscience) gelfiltriert (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).

### **2.4.3 Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *T. thermophilus***

#### **2.4.3.1 Anzucht auf LB-Medium**

Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) pLysS werden mit dem Plasmid pMA10 transformiert. Eine Übernachtskultur in LB-Medium (Amp, Cm, 37 °C) wird zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Diese wird bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 geschüttelt und dann für 6 Stunden mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Zellen werden geerntet (5000 rpm, 10 min, 4 °C) und in 50 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (0,1 mg/ml) und Pefabloc (100 µM) wird die Suspension für 30 min bei 4 °C gerührt und dann bei -80 °C eingefroren.

Die Zellen werden aufgetaut und durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250, Stufe 4, 40 %) aufgebrochen. Durch Zentrifugation (35000 rpm, 4 °C, 40 min) werden Zelltrümmer entfernt und der Überstand wird mit einem Volumen 50 mM Natriumacetat (pH 4,6) verdünnt. Das entstehende Präzipitat wird abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4 °C) und die Rekonstitution des Cu<sub>A</sub>-Zentrums erfolgt durch Zugabe eines Cu(His)<sub>2</sub>-Komplexes (100 mM, 15 µl pro ml Überstand). Die Lösung wird für 5 min gerührt und dann für 10 min auf 65 °C erhitzt. Diese Hitzefällung führt zur Denaturierung der meisten Proteine aus *E. coli* und das Präzipitat wird durch Zentrifugation entfernt (6000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird auf pH 4,6 nachgestellt, filtriert und auf mit 50 mM NaAc (pH 4,6) äquilibrierte CM-Sepharose aufgetragen. Zunächst wird mit zwei Säulenvolumina 50 mM Natriumacetat (pH 4,6) gewaschen und dann mit einer Mischung aus 30% Natriumacetat (50 mM, pH 4,6) und 70% Bis-Tris (20 mM, pH 7). Die Elution des purpurfarbenen Proteins erfolgt durch 20 mM Bis-Tris pH 7.

### 2.4.3.2 Anreicherung mit $^{15}\text{N}$ -Stickstoff

Die Anreicherung der löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne der  $ba_3$ -Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff wurde durch Wachstum auf Fermentermedium (2.1.4.2) durchgeführt. Hierzu wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS zunächst mit dem Plasmid pMA10 transformiert und eine  $\text{LB}_{\text{Amp,Cm}}$ -Vorkultur (37 °C) für ca. 6 Stunden angezogen. Die Zellen werden abzentrifugiert, in einem Liter Fermentermedium (mit Ampicillin, Chloramphenicol und 1 g/l  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) resuspendiert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Diese Vorkultur wird zum 10%igen Animpfen einer 5 Liter Hauptkultur im Fermenter (New Brunswick, Microferm) verwendet. Die Zellen werden bei 37 °C und zunächst 300 rpm Rührgeschwindigkeit angezogen, bei hoher Zelldichte ( $\text{OD} > 3$ ) wird auf 600 rpm gestellt. Bei einer optischen Dichte von  $\sim 4,0$  werden die Zellen mit 0,4 mM IPTG induziert und zunächst mit 1 g  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  versetzt. Nach 30 min wird das restliche  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (4 g) hinzugegeben und die Zellen für weitere 5 Stunden angezogen. Ernte, Rekonstitution des Kupferzentrums und Aufreinigung werden wie in Abschnitt 2.4.3.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.4.4 Cytochrom $c_{552}$ aus *T. thermophilus*

#### 2.4.4.1 Heterologe Expression

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wird mit dem Plasmid pMA7 transformiert und auf LB (Amp)-Platten ausplattiert. Aus einem dieser Klone werden kompetente Zellen hergestellt und mit dem Hämreifungsvektor pEC86 kotransformiert. Mit 2 ml Übernachtskulturen werden in einem Vorversuch verschiedene Klone auf gute Expression getestet. Ein gut exprimierender Klon wird in 100 ml  $\text{LB}_{\text{Amp,Cm}}$ -Medium für 4-5 Stunden bei 37 °C angezogen. Von dieser Vorkultur werden 10 ml zum Inokulieren von 2,5 l  $\text{LB}_{\text{Amp,Cm}}$ -Medium verwendet und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen werden die Zellen mit 0,2 mM IPTG induziert und durch die Zugabe von Glycerin (5 ml) wird eine weitere Kohlenstoffquelle angeboten. Nach vier Stunden werden die Zellen geerntet (Sorvall RC3C, 5000 rpm, 4 °C, 10 min), in Periplasmapuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 500 mM Sucrose) resuspendiert und mit Pefabloc SC (100  $\mu\text{M}$ ) versetzt.

Durch Einwirkung von Lysozym (0,1 mg/ml) für 30 min bei 4 °C und Verdünnen mit einem Volumen destilliertem Wasser wird das Periplasma freigesetzt. Die Zelltrümmer werden durch Ultrazentrifugation (35000 rpm, 4 °C, 60 min) abgetrennt. Falls noch genomische DNA im Überstand vorhanden ist, so wird diese durch

Ultraschallbehandlung fragmentiert. Der Überstand wird auf pH 8 nachgestellt und auf eine zuvor äquilibrierte (50 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) CM-Sepharose (Amersham Bioscience) aufgetragen. Innerhalb von vier Säulenvolumina wird ein Gradient bis 300 mM NaCl angelegt und das Cytochrom eluiert.

Die roten Fraktionen werden auf Verunreinigungen durch Cytochrom  $c_{557}$  spektroskopisch getestet. Fraktionen, die nur das Cytochrom  $c_{552}$  enthalten werden vereinigt, ankonzentriert und über Sephacryl S100 (Amersham Bioscience) gelfiltriert (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).

### **2.4.4.2 Homologe Expression des Histidin-markierten Proteins**

Der Expressionsstamm wird durch Elektroporation des Plasmids pMA42 in *T. thermophilus* HB27 generiert und auf LB<sub>Km</sub>-Platten bei 70 °C angezogen. Von dieser Agarplatte wird eine Vorkultur in 400 ml LB<sub>Km</sub> bei 70 °C angezogen und zur Inokulation von 10 l Flüssigkultur (LB<sub>Km</sub>) verwendet. Die Expression erfolgt konstitutiv während der Wachstumsphase bei 70 °C über ~40 Stunden. Nach Ernte der Zellen (Sorvall RC3C, 5000 rpm, 4 °C, 10 min) erfolgt die Präparation des Periplasmas durch Resuspendierung der Zellen in 20 ml Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 500 mM Sucrose, 100 µM Pefabloc) und Behandlung mit Lysozym (0,1 mg/ml) für 30 min bei 4 °C. Nach dem Verdünnen mit einem Volumen destilliertem Wasser wird das Periplasma freigesetzt und durch Zentrifugation werden Zelltrümmer abgetrennt (35000 rpm, 4 °C, 60 min).

Der Überstand wird auf pH 8 nachgestellt und auf eine zuvor äquilibrierte (50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl) Ni-NTA-Säule (Qiagen) aufgetragen und mit mehreren Säulenvolumina 50 mM Imidazol (in 50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl) gewaschen. Die Elution des roten Proteins erfolgt mit 300 mM Imidazol (in 50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl). Die gefärbten Fraktionen werden vereinigt, ankonzentriert und durch Gelfiltration über Sephacryl S100 (in 50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl) weiter aufgereinigt.

### **2.4.5 Cytochrom $c_1$ aus *T. thermophilus***

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wird mit den Plasmiden pMA37 und pEC86 nacheinander transformiert. Wie bei den anderen heterolog exprimierten Cytochromen wird zunächst auf einen gut exprimierenden Klon getestet und dieser wird in 100 ml LB<sub>Amp, Cm<sup>-</sup></sub> Medium für 4-5 Stunden bei 37 °C angezogen.

Mit dieser Vorkultur wird eine 2,5 l LB<sub>Amp, Cm</sub>-Kultur angeimpft und über Nacht bei 32 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen werden die Zellen mit IPTG induziert (Endkonzentration 0,2 mM) und mit 5 ml Glycerin versetzt. Nach vier Stunden werden die Zellen geerntet und wird das Periplasma präpariert. Die Aufreinigung erfolgt über eine mit 20 mM Tris/HCl (pH 8) und 1 mM EDTA äquilibrierte Q-Sepharose Fast-Flow-Säule. Das Protein wird durch Anlegen eines Salzgradienten auf 150 mM NaCl eluiert. Die rot gefärbten Fraktionen werden vereinigt, ankonzentriert und über eine Sephacryl S100-Säule (Amersham Bioscience) in 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA gelfiltriert.

### **2.4.6 *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus***

Die Expression der Plasmid-kodierten *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase wird in *T. thermophilus* HB 27 durchgeführt. Nach Elektroporation des Plasmids pMA39 (His<sub>6</sub>-Tag C-terminal an der Untereinheit I) in die Zellen werden die Transformanten zunächst auf frische LB<sub>Km</sub>-Platten überstrichen. Eine 400 ml Vorkultur in LB<sub>Km</sub> wird bei 70 °C über Nacht angezogen und zur Inokulation von 7,5 Litern Hauptkultur (LB<sub>Km</sub>) verwendet. Nach der Anzucht über Nacht bei 70 °C und 135 rpm erfolgt die Ernte der Zellen (Sorvall RC3C, 5000 rpm, 4 °C, 10 min). Das Zellpellet wird in 100 mM Tris/HCl, pH 8 resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, Stufe 4, 40%, 3 mal 10 min) werden die Zellen aufgeschlossen und durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 6000 rpm, 10 min, 4 °C) werden grobe Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wird erneut zentrifugiert (35000 rpm, 60 min, 4 °C) und das Membranpellet in 100 mM Tris/HCl, pH 8 resuspendiert, so daß eine Suspension von ~ 10 mg Protein pro ml entsteht. Diese Suspension wird auf 5 % Triton X-100 eingestellt und für drei Stunden solubilisiert. Durch Ultrazentrifugation (35000 rpm, 60 min, 4 °C) werden weiterhin unlösliche Anteile abgetrennt und der Überstand wird auf die Startbedingungen der Chromatographiesäule (0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl) gebracht. Der Solubilisierungsansatz wird auf eine zuvor äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Qiagen) aufgetragen und mit mehreren Säulenvolumina Puffer (0,5% Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt durch Anlegen eines Imidazolgradienten von 0 - 150 mM. Die durch die Häm-Cofaktoren grün-bräunliche gefärbten Fraktionen (~ 60 mM Imidazol) werden vereinigt, ankonzentriert und über Gelfiltration (Sephacryl S200 in 0,5% Triton X-100, 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl) weiter aufgereinigt.

## 2.5 Spektroskopische Methoden

### 2.5.1 Optische Spektren

#### 2.5.1.1 Redoxspektren

Zur Konzentrationsbestimmung der Cytochrome werden Redoxdifferenzspektren aufgenommen. Hierzu wird zunächst eine Probe mit Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert, und dann durch Zugabe von Natriumdithionitkristallen reduziert. Es wird jeweils ein Spektrum von 500 - 650 nm aufgenommen und die Differenz zwischen dem reduzierten minus dem oxidierten Spektrum gebildet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt dann über das Lambert-Beer-Gesetz mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten bei einer festgelegten Wellenlänge (*P. denitrificans* Cytochrom  $C_{552}$ :  $\epsilon_{\text{Red-Ox}, 552 \text{ nm}} = 19,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; *T. thermophilus* Cytochrom  $C_{552}$ :  $\epsilon_{\text{Red-Ox}, 552 \text{ nm}} = 21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [25]; *T. thermophilus* Cytochrom  $C_1$ :  $\epsilon_{\text{Red-Ox}, 552 \text{ nm}} = 15,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 2.5.1.2 Pyridinhämochrom-Spektren

Zur Bestimmung der einzelnen Hämkomponenten einer Probe werden Pyridinhämochrom-Spektren aufgenommen. Das Protein wird in 0,1 N NaOH und 20% Pyridin (v/v) denaturiert. Das Pyridin kann daraufhin die fünfte und sechste Koordinierungsstelle des Eisenatoms im Häm besetzen. Die Aufnahme von Redoxspektren ermöglicht die Zuordnung von Hämtypen und die Bestimmung ihrer Konzentration in der Probe [80]. Die Reduktion erfolgte durch Natriumdithionit, die Oxidation durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III).

### 2.5.2 Kohlenmonoxid-Bindungsspektren

Kohlenmonoxid bindet an Häm  $a_3$  und führt so zu einer charakteristischen Veränderung des Spektrums. Die Oxidase wird in einem detergenzhaltigen Puffer verdünnt und mit Dithionit reduziert. Nach Aufnahme eines Spektrums von 400 - 650 nm wird die Küvette mit CO begast (ca. 30 Bläschen) und erneut ein Spektrum aufgenommen. Durch Subtraktion des ersten Spektrums vom zweiten (ligandierten Spektrum) erhält man das CO-Differenzspektrum.



### **2.5.3 Redoxtitration**

Zur Bestimmung des Redoxpotentials des Cu<sub>A</sub>-Fragmentes aus *T. thermophilus* wurde das Protein zunächst in 100 mM KPi, 100 mM KCl, pH 7 umgepuffert und mit einem Mediator-Mix für 10 min auf Eis inkubiert. Die Mediatoren, redoxaktive Verbindungen unterschiedlicher Redoxpotentiale, gewährleisten die Elektronenübertragung von den Elektroden auf das Protein. Die Protein/Mediator-Mischung wurde in die Meßzelle des UV/VIS-Spektrometers mit Redoxzelle (Bruker IFS25) eingebracht und die Temperatur äquilibriert. Durch Anlegen verschiedener Potentiale (in Abständen von 30 mV) über die Elektroden (Ag/AgCl) und Verfolgung des Redox-sensitiven Signals bei 480 nm erfolgt die Aufnahme der Redoxkurve. Die Reversibilität des Prozesses wird durch Rücktitration überprüft und das Mittelpunktspotential ergibt sich durch Anpassung an die Nernst-Gleichung.

### **2.5.4 Stopped-flow-Kinetiken**

Die Messung schneller Kinetiken erfolgte an einem thermostatisierten Applied Photophysics DX.17MV stopped-flow Apparat (Leatherhead, UK) mit einer 1 cm Meßzelle in Zusammenarbeit mit Prof. Francesco Malatesta an der Universität „La Sapienza“ (Rom, Italien).

Um die Autoxidation der Redoxproteine zu verhindern, wurden die Proben in einem zuvor mit Stickstoff gespülten (30 min), anaeroben Puffer (20 mM BisTris, pH 7) mit Natriumascorbat in einer Spritze vorreduziert. Bei dem gewählten pH-Wert ist Ascorbat ein langsames Reduktionsmittel [81, 82]. Um eine vollständige Reduktion des Elektronendonors zu erreichen, wird für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektronentransferreaktion wird dann nach dem Mischen mit dem oxidierten Elektronenakzeptor bei einer Wellenlänge mit einer großen Reaktionsamplitude verfolgt. Die Ionenstärke des Puffers wurde durch Zugabe von Kaliumchlorid variiert.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion mit Hilfe des Programms Origin (Microcal) und lineare Regression der resultierenden Daten.

### 2.5.5 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme aller NMR-Spektren erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für biophysikalische Chemie (J.W. Goethe-Universität, Frankfurt).

Die Interaktionsmessungen der *P. denitrificans*-Redoxpartner wurden an einem Bruker DRX 500 Spektrometer mit einem 5 mm Triple-Resonanz Probenkopf durchgeführt. Die Aufnahme der 2D-[<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H]-TROSY-Experimente erfolgte durch Dr. H. Wienk bei Messtemperaturen von 27 °C oder 7 °C für die reduzierte Probe und für die oxidierte Probe bei 27 °C oder 12 °C.

Die Interaktionsmessungen für den Komplex Cytochrom *c*<sub>552</sub> und [<sup>15</sup>N]-Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *T. thermophilus* wurden an einem Bruker Avance 900 MHz Spektrometer mit einem 5 mm Triple-Resonanz Probenkopf durchgeführt. Die Aufnahme der 2D-[<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H]-TROSY-Spektren bei 25 °C und 40 °C erfolgte durch Dr. F. Lühr.

Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden diese parallel verarbeitet, in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) umgepuffert und mit DSS als Referenzsubstanz versetzt.

Durch mehrfaches Entgasen und Begasen mit Argon wurde für Sauerstofffreiheit der Proben gesorgt. Die Reduktion der Proben erfolgte durch Zugabe von entgastem Natriumascorbat (1 M Stammlösung) in einer Endkonzentration von 4 mM. Vollständig oxidierte Proben wurden durch Zugabe von 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) hergestellt.

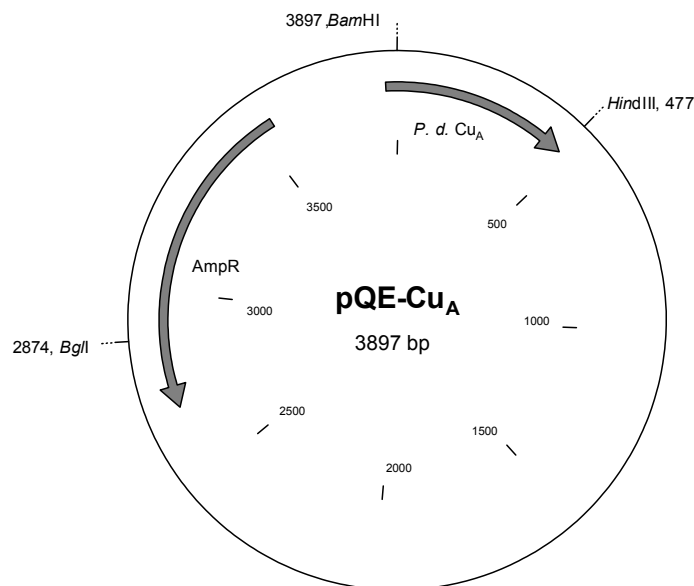
Durch Zugabe des Redoxpartners in ~4-fachem Überschuß werden die Änderungen der chemischen Verschiebungen aufgrund der Komplexbildung induziert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Cytochrom $c_{552}$ und $Cu_A$ aus *P. denitrificans*

##### 3.1.1 Expressionssteigerung des löslichen $Cu_A$ -Fragments

Um eine effiziente Anzucht und eine spätere Markierung mit  $[^{15}\text{N}]$ -Stickstoff zu ermöglichen, wurde zunächst die Expression des löslichen  $Cu_A$ -Fragments der  $aa_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase aus *P. denitrificans* gegenüber dem ursprünglich von Lappalainen *et al.* [57] beschriebenen Klon gesteigert. Hierzu wurde ein Expressionssystem für *E. coli* basierend auf dem Vektor pQE-30 (Qiagen) ausgewählt und modifiziert. Dieser Vektor stellt ein N-terminales  $\text{His}_6$ -Tag zur Verfügung und steht in der Zelle in hoher Kopienzahl zur Verfügung. Die Konstruktion einer TEV-Proteaseschnittstelle hinter das  $\text{His}_6$ -Tag ermöglicht ein späteres Entfernen der N-terminalen Aminosäuren (siehe Abbildung 5), da diese bei manchen Experimenten unerwünscht sind.

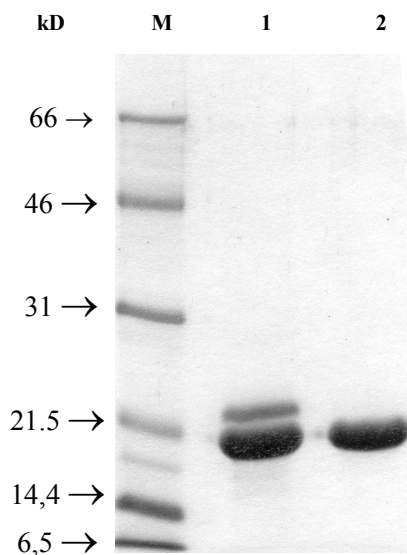


**Abbildung 5:** Plasmidkarte des Vektors pQE- $Cu_A$  mit den ersten N-terminalen 25 Aminosäureresten des translatierten Produktes (unten, Erkennungssequenz der TEV-Protease unterstrichen). Spaltung durch die TEV-Protease erfolgt N-terminal vor dem hervorgehobenen Serin.

Durch PCR mit den Primern SUII-*Bam*HI-TEV und *cta-Hind*III wurde das für die Aminosäuren 128-280 kodierende DNA-Fragment amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen versehen. Die Klonierung in pQE-30 mit *Bam*HI und *Hind*III ergab den Expressionsvektor pQE- $Cu_A$ .

## Ergebnisse

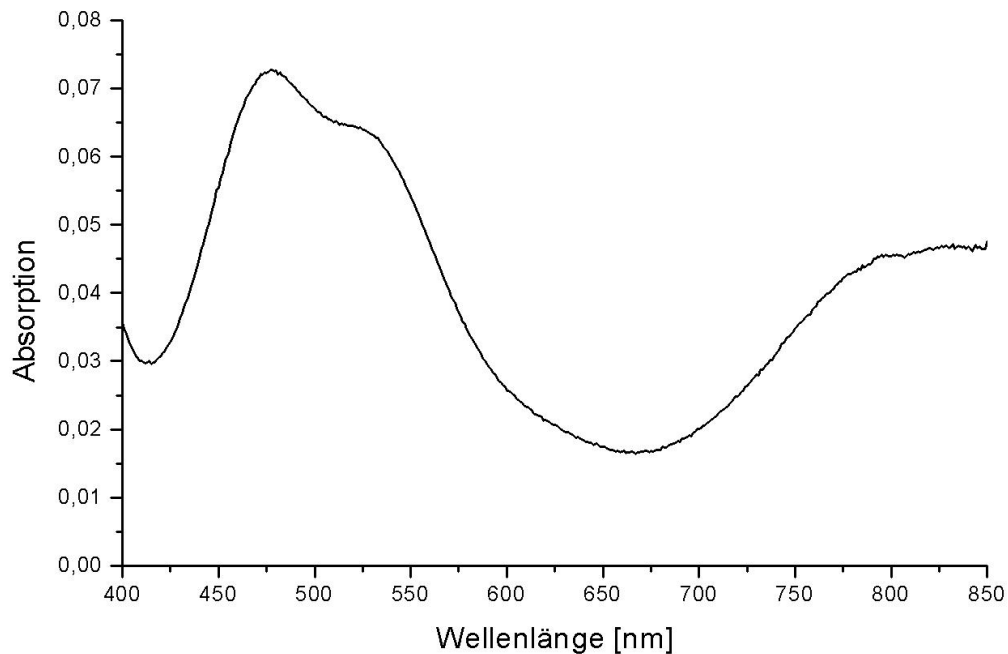
Da dieses Konstrukt nach Transformation in *E. coli* JM 109 zu ca. 20-fach höheren Ausbeuten führt, das His<sub>6</sub>-Tag jedoch zu keinen Verbesserungen bei der Aufreinigung führte, wurde das Tag daraufhin bereits *in vivo* wieder entfernt. Dies wurde durch Co-



**Abbildung 6:** SDS-PAGE (12%) von angereichertem *P. denitrificans* Cu<sub>A</sub>-Fragment. M: Proteinmarker, 1: vorgereinigtes Produkt nach Gelfiltration mit noch unprozessiertem Protein (obere Bande), 2: Durchlauf nach der Ni-NTA-Säule

Transformation des Stammes mit dem Vektor pRK603 erreicht, der zu einer konstitutiven Expression der TEV-Protease führt.

Nach Reinigung über den Anionenaustauscher Q-Sepharose (Amersham Bioscience) und Gelfiltration über Sephacryl S100 HR (Amersham Bioscience) enthält die Probe gelegentlich noch Cu<sub>A</sub>-Protein mit His<sub>6</sub>-Tag (siehe Abbildung 6). Dieses wird durch die Ni-NTA-Säule entfernt und das gereinigte Produkt findet sich im Durchlauf. Es werden Ausbeuten von 8 mg gereinigtem Protein pro Liter Kulturmedium (LB-Medium) erreicht. Bei Anzucht auf Fermentermedium werden vergleichbare Ausbeuten erreicht, jedoch erfolgt eine vollständige Prozessierung des Proteins durch die TEV-Protease.



**Abbildung 7:** Spektrum des aufgereinigten Cu<sub>A</sub>-Fragments (24 μM) aus *P. denitrificans* mit den charakteristischen Maxima bei 480, 530 und ~810 nm.

Die insgesamt verlangsamte Wachstums-geschwindigkeit der Zellen könnte sich hierbei auch die Bildung der *Inclusion-Bodies* verzögern, so daß die Protease alle gebildeten Cu<sub>A</sub>-Präsequenzen durch eine verlängerte Zugänglichkeit prozessieren kann. Das gereinigte Produkt zeigt das für die Cu<sub>A</sub>-Domäne charakteristische Spektrum (Abbildung 7) mit einem Maximum bei 480 nm ( $\epsilon_{480} = 3,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und einer sehr breiten Bande um 800 nm ( $\epsilon_{808} = 1,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [57].

### **3.1.2 Elektronentransferkinetiken**

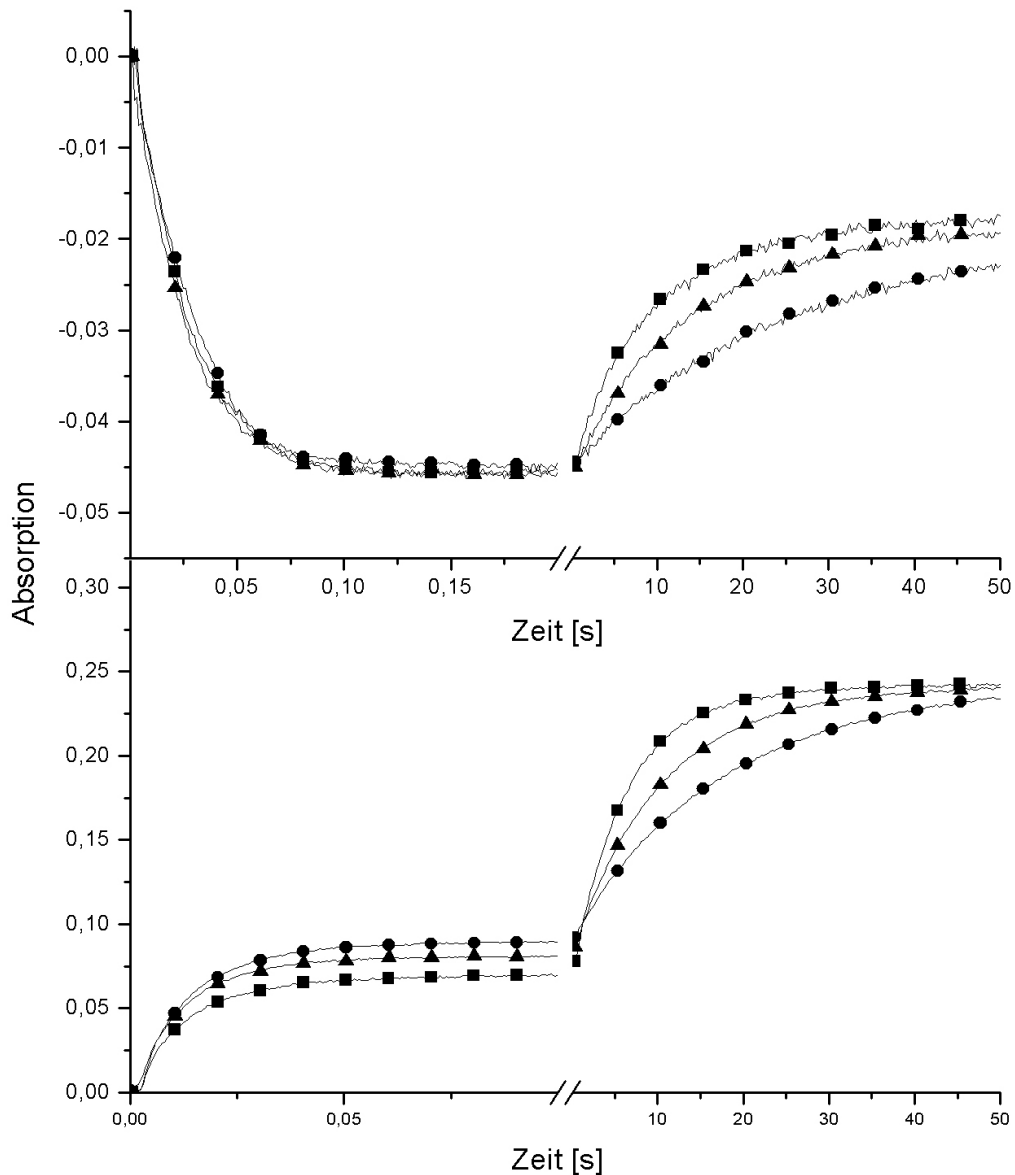
#### **3.1.2.1 Vorversuche**

Um den primären Elektronentransferschritt zur *aa*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* ohne störende Einflüsse durch nachfolgende Elektronentransferreaktionen untersuchen zu können, wurden schnelle Kinetiken mit den löslichen Proteinmodulen des Cytochrom *c*<sub>552</sub> und der Cu<sub>A</sub>-Domäne mittels *stopped-flow*-Spektroskopie aufgenommen.

Es wurde ein Protokoll ausgearbeitet, indem eine der beiden Komponenten zunächst durch Ascorbat vorreduziert wird. Hierzu muß zunächst sichergestellt werden, daß die Reaktion des Ascorbat unter den verwendeten Bedingungen mit den Proteinen wesentlich langsamer ist als der Interproteinelektronentransfer. Um diese Voraussetzung zu überprüfen, wurde jeweils eine der beiden Komponenten mit Ascorbat in einer Spritze reduziert, mit dem oxidierten Partner in der *stopped-flow*-Apparatur gemischt und die Absorptionsänderung bei 552 nm verfolgt.

Durch eine längere Aufnahmezeit (bis 50 s) wurde sichergestellt, daß beide Phasen (Interproteinelektronentransfer und Ascorbatreaktion) der Reaktion verfolgt wurden (Abbildung 8). Auf der kurzen Zeitskala (0,1 und 0,2 s) sind jeweils die schnellen Phasen des Interproteinelektronentransfers zu beobachten und bei längerer Datenaufnahme (50 s) ist die Rereduktion der Komponenten durch das Ascorbat zu erkennen. Bei der Hinreaktion wird nicht wieder die gleiche Absorption wie zu Beginn der Reaktion erreicht, da zunächst noch das Cu<sub>A</sub> bei der verwendeten Wellenlänge zur Absorption beiträgt, dieses aber als reduziertes Protein komplett farblos ist. In der Rückreaktion wird zunächst nur ein Teil des Cytochroms durch Cu<sub>A</sub> reduziert, dann folgt die vollständige Reduktion beider Komponenten durch Ascorbat, und die Absorption steigt, bis das gesamte Cytochrom durch Ascorbat reduziert wurde.

## Ergebnisse



**Abbildung 8:** Abhängigkeit der Hin- (oben) und Rückreaktion (unten) des Elektronentransfers zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und der  $Cu_A$ -Domäne aus *P. denitrificans* von der Ascorbatkonzentration (0,25 mM: ●, 0,5 mM: ▲, 1 mM: ■ nach Mischung der Komponenten). Alle Proteinproben wurden in 20 mM Bis-Tris pH 7,0 ( $T = 8^\circ\text{C}$ ) mit einer Salzkonzentration von 50 mM KCl verdünnt. Man beachte die geteilte Zeitskala. Oben: Ascorbat-reduziertes *Pd-c*<sub>552</sub> (63,1  $\mu\text{M}$ ) wird mit oxidiertem *Pd-Cu*<sub>A</sub> (16,8  $\mu\text{M}$ ) gemischt und die Absorptionsänderung bei 552 nm verfolgt. Die kurze Zeitskala (links) repräsentiert den Elektronentransfer zwischen den beiden Proteinen und bei längeren Datenquisitionen erfolgt die Rereduktion des *Pd-c*<sub>552</sub> (rechts). Unten: In der Rückreaktion wird *Pd-Cu*<sub>A</sub> (16,1  $\mu\text{M}$ ) vorreduziert und mit oxidiertem *Pd-c*<sub>552</sub> (32,7  $\mu\text{M}$ ) gemischt (links); die vollständige Reduktion aller Komponenten durch Ascorbat erfolgt auf der längeren Zeitskala (rechts).

An die beobachteten Zeitverläufe wurde eine biexponentielle Funktion angepasst und daraus die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Reaktionsphasen ermittelt (Tabelle 1). Es zeigt sich, daß die schnellen Phasen ( $k_{\text{fast}}$ ) des Elektronentransfers zwischen den Proteinen unabhängig von der Ascorbatkonzentration (Asc) sind und die

## Ergebnisse

Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase ( $k_{\text{slow}}$ ) mit zunehmenden Ascorbatkonzentrationen steigen. Die verschiedenen Phasen der Reaktion sind somit problemlos getrennt voneinander zu beobachten. Aus diesen Daten wurde ermittelt, daß die apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des Ascorbats mit dem Cytochrom  $c_{552}$   $\sim 150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und mit dem  $\text{Cu}_A$ -Fragment  $\sim 62 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  beträgt. Damit ist die Ascorbatreaktion um drei bis fünf Größenordnungen langsamer als der Elektronentransfer der beiden Proteine untereinander (siehe auch 3.1.2.2).

	$k_{\text{fast}}$	$k_{\text{slow}}$ (0,25 mM Asc)	$k_{\text{slow}}$ (0,5 mM Asc)	$k_{\text{slow}}$ (1,0 mM Asc)
Hinreaktion	$39,7 \text{ s}^{-1}$	$0,041 \text{ s}^{-1}$	$0,074 \text{ s}^{-1}$	$0,112 \text{ s}^{-1}$
Rückreaktion	$83,3 \text{ s}^{-1}$	$0,06 \text{ s}^{-1}$	$0,1 \text{ s}^{-1}$	$0,16 \text{ s}^{-1}$

**Tabelle 1:** Beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die schnelle ( $k_{\text{fast}}$ , interprotein) und die langsame ( $k_{\text{slow}}$ , zwischen Ascorbat und Protein) Phase des Elektronentransfers bei verschiedenen Ascorbatkonzentrationen (0,25 – 1 mM nach Mischung). Alle Experimente wurden in 20 mM Bis-Tris pH 7,0 ( $T= 8 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mit einer Salzkonzentration von 50 mM KCl durchgeführt. (siehe auch Abbildung 7).

### 3.1.2.2 Die Reaktion von Cytochrom $c_{552}$ mit $\text{Cu}_A$

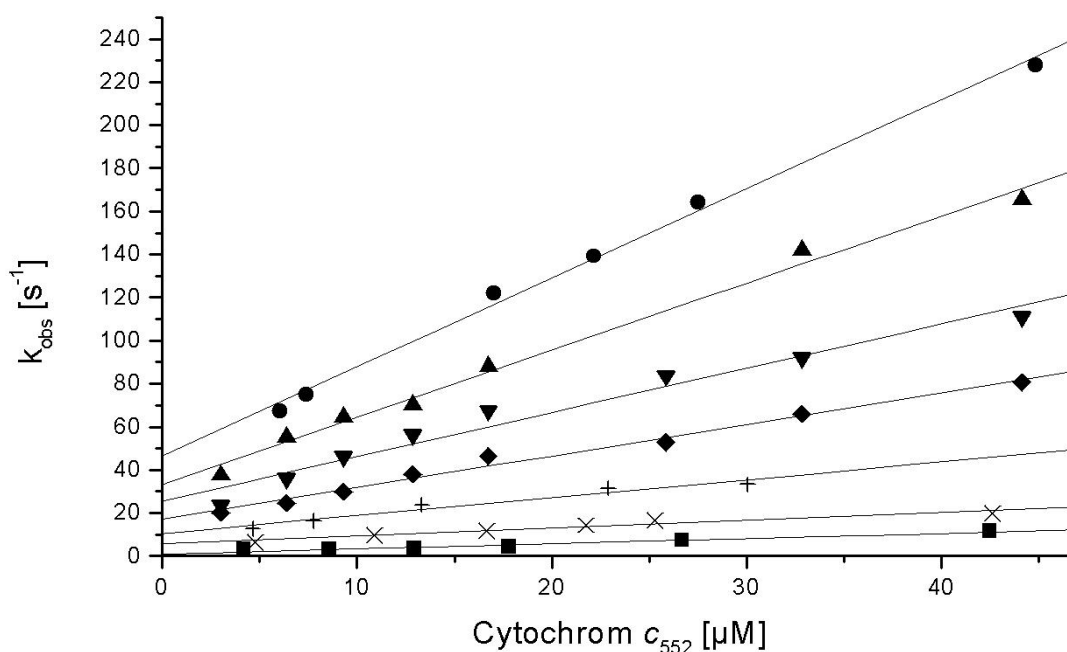
Die Elektronentransferraten in der physiologischen Richtung, vom reduzierten Cytochrom  $c_{552}$  zum oxidierten  $\text{Cu}_A$ , wurden systematisch bei verschiedenen Ionenstärken in der *stopped-flow*-Apparatur untersucht. Durch Variation der Pd- $c_{552}$ -Konzentrationen kann die bimolekulare Reaktionskonstante ( $k_{\text{forward}}$ ) auch unter *non-pseudo first order* Bedingungen abgeschätzt werden. Echte Bedingungen nach pseudo erster Ordnung werden dadurch erreicht, daß einer der beiden Reaktionspartner im großen Überschuß (im Regelfall 50 bis 100-fach) vorhanden ist. Die Konzentration dieses Reaktanden kann dann, in erster Näherung, als konstant über den Reaktionsverlauf betrachtet werden.

Echte Bedingungen nach pseudo erster Ordnung sind bei der Messung dieser beiden Elektronentransferproteine zum Einen aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Reaktion und zum Anderen durch die großen Unterschiede der Extinktionskoeffizienten der Proteine (siehe 2.5.1.1) nicht möglich. Die Messung der Elektronentransferreaktion erfolgte deshalb unter *non-pseudo first order* Bedingungen. Hierzu wurde die Konzentration des Pd- $\text{Cu}_A$  konstant gehalten (um  $10 \text{ } \mu\text{M}$ ) und gegen variierte Konzentrationen des Cytochroms ( $5 - 50 \text{ } \mu\text{M}$ ) gemessen. Durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion (Formel 1) an die Rohdaten wird die Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) der jeweiligen Reaktion bestimmt.

$$y = y_0 + Ae^{-kt} \quad \text{Formel 1}$$

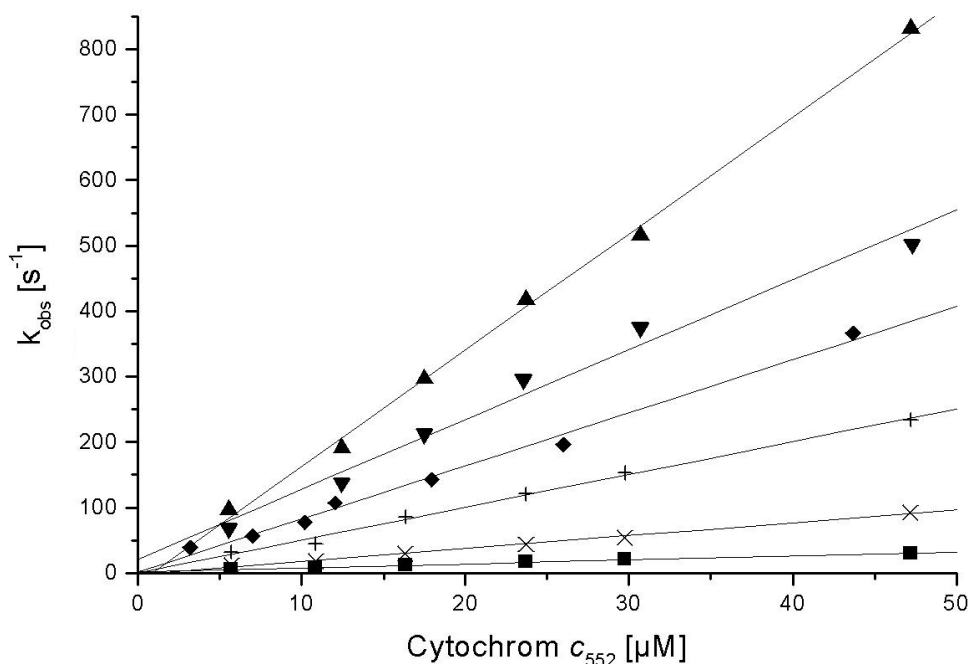
In dieser Formel ist  $y_0$  der Absorptions-Endwert (offset) der Reaktion,  $A$  die Amplitude,  $k$  die beobachtete Geschwindigkeitskonstante unter den verwendeten Bedingungen und  $t$  der jeweilige Zeitpunkt der Absorptionsmessung. Durch Auftragen von  $k_{obs}$  gegen die Cytochrom  $c_{552}$  Konzentrationen (Abbildung 9) und lineare Regression kann aus der Steigung der Geraden die apparente bimolekulare Geschwindigkeitskonstante bestimmt werden (Tabelle 2). Die apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Hinreaktion liegen im Bereich von  $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (10 mM KCl) bis  $9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (200 mM KCl) und sind damit um mehrere Größenordnungen schneller als die Reduktion durch Ascorbat.

Durch Vorreduktion des  $\text{Cu}_A$ -Fragmentes und Elektronentransfer zu oxidiertem Cytochrom  $c_{552}$  wurde auch die Rückreaktion, die nicht-physiologische Richtung, untersucht (Abbildung 10).



**Abbildung 9:** Elektronentransfer zwischen reduziertem  $Pd-c_{552}$  (physiologische Richtung) und oxidiertem  $Pd-Cu_A$  (mit Konzentrationen von 8,0 - 10,8  $\mu\text{M}$ ) bei verschiedenen Ionenstärken (10 mM: ●, 15 mM: ▲, 25 mM: ▼, 35 mM: ◆, 50 mM: +, 100 mM: x, 200 mM: ■) in 20 mM Bis-Tris (pH 7,  $T = 8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[\text{Asc}] = 0,25 \text{ mM}$ ). Die beobachteten, gefitteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden gegen die  $Pd-c_{552}$ -Konzentrationen aufgetragen. Durchgezogene Linien wurden durch lineare Regression der Datenpunkte berechnet.





**Abbildung 10:** Elektronentransfer zwischen oxidiertem *Pd-c<sub>552</sub>* (nicht-physiologische Richtung) und reduziertem *Pd-Cu<sub>A</sub>* (mit Konzentrationen von 8,1 – 9,8  $\mu\text{M}$ ) bei verschiedenen Ionenstärken (15 mM: ▲, 25 mM: ▼, 35 mM: ◆, 50 mM: +, 100 mM: x, 200 mM: ■) in 20 mM Bis-Tris (pH 7, T= 8 °C, [Asc]= 0,25 mM). Die beobachteten, gefitteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden gegen die *Pd-c<sub>552</sub>*-Konzentrationen aufgetragen. Durchgezogene Linien wurden durch lineare Regression der Datenpunkte berechnet.

Ionenstärke [mM]	$k_{\text{for}}$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{rev}}$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$K_{\text{eq}}$
10	$4,13 \cdot 10^6$	n.b.	n.b.
15	$3,42 \cdot 10^6$	$17,7 \cdot 10^6$	0,19
25	$2,05 \cdot 10^6$	$10,6 \cdot 10^6$	0,19
35	$1,46 \cdot 10^6$	$8,1 \cdot 10^6$	0,18
50	$0,83 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	0,17
100	$0,36 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	0,19
200	$0,09 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^6$	0,15

**Tabelle 2:** Apparente Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für den Elektronentransfer zwischen Cytochrom *c<sub>552</sub>* und *Cu<sub>A</sub>*-Fragment aus *P. denitrificans* unter variierten Ionenstärken (n.b.= nicht bestimmt).

Die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten sind für die Rückreaktion gegenüber der Hinreaktion bei gleichen Ionenstärken schneller und liegen im Bereich von  $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (15 mM KCl) bis  $6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (200 mM KCl). Die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}$  für die physiologische Richtung kann durch Teilung von

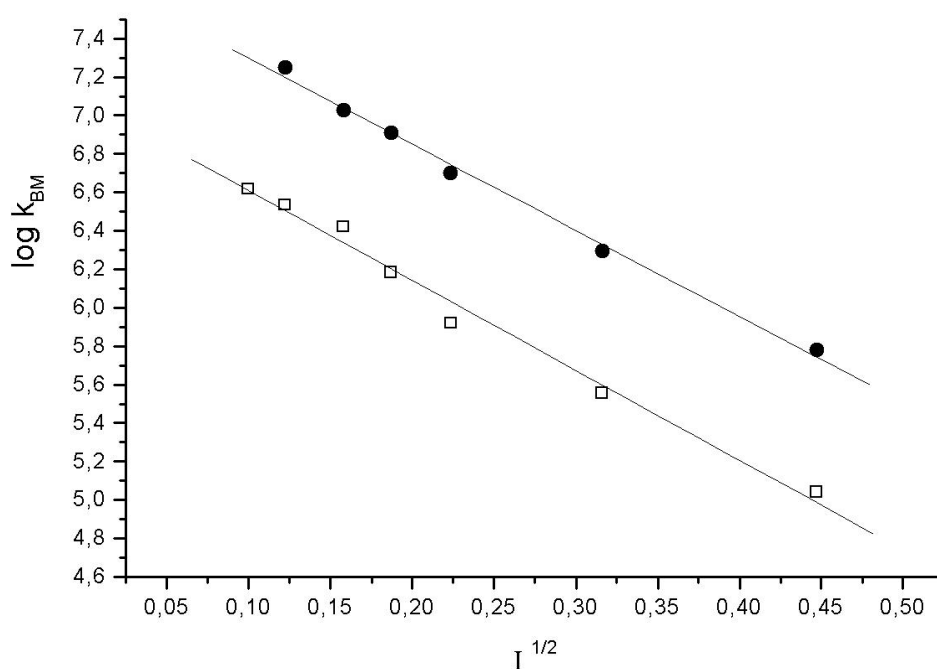
$k_{\text{forward}}$  durch  $k_{\text{reverse}}$  berechnet werden und liegt für alle Ionenstärken bei  $\sim 0,2$  (Tabelle 2). Dies verdeutlicht die Bevorzugung der Rückreaktion, da das Gleichgewicht auf Seiten des reduzierten Cytochroms liegt; die Ionenstärke des Puffers hat keinen Effekt auf die Lage des Gleichgewichts.

### 3.1.2.3 Ionenstärkeabhängigkeit

Die Ionenstärkeabhängigkeit der Elektronentransferreaktion wurde nach der Theorie von Brønsted [83] analysiert. Hierzu wird der dekadische Logarithmus der apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten gegen die Quadratwurzel der Ionenstärke aufgetragen (Abbildung 11).

$$\log k = \log k_0 + 2Bz_A z_B \sqrt{I} \quad \text{Formel 2}$$

In dieser Formel ist  $k$  die bei einer bestimmten Ionenstärke gemessene apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante,  $k_0$  entspricht der bimolekularen Rate bei einer Ionenstärke  $I = 0$ .  $B$  ist ein Faktor der aus der Debye-Hückel-Theorie entstammt und dessen Wert bei einer Temperatur von  $T = 8 \text{ }^\circ\text{C}$  ungefähr 0,5 beträgt.

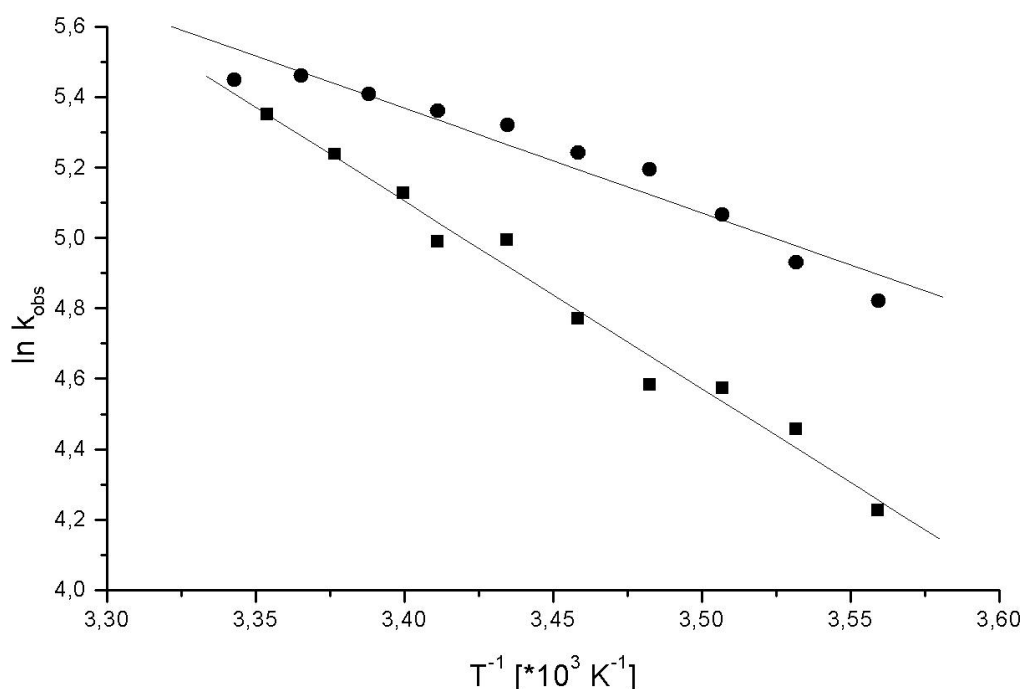


**Abbildung 11:** Ionenstärkeabhängigkeiten der apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{BM}}$ ) des Elektronentransfers Cytochrom  $c_{552}$ -Cu<sub>A</sub>-Fragment aus *P. denitrificans*. Der Logarithmus von  $k_{\text{BM}}$  wird gegen die Wurzel der Ionenstärke aufgetragen. Die Steigung dieses Graphen, das  $z_A z_B$ -Produkt, ist ein Maß für die Ladungen auf den Interaktionsflächen der Proteine. Hinreaktion: □; Rückreaktion: ●.

Die Ladungen der beiden Proteine, von der die Elektronentransferreaktion abhängig ist, repräsentieren in dieser Formel  $z_A$  und  $z_B$ . Durch lineare Regression der Daten für Hin- und Rückreaktion ergibt sich eine Steigung (das  $z_A z_B$ -Produkt) von -4,6. Daraus ergibt sich, daß auf den Interaktionsflächen der beiden Proteine im Schnitt 2-3 Ladungen mit entgegengesetztem Vorzeichen miteinander interagieren. Der parallele Verlauf ergibt sich daraus, daß bei Hin- und Rückreaktion die gleiche Anzahl von Ladungen beteiligt sind.

### 3.1.2.4 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit des Elektronentransfers des Reaktionspaares Cytochrom  $c_{552}$  -  $Cu_A$ -Domäne wurde für die Hin- und Rückreaktion im Bereich von 8 – 26 °C vermessen. Im Arrhenius Diagramm (Abbildung 12) wird der natürliche Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{obs}$ ) gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen (Formel 3).



**Abbildung 12:** Temperaturabhängigkeit des Elektronentransfers zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und  $Cu_A$ -Domäne aus *P. denitrificans*. Der natürliche Logarithmus der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wird gegen die reziproke absolute Temperatur (variiert von 8 – 26 °C) aufgetragen. Aus der Steigung kann die Aktivierungsenergie  $E_a$  berechnet werden. ■: Hinreaktion ( $Pd-c_{552} = 6 \mu M$ ,  $Pd-Cu_A = 10,8 \mu M$ ). ●: Rückreaktion ( $[Pd-c_{552}] = 5 \mu M$ ,  $[Pd-Cu_A] = 10,7 \mu M$  nach Mischung). Die Experimente wurden in 20 mM Bis-Tris pH 7,0 mit 10 mM KCl durchgeführt.

## Ergebnisse

---

Durch lineare Regression lässt sich aus den Steigungen durch Multiplikation mit  $R$  (Gaskonstante,  $R = 8,314 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) die Aktivierungsenergie  $E_a$  für die Reaktion berechnen.

$$k_{obs} = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \rightarrow \quad \ln k_{obs} = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + const. \quad \text{Formel 3}$$

Für die Hinreaktion ergibt sich eine Aktivierungsenergie von 44,4 kJ/mol, für die Rückreaktion beträgt  $E_a$  nur 24,7 kJ/mol. Es zeigt sich auch hier wieder die schon zuvor beobachtete Bevorzugung der Rückreaktion, da das Gleichgewicht auf Seiten des reduzierten Cytochroms liegt.

### 3.1.2.5 Weiterführende Analyse der bimolekularen Reaktion

Da, wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben, die Bedingungen nach pseudo-erster Ordnung für die Reaktion Cytochrom  $c_{552} - Cu_A$  nicht vollständig erreicht werden können, wurde von Prof. F. Malatesta (Universität L'Aquila, Italien) eine Methode entwickelt, um bimolekulare Reaktionen unter Bedingungen non-pseudo-erster Ordnung besser analysieren zu können (unveröffentlicht). Danach werden bimolekulare Reaktionen durch einen Quotienten von Exponentialfunktionen beschrieben.

Dieses theoretisch hergeleitete Gleichungssystem wurde auf seine Anwendbarkeit für das Elektronentransferpaar Cytochrom  $c_{552} - Cu_A$  getestet. Die Reaktionen wurden in 20 mM Bis-Tris, 50 mM KCl bei einer Temperatur von 8 °C durchgeführt ( $[Asc]=0,25$  mM) und sind damit mit den in Kapitel 3.1.2.2 beschriebenen Daten vergleichbar, jedoch wurden wesentlich mehr Datenpunkte aufgenommen ( $[c_{552}]=0,5 - 40$   $\mu$ M).

Formel 4 wurde an die Zeitverläufe der Reaktion (verfolgt durch die Absorptionsänderung bei 552 nm) durch ein iteratives Verfahren (Microcal Origin) angeglichen und damit die beobachteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (hier  $\eta$ ) bestimmt. Der Reaktionsverlauf in der Zeit  $t$  ist hierbei abhängig von folgenden Variablen:  $A$  ist die Amplitude der Reaktion,  $y_0$  entspricht der y-Achsenverschiebung,  $\eta$  ist äquivalent zu  $k_{obs}$  (beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante) und der Parameter  $\omega$  ist ein Maß für die Reaktionsbedingungen (*pseudo-first order degree*). Unter bestimmten Bedingungen ( $\omega = 0$ ,  $B_0 \gg A_0$  oder  $k_{for} = k_{rev}$ ) reduziert sich Formel 4 zu einer Gleichung monoexponentiellen Abfalls, entsprechend der Analyse nach Bedingungen pseudo-erster Ordnung.

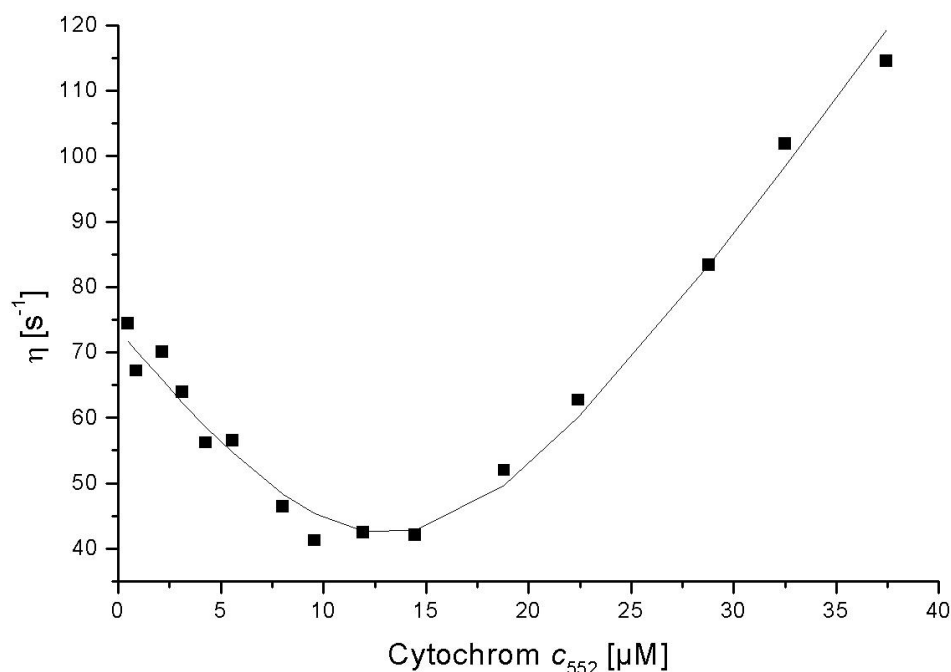
$$y = A \frac{1 - e^{-\eta t}}{1 + \omega e^{-\eta t}} + y_0 \quad \text{Formel 4}$$

Die aus dieser Berechnung erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten werden dann, ähnlich der klassischen Analyse unter Bedingungen pseudo erster Ordnung, gegen die Cytochrom  $c_{552}$  Konzentrationen aufgetragen. Die bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten werden in diesem Verfahren jedoch nicht durch lineare Regression, sondern durch Iteration an Formel 5 (Eta-Funktion) ermittelt.

$$\eta = \sqrt{(k_{for}^2 \cdot (A_0 + B_0)^2) - 4(k_{for} - k_{rev}) \cdot k_{for} \cdot A_0 \cdot B_0}$$

**Formel 5:** Eta-Funktion nach Prof. F. Malatesta (unveröffentlicht) zur Analyse bimolekularer Reaktionen unter Bedingungen non-pseudo erster Ordnung.

Wie aus dieser Formel ersichtlich, können die bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Hin- ( $k_{for}$ ) und die Rückreaktion ( $k_{rev}$ ) gleichzeitig ermittelt werden.  $A_0$  und  $B_0$  sind die Konzentrationen der Reaktionspartner zum Zeitpunkt  $t=0$ . Einer der beiden Reaktanden wurde auch in diesem Experiment konstant gehalten und betrug - spektroskopisch bestimmt - für das  $Cu_A$ -Fragment  $15 \mu\text{M}$  (nach Mischung). Die Reaktion wurde vom reduzierten  $Cu_A$  zum oxidierten Cytochrom durchgeführt.



**Abbildung 13:** Plot der nach Formel 5 gefitteten beobachteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $\eta$ ) gegen die Cytochrom  $c_{552}$  Konzentrationen. Durchgezogene Linie wurde durch Iteration der Eta-Funktion an die Datenpunkte generiert.

Durch Iteration der Eta-Funktion an die experimentell bestimmten Daten wurde die Kurve in Abbildung 13 generiert (Origin, Microcal) und die Parameter  $k_{for}$ ,  $k_{rev}$  und  $A_0$  bestimmt. Aus diesem Prozeß wurden folgende Daten ermittelt:  $k_{for} = 0,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{rev} = 4,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $A_0$  ( $[Cu_A]$ ) =  $16,0 \mu\text{M}$ . Der aus der mathematischen Prozedur ermittelte Wert für  $A_0$  stimmt damit mit der eingesetzten und spektroskopisch überprüften  $Cu_A$ -Konzentration ( $[Cu_A]=15 \mu\text{M}$ ) im Rahmen der Meßgenauigkeit überein. Die errechneten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{for}$  und  $k_{rev}$  liegen in der gleichen Größenordnung wie die durch lineare Regression ermittelten Werte (Tabelle 2).

### **3.1.3 Die Interaktionsfläche des Cytochrom $c_{552}$**

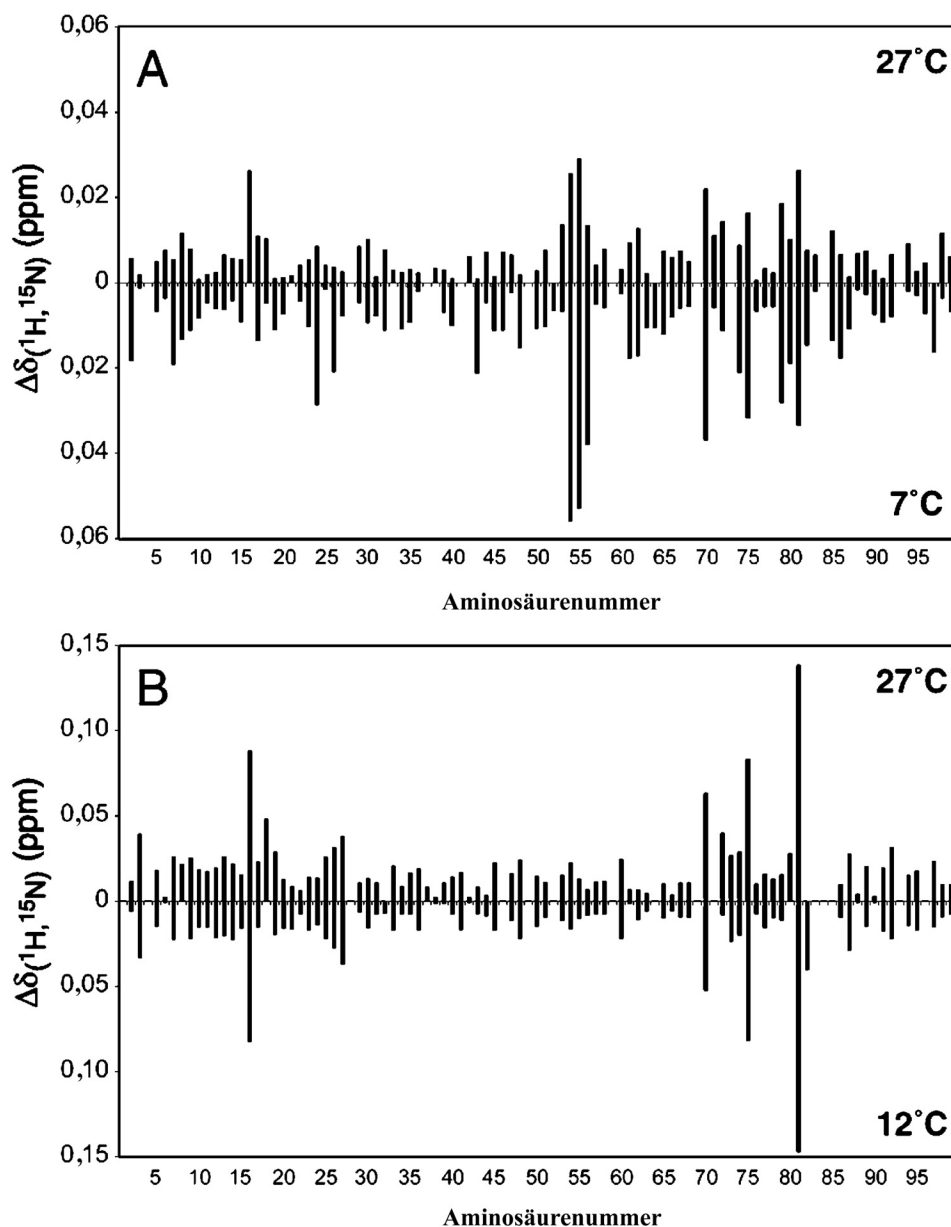
In den Elektronentransportketten respiratorischer Systeme bilden sich aufgrund der hohen Umsatzraten nur sehr transiente Interproteinkomplexe. Die kurze Lebensdauer erschwert die Analyse der Komplexstruktur und somit die Identifizierung der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren. NMR-spektroskopische Experimente zur Untersuchung der Änderung der chemischen Verschiebungen aufgrund der Komplexbildung sind eine Möglichkeit, solche nur vorübergehenden Komplexe in wässrigen Lösungen zu untersuchen. Durch sogenannte *chemical-shift perturbation mapping* Experimente können somit die an einer Komplexbildung beteiligten Interaktionsflächen eines Proteins charakterisiert werden. Durch Aufnahme von 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY Spektren werden alle NH-Gruppen des Proteins erfasst, und deren Lage im Spektrum wird durch den Einfluß des Partnerproteins geändert.

Eine Voraussetzung für ein solches Experiment ist die Zuordnung der Protonen- und Stickstoffresonanzen für die einzelnen Aminosäurereste des zu untersuchenden Proteins. Durch Zugabe des Partnerproteins ( $\text{Cu}_A$ -Domäne) können aufgrund von Veränderungen in der elektronischen Umgebung der einzelnen Kerne Änderungen in den chemischen Verschiebungen auftreten. Diese werden durch eine Wechselwirkung der beiden Proteine induziert und lassen einen Rückschluß auf mögliche Interaktionsflächen zu. Aus dieser Technik werden zwar keine Informationen über die Seitenketten gewonnen, jedoch wird eine Information über die Beeinflussung des Proteinerückgrats anhand der Änderung der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen erhalten. Die Amidgruppen der Seitenketten erfahren zwar auch induzierte Veränderungen ihrer chemischen Verschiebungen, diese sind aber aufgrund zusätzlicher Kopplungen schwer zu quantifizieren. Aus den induzierten *Shift*-Änderungen wird dann auf die Beteiligung einzelner Aminosäuren an der Komplexbildung zurückgeschlossen.

Die  $[^{15}\text{N}]$ -Markierung und die Zuordnung des Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* erfolgte im Rahmen der Dissertation von B. Reincke und ist publiziert [71]. Um eine Verstärkung der durch die Komplexbildung induzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen zu erreichen, wurde das Cytochrom mit einem ca. 4-fachen Überschuß der  $\text{Cu}_A$ -Domäne versetzt. Die Aufnahme der Spektren für den vollständig reduzierten Komplex erfolgte nach mehrfachem Ent- und Begasen mit Argon und Zugabe von Ascorbat als Reduktionsmittel im Überschuß. Die Proben für die Spektren des vollständig oxidierten Komplexes wurden mit Kaliumhexacyanoferrat(III) behandelt, um im Hinblick auf den Redoxzustand eine homogene Probe zu erhalten. Die Aufnahme der 2D- $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -TROSY Spektren und deren Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. H. Wienk (Institut für biophysikalische Chemie, J.W. Goethe-

## Ergebnisse

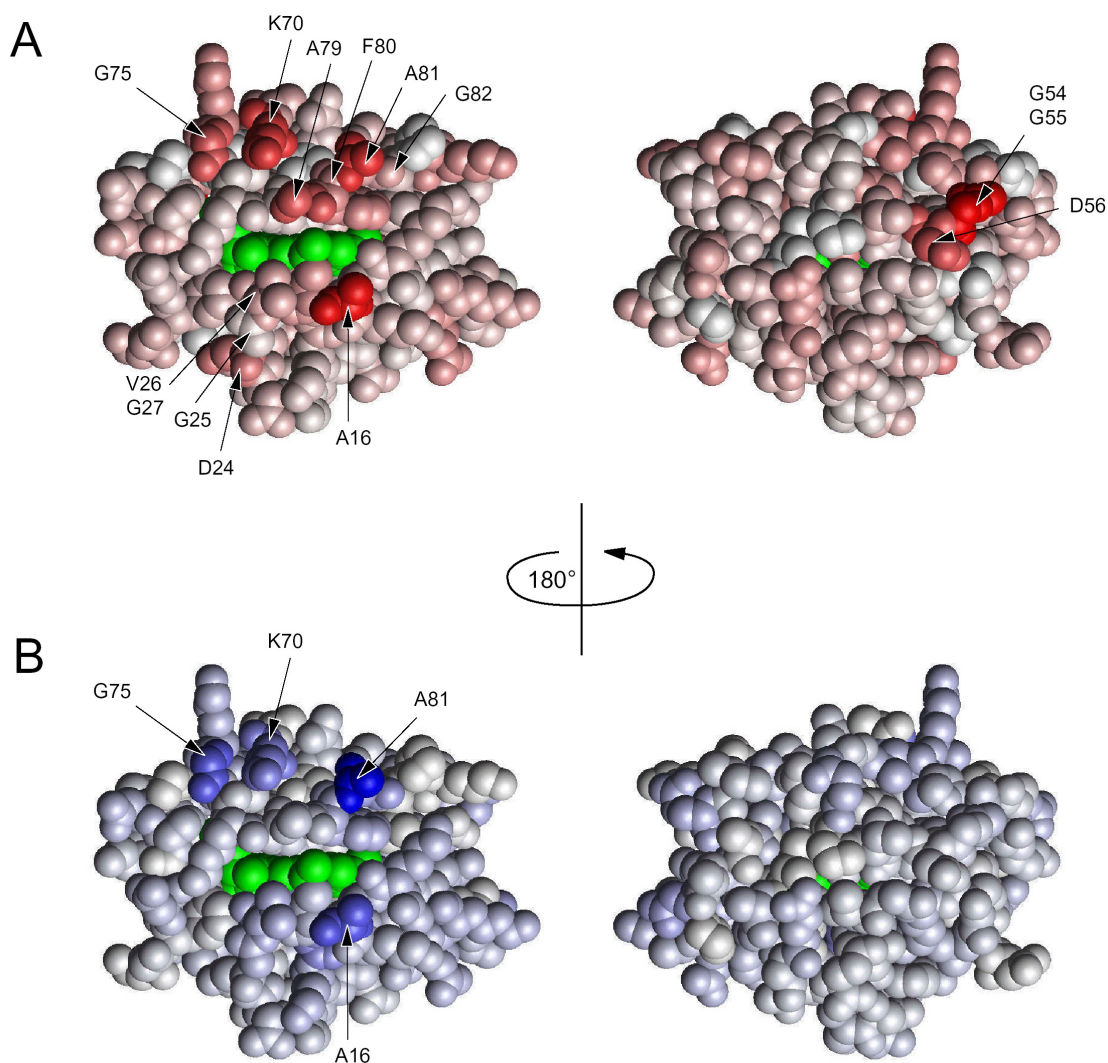
Universität Frankfurt). In Abbildung 14 sind die Cu<sub>A</sub>-induzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidgruppen des Peptidrückgrats (kombinierte Verschiebungsänderungen von <sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N, siehe [85]) durch die Komplexbildung bei verschiedenen Temperaturen jeweils für die reduzierte und die oxidierte Probe aufgetragen.



**Abbildung 14:** Durch Komplexbildung induzierte Änderung der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen im Proteinrückgrat des Cytochrom *c*<sub>552</sub> bei Zugabe von löslichem Cu<sub>A</sub>-Fragment. Kombinierte chemischen Verschiebungsänderungen der Amidgruppen (<sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N): (A) reduzierten Zustand bei 27 °C (oben) und 7 °C (unten); (B) oxidierten Zustand bei 27 °C (oben) und 12 °C (unten). Entnommen aus [85].



Eine Erniedrigung der Temperatur sollte zur Verstärkung der Verschiebungsänderungen durch eine verlängerte Lebensdauer des Komplexes führen, da elektrostatische Wechselwirkungen an der Interaktion beteiligt sind [62, 84]. Für das reduzierte System lässt sich gut beobachten, daß die Stärke der Änderungen der chemischen Verschiebungen mit geringerer Temperatur zunehmen (Abbildung 14). Insgesamt wurden nur sehr geringe Änderungen der chemischen Verschiebungen beobachtet, jedoch sind im Großen und Ganzen für beide Redozustände bei allen Temperaturen die gleichen Aminosäuren betroffen. Im oxidierten Zustand wurden in der Regel größere Änderungen der chemischen Verschiebungen beobachtet.



**Abbildung 15:** Struktur des Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* (PDB:1QL3) koloriert nach den durchschnittlichen gewichteten Änderungen der chemischen Verschiebungen, die durch Komplexbildung mit dem  $\text{Cu}_A$ -Fragment induziert werden; (A) reduzierter und (B) oxidiertes Zustand (Häm jeweils in grün). Zur besseren Übersicht wurden die gesamten Aminosäurereste eingefärbt, nicht nur die Amidgruppen (entnommen aus Wienk *et al.* [85]).

## Ergebnisse

---

In beiden Redoxzuständen wurden in Anwesenheit des Cu<sub>A</sub>-Fragments die größten Effekte für die Amidprotonenresonanzen der Aminosäurereste A16, K70, G75 und A81 beobachtet. Eine genauere Analyse der Daten in Abbildung 14 läßt vermuten, daß auch die Reste D24, V26, A79, F80 und möglicherweise G25, G27 und G82 an direkten Kontakten zum Cu<sub>A</sub>-Protein beteiligt sein könnten. Zusammengenommen ergibt dies eine nahezu kontinuierliche Kontaktfläche um die Hämspalte des Cytochroms.

Diese mögliche Interaktionsfläche ist umgeben von mehreren positiv geladene Lysinseitenketten auf der Oberfläche des Cytochroms. Von diesen insgesamt neun Lysinen ist nur K70 von Änderungen der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats betroffen und scheint somit als einzige positiv geladene Seitenkette an direkten Kontakten zum Cu<sub>A</sub>-Fragment beteiligt zu sein.

Um die Ergebnisse aus Abbildung 14 zu graphisch darzustellen, wurden die Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen der Amidprotonen (für jede Aminosäure als Durchschnitt bei beiden Temperaturen) für den jeweilige Redoxzustand bestimmt, normalisiert und in eine Farbkodierung umgesetzt (Abbildung 15). In dieser Abbildung ist somit die anzunehmende Interaktionsfläche des Cytochroms mit seinem Partner Cu<sub>A</sub> durch die intensivsten Farben angedeutet.

Auffällig ist, daß im reduzierten Zustand auch auf der Rückseite (ohne direkte Zugänglichkeit eines Partnerproteins zum Häm) durch Cu<sub>A</sub> induzierte *Shift*-Änderungen auftreten. Betroffen ist hierbei das Segment G54-G55-D56, jedoch erscheinen direkte Kontakte zum Cu<sub>A</sub>-Fragment unwahrscheinlich (siehe Diskussion).

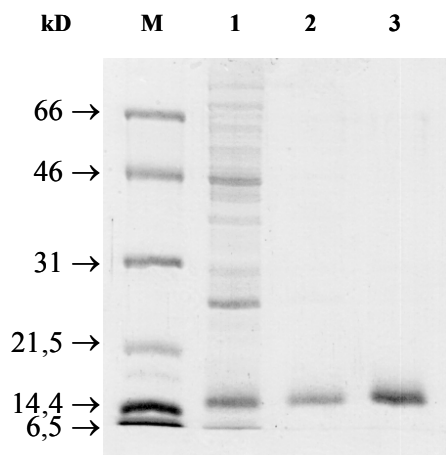
## 3.2 Cytochrom $c_{552}$ und $Cu_A$ aus *T. thermophilus*

### 3.2.1 Klonierung und Expression des Cytochrom $c_{552}$

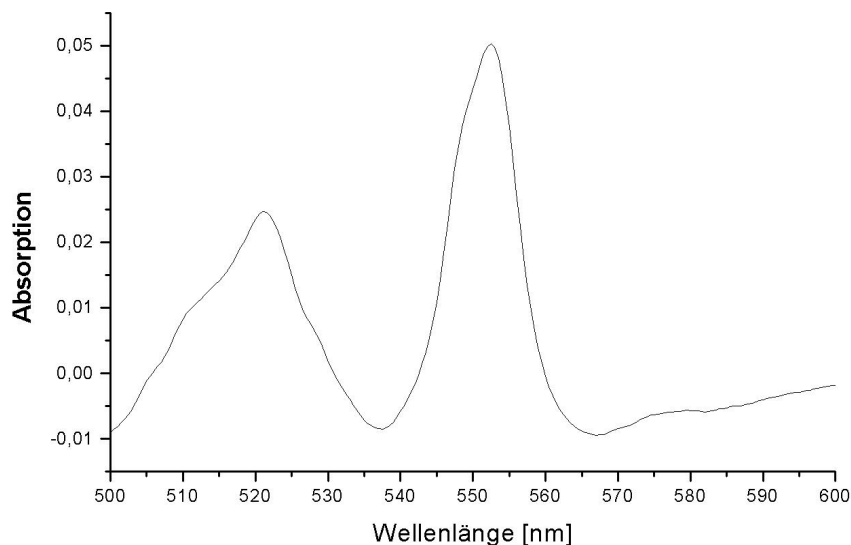
Der für das Cytochrom  $c_{552}$  kodierende Genabschnitt wurde zunächst durch PCR mit den Primern Th-552-F und Th-552-R auf genomische DNA von *T. thermophilus* HB8 amplifiziert und mit *XbaI/PstI* in pUC18 kloniert. Für die Expression in *E. coli* BL21(DE3) wurde der Expressionvektor pMA7 kloniert. Durch Einführung der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* durch PCR mit den Primern Th-552-Nco-F

und Th-552-Hind-R wurde die Klonierung in pET22b ermöglicht. Dieser Vektor stellt die *pelB*-Signalsequenz zur Verfügung, die zum Export eines *in frame* klonierten Proteins ins Periplasma führt.

Nach Co-Transformation der Zellen mit dem Plasmid pEC86 (Häm-Reifungsgene, [86]) wurde ein Expressionsprotokoll etabliert (siehe 2.4.4.1), und die Zellen zeigen nach der Induktion durch die Expression der Cytochrome eine deutliche Rotfärbung. Nach den beiden Chromatographie-schritten, über den Kationenaustauscher CM-Sepharose (Amersham Bioscience) und die Gelfiltration mit Sephacryl S100, wird ein sauberes Produkt mit dem erwarteten Molekulargewicht von ~14,5 kD erhalten.



**Abbildung 16:** 12%-Laemmli-PAGE der Aufreinigung des heterolog in *E. coli* exprimierten Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* (rechts, M: Größenstandard, 1: Periplasma, 2: nach CM-Sepharose, 3: nach Gelfiltration).



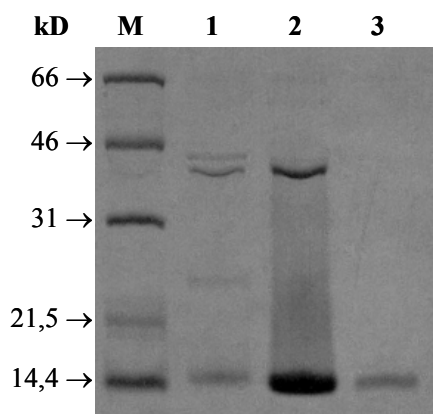
**Abbildung 17:** Redoxdifferenzspektrum des gereinigten Cytochrom  $c_{552}$ .

Dieses zeigt im Redoxdifferenzspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert) das für dieses Protein typische Maximum von 552 nm (siehe Abbildung 17). Im Regelfall wurden ungefähr 5 mg gereinigtes Protein aus einem Liter LB-Medium erhalten.

### 3.2.2 Klonierung und Expression des Cu<sub>A</sub>

Um ein lösliches Fragment der Cu<sub>A</sub>-Domäne der *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* zu erhalten, wurde dieses Protein heterolog in *E. coli* exprimiert und die Kupferatome des Cu<sub>A</sub>-Zentrum rekonstituiert.

Durch PCR mit den Primern Th-CuA34-F und Th-CuA-R auf das Plasmid pBScbaX wurde die kodierende Sequenz (ab Aminosäure 34, nach der Transmembranhelix der Untereinheit II) für die periplasmatische Domäne amplifiziert. Die Einführung der

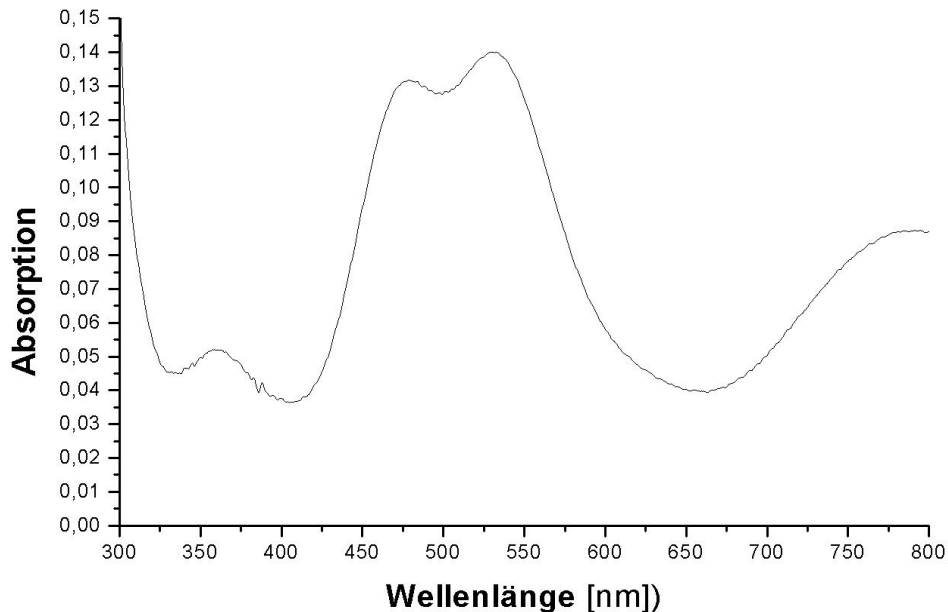


**Abbildung 18:** SDS-PAGE der Aufreinigung des Cu<sub>A</sub>-Proteins aus *T. thermophilus* (links, M: Protein-Standard, 1: vor Ionenaustauscher, 2: nach Ionenaustauscher, 3: nach Gelfiltration).

Schnittstellen *Nco*I und *Bam*HI ermöglichte die Klonierung in pET3d zur Generierung des Expressionsplasmids pMA10 für *E. coli* BL 21(DE3). Die Induktion dieses Stammes führt zur Expression des Apoproteins, und die beiden Kupferatome des Cu<sub>A</sub>-Zentrums werden während der Aufreinigung rekonstituiert ([59], siehe 2.4.3), welches zur intensiven Purpurfärbung der Proteinlösung führt. Durch eine Hitzefällung wird ein Großteil der Proteine aus *E. coli* denaturiert, und man erhält ein gut vorgereinigtes Produkt. Gelegentlich kommt es zur Expression eines Cytochroms, welches nur sehr schwer vom Cu<sub>A</sub>-Fragment zu reinigen ist. Deshalb wurde ein Reinigungsprotokoll mit einem pH-Sprung ausgearbeitet, so daß ein vollständig

gereinigtes Produkt nach Ionenaustausch-Chromatographie (CM-Sepharose) und Gelfiltration (Sephacryl S100) erhalten wird (siehe Abbildung 18). Die erfolgreiche Reinigung des Proteins zeigt das Gelbild der SDS-PAGE, und der Einbau des Kupfers ergibt das typische Absorptionsspektrum. Dieses zeigt den für das Cu<sub>A</sub>-Zentrum charakteristischen Doppelpeak bei 480 und 530 nm und die sehr breite Bande bei 800 nm (Abbildung 19). Im Gegensatz zur Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *P. denitrificans* ist die 530 nm Bande des Proteins aus *Thermus* die ausgeprägteste und hat einen Extinktionskoeffizienten von 3,1 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Die Verunreinigung durch das Cytochrom ergibt einen charakteristischen Soret-Peak und wurde durch den pH-Sprung vollständig entfernt. Als Maß für die Reinheit des Proteins dient der Quotient der

Absorptionen bei 280 und 530 nm  $A_{280}/A_{530}$ ; dieser beträgt nach der beschriebenen Reinigung  $\sim 4,7$ .



**Abbildung 19:** UV/VIS-Spektrum der aufgereinigten Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *T. thermophilus*

### 3.2.3 Elektronentransferkinetiken

#### 3.2.3.1 Vorversuche

Für die Untersuchung des Elektronentransfers Cytochrom  $c_{552}$  - Cu<sub>A</sub> aus *T. thermophilus* wurde das Ascorbat-Protokoll (3.1.2) verwendet, welches für das *Paracoccus*-Redoxpaar entwickelt wurde.

Hierzu mußte zunächst überprüft werden, ob die Reduktion der beiden *Thermus*-Proteine durch Ascorbat ebenfalls ausreichend langsam ist, um die Reaktionsphasen trennen zu können. Deshalb wurden in Vorversuchen die apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen der Proteine mit Ascorbat abgeschätzt und folgende Werte bestimmt: Cu<sub>A</sub>:  $\sim 77 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $c_{552}$ :  $\sim 326 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Die Reaktion mit dem im Puffer vorhandenen Reduktionsmittel ist damit ausreichend langsam, um die schnelle Phase der Reaktion, den Elektronentransfer der Proteine untereinander, ohne Beeinflussung durch das Ascorbat messen zu können.

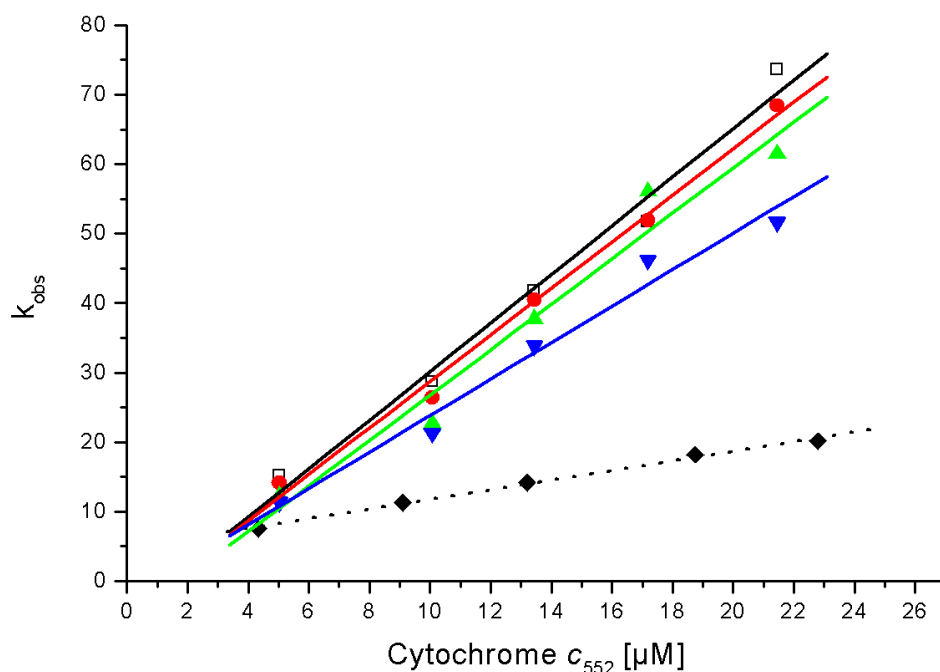
### 3.2.3.2 Reaktion von Cytochrom c<sub>552</sub> mit Cu<sub>A</sub>

Der Elektronentransfer zwischen dem Redoxpaar Cytochrom c<sub>552</sub> und löslicher Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *T. thermophilus* wurde ebenfalls mit Hilfe der *stopped-flow*-Spektroskopie untersucht (siehe auch 2.5.4). Die Elektronentransferraten wurden für die physiologische Richtung (vom Th-c<sub>552</sub> zum Th-Cu<sub>A</sub>) und in der Rückrichtung (vom Th-Cu<sub>A</sub> zum Th-c<sub>552</sub>) bestimmt. Durch Variation der Cytochromkonzentration wurde die apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante nach Auftragung von  $k_{\text{obs}}$  gegen die Cytochrom c Konzentration und linearer Regression der Daten ermittelt (siehe Tabelle 3 und Abbildung 20).

Die apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten variieren im Bereich der gemessenen Ionenstärken nur geringfügig zwischen  $3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (15 mM KCl) und  $2,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (100 mM KCl). Aus diesem Grund wurde die Rückreaktion nur unter einer Ionenstärkebedingung gemessen (25 mM KCl) und  $k_{\text{reverse}}$  beträgt hierfür  $0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und ist damit ca. 5-fach langsamer als die Hinreaktion unter gleichen Bedingungen. Aus dem Quotienten  $k_{\text{forward}}/k_{\text{reverse}}$  ergibt sich die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}$  für die Reaktion. Diese beträgt 4,8 und liegt damit für dieses Redoxpaar auf Seiten des reduzierten Cu<sub>A</sub>-Fragments, d.h. die physiologische Richtung ist bevorzugt.

Ionenstärke [mM]	$k_{\text{for}}$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{rev}}$ [ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]	$K_{\text{eq}}$
15	$3,50 \cdot 10^6$	n.b.*	n.b.*
25	$3,35 \cdot 10^6$	$0,7 \cdot 10^6$	4,8
50	$3,27 \cdot 10^6$	n.b.*	n.b.*
100	$2,26 \cdot 10^6$	n.b.*	n.b.*

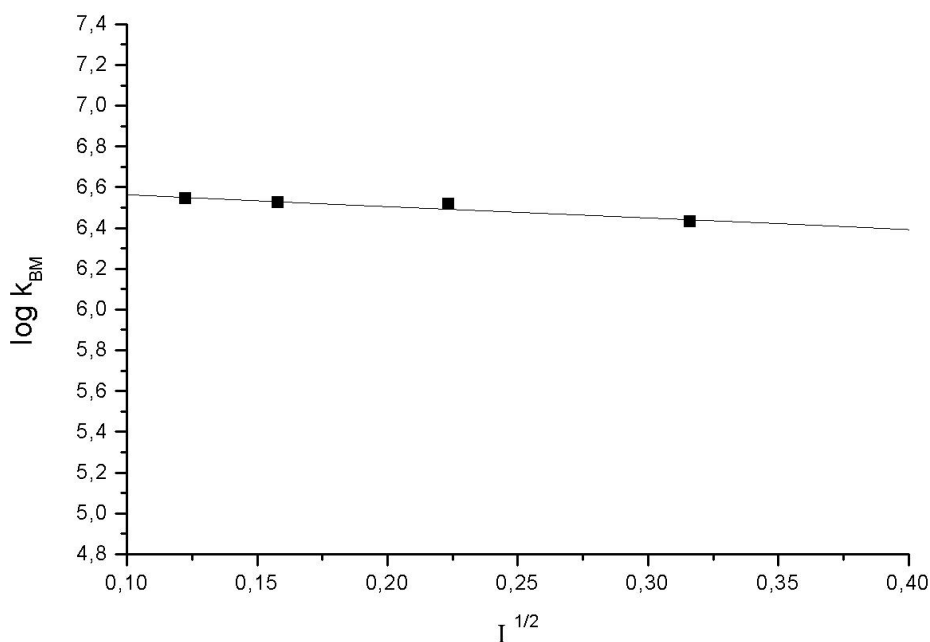
**Tabelle 3:** Apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für den Elektronentransfer zwischen *Th-c<sub>552</sub>* und *Th-Cu<sub>A</sub>* unter variierten Ionenstärkebedingungen für die Reaktion in physiologischer Richtung ( $k_{\text{for}}$ ) und Rückrichtung ( $k_{\text{rev}}$ ), sowie die daraus errechnete Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}$  (n.b.= nicht bestimmt).



**Abbildung 20:** Elektronentransfer zwischen  $Th-c_{552}$  und  $Th-Cu_A$  in physiologischer (15 mM:  $\square$ ; 25 mM:  $\bullet$ ; 50 mM:  $\blacktriangle$ ; 100 mM:  $\blacktriangledown$ ;  $[Th-Cu_A] = 8,7 - 9,3 \mu\text{M}$ ) und nicht-physiologischer Richtung (25 mM KCl:  $\blacklozenge$ ;  $[Th-Cu_A] = 10,6 \mu\text{M}$ ). Alle Experimente wurden in 20 mM Bis-Tris (pH 7,  $T = 8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[\text{Asc}] = 0,25 \text{ mM}$ ) durchgeführt. Die beobachteten, gefitteten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden gegen die  $Th-c_{552}$ -Konzentrationen aufgetragen. Regressionsgeraden der physiologischen Richtung: durchgezogene Linien; Regressionsgerade der Rückreaktion: gestrichelte Linie.

### 3.2.3.3 Ionenstärkeabhängigkeit

Die genauere Analyse der Ionenstärkeabhängigkeit des Elektronentransfers zwischen  $Th-c_{552}$  und  $Th-Cu_A$  wurde mit Hilfe der Brønsted-Gleichung durchgeführt (siehe Formel 2). Durch diese Verfahren werden die an der Reaktion beteiligten Ladungen ermittelt, und es kann ein Rückschluss auf den Interaktionsmodus der Proteine geführt werden. Die durch lineare Regression ermittelte Steigung der Geraden (das  $z_A z_B$  Produkt, siehe 3.1.2.3) repräsentiert die Anzahl der miteinander interagierenden Ladungen auf den beiden Proteinen und beträgt in diesem Falle  $-0,57$ . Daraus ergibt sich, daß weniger als eine effektive Ladung pro Protein den Elektronentransfer beeinflusst und nur eine geringe Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkungen stattfindet. Dies lässt vermuten, daß es sich um eine Wechselwirkung mit vornehmlich nicht polaren Kontakten handelt.



**Abbildung 21:** Ionenstärkeabhängigkeiten der apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{BM}$ ) des Elektronentransfers Cytochrom  $c_{552}$ - $Cu_A$ -Fragment aus *T. thermophilus*. Der Logarithmus von  $k_{BM}$  wird gegen die Wurzel der Ionenstärke aufgetragen. Die Steigung dieses Graphen, das  $z_A z_B$ -Produkt, repräsentiert die interagierenden Ladungen auf den Interaktionsflächen der Proteine.

### 3.2.4 Redoxpotential des $Cu_A$

Um das Redoxpotential des  $Cu_A$ -Fragmentes zu bestimmen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. P. Hellwig (Institut für Biophysik, J.W. Goethe-Universität Frankfurt) eine Potentialtitration durchgeführt. Die Anpassung der Nernst-Gleichung an die Datenpunkte ermöglicht die Bestimmung des Mittelpunktspotentials gegen die verwendete Silber/Silberchloridelektrode (Abbildung 22). Das Redoxpotential beträgt 58 mV (gegen Ag/AgCl), dieses entspricht gegen die Normalwasserstoffelektrode einem Potential von 266 mV. Das Redoxpotential des  $Cu_A$ -Proteins aus *Thermus* liegt damit etwas höher als das Potential des homologen Proteins aus *P. denitrificans*, für das ein Wert von 240 mV beschrieben wurde [57].



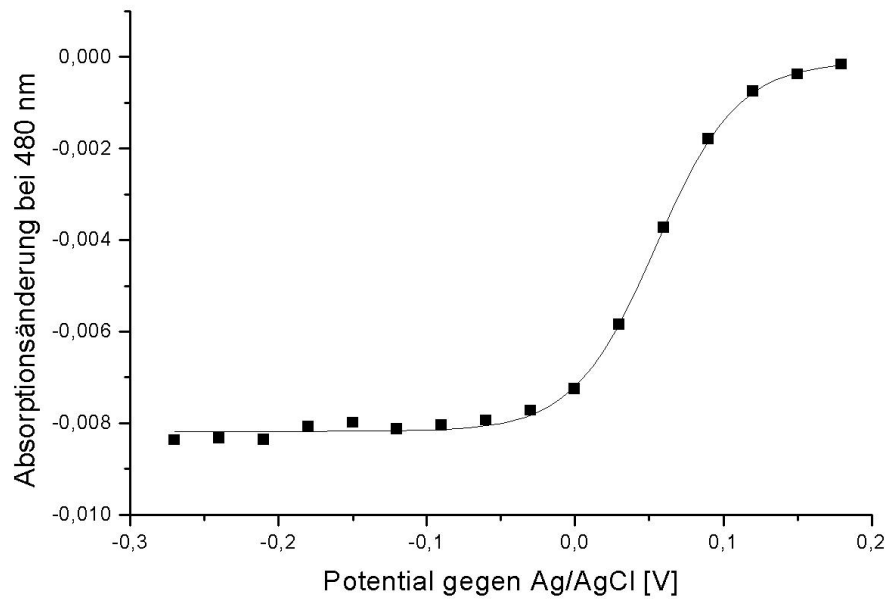
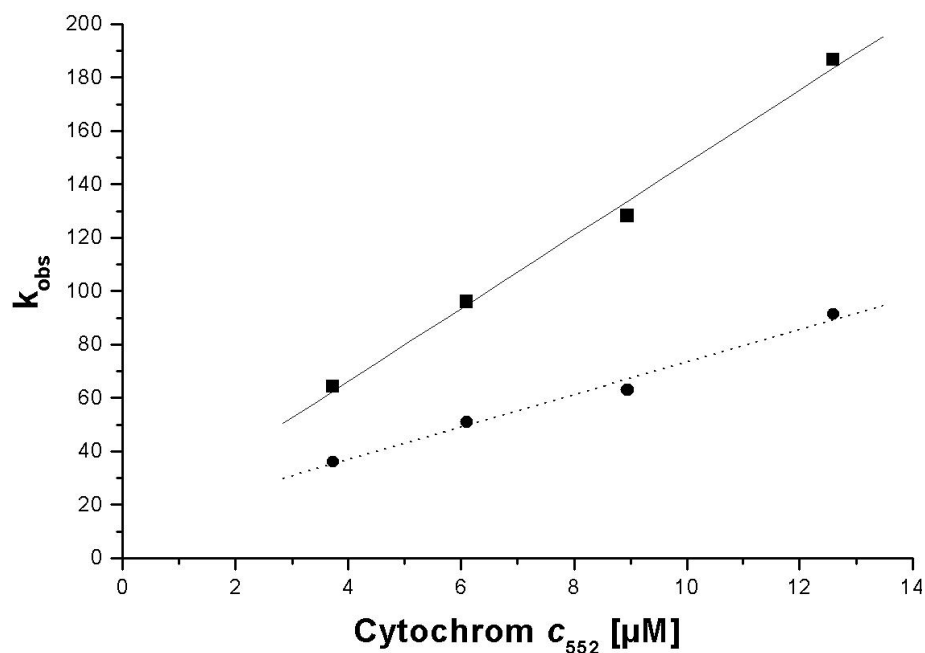


Abbildung 22: Redoxpotentialtitration des Cu<sub>A</sub>-Fragments aus *T. thermophilus*.

### 3.2.5 Mutagenese am Elektroneneintrittspunkt des Cu<sub>A</sub>

Für die Untereinheit II der *aa*<sub>3</sub> Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* wurde gezeigt, daß der Elektroneneintrittspunkt zum Cu<sub>A</sub>-Zentrum Trp121 ist [61]. Diese Aminosäure ist in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus* nicht konserviert, jedoch findet sich an gleicher Position ein Phenylalanin (F88), von dem spekuliert wurde, daß es eine ähnliche Funktion übernehmen könnte [16]. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden gerichtete Mutagenesen am Cu<sub>A</sub>-Fragment durchgeführt und Phe-88 durch die nicht-aromatische Aminosäure Leucin ersetzt. Als weiterer aromatischer Rest in der Nähe des Kupferzentrums wurde Phe-86 zu Leucin mutiert und die Doppelmutante F86L/F88L generiert. In kinetischen Experimenten durch *stopped-flow*-Spektroskopie wurden die Elektronentransferraten zum Cu<sub>A</sub> für den Wildtyp und die Mutanten bestimmt. Da die Experimente zum Elektroneneintrittspunkt an der vollständigen *aa*<sub>3</sub>-Oxidase aus *P. denitrificans* durchgeführt wurden und das Cu<sub>A</sub>-Zentrum unter Umständen im Fragment einer generell höheren Zugänglichkeit unterliegt, wurde zum Vergleich das lösliche Cu<sub>A</sub>-Modul mit der Mutation W121F der *Paracoccus*-Oxidase untersucht. In der Gesamtoxidase führt diese Mutation zu einer Verringerung der Aktivität auf 5% des Wildtyps unter *turnover*-Bedingungen [63].



**Abbildung 23:** Bimolekularer Plot für die Elektronentransferreaktion zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und  $\text{Cu}_A$  (Wildtyp: ■,  $\text{Cu}_A$ -F88L-Mutante: ●) aus *T. thermophilus* zur Bestimmung von  $k_{\text{BM}}$  durch lineare Regression.

<i>P. denitrificans</i>	$k_{\text{for}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
Wildtyp	$3,4 \cdot 10^6$
W121F	$0,37 \cdot 10^6$

<i>T. thermophilus</i>	$k_{\text{for}} [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$
Wildtyp	$13,6 \cdot 10^6$
F88L	$6,1 \cdot 10^6$

**Tabelle 4:** Apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Mutante am Elektroneneintrittspunkt W121 des  $\text{Cu}_A$  (*P. denitrificans*) und für die Mutante  $\text{Cu}_A$ -F88L (*T. thermophilus*), jeweils im Vergleich zum Wildtyp.

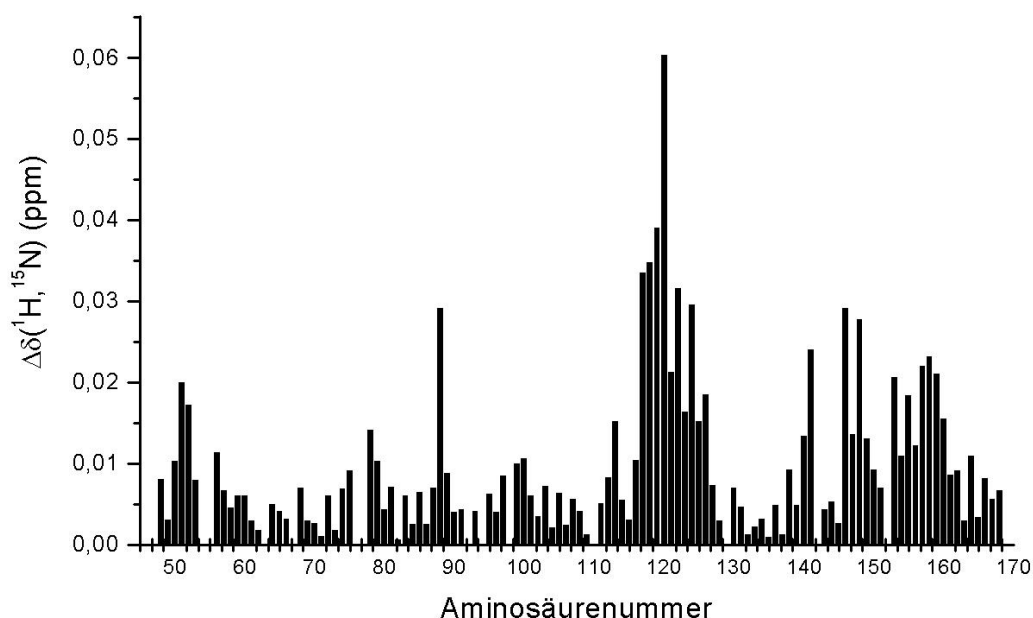
Die Bestimmung der apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Reaktion  $\text{Pd-}c_{552} - \text{Pd-Cu}_A$  (W121F) wurde in 20 mM Bis-Tris (pH 7) mit 15 mM KCl durchgeführt und ergab einen Wert von  $0,37 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Damit liegt die Elektronentransferrate bei 10% des Wildtyps (Tabelle 4) für das isolierte Fragment. Die Untersuchungen an den *Thermus*-Mutanten zeigten einen deutlichen Effekt für die Mutante F88L (50% des Wildtyps, siehe Abbildung 23), jedoch fällt dieser nicht so prägnant wie für das *Paracoccus*-Paar aus. Die Mutante F86L verhält sich in den Elektronentransferkinetiken wie der Wildtyp, und für die Doppelmutante

F86L/F88L wurde im Rahmen der Messgenauigkeit die gleiche apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bestimmt wie für die Mutante F88L. Damit scheint die Position F88 eine wichtige Rolle beim Elektroneneintritt in die  $ba_3$ -Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* zu spielen (siehe auch 4.3), aber sie nimmt keine so zentrale Rolle ein wie das Trp121 in *P. denitrificans* und Alternativen müssen diskutiert werden.

### 3.2.6 Interaktionsfläche des Cu<sub>A</sub> aus *T. thermophilus*

Um die Interaktionsfläche des Cu<sub>A</sub>-Fragmentes der ba<sub>3</sub>-Cytochrom c Oxidase aus *T. thermophilus* zu charakterisieren, wurden analog zum Cytochrom c<sub>552</sub> aus *P. denitrificans* chemical-shift perturbation mapping Experimente durchgeführt. Für die Interpretation der Ergebnisse einer Bindungsstudie mit dieser Technik ist die Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den einzelnen Aminosäuren eine Voraussetzung. Diese Zuordnung wurde im Rahmen der Diplomarbeit von M. Mukrasch [87] durch eine Doppelmarkierung mit <sup>13</sup>C-Kohlenstoff und <sup>15</sup>N-Stickstoff für das reduzierte Protein erreicht. Eine entsprechende Zuordnung des oxidierten Proteins wurde bisher auf Grund der paramagnetischen Eigenschaften des Kupfers nicht durchgeführt.

Die Aufnahme der 2D-[<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H]-TROSY Komplexspektren mit Cytochrom c<sub>552</sub>, in dem alle NH-Gruppen des Proteins zu erkennen sind, sowie deren Interpretation wurde in Zusammenarbeit mit Dr. F. Löhr und L. Muresanu (Institut für biophysikalische Chemie, J.W. Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt. Proline sind in diesem Spektrum nicht sichtbar, jedoch NH-Seitengruppen verschiedener Aminosäurereste. Letztere waren aufgrund von zusätzlichen Kopplungen schlecht auswertbar. Um die Effekte der Komplexbildung zu verstärken wurde das [<sup>15</sup>N]-markierten Cu<sub>A</sub>-Fragment mit einem vierfachen Überschuss des Interaktionspartners Cytochrom c<sub>552</sub> gemischt.

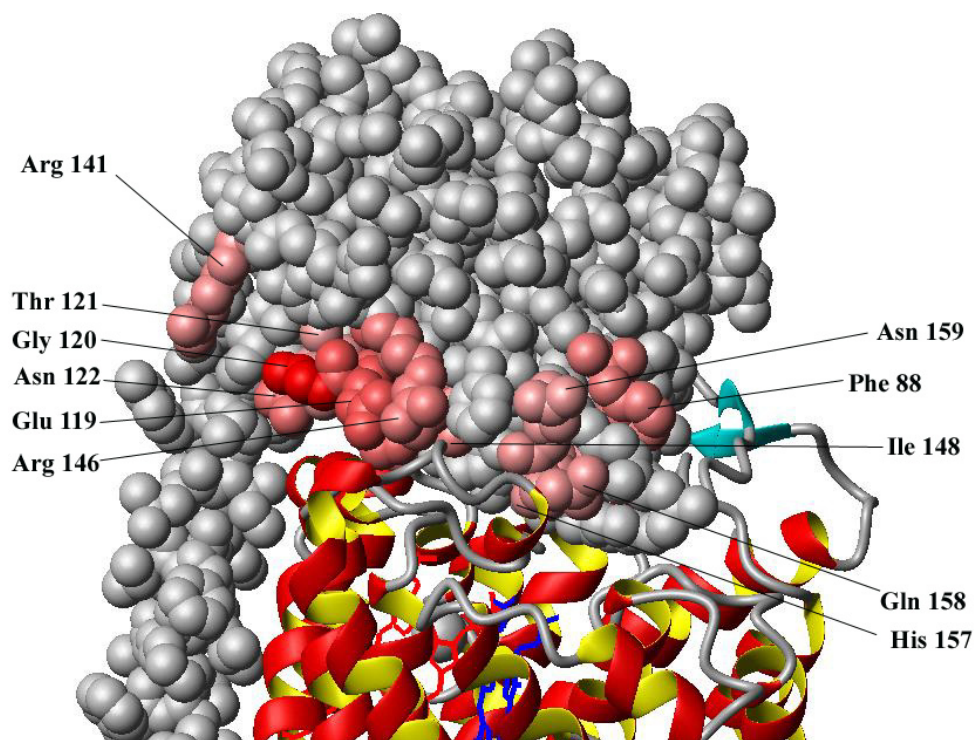


**Abbildung 24:** Kombinierte Änderungen der Amidgruppen-Shifts (<sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N) des Proteinrückgrats, die durch Zugabe eines Überschusses an Cytochrom c<sub>552</sub> zur [<sup>15</sup>N]-angereicherten Cu<sub>A</sub>-Domäne induziert werden (durch 5 mM Ascorbat vollständig reduziertes System, Meßtemperatur: 25 °C).

Die durch Komplexbildung induzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen wurden mit der bereits auf das *Paracoccus*-Paar Cytochrom  $c_{552}$ -Cu<sub>A</sub> angewendeten Methode quantifiziert [85]. Die kombinierten *Shift*-Änderungen (<sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N) der Messung bei 25 °C sind für das vollständig durch Ascorbat reduzierte System in Abbildung 24 dargestellt. Eine weitere Messung wurde bei 40 °C unter übereinstimmenden Bedingungen durchgeführt und ergab mit kleineren Abweichungen in den Verschiebungsintensitäten die gleichen Änderungen der chemischen Verschiebungen (Daten nicht gezeigt).

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse wurden dazu verwendet, die Struktur der *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase (PDB: 1EHK, [16]) entsprechend der Stärke der *Shift*-Änderungen einzufärben, um die mögliche Bindungsstelle des Cytochrom  $c_{552}$  graphisch darzustellen. Hierbei wurde auf die größte induzierte Änderung normiert (Gly 120 = 100%). Für alle kombinierten Verschiebungsänderungen unter 35% dieses Wertes wurde angenommen, daß sie innerhalb der Fehlergrenzen liegen. Diese wurden in Abbildung 25 nicht berücksichtigt. Zu beachten ist, daß im durchgeführten Experiment nur Informationen über die Amidgruppen des Proteinerückgrats erhalten wurden, in Abbildung 25 wurden jedoch zur besseren Übersicht die gesamten Aminosäuren eingefärbt. Bei Betrachtung von Abbildung 25 ist zunächst auffällig, daß zwei Regionen auf der Proteinoberfläche an der Interaktion mit dem Cytochrom beteiligt zu sein scheinen.

Der Bereich um Glycin 120, die Aminosäure die den stärksten *Shift*-Änderungen der Amidgruppe unterworfen ist, zeigt die ausgeprägtesten Effekte durch die Cu<sub>A</sub>-Bindung. Es handelt sich um eine Schleife aus den Resten Glu119-Gly120-Thr121-Asn122, welche durch die strukturell benachbarte Aminosäure Arg 146 ergänzt wird. Die zweite Region, um den vermutlichen Elektroneneintrittsort Phe88 (siehe auch 3.2.5), zeigt insgesamt weniger stark ausgeprägte *Shift*-Änderungen, jedoch ist Phe88 selbst betroffen und eine Schleife aus den Aminosäureresten His157-Gln158-Asn159. Histidin 157 liegt nicht direkt an der Oberfläche des Proteins, aber es handelt sich um einen der Kupferliganden des Cu<sub>A</sub>-Zentrums (siehe auch Abbildung 4), welches von der Proteinoberfläche gesehen direkt unterhalb des Phenylalanin-88 liegt. Auf der Rückseite des Cu<sub>A</sub>-Proteins finden sich keine signifikanten *Shift*-Änderungen die durch die Bindung des Cytochroms induziert werden.

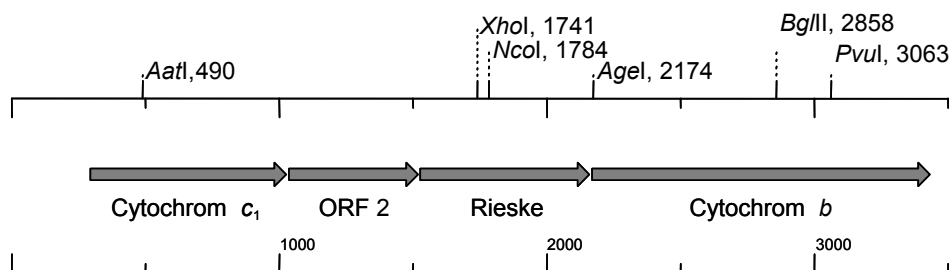


**Abbildung 25:** Struktur der *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* (Untereinheit II als Kugelmodell, PDB:1EHK) koloriert nach den in Rottönen gewichteten Änderungen der chemischen Verschiebungen, die durch Komplexbildung des [<sup>15</sup>N]-angereicherten Cu<sub>A</sub>-Fragments mit Cytochrom *c*<sub>552</sub> induziert werden. Untereinheit I ist als Bänder-Struktur des Proteinrückgrats mit den beiden Häm-Cofaktoren in blau und rot dargestellt. Von der Proteinoberfläche gesehen liegen unterhalb des vermuteten Elektroneneintrittspunkts Phe88 die beiden Kupferatome des Cu<sub>A</sub>-Zentrums; His157 ist einer der Kupferliganden.

### 3.3 Cytochrom $c_1$ aus *T. thermophilus*

#### 3.3.1 Identifizierung des $bc_1$ -Operons

Aufgrund von publizierten Informationen über das Rieske Eisen-Schwefel-Protein [20] wurde mit Hilfe der Daten aus dem Sequenzierprojekt von *T. thermophilus* (Göttingen Genomics Laboratory) die DNA-Sequenz des putativen Operons ermittelt. Hierzu wurde mit dem Algorithmus tBLASTn [88] auf der Internetseite des Sequenzierlabors (<http://www.g2l.bio.uni-goettingen.de>) die für das Rieske-Protein kodierende Stelle im Genom durch Vergleich der bekannten Aminosäuresequenz mit allen *in silico* translatierten ORFs ermittelt. Die umgebende DNA-Sequenz wurde dann auf weitere *open reading frames* untersucht, und durch die Suche nach Konsensmustern sowie Cofaktor-bindenden Motiven wurde eine Zuordnung der ORFs durchgeführt. Das ermittelte Operon besteht aus vier direkt aufeinander folgenden ORFs (siehe Abbildung 26) und besitzt eine Gesamtlänge von 3137 bp für den kodierenden Bereich. Bei *in silico* Translation ergeben sich die folgenden Größen für die Proteine eines vermuteten  $bc_1$ -Komplexes: Cytochrom  $c_1$  26 kD, ORF2 17,6 kD, Rieske-Protein 22,4 kD und Cytochrom  $b$  46,7 kD.



**Abbildung 26:** Putatives  $bc_1$ -Operon aus *T. thermophilus* mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und Zuordnung der offenen Leseraster.

Die Zuordnung der einzelnen Komponenten erfolgte durch die Suche nach typischen Signaturen in den Aminosäuresequenzen und durch BLASTp-Suche [88] gegen die NCBI Proteindatenbank. So enthält das dritte offene Leseraster des Operons das typische Bindungsmotiv für den Eisen-Schwefel Cofaktor (C-[TK]-H-L-G-C-[LIVST]) und wird durch BLASTp eindeutig zur Familie der Rieske Proteine eingeordnet. Der erste ORF enthält das typische Häm-Bindemotiv CXXCH; es handelt sich damit vermutlich um ein  $c$ -Typ Cytochrom. Die Aminosäuresequenz des Cytochroms wurde einer Transmembranhelix-Vorhersage mit der „DAS“-Methode (Dense Alignment Surface, [89]) unterzogen. Dieser Algorithmus sucht nach 15-30 überwiegend

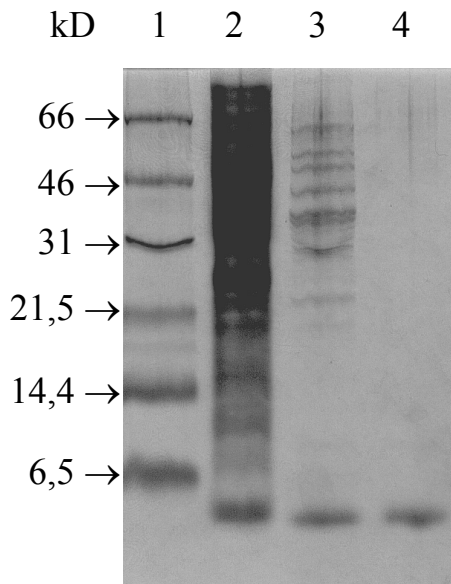
hydrophoben Aminosäureresten, die durch polare Schleifen begrenzt sind, und gibt mögliche Regionen für Transmembranhelices an. 90-95% aller bestätigten Transmembransegmente konnten mit dieser Methode identifiziert werden [90, 91]. Die Analyse zeigt, daß im Cytochrom  $c_1$  vermutlich eine Transmembranhelix von Aminosäure 100-122 zu finden ist. Diese würde das Protein in eine N-terminale cytoplasmatische und eine periplasmatische Domäne, die das Häm trägt, trennen.

Ein Sequenzhomologievergleich des ORF2 ergibt signifikante Übereinstimmungen zu Cytochrom  $c_6$  aus *Deinococcus radiodurans*, einem *Thermus* verwandten Bakterium, jedoch zeigt die Aminosäuresequenz keinerlei Hinweis auf ein Häm-Bindemotiv. Auch dieses Protein wurde durch die „DAS“-Analyse als membranständig erkannt.

Die „DAS“-Analyse der Aminosäuresequenz des Rieske-Proteins ergibt ebenfalls, daß dieses Protein eine transmembrane Domäne enthält, welche N-terminal wie bei den meisten bekannten homologen Proteinen liegt. Der letzte ORF wird durch Vergleich mit der Proteindatenbank eindeutig der Familie der *b*-Typ Cytochrome zugeordnet und weist eine Häm *b* Bindungssignatur auf. Die Untersuchung des Cytochroms *b* durch die „DAS“-Methode sagt voraus, daß dieses Protein bei einem Molekulargewicht von 46 kD wahrscheinlich 8-9 Transmembranhelices enthält (siehe auch [92]).

### **3.3.2 Klonierung und Aufreinigung des löslichen Cytochrom $c_1$**

Um ein lösliches Modul des Cytochrom  $c_1$  aus *T. thermophilus* in *E. coli* heterolog exprimieren zu können, wurde die entsprechende DNA kloniert. Durch PCR mit den Primern Thermus-C1-F und Thermus-C1-R auf genomische DNA von *T. thermophilus* HB8 wurde die kodierende Sequenz für die letzten 85 Aminosäuren des Cytochroms  $c_1$  amplifiziert. Die Bindungsstelle des ersten Primers wurde so gewählt, daß ein Produkt ohne die vorhergesagte Transmembranhelix entsteht und somit ein lösliches Modul der Häm-bindenden Domäne zur Expression gebracht wird. Mit Hilfe der eingefügten Schnittstellen *NcoI/HindIII* erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pET22b, so daß es zum Export des Expressionsproduktes kommen kann. *E. coli* BL21 (DE3) mit dem entstandenen Plasmid pMA37 wurden zusätzlich mit dem Hämreifungsvektor pEC86 transformiert, somit sind diese gegen Ampicillin und Chloramphenicol resistent. Nach Wachstum der Zellen über Nacht und Induktion mit IPTG zeigen die Zellen die charakteristische Rotfärbung des Cytochroms. Ein Protokoll für die Aufreinigung aus Periplasma wurde ausgearbeitet (siehe 2.4.5) und ergibt nach zwei chromatographischen Schritten ein sauberes Produkt (siehe Abbildung 27).

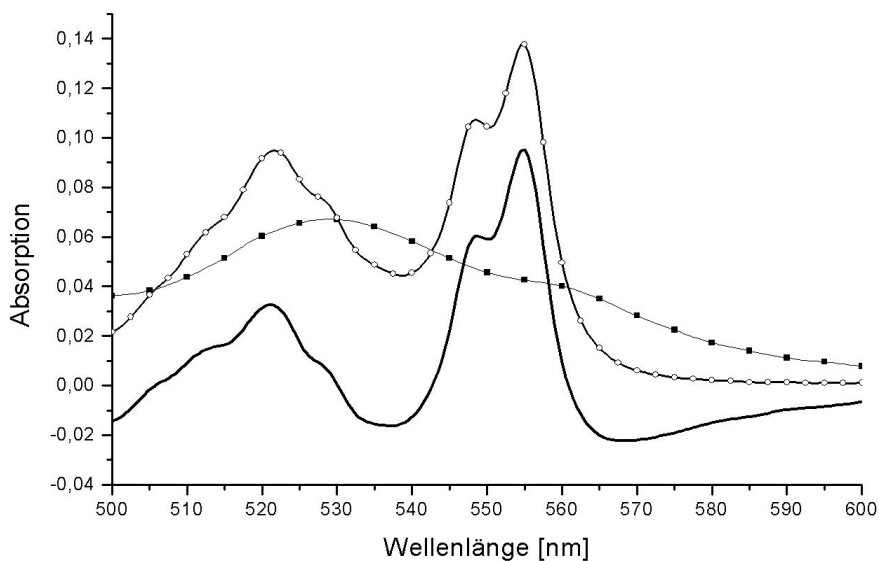


**Abbildung 27:** 16% SDS-PAGE der Aufreinigung des Cytochrom  $c_1$ -Fragments aus *T. thermophilus*.

Das lösliche Modul besitzt eine rechnerische Masse von 8,8 kD (ohne Häm), jedoch erscheint dieses aufgrund seiner Wanderungseigenschaften im SDS-Gel kleiner, da die entsprechende Bande unterhalb von 6,5 kD läuft. Deshalb wurde durch MALDI-Massenspektroskopie überprüft, ob es sich hierbei um ein Abbauprodukt des exprimierten Fragmentes handelt oder ob lediglich ein untypisches Laufverhalten im Gel vorliegt. Diese Überprüfung ergab eine Masse von 9426 kD und trifft damit die erwartete Masse (8796 kD für das Cytochrom + 617 kD für das Häm) im Rahmen der Messgenauigkeit des verwendeten Verfahrens. Während der Expression und der Aufreinigung kommt es somit nicht zu unerwünschten Prozessierungen des löslichen Cytochrom  $c_1$ .

### 3.3.3 Spektrale Charakterisierung des Cytochrom $c_1$

Im Dithionit-reduzierten Spektrum zeigt das aufgereinigte Cytochrom  $c_1$  aus *T. thermophilus* das Bandenmuster eines  $c$ -Typ Cytochroms, jedoch zeigt sich eine deutliche Aufspaltung der  $\alpha$ -Bande in ein Maximum bei 555 nm und eine ausgeprägte Schulter bei 549 nm (Abbildung 28).

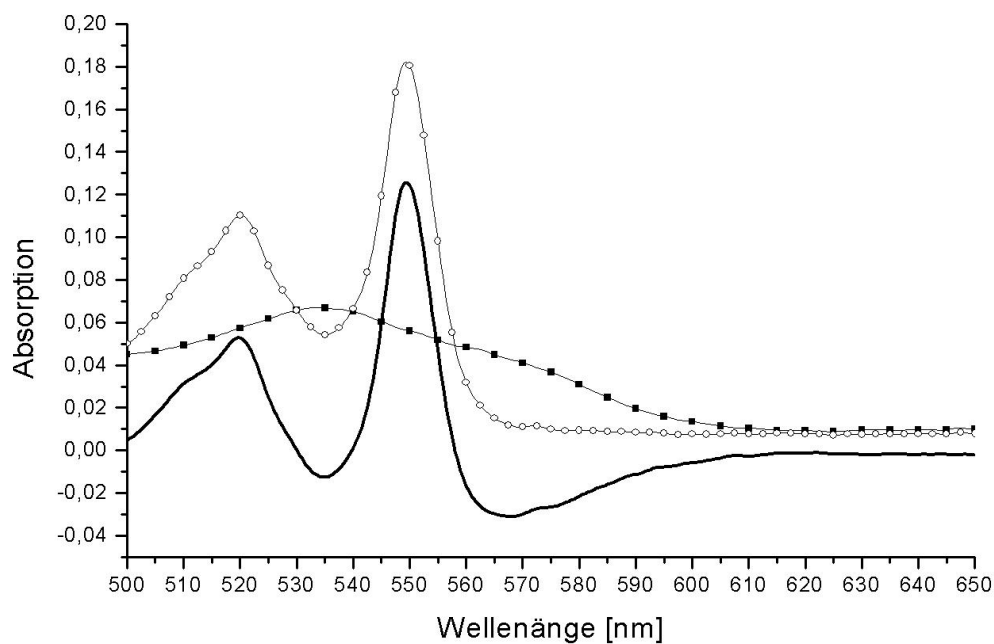


**Abbildung 28:** UV/VIS-Spektren des aufgereinigten Cytochrom  $c_1$  aus *T. thermophilus* (reduziert: dünne Linie; oxidiert: ■; reduziert – oxidiert: dicke Linie).



## Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob nach der Aufreinigung eine homogene Fraktion erhalten wird, wurden Pyridin-Hämochromspektren aufgenommen, die auf den Charakter des Hämcofaktors oder auf eine eventuell vorliegende Mischung aus verschiedenen Hämtypen schließen lassen. Auch eine nur unzureichende Verknüpfung des Häms mit dem Protein über nur einen Thioether würde sich durch Pyridin-Hämochromspektren identifizieren lassen [80, 93, 94]. Im reduziert-oxidierten Pyridin-Hämochromspektrum zeigt sich eine scharfe Bande bei 550 nm, indikativ für ein c-Typ Cytochrom (Abbildung 29). Es treten keine weiteren Banden auf, die auf andere Häm-Typen oder auf die Ausbildung von nur einem Thioether hinweisen.



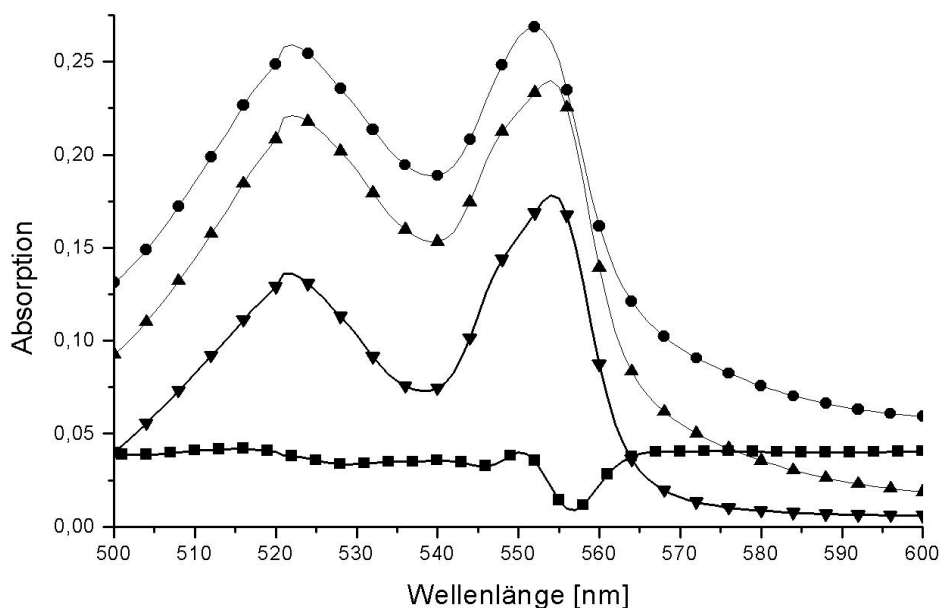
**Abbildung 29:** Pyridin-Hämochromspektren des aufgereinigten Cytochrom  $c_1$  aus *T thermophilus* (reduziert: □; oxidiert: ■; reduziert – oxidiert: dicke Linie).

Die Pyridin-Hämochromspektren wurden mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten [80] für 550 nm zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Cytochrom  $c_1$ -Lösung genutzt. Durch Aufnahme von Spektren einer nicht denaturierten Probe gleicher Verdünnung wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz der Extinktionskoeffizient für das native  $c_1$  berechnet. Dieser beträgt bei 555 nm  $15,81 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dieser Extinktionskoeffizient wurde zur Konzentrationsbestimmung bei allen weiteren Experimenten mit dem Cytochrom  $c_1$  verwendet.

### 3.3.4 Elektronentransferkinetiken

#### 3.3.4.1 Vorversuche

Bei der Aufnahme der Elektronentransferkinetiken zwischen zwei Cytochromen fällt die Wahl einer geeigneten Wellenlänge schwer, da sich die Spektren der beiden Proteine überlappen. Deshalb wurde zunächst ein Experiment mit einer Doppelsektor-Küvette (DSC) durchgeführt (siehe Abbildung 30). Hierzu wurde in den ersten Sektor der Küvette reduziertes Cytochrom  $c_1$ , in die zweite Hälfte oxidiertes Cytochrom  $c_{552}$  (jeweils  $\sim 10 \mu\text{M}$ ) und ein Spektrum von 500 bis 600 nm aufgenommen. Nach guter Durchmischung der beiden Lösungen wurde erneut ein Spektrum aufgezeichnet und das Differenzspektrum (vor Mischung minus nach dem Mischen) gebildet. Das ausgeprägte Minimum im Differenzspektrum bei 557 nm zeigt die größte Reaktionsamplitude, und diese Wellenlänge wurde für die Aufnahme der *stopped-flow* Kinetiken ausgewählt.



**Abbildung 30:** DSC-Experiment zur Bestimmung der optimalen Wellenlänge. ▼: reduziertes Cytochrom  $c_1$  vor Mischung; ▲: Oxidiertes Cytochrom  $c_{552}$  und reduziertes  $c_1$  vor Mischung; ●: Spektrum nach Mischung beider Sektoren; ■: Differenzspektrum (▲ minus ●).

Die Elektronentransferraten für die Reaktion zwischen dem löslichen Modul des Cytochrom  $c_1$  und dem Cytochrom  $c_{552}$  wurden durch *stopped-flow* Spektroskopie mit Hilfe des zuvor ausgearbeiteten Protokolls (siehe 3.1.2.1) untersucht. Da eine Vorreduktion mit Ascorbat erfolgt, musste auch für das Cytochrom  $c_1$  sichergestellt werden, daß die Interproteinreaktion auf einer anderen Zeitskala stattfindet als die Reaktion mit dem Reduktionsmittel. Hierzu wurden verschiedene Ascorbat-

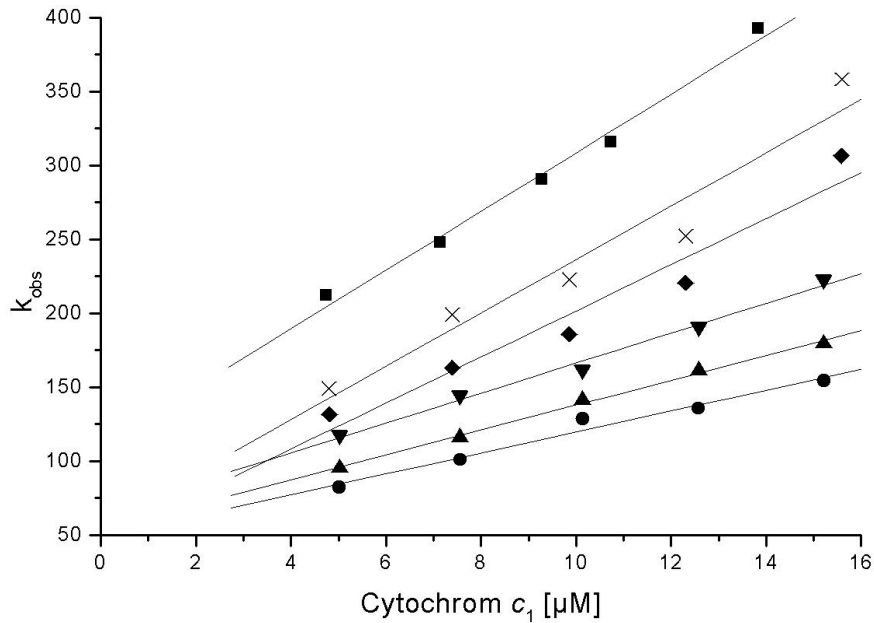
konzentrationen gegen oxidiertes Cytochrom  $c_1$  gemessen und die bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für diese Reaktion bestimmt. Durch Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Zeitverläufe wurden die entsprechenden Werte für  $k_{obs}$  ermittelt, in einem bimolekularen Plot aufgetragen und durch lineare Regression ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Es wurde berechnet, daß  $k_{BM}$  für die Ascorbatreaktion des Cytochroms (in 20 mM Bis-Tris pH 7, 10 mM KCl)  $2830 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  beträgt.

### 3.3.4.2 Der Elektronentransfer vom Cytochrom $c_1$ zum $c_{552}$

Der direkte (Interprotein) Elektronentransfer zwischen dem löslichen Modul des Cytochrom  $c_1$  und dem  $c_{552}$  wurde in physiologischer (unter verschiedenen Ionenstärkebedingungen) und nicht-physiologischer Richtung untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben. Die Elektronentransferreaktionen in beiden Richtungen zeigen ein sehr schnelles Verhalten mit Raten von  $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bei allen gemessenen Ionenstärken (Tabelle 5 und Abbildung 31). Diese hohe Reaktionsbereitschaft der beiden Proteine lässt vermuten, daß es sich um native Partner in der Elektronentransportkette von *T. thermophilus* handelt. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zeigen eine moderate Abhängigkeit von der Ionenstärke und deuten die nur geringe Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen bei dieser Interaktion an. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten für diese Reaktion erfolgte durch Bildung des Quotienten  $k_{for}/k_{rev}$  und ergibt 1,13; so daß sich die Reaktion nahe dem Gleichgewicht befindet.

Ionenstärke [mM]	$k_{forward} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_{reverse} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$K_{eq}$
10	$1,98 \cdot 10^7$	$1,75 \cdot 10^7$	1,13
25	$1,81 \cdot 10^7$	n.b.	n.b.
35	$1,56 \cdot 10^7$	n.b.	n.b.
50	$1,01 \cdot 10^7$	n.b.	n.b.
100	$0,84 \cdot 10^7$	n.b.	n.b.
200	$0,71 \cdot 10^7$	n.b.	n.b.

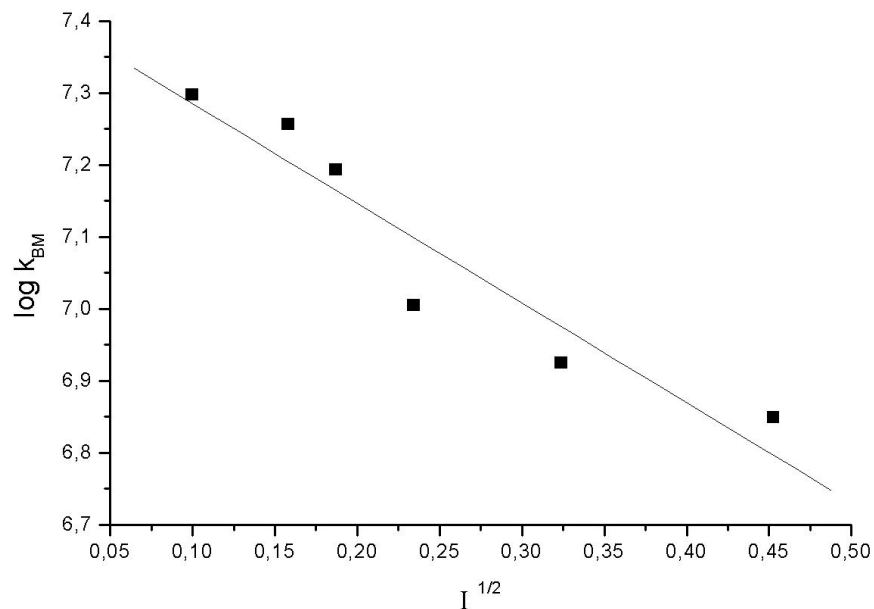
**Tabelle 5:** Apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Elektronentransferreaktion zwischen Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* unter verschiedenen Ionenstärkebedingungen (n.b.= nicht bestimmt).



**Abbildung 31:** Elektronentransfer zwischen reduziertem Cytochrom  $c_1$  aus *T. thermophilus* bei verschiedenen Ionenstärken: 10 mM KCl: ■; 25 mM KCl: ×; 35 mM KCl: ◆; 50 mM KCl: ▼; 100 mM KCl: ▲; 200 mM KCl: ● (in 20 mM Bis-Tris pH 7, [Asc]= 0,5 mM, [Cyt.  $c_1$ ]= 5 µM).

### 3.3.4.3 Ionenstärkeabhängigkeit

Die Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion des reduzierten Cytochrom  $c_1$  mit oxidiertem  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* wurde entsprechend der Brønsted-Gleichung (siehe auch 3.1.2.3) analysiert.

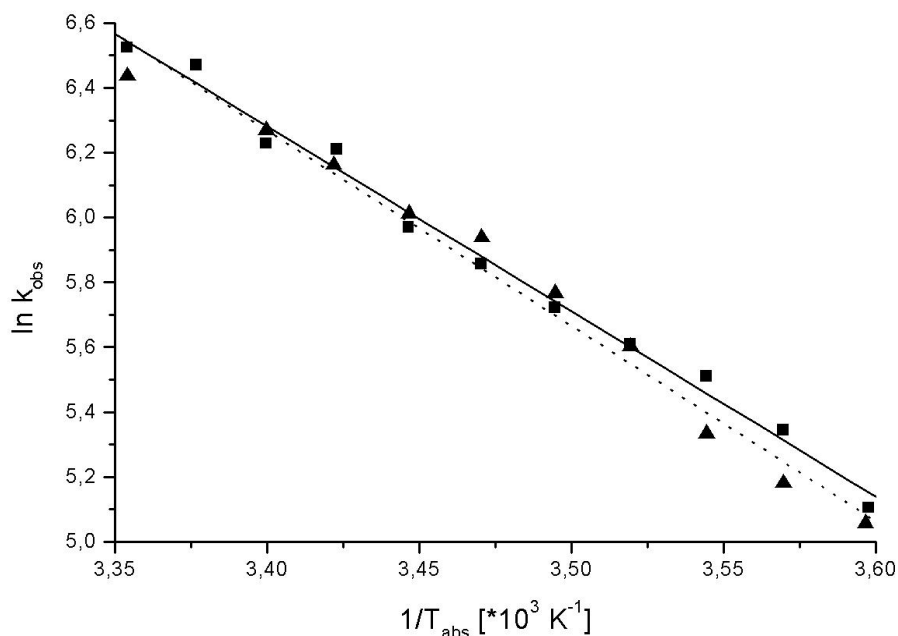


**Abbildung 32:** Brønsted-Diagramm für die Reaktion Cytochrom  $c_1$  - Cytochrom  $c_{552}$ . Aufgetragen ist der dekadische Logarithmus der apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten gegen die Wurzel der Ionenstärke. Aus der Steigung der Regressionsgeraden (dem  $z_A z_B$  Produkt) ergibt sich die Anzahl der interagierenden Ladungen.

Aufgetragen wird in dieser Analyse der dekadische Logarithmus der apparenten bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten gegen die Wurzel aus der Ionenstärke. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ergibt sich auch für dieses Elektronentransferpaar die Anzahl der effektiv an der Interaktion beteiligten Ladungen. Der Wert für das  $z_{A z_B}$  Produkt beträgt -1,39 und damit tritt rechnerisch etwas mehr als eine Ladung pro Protein (mit entgegengesetztem Vorzeichen) in Wechselwirkung.

### 3.3.4.4 Temperaturabhängigkeit

Der Einfluß der Temperatur auf die Elektronentransferreaktion Cytochrom  $c_1$  - Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* wurde systematisch für den Temperaturbereich von 5 - 25 °C untersucht. Die Analyse erfolgte durch die Arrhenius-Gleichung (Formel 3) und die lineare Regression der Daten (Abbildung 33). Der parallele Geradenverlauf ist indikativ für gleiche Aktivierungsenergien für die Hin- und Rückreaktion. Aus der Regressionsgeraden wurde für die Reaktion in physiologischer Richtung eine Aktivierungsenergie von 47,5 kJ/mol berechnet (für die Rückreaktion beträgt diese 49,9 kJ/mol). Dies bestätigt die nur leicht ausgeprägte Bevorzugung der Hinreaktion, die man auch aus den apparenten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ablesen kann (Tabelle 5).



**Abbildung 33:** Arrhenius-Plot für die Elektronentransferreaktion Cytochrom  $c_1$  - Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* zur Bestimmung der Aktivierungsenergien (physiologische Richtung: ■, durchgezogene Regressionsgerade; nicht-physiologische Richtung: ▲, gepunktete Regressionsgerade).

## 3.4 Expression in *T. thermophilus*

### 3.4.1 Konstruktion eines Expressionsvektors

Ausgehend von dem *E. coli* – *Thermus* shuttle Vektor, pNTsp2, wurde ein für die Expression in *T. thermophilus* geeigneter Expressionsvektor konstruiert. Dieser Vektor basiert auf pUC19, in dem ein *ori* (Origin of Replication) für *Thermus* selektioniert wurde [95]. Um den optimalen Wachstumstemperaturen ( $\sim 70$  °C) von *T. thermophilus* gerecht zu werden wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Kagamiyama (Osaka, Japan) eine hitzeoptimierte Kanamycinresistenz entwickelt [96]. Die ursprüngliche Kanamycin-Nukleotidyltransferase aus *Staphylococcus aureus* kann nur bei Temperaturen von bis zu 60 °C verwendet werden. Dieses optimierte Resistenzgen wurde auf dem Vektor pUC18-JHK3-1 zur Verfügung gestellt und mit den Primern HTK-F und HTK-R amplifiziert, bei gleichzeitiger Einführung der Schnittstellen *KpnI* und *XhoI* vor dem Gen, sowie *BamHI* am Ende des kodierenden Bereiches. Diese Restriktionsschnittstellen ermöglichen die Klonierung des *KpnI/BamHI* geschnittenen Amplifikates in mit *KpnI/BglII* restringierten pNTsp2. Der entstandene Vektor pMA28 enthält nun die hitzeoptimierte Kanamycinresistenz und kann als Expressionsvektor auch bei Bedingungen von über 70 °C genutzt werden. Da die Schnittstellen der einzigen möglichen Enzymkombination (*KpnI/XhoI*) zum späteren Einfügen des *ba<sub>3</sub>*-Operon zu dicht beieinander liegen, musste in die *XhoI*-Schnittstelle ein DNA-Fragment eingeführt werden. Hierzu wurde das 700 bp Fragment aus pMA32 mit *XhoI* herausgeschnitten und in pMA28 eingesetzt (pMA34). Um die spätere Klonierung von Histidin-markierten Versionen und Mutanten der *ba<sub>3</sub>* direkt hinter den Promotor in das Expressionsplasmid zu ermöglichen, wurde noch die *PstI*-Stelle deletiert (pMA35).

Da die *ba<sub>3</sub>* Cytochrom *c* Oxidase in *T. thermophilus* vermehrt bei geringem Sauerstoffpartialdruck exprimiert wird [97] und deshalb vermutlich regulatorische Elemente oberhalb des Start-ATG enthält, wurden diese entfernt, so daß eine konstitutive Expression ermöglicht wurde. Hierzu wurde direkt vor das Startkodon der Untereinheit IIa eine *XbaI*-Restriktionsschnittstelle, durch PCR auf pBScaX, eingeführt und zusammen mit der am Ende des Operons generierte *XhoI* Schnittstelle erfolgte die Klonierung in *SaI/XbaI* restringierten pUC18 (pMA29).

Als ein von den Anzuchtbedingungen unabhängigen, konstitutiven Promotor wurde das DNA-Element vor der Kanamycinresistenz von pNTsp2 ausgewählt, mit Hilfe der Primer Thermus 9-F und Thermus 10-R durch PCR amplifiziert, und durch Einführung der Schnittstellen *XbaI/KpnI* vor das für die *ba<sub>3</sub>* kodierende Operon in pMA29 kloniert (pMA30).

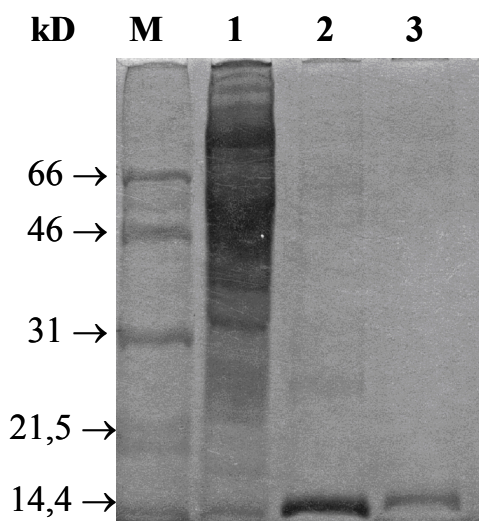
Aufgrund ungünstiger Schnittstellenkombinationen wurde das Konstrukt aus dem Kanamycinresistenzpromotor und dem *ba<sub>3</sub>*-Operon noch zweimal umklont (pMA31

und pMA32), um dann durch Restriktion mit *KpnI/SaI* aus pMA32 in den mit *KpnI/XhoI* geschnittenen Vektor pMA35 überführt zu werden (pMA36). Der Vektor pMA36 enthält nun neben der hitzeoptimierten Kanamycinresistenz auch das Operon für die *ba<sub>3</sub>* Cytochrom c Oxidase mit vorgeschaltetem Kanamycinpromotor.

### 3.4.2 His<sub>6</sub>-markiertes Cytochrom c<sub>552</sub>

Nach der Konstruktion eines Expressionsvektors für *T. thermophilus* wurde zunächst versucht, ein kleines Protein mit His<sub>6</sub>-Tag zu exprimieren. Hierzu wurde das Cytochrom c<sub>552</sub> aus *Thermus* ausgewählt und ein Teil des kodierenden Bereichs für das His<sub>6</sub>-markierte Protein aus pMA6 in pUCcycA mit den Restriktionsenzymen *BgII/PstI* kloniert (pMA40). Dieser Vektor enthält nun die Sequenz für das Cytochrom c<sub>552</sub> mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag und die endogene (für *T. thermophilus*) Signalsequenz für den Export in das Periplasma. Für die Expression wurde dieser Bereich mit *XbaI/PstI* in den Expressionsvektor pMA36 kloniert, so daß der Kanamycinresistenzpromotor vor dem Gen liegt (pMA42). Durch Elektroporation des Vektors pMA42 in *T. thermophilus* HB27 wurde der Expressionsstamm (Km<sup>R</sup>) erzeugt und zunächst auf LB<sub>Km</sub>-Platten angezogen.

Von mehreren Klonen wurde eine Periplasmapräparation durchgeführt und diese auf ein positives Signal im Western-Blot (Anti-His-Antikörper) untersucht. Ein positiver Klon wurde daraufhin ausgewählt und eine größere Menge Zellen angezogen. Nach der



**Abbildung 34:** 12% SDS-PAGE der Aufreinigung des His<sub>6</sub>-markierten Cytochrom c<sub>552</sub> aus *T. thermophilus* (M: Protein-Standard, 1: Periplasma, 2: nach Ni-NTA-Säule, 3: nach Sephacryl S100).

Präparation des Periplasmas wurde das Protein über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Während der Aufreinigung ist das Protein aufgrund seiner rötlichen Färbung deutlich zu verfolgen und bleibt am Säulenmaterial während des Waschschrilles (50 mM Imidazol) gut haften. Die Elution erfolgte mit 300 mM Imidazol, und die rötlichen Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und durch Gelfiltration weiter gereinigt (siehe 2.4.4). Im Redoxdifferenzspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert) zeigt die His<sub>6</sub>-markierte Variante das charakteristische Maximum bei 552 nm. Zur genauen Bestimmung der Proteingröße wurde ein MALDI-Massenspektrum aufgenommen und eine Masse von 15.865 Dalton ermittelt. Dies

trifft im Rahmen der Messgenauigkeit des angewandten Verfahrens (externer Standard) die theoretisch errechnete Masse von 15.855 Da (Protein: 15.238 Da + Häm 617 Da).

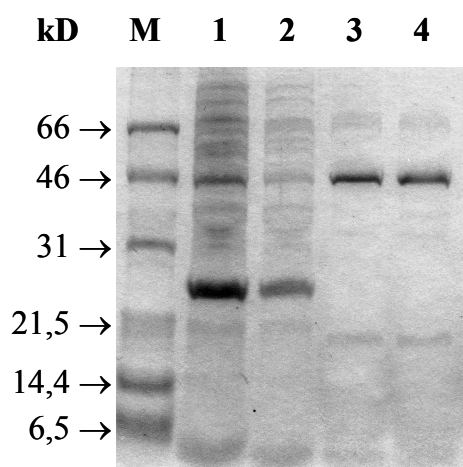
### 3.4.3 His<sub>6</sub>-markierte *ba<sub>3</sub>* Cytochrom *c* Oxidase

#### 3.4.3.1 Expression und Aufreinigung

Das zuvor am Cytochrom *c*<sub>552</sub> getestet Expressionssystem für *T. thermophilus* wurde daraufhin zur Expression der *ba<sub>3</sub>* Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* genutzt.

Der Expressionsvektor pMA36 enthält die kodierende Sequenz für dieses Enzym, jedoch ist eine Unterscheidung von der endogen exprimierten Oxidase nicht möglich, da die zu erwartende weitgehende Unterdrückung der Expression der chromosomal kodierten *ba<sub>3</sub>*-Oxidase bei hohen Sauerstoffpartialdruck nicht erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurde eine andere Strategie gewählt um das Plasmid-kodierte Enzym von der endogen exprimierten Variante abtrennen zu können: Durch PCR mit den Primern Thermus 11-F und ThSUI-C-His auf das Template pBScbaX wird eine am C-Terminus der Untereinheit I mit einem Histidin-Tag (His<sub>6</sub>) markierte Version der *ba<sub>3</sub>*

generiert. Das Amplifikat wurde mit *Xba*I/*Pst*I restringiert und in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pMA36 kloniert. Der Vektor pMA39 enthält nun das Operon für alle drei Untereinheiten der Oxidase hinter dem Kanamycinresistenzpromotor. Durch das Histidin-Tag wird auch die Unterscheidung zwischen der rekombinanten und der endogenen Oxidase ermöglicht und die Aufreinigung der Ersteren über eine Metallaffinitätssäule erleichtert. Durch Elektroporation dieses Plasmids (pMA39) in *T. thermophilus* HB27 wurde der Expressionstamm generiert. Durch Western-Blot-Analyse mit einem Anti-His-Antikörper wurde nach Transformanten gesucht, die in



**Abbildung 35:** SDS-PAGE (12%) der *ba<sub>3</sub>* Cytochrom *c* Oxidase. Aufreinigung aus *T. thermophilus* über Metallaffinitätschromatographie (M: Proteinstandard, 1: Solubilisierungsansatz, 2: Ni-NTA-Durchlauf, 3: Ni-NTA-Eluat, 4: nach Sephacryl S200).

ihren Membranen ein auf den Histidin-Tag positives Signal geben. Nach Präparation der Membranen aus einem His-Tag-positiven Klon und Solubilisierung der membranständigen Proteinkomplexe zeigt sich bei Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule (Qiagen) die starke Anreicherung des Proteingemisches mit apparenten



Molekulargewichten im SDS-Gel von  $\sim 46$  und  $\sim 18$  kD (Abbildung 35). Die Probe enthält noch kleinere Verunreinigungen, jedoch entsprechen die beiden Hauptbanden dem Größemuster für die Wildtyp  $ba_3$  Oxidase aus *T. thermophilus* [97]. Die Gelfiltration über Sephacryl S200 scheint keinen weiteren Aufreinigungseffekt zu zeigen.

In immunologischen Tests erwies sich die 46 kD Bande als reaktiv gegenüber dem Anti-His-Antikörper, und die 18 kD Bande färbte sich im Western-Blot mit dem Antikörper gegen die  $ba_3$ -Oxidase (Thba3) an. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß der Antikörper Ththba3 nur gegen die kleine Untereinheit der  $ba_3$ -Oxidase reaktiv ist. Durch N-terminale Sequenzierung wurden die ersten Aminosäurereste einer über Ni-NTA gereinigten Probe bestimmt. Die Peptidsequenzen MVDEH (Untereinheit II) und SEISRVY (Untereinheit I) lassen sich eindeutig zuordnen und sind stöchiometrisch vorhanden (T. Soulimane, persönliche Mitteilung). Die Prozessierung der N-terminalen Aminosäurereste von Untereinheit I wurden bereits zuvor berichtet [16]. Die aus nur 34 Aminosäureresten bestehende Untereinheit IIa konnte durch N-terminale Sequenzierung nicht nachgewiesen werden.

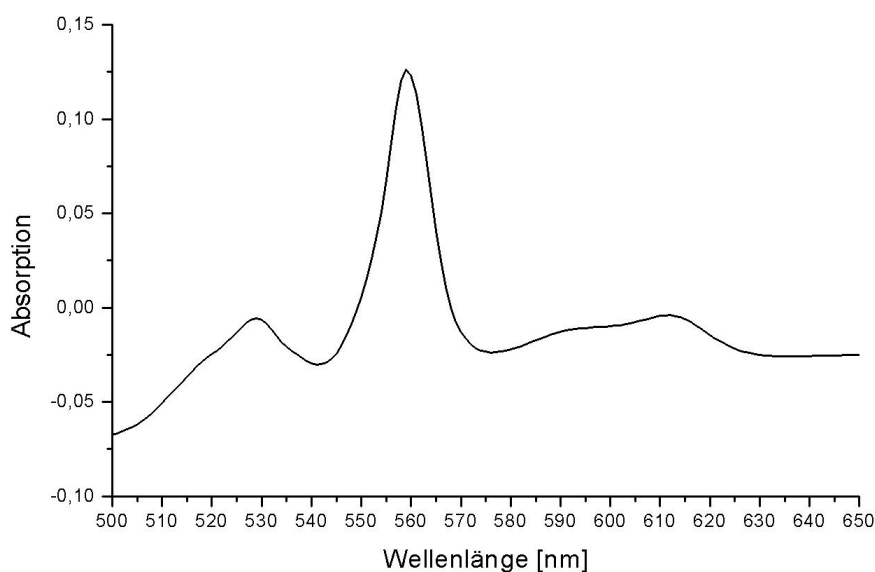
Durch Extraktion der Membranfraktion mit 7 M Harnstoff und Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni-NTA-Säule wurde mit dem Histidin-Tag selektiv die Untereinheit I aufgereinigt und durch MALDI-Massenspektroskopie das Molekulargewicht bestimmt. Die prominentesten Peaks im Massenspektrum zeigen Molekulargewichte von 63.314 Da, 63.128 Da und 22.391 Da. Der größte Wert entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit ( $\pm 50$  Da) der theoretisch errechneten Molekülmasse des Proteins von 63.350 Da. Bei der leicht verringerten Masse könnte es sich um eine prozessierte Variante des Proteins handeln. Die kleinsten Masse könnte durch ein Degradationsprodukt oder durch eine Verunreinigung hervorgerufen werden. In kinetischen Experimenten unter Umsatzbedingungen mit *Thermus*-Cytochrom  $c_{552}$  konnte für das über Metallaffinitätschromatographie aufgereinigte Material nur eine stark verminderte Aktivität gegenüber dem Wildtyp (von T. Soulimane zur Verfügung gestellt) gemessen werden (siehe auch 4.6).

### 3.4.3.2 Spektrale Charakterisierung

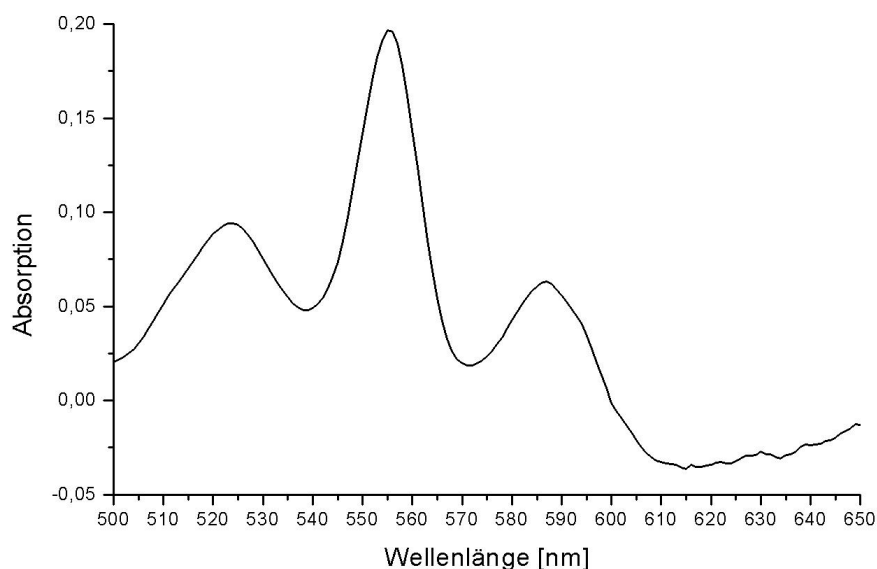
Zur weiteren Charakterisierung des über die Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigten Materials wurden verschiedene Spektren im sichtbaren Wellenlängenbereich aufgenommen. Im Differenzspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert, Abbildung 36) bilden sich Maxima bei 530 nm, 560 nm und 613 nm heraus, dies entspricht dem spektralen Verhalten einer Häm  $a_3$  und Häm  $b$ -haltigen Probe und stimmt mit den für die  $ba_3$ -Oxidase veröffentlichten Werten überein [99]. Zur weiteren Bestimmung des

## Ergebnisse

Hämgehaltes der Probe wurden Pyridin-Hämochromspektren aufgenommen. Hierbei werden die Häme aus der Proteinumgebung herausgelöst und die fünfte und sechste Koordinierungsstelle durch Pyridin ersetzt. Für das Eluat der Ni-NTA-Chromatographie ergibt sich ein für Häm *b* typisches Maximum bei 556 nm. Die sehr breite Bande bei 613 nm wird schärfer und verschiebt sich zu 588 nm (Abbildung 36), einem für Häm *a* charakteristischen Wert [80]. Mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten für die Pyridinhämochrome wurde ein Verhältnis von Häm *b* zu Häm *a* von 1,2 ermittelt, somit tritt eine gewisse Abweichung von der erwarteten Stoichiometrie von 1:1 auf und die Probe scheint einen zu großen Anteil an Cytochrom *b* zu enthalten.

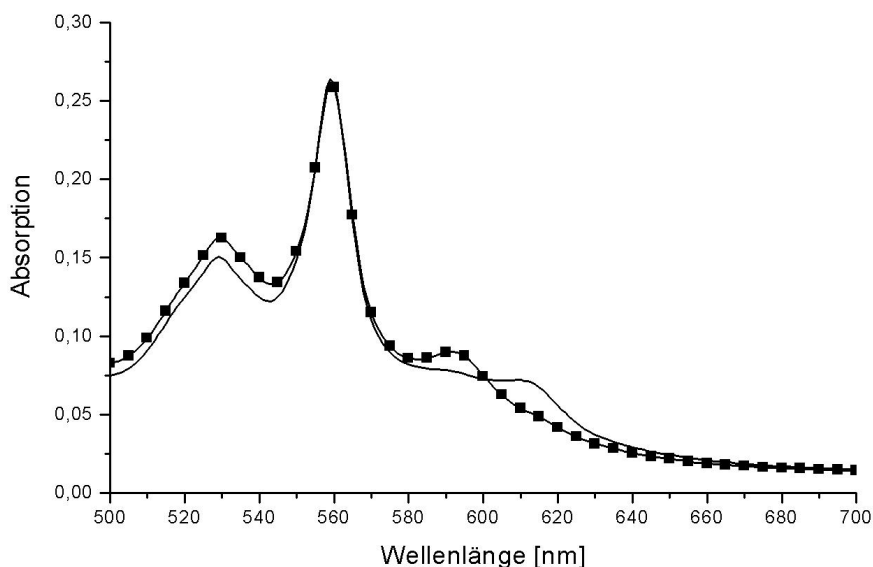


**Abbildung 36:** Redoxdifferenzspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert) der in *T. thermophilus* exprimierten und über Ni-NTA gereinigten *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase.



**Abbildung 37:** Pyridinhämochrom-Redoxspektrum (Dithionit-reduziert minus oxidiert) der aus *T. thermophilus* über Ni-NTA gereinigten *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase.

Kohlenmonoxid als kompetitiven Inhibitor der Cytochrom *c* Oxidasen bindet mit starker Affinität an das high-spin Häm  $a_3$ . Obwohl für die  $ba_3$ -Oxidase gegenüber dem mitochondrialen Enzym eine geringere Affinität für CO beobachtet wurde [98], wird durch die Bindung des Kohlenmonoxids das Absorptionsspektrum des Häms auf charakteristische Weise verschoben.



**Abbildung 38:** CO-Bindungsspektrum der aus *T. thermophilus* über Ni-NTA gereinigten  $ba_3$ -Cytochrom *c* Oxidase (durchgezogene Linie: Dithionit-reduziertes Spektrum, ■: Dithionit-reduziert + CO).

Durch Aufnahme des reduzierten Spektrums (Dithionit-reduziert) und Vergleich mit dem Spektrum nach Begasung durch Kohlenmonoxid erkennt man deutlich die durch die CO-Bindung induzierte Verschiebung der Häm *a* Absorptionsbande (Abbildung 38). Die Verschiebung von 611 nm im reduzierten zu 593 nm (reduziert + CO) entspricht den für die  $ba_3$ -Oxidase aus *T. thermophilus* publizierten Werten [99].

## 4 Diskussion

Die spezifische Erkennung und Bindung zwischen Proteinen ist ein zentrales Element in der Steuerung biologischer Prozesse. In vielen Fällen, zum Beispiel Antigen-Antikörper-Reaktionen, findet eine hochspezifische und sehr feste Bindung der Proteine statt. In Anderen werden Komplexe mit dynamischem Charakter gebildet und es muß eine Balance zwischen Spezifität und geringen Bindungsstärken gefunden werden. Dies gilt insbesondere für Enzyme mit sehr hohen Umsatzraten, da die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des freien Enzyms abhängig ist und mußinsbesondere auch bei Elektronentransferreaktionen erfolgen, damit ein gerichteter und kontrollierter Ablauf des Energiehaushaltes der Zelle stattfinden kann. Viele Elektronentransferreaktionen zwischen Proteinenpartnern *in vivo* finden unter Beteiligung zumindest eines frei diffundierbaren Partners statt. Kleine, elektronentragende Proteine (10 - 15 kD), wie Plastocyanin oder Cytochrom *c*, fungieren als Mediatoren zwischen den verschiedenen metabolischen Akzeptorsystemen und vermitteln die Reduktionsäquivalente für nachfolgende Reaktionen.

Ein schnelles elektronenakzeptierendes Enzym ist die Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* mit Umsatzraten von  $1000 \text{ s}^{-1}$  [84]. Diese Oxidase steht damit unter der Anforderung mit ihrem Substrat Cytochrom  $c_{552}$  eine spezifische Wechselwirkung einzugehen und dabei nur einen transienten Komplex zu bilden. Um die Grundlage für die spezifische und dennoch sehr schnelle Wechselwirkung dieser beiden Proteine zu untersuchen, wurden lösliche Module der Cofaktor-tragenden Domänen hergestellt. Dieser Ansatz ermöglicht eine Untersuchung des Interaktionsmechanismus ohne störende Einflüsse durch nachfolgende Elektronen-transferreaktionen in der Oxidase oder Probleme, die im Zusammenhang mit der Löslichkeit membranständiger Proteine auftreten. So könnte der im Zusammenhang mit Membranproteinen notwendige Einsatz von Detergenzien auch die Protein-Protein-Wechselwirkung beeinflussen.

Bei der heterologen Expression von Elektronentransfermodulen in *E. coli* treten häufig Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Assemblierung und dem Einbau der Cofaktoren auf. Durch die Klonierung und Koexpression der Hämreifungsgene wurde die Überproduktion von *c*-Typ Cytochromen in *E. coli* möglich [86]. Dieser Ansatz wurde auch zur Expression einer löslichen Domäne des Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* genutzt [100]. Die erste heterologe Expression einer löslichen  $\text{Cu}_A$ -Domäne und Rekonstitution des Kupferzentrums wurde von Lappalainen *et al.* [57] durchgeführt, so daß beide Partnerproteine als lösliche Module zur Verfügung standen. In ähnlichen Ansätzen wurde auch das Cytochrom  $c_{552}$  [101] und die  $\text{Cu}_A$ -Domäne [59]

aus *T. thermophilus* exprimiert, so daß auch dieses Proteinpaar den kinetischen Untersuchungen durch *stopped-flow*-Spektroskopie zugänglich wurde. Ein direkter Vergleich des mesophilen mit dem thermophilen System sollte genaueren Aufschluß über die generellen Interaktionsmechanismen der strukturell bekannten Proteine geben [16, 43, 53, 102] und wurde in dieser Arbeit durchgeführt.

### 4.1 Kinetische Untersuchungen

Die schnellen Elektronentransferreaktionen zwischen dem Cytochrom  $c_{552}$  und der  $Cu_A$ -Domäne wurden für die Proteine aus *P. denitrificans* und *T. thermophilus* durch *stopped-flow*-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Protokoll ausgearbeitet das Ascorbat als Reduktionsmittel einsetzt und dieses während der Elektronentransferreaktion in den Reaktionslösungen verbleibt. Da Ascorbat bei dem verwendeten pH-Wert (pH 7) ein langsames Reduktionsmittel ist [81, 82], sind die beiden Reaktionsphasen, Interproteinelektronentransfer und Reduktion durch Ascorbat, gut von einander zu trennen (siehe 3.1.2.1). In den Vorversuchen wurde bestätigt, daß die Redoxreaktion der Proteine untereinander bei diesen Bedingungen um mehrere Größenordnungen schneller ist als die Ascorbatreaktion. Damit wurde gezeigt, daß sich die Reaktionsphasen auf unterschiedlichen Zeitskalen (0,2 bzw. 50 Sekunden) gut getrennt voneinander beobachten lassen.

Die gemessenen bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für das Paar  $Pd-c_{552}$  und  $Pd-Cu_A$  sind bei Raumtemperatur sehr hoch und erreichen im Zusammenhang mit den sehr kleinen Amplituden die technischen Grenzen der *stopped-flow*-Apparatur. Aus diesem Grund wurden die Messungen bei 8 °C durchgeführt, so daß die Reaktionen etwas verlangsamt ablaufen. Bei dieser Temperatur und einem Salzgehalt von 15 mM KCl beträgt  $k_{for}$  bereits  $3,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und mit einer Rate von  $17,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ist die Reaktion in Rückrichtung bei gleicher Ionenstärke um fast eine Größenordnung schneller. Die Gleichgewichtskonstanten, die sich aus dem Quotienten der beiden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten errechnen, ergeben eine Bevorzugung der Rückreaktion bei allen Ionenstärken ( $K_{eq} = \sim 0,2$ ).

Dies spricht für eine Bevorzugung des reduzierten Cytochroms und würde den Elektronenfluß in physiologischer Richtung nicht favorisieren, jedoch würden in der Gesamtoxidase die weiterführenden Reaktionen vom  $Cu_A$  zum Häm *a* und dem binukleären Zentrum aus Häm *a*<sub>3</sub> und  $Cu_B$ , sowie der Umsatz des Sauerstoffs, die Reaktion thermodynamisch in die physiologische Richtung treiben. Auch die Aktivierungsenergien, die aus den Temperaturabhängigkeitsmessungen des Elektronentransfers zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und dem löslichen  $Cu_A$ -Fragment

ermittelt wurden, bestätigen die Bevorzugung der Reaktion in der Rückrichtung, d.h. zum reduzierten Cytochrom. Eine Gleichgewichtskonstante, die auf Seite des reduzierten Cytochroms liegt, wurde zuvor auch für die Reaktion der Cytochrom *c* Oxidase aus Rinderherz mit dem Iso-1-Cytochrom *c* aus Hefe berichtet [56] und unterstützt die in dieser Arbeit ermittelten Werte. Weiterhin ergeben die publizierten Redoxpotentiale (270 mV für das *Pd-c*<sub>552</sub> und 240 mV für das *Pd-Cu<sub>A</sub>*) in guter Übereinstimmung mit den Werten dieser Arbeit eine Gleichgewichtskonstante von 0,3. Eine andere Situation findet sich für das entsprechende Redoxpaar aus *T. thermophilus*: aus den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{for}} = 3,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und  $k_{\text{rev}} = 0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , bei  $T = 8 \text{ °C}$  und 25 mM KCl) errechnet sich eine Gleichgewichtskonstante von 4,8. In diesem Redoxsystem ist die physiologische Richtung bevorzugt, und dies spiegelt sich auch in den Redoxpotentialen der Proteine wider, obwohl unterschiedliche Werte veröffentlicht wurden (200 und 230 mV für das *Th-c*<sub>552</sub> [101, 103] und 240 bzw. 266 mV für das *Th-Cu<sub>A</sub>*, siehe 3.2.4 und [59, 104]). Die Extrapolation der bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten des *Paracoccus*-Paares auf 20 °C ergibt einen Wert von  $4,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und ermöglicht den Vergleich mit zuvor veröffentlichten Werten für die Reaktion mit anderen Cytochrompartnern. So ist die Reaktion des *Pd-c*<sub>552</sub> mit dem *Pd-Cu<sub>A</sub>* ungefähr dreimal schneller als bei Verwendung des Cytochroms *c*<sub>550</sub> aus *P. denitrificans* ( $1,46 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und rund fünfzehnmal schneller als bei Verwendung von Pferdeherz-Cytochrom *c* ( $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [48]. Dies liefert ein unabhängiges kinetisches Argument für die These, daß es sich beim Cytochrom *c*<sub>552</sub> um den bevorzugten Elektronendonator für die *aa*<sub>3</sub> Cytochrom *c* Oxidase handelt [49, 50, 51]. Es ist zu beachten, daß die zusätzliche saure Domäne und der Membrananker im nativen Cytochrom *c*<sub>552</sub> zu noch höheren Elektronentransferraten durch die Bildung eines Superkomplexes mit *bc*<sub>1</sub>-Komplex und *aa*<sub>3</sub>-Oxidase [105] führen könnten.

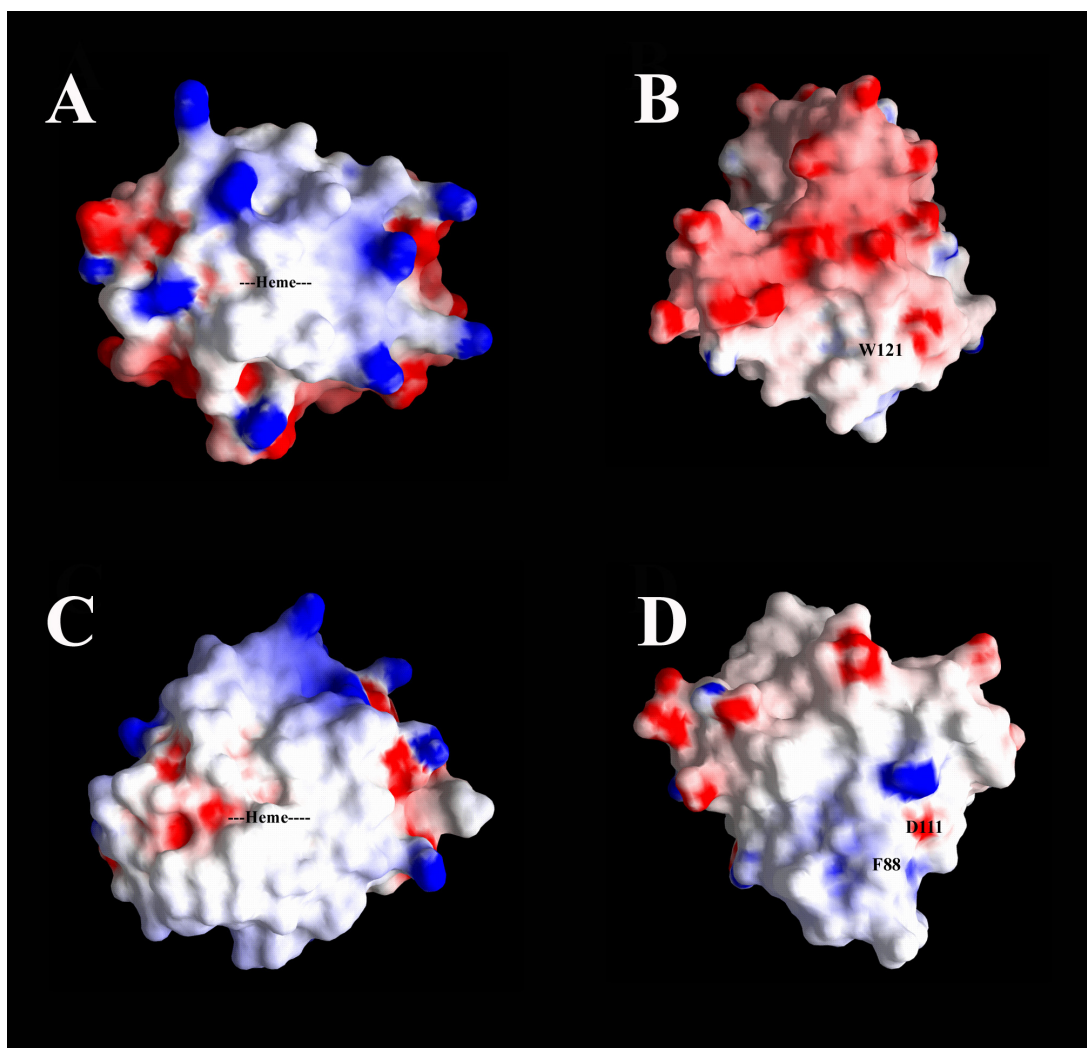
Die Beteiligung von elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Interaktion von Cytochrom *c* mit der *aa*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase wurde durch Mutagenesestudien gezeigt [62, 63]. So trägt das Cytochrom *c*<sub>552</sub> insgesamt neun Lysinreste, die einen Ring aus basischen Seitenketten um die Hämspalte ergeben [102]. Acht dieser Lysinreste wurden in Mutageneseexperimenten untersucht [84], und es wurde beobachtet, daß durch Austausch zu ungeladenen Seitenketten im Großen und Ganzen alle Mutanten ähnliche Effekte in einem standardisierten Aktivitätstest mit der *aa*<sub>3</sub>-Oxidase zeigen. Jede der Mutanten zeigte einen Anstieg des  $K_M$ -Wertes, als ein Maß für eine gegenüber dem Substrat verringerte Affinität (3 - 5-fach geringer). Dies spricht für das Konzept eines generellen Oberflächenpotentials, welches ausschlaggebend für die Assoziationsreaktion ist. Demgegenüber steht die Theorie, daß einzelne definierte Ladungspaare in der Wechselwirkung der beiden Moleküle

eine wichtige Rolle spielen, da das Partnerprotein des Cytochrom  $c_{552}$ , die  $aa_3$ -Oxidase, auf der Oberfläche der Untereinheit II eine Anhäufung von sauren Resten in der Nähe des  $Cu_A$ -Zentrums trägt [43].

Für mitochondriales Cytochrom  $c$  wurde aber die Bedeutung von spezifischen Resten aufgrund von Mutageneseexperimenten und chemischen Modifikationen von Lysinen gezeigt [106, 107]. Hieraus ergab sich die Fragestellung, wieviele Ladungen wirklich an der Interaktion des *Paracoccus*-Paares beteiligt sind. Durch die Bestimmung der Ionenstärkeabhängigkeit des Elektronentransfers zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und der löslichen  $Cu_A$ -Domäne mittels *stopped-flow*-Kinetiken und deren Analyse mit Hilfe der Brønsted-Gleichung konnte ermittelt werden, daß formal insgesamt 4,6 Ladungen an der Wechselwirkung beteiligt sind. Dies bedeutet, daß 2 - 3 Ladungen mit entgegengesetztem Vorzeichen auf den Interaktionsflächen der beiden Proteine durch die Ionenstärkeeffekte beeinflußt werden. Im Gegensatz hierzu ist die Interaktion des Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* mit der löslichen  $Cu_A$ -Domäne der  $ba_3$ -Oxidase weit weniger durch Änderungen der Ionenstärke beeinflussbar. Die Analyse der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Ionenstärke ergab einen Wert von -0,57, so daß in diesem System formal weniger als eine effektive Ladung pro Interaktionsfläche an der Wechselwirkung beteiligt ist. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Oberflächeneigenschaften, die aus den Kristallstrukturen bekannt sind und zur Berechnung der elektrostatischen Potentiale der vermuteten Interaktionsflächen aller vier verwendeten Proteine verwendet wurden (Abbildung 39). Diese Abbildung zeigt deutlich die sternförmige Anordnung der Lysine um die Hämspalte des löslichen Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* und die entgegengesetzten Ladungen der sauren Reste um den Elektroneneintrittspunkt Trp121 auf dem  $Cu_A$ -Fragment der  $aa_3$ -Oxidase. Im Gegensatz dazu zeigen die vermuteten Interaktionsflächen der entsprechenden Proteine aus *T. thermophilus* kaum Ladungen und nur Asp111, als einziger konservierter saurer Aminosäurerest, liegt in der Nähe des vermuteten Elektroneneintrittspunkts Phe88.

Die Oberfläche des Cytochroms  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* zeigt um die Hämspalte ebenfalls fast keine Ladungen. Bis heute gibt es keinen experimentellen Beweis für einen durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierten Komplex für die Interaktion zwischen Cytochrom  $c_{552}$  und der  $ba_3$ -Oxidase aus *T. thermophilus*, jedoch deuten mehrere Befunde auf eine solche Interaktion hin. Giuffrè *et al.* [29] schließen die Bildung eines elektrostatisch stabilisierten Komplexes aus, da die Aktivität der  $ba_3$ -Oxidase unter Umsatzbedingungen bei niedrigster Ionenstärke maximal wird. In diesem System würde die Dissoziationsrate des Cytochroms von der Oxidase eine signifikante Rolle spielen und den Umsatz verlangsamen, da bei zunehmender Ionenstärke ein hydrophober Komplex zunehmend stabilisiert werden könnte. Die in

der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten scheinen dieser Aussage zunächst zu widersprechen, doch sollte in Betracht gezogen werden, daß bei den schnellen Kinetiken, im Gegensatz zu Experimenten mit Substratumsatz, nur die initiale Anziehung und der Elektronentransfer erfaßt werden. Deshalb sind die Reaktionen mit den löslichen Modulen nicht abhängig von einer zu langsamen Dissoziationsrate bei hohen Ionenstärken, und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten werden nur moderat beeinflusst. Diese Überlegungen deuten daraufhin, daß es im Falle der *Thermus*-Proteine nicht zu einer elektrostatisch getriebenen Vororientierung der Fragmente kommt, wie sie für die Wechselwirkung des entsprechenden Systems aus *Paracoccus* angenommen wird.



**Abbildung 39:** Elektrostatische Potentiale für die vorgeschlagenen Interaktionsflächen von (A) *P. denitrificans* Cytochrom  $c_{552}$  (PDB: 1QL3), (B) *P. denitrificans*  $Cu_A$ -Fragment (1AR1), (C) *T. thermophilus*  $c_{552}$  (PDB: 1C52) und (D) *T. thermophilus*  $Cu_A$  (PDB: 1EHK). Die Farbgebung wurde entsprechend den mit GRASP [108] berechneten elektrostatischen Potentialen mit Abstufungen vorgenommen: zwischen -15 kT (intensives Rot) bis + 15 kT (intensives Blau) für die  $Cu_A$ -Fragmente und -1 kT (intensives Rot) bis + 5 kT (intensives Blau) für die Cytochrome. Die Lage des Häm-Cofaktoren, sowie der Elektroneneintrittspunkt W121 in das *Pd*- $Cu_A$  wurden gekennzeichnet. Für das *Th*- $Cu_A$  wurde F88 als möglicher Elektroneneintrittspunkt vorgeschlagen.



Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Cytochrom  $c_{552}$  aus *T. thermophilus* kein effizientes Substrat für die Wildtyp  $aa_3$ -Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* ist, aber durch Erhöhung der Hydrophobizität der Bindungsstelle auf der Oxidase ein besserer Umsatz des thermostabilen Cytochroms erfolgen kann [109].

Durch gerichtete Mutagenese konnte auch für die Reaktion der *Paracoccus*-Proteine die Beteiligung hydrophober Wechselwirkung gezeigt werden [62], und es wurde ein dreistufiges Reaktionsmodell vorgeschlagen: (i) durch elektrostatische Wechselwirkungen wird über größere Entfernungen die Anziehung der beiden Moleküle vermittelt; (ii) über hydrophobe Kontakte erfolgt eine Umorientierung der Fragmente zueinander, ein produktiver Elektronentransferkomplex kann sich ausbilden und (iii) die Proteine dissoziieren.

Zusammengenommen läßt dies die Frage aufkommen, wie es zur spezifischen Erkennung der Moleküle kommt, die sich in den Reaktionsraten widerspiegelt, und welche Aminosäuren an direkten Kontakten zwischen den Proteinen beteiligt sind.

## 4.2 Ermittlung der Interaktionsflächen

Zahlreiche Ansätze wurden durchgeführt um die Kontaktflächen von Elektronentransferproteinen durch Kokristallisation zu charakterisieren [65, 67, 110, 111, 112, 113]. Um der Kritik zu begegnen, daß es sich bei der Kokristallisation um eine „statische“ Sicht von eigentlich in Lösung stattfindenden dynamischen Prozessen handelt, wurden Experimente mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Durch *chemical-shift perturbation mapping* können auch Komplexe mit transienter Natur (z.B. Redoxkomplexe) in Lösung untersucht werden. Durch Änderungen in der Umgebung eines mit [ $^{15}\text{N}$ ]-Stickstoff markierten Proteins können die Interaktionsflächen durch Zugabe des Reaktionspartners identifiziert werden. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst auf das Cytochrom  $c_{552}$  aus *P. denitrificans* angewendet, und durch Zugabe des löslichen  $\text{Cu}_A$ -Proteins erfolgte die Ermittlung der wahrscheinlichen Interaktionsfläche. Das [ $^{15}\text{N}$ ]-markierte Cytochrom  $c_{552}$  wurde im reduzierten und im oxidierten Zustand untersucht. In beiden Redoxzuständen wurden nur sehr kleine Veränderungen in den chemischen Verschiebungen und den Linienbreiten der Amidresonanzen beobachtet. Dies deutet daraufhin, daß es zu keinen strukturellen Veränderungen des Cytochroms durch die Komplexbildung kommt und daß trotz des Überschusses an  $\text{Cu}_A$ -Fragment ein großer Anteil des Proteins sich nicht im Komplex befindet. Daraus läßt sich schließen, daß es sich um einen sehr kurzlebigen Proteinkomplex handelt, was in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Daten ist. Die

Quantifizierung der Änderungen der chemischen Verschiebungen ist aufgrund der komplizierten Beziehung zwischen Struktur und chemischer Verschiebung schwierig und sollte nur als statistisches Maß genutzt werden [70]. Die Resultate aus einer solche Quantifizierung haben die größte Signifikanz, wenn ein kontinuierlicher Bereich von *Shift*-Änderungen auf der Proteinoberfläche beobachtet wird. Wie Abbildung 15 zeigt, ist dies für die Interaktionsmessung des *Pd-c<sub>552</sub>* mit dem *Pd-Cu<sub>A</sub>* der Fall, wobei beachtet werden sollte, daß nur Amidprotonenresonanzen des Proteinrückgrats untersucht wurden, aber der Rückschluß auf die gesamten Aminosäurereste geführt wurde. Da in beiden Redoxzuständen und bei allen Temperaturen im Großen und Ganzen die gleichen Aminosäurereste durch die Cu<sub>A</sub>-Bindung betroffen sind, ergibt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Untersuchung der Interaktionsfläche des [<sup>15</sup>N]-markiertem Iso-1-Cytochrom *c* mit Cytochrom *c* Peroxidase aus Hefe gemacht [68].

Für das reduzierte System ist eine Verstärkung der *Shift*-Änderungen bei erniedrigten Temperaturen zu beobachten, so daß auf eine leichte Verschiebung des Assoziationsgleichgewichts zum gebundenen Cytochrom geschlossen werden kann. Insgesamt wurden für das oxidierte System größere Verschiebungsänderungen beobachtet, jedoch sind die ausgeprägtesten Effekte nicht temperaturabhängig, so daß diese nicht notwendigerweise durch eine festere Bindung zustande kommen. Diese Effekte könnten durch die paramagnetische Natur des Systems erzeugt werden, da beide Proteine im oxidierten Zustand ungepaarte Elektronen aufweisen.

Wie bereits erwähnt wurden für das reduzierte und das oxidierte System große Übereinstimmungen im Hinblick auf die wahrscheinliche Interaktionsfläche gefunden. In beiden Redoxzuständen zeigen die Aminosäurereste A16, K70, G75 und A81 die größten *Shift*-Änderungen und sind damit wahrscheinlich am Aufbau der Kontaktfläche beteiligt. Eine genauere Analyse der Daten ergibt auch eine mögliche Beteiligung der Reste D24, V26, A79 und F80 und möglicherweise auch G25, G27 und G82. Dies impliziert, daß die fast kontinuierliche Kontaktfläche um die Hämspalte weitgehend unabhängig vom Redoxzustand des Proteins ist. Um diese mögliche Interaktionsfläche befinden sich die neun Lysinreste des Moleküls, die grob in zwei Ringe unterteilt werden können: Im inneren Ring finden sich K13, K15, K70 und K77; im äußeren K9, K19, K51, K74 und K85 [102]. Von diesen basischen Lysinresten ist bei Anwesenheit des Cu<sub>A</sub>-Fragments nur K70 durch *Shift*-Änderungen der Amidgruppe im Proteinrückgrat betroffen und damit wahrscheinlich auch an direkten Kontakten beteiligt. Dies steht in Gegensatz zu zuvor postulierten mehrfachen Ausbildung von Salzbrücken zwischen Cytochrom *c<sub>552</sub>* und der *aa<sub>3</sub>*-Oxidase, welche in einer *Docking*-Studie errechnet wurden [114]. Aus dieser Computersimulation wurden zwei hypothetische Komplexstrukturen mit jeweils drei intermolekularen Ionenpaarungen

vorgeschlagen. In beiden theoretisch ermittelten Komplexstrukturen ist K70 an direkten Kontakten zur Oxidase beteiligt. Neben K70 sind im NMR-Experiment hauptsächlich unpolare Aminosäurereste involviert, und somit sind keine weiteren Kontakte über Salzbrücken mit dem Cu<sub>A</sub>-Fragment zu erwarten. Die Beteiligung von hydrophoben Resten ist in guter Übereinstimmung mit dem zuvor von *Witt et al.* [61, 62] postulierten Modell der Interaktion, bei dem die hydrophoben Seitenketten an der Feinjustierung des Elektronentransferkomplexes beteiligt sind.

Für die Reste F80 und G82 wurde in NMR-spektroskopischen Experimenten eine erhöhte Beweglichkeit festgestellt [71], und für den aromatischen Ring wird eine Beteiligung am Elektronentransfer diskutiert [115]. Von den aromatischen Aminosäureresten des Cytochrom c<sub>552</sub> liegt F80 dem Eisenatom am nächsten (6,51 Å vom Ringzentrum [116]) und ist ein hochkonservierter Rest (F87 im Iso-1-Cytochrom c aus Hefe, F82 in Pferdeherz Cytochrom c), dessen Einfluß auf die Elektronentransferreaktion durch Mutageneseexperimente gezeigt werden konnte. Die Mutante F80Y zeigt bei gleich bleibendem K<sub>M</sub>-Wert eine Verringerung der katalytischen Aktivität (k<sub>cat</sub>) um den Faktor 3, obwohl das Redoxpotential um ca. 30 mV verringert ist (248 mV, [109]). Auch in der Kristallstruktur des Cytochrom c<sub>552</sub> aus *T. thermophilus*, welches geringe Aminosäuresequenzhomologien zu anderen Klasse-1 Cytochromen aufweist [117], findet sich in einer gleichen räumlichen Position ein Phenylalanin (F72) [53]. In Mutageneseexperimenten mit Iso-1-Cytochrom c aus Hefe konnte ebenfalls gezeigt werden, daß ein Phenylalanin zwar nicht essentiell an dieser Position ist, aber einen starken Einfluß auf den Elektronentransfer hat und hierbei der aromatische Charakter entscheidend ist [118]. Im Kokristall aus Cytochrom c Peroxidase und Iso-1-Cytochrom c (beides aus Hefe) scheint F87 an der Ausbildung von direkten van-der-Waals-Kontakten zwischen den beiden Molekülen beteiligt zu sein, da Abstände von weniger als 4 Å zwischen dem Phenylalanin und der Peroxidase beobachtet wurden [65].

Obwohl die beobachteten *Shift*-Änderungen für beide Redoxzustände sehr ähnlich sind, fällt auf das im reduzierten Zustand die Cu<sub>A</sub>-Bindung auch deutliche Effekte in den Amidresonanzen der Reste G54-G55-D56 zeigt (Abbildung 15). Dieses Segment liegt auf der anderen Seite des Moleküls im Bezug auf die exponierte Hämspalte und somit erscheinen direkte Kontakte durch Bindung des Cu<sub>A</sub>-Fragments als sehr unwahrscheinlich. Indirekte Effekte durch die Interaktion der beiden Proteine könnten Auslöser dieser *Shift*-Änderungen sein: Viele eukaryotische Cytochrome zeigen redoxabhängige Konformationsunterschiede [119], welche auch durch Bindung an die jeweiligen Oxidasen beeinflusst werden könnten. Ein ähnlicher Effekt könnte auch für das Segment G54-G55-D56 vorliegen, jedoch zeigt ein Vergleich der NMR-Strukturen im reduzierten und oxidierten Zustand nur eine sehr kleine Verschiebung dieses

Segments, aber unterschiedliche Orientierungen des benachbarten Rests His53 [71, 85]. Im Prinzip könnten diese kleinen Änderungen durch die Cu<sub>A</sub>-Bindung amplifiziert werden und zu den beobachteten Effekten führen. Eine alternative Erklärung bezieht die unterschiedlichen elektronischen Zustände mit ein: Im reduzierten Zustand befindet sich ein zusätzliches Elektron auf dem Cytochrom, und diese negative Ladung verteilt sich über das gesamte Häm, möglicherweise inklusive der Propionatgruppen [120]. Durch die Bindung des Cu<sub>A</sub> könnte es zu einer Umverteilung der Elektronendichte zur Lösungsmittel-abgewandten Seite des Häms kommen und dies zu den Effekten an den Amidprotonen der Reste G54-G55-D56 führen. Unterstützung erhält diese These durch die Beobachtung, daß Fluoreszenzspektren des reduzierten und oxidierten Zustands, obwohl diese identische Konformationen besitzen, unterschiedliche elektronische Umgebungen für den Indolring von Trp57 anzeigen [71]. Dieser Rest liegt ebenfalls auf der „Rückseite“ des Häms und könnte damit sensitiv gegenüber elektronisch unterschiedlichen Zuständen des Häms sein. Ein Tryptophan an der Basis des Häms ist zumindest bei allen eukaryotischen c-Typ Cytochromen ein hochkonservierter Rest; ob dieser eine essentielle Rolle beim Elektronentransfer spielt, ist bisher ungeklärt [117].

Der Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten direkten Kontakte mit beschriebenen Interaktionen von c-Typ Cytochromen mit ihren Redoxpartnern könnte Einblick in einen generellen Interaktionsmodus liefern. Kürzlich wurden die Kokristallstrukturen von zwei membranständigen Enzymkomplexen mit ihren Cytochrom-Substraten veröffentlicht [67, 66]. Es wurde zunächst auch für die Interaktion von Cytochrom c<sub>2</sub> und dem Reaktionszentrum aus *R. sphaeroides* angenommen, daß diese primär über Ionenpaarungen reagieren. Im Kokristall zeigte sich jedoch, daß die ionisierbaren Seitenketten zu weit (mehr als 5 Å) von einander entfernt liegen um Salzbrücken ausbilden zu können [66]. In diesem Komplex sind die direkten Kontakte durch apolare Interaktionen, die durch van-der-Waals-Kontakte vermittelt werden, dominiert und werden durch eine π-Kationen-Interaktion ergänzt. Ein ähnliches Bild zeigt sich im Kokristall aus bc<sub>1</sub>-Komplex und Cytochrom c von *Saccharomyces cerevisiae* [67]. In diesem Komplex wird eine kleine kompakte Interaktionsfläche aus hauptsächlich unpolare Resten unter Beteiligung einer π-Kationen-Interaktion aufgebaut. Auch Interaktionsmessungen, die durch NMR-Spektroskopie in Lösung mit [<sup>15</sup>N]-markiertem Iso-1-Cytochrome c aus Hefe und Peroxidase durchgeführt wurden, ergaben eine kleine Kontaktstelle aus hydrophoben und einigen polaren Resten [68]. In einer analogen Interaktionsstudie wurde mit [<sup>15</sup>N]-Stickstoff markiertes Plastocyanin mit seinem physiologischen Partner Cytochrom f aus dem moderat thermophilen Cyanobakterium *Phormidium laminosum* untersucht [69]. Wieder wurde eine hydrophobe Kontaktstelle ermittelt, die einen exponierten Histidinrest umgibt, welcher

die stärksten *Shift*-Änderungen erfährt und ein Ligand des redoxaktiven Kupferatoms ist. Die Unempfindlichkeit dieses Komplexes gegenüber steigenden Ionenstärken verdeutlichte den hydrophoben Charakter der direkten Protein-Protein Kontakte, welcher sich in der Bindungskonstante ausdrückt und das Fehlen von intermolekularen Salzbrücken anzeigt. Durch *double-mutant-cycle*-Analyse wurde für diese Interaktion auch eine schwache Beteiligung von Ladungsinteraktionen nachgewiesen, diese beeinflusst jedoch nur den diffusionskontrollierten Schritt der Bildung des unspezifischen „Encounter“-Komplexes [121].

Um den Kokomplex in Lösung zwischen *Paracoccus* Cytochrom  $c_{552}$  und dem  $Cu_A$ -Fragment vollständig charakterisieren zu können, sollte auch die lösliche  $Cu_A$ -Domäne mit [ $^{15}N$ ]-Stickstoff markiert und in einer Bindungsstudie untersucht werden. Die Markierung wurde durchgeführt, jedoch zeigte das  $Cu_A$ -Fragment keine ausreichende Stabilität während der Aufnahme der Spektren, so daß die Zuordnung der Resonanzen nicht möglich war. Deshalb wurde das thermostabile  $Cu_A$ -Fragment der  $ba_3$ -Cytochrom *c* Oxidase aus *Thermus* als Alternative ausgewählt, um die Möglichkeit der Charakterisierung beider Kontaktflächen eines Elektronentransferskomplexes zu erlangen.

Eine dem Plastocyanin aus *P. laminosum* vergleichbare Situation wurde in der vorliegenden Arbeit für den Interaktionsmodus des  $Cu_A$ -Fragments der  $ba_3$ -Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* mit Cytochrom  $c_{552}$  ermittelt. Neben der bereits schon erwähnten, aus den kinetischen Daten ermittelten geringen Beteiligung von Ladungen (siehe 3.2.3) zeigt sich auch in den Interaktionsmessungen durch *chemical-shift perturbation mapping* keine ausgeprägte Beteiligung von geladenen Aminosäureseitenketten. Zwar sind Glu119 und Arg146 durch die Anwesenheit des  $Cu_A$ -Fragments betroffen, aber die Seitenketten befinden sich in enger räumlicher Nachbarschaft ( $\sim 3,5$  Å), so daß die Ausbildung einer Salzbrücke möglich scheint. Diese könnte zur Ladungskompensation führen und die zwei von der  $Cu_A$ -Bindung betroffenen Regionen verbrücken. Eine Schleife aus dem Aminosäureresten 119-122 zeigt die ausgeprägtesten *Shift*-Änderungen und die Region aus den Aminosäureresten 146 - 160 in der Nähe der Kupferatome ist ebenfalls deutlich durch die Anwesenheit des Partnerfragments beeinflusst (siehe Abbildung 24). Zusätzlich zeigt Phe88, welches als möglicher Elektroneneintrittspunkt diskutiert wird, deutliche *Shift*-Änderungen und dessen aromatische Seitenkette liegt in direkter Nachbarschaft zur Schleife der Aminosäurereste 146 - 160. Aus dieser Schleife sind die Reste Cys153, His157 und Met160 Liganden der Kupferatome. Gln158 und Asn159 erfahren ebenfalls signifikant starke *Shift*-Änderungen und liegen in Nachbarschaft zum aromatischen Ring von Phe161, welcher selbst nicht durch größere Änderungen der chemischen Verschiebung

der Amidgruppe auffällt. Von der Proteinoberfläche aus gesehen liegt dieser unterhalb dieses Restes des signifikant betroffenen Ile148.

Da Phe 161 in der Mitte der beiden von den stärksten Änderungen in den chemischen Verschiebungen betroffenen Regionen liegt, könnte man über diesen aromatischen Rest spekulieren, daß dieser ein alternativer Elektroneneintrittspunkt zu Phe88 sein könnte (siehe auch 3.2.5 und 4.3).

Zusammengenommen scheint die Verhinderung von direkten intermolekularen Salzbrücken ein zentrales Element bei der Interaktion von Elektronentransferproteinen zu sein, wenn transiente Komplexe gebildet werden sollen, die hohe Transferraten unterstützen. Zwar erfolgt eine initiale Anziehung mesophiler Reaktionspartner über elektrostatische Wechselwirkungen, aber die direkten Kontakte werden weitgehend durch nicht-geladene Reste vermittelt. Dies erklärt das zunächst paradox erscheinende Phänomen, daß aus den kinetischen Experimenten eine klare Beteiligung von Ladungsinteraktionen zu erkennen ist, aber in den Komplexmessungen mittels NMR-Spektroskopie hauptsächlich ungeladene Reste identifiziert werden. Die kinetischen Messungen erfassen den gesamten diffusionskontrollierten Schritt, und die Geschwindigkeit der Bildung des „Encounter“-Komplexes ist stark von der ladungsvermittelten initialen Anziehung abhängig. Die Komplexmessungen durch NMR-Spektroskopie spiegeln die Situation im Reaktionskomplex wider und sind damit nur von der Bindungskonstante der Proteine zueinander abhängig. Elektronentransferreaktionen in thermophilen Organismen scheinen auf elektrostatische Wechselwirkungen verzichten zu können, da diese zum einen bei höheren Temperaturen geschwächt werden und zum anderen hydrophobe Kontakte begünstigt werden könnten.

### 4.3 Elektroneneintrittspunkt in die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase

Mutagenesestudien die an den *P. denitrificans* und *R. sphaeroides* Cytochrom *c* Oxidasen durchgeführt wurden [61, 122], zeigten die entscheidende Rolle des Trp121 (*P. denitrificans* Nummerierung) als Elektroneneintrittspunkt zum Cu<sub>A</sub>-Zentrum. Dieses Tryptophan ist in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus* nicht konserviert, aber an gleicher räumlicher Position liegt in der dreidimensionalen Struktur das Phenylalanin 88 [16].

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Mutageneseexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Elektronentransferrate zum Cu<sub>A</sub> in der Mutante F88L um 50% sinkt. Dies ist aber kein so dominanter Effekt, wie er für Mutanten an der Position 121 des *Paracoccus* Cu<sub>A</sub>-Fragments gemessen wurde (siehe 3.2.5). Die Elektronentransferrate

der Mutante W121F sinkt auf ca. 10% des Wildtyps und ist damit den mit der Gesamtoxidase gewonnenen Ergebnissen vergleichbar [61]. Ein ähnliches Ergebnis berichten auch Song *et al.* [123] für kinetischen Untersuchungen der löslichen Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *P. versutus* mit der Mutation W121Y (14% der Rate des Wildtyps), bei gegenüber dem Wildtyp unveränderten strukturellen und spektralen Eigenschaften. Daraus läßt sich schließen, daß Messungen zum Elektroneneintritt mit den löslichen Cu<sub>A</sub>-Fragmenten als einfach handhabbare Modellsysteme durchgeführt werden können. Weiterhin fungieren möglicherweise weitere Aminosäurereste im *Thermus*-Cu<sub>A</sub>-Fragment als Elektroneneintrittspunkte. Als weiterer aromatischer Rest in der Nähe des Kupferzentrums wurde Phenylalanin-86 zu Leucin mutiert und in kinetischen Messungen untersucht, jedoch verhält sich diese Mutante wie der Wildtyp, so daß diesem Rest keine Beteiligung am Elektroneneintritt zugesprochen werden kann. Durch die Interaktionsmessungen, die mittels NMR-Spektroskopie zwischen dem Cu<sub>A</sub>-Fragment und dem Partnerprotein Cytochrom *c*<sub>552</sub> durchgeführt wurden, kann ein weiterer aromatischer Rest, Phenylalanin 161, als alternativer Elektroneneintrittspunkt diskutiert werden (siehe 4.2). Dieser ist zwar durch die Interaktion mit dem Cytochrom selbst nicht von *Shift*-Änderungen der Amidprotonen des Proteinerückgrats betroffen, liegt aber zwischen den beiden signifikant veränderten Regionen an der Oberfläche des Cu<sub>A</sub>-Proteins, und der Phenylring befindet sich in weniger als 10Å Entfernung zum Kupferzentrum. Damit könnte dieser nah genug am Kupferzentrum liegen, um vom Rande des Häms zum Phe161, einen effizienten Elektronentransfer leisten zu können [124]. Alternativ könnte es sich bei Phe88 auch um den einzigen Elektroneneintrittspunkt handeln und Leucin müsste dann dessen Funktion auch ohne aromatische Seitenkette, z.B. über  $\sigma$ -Bindungen, übernehmen können. Eine alternative Erklärung für die verringerte Elektronen-eintrittsrate in die Mutante F88L ist die Möglichkeit, daß durch die Mutation das Redoxpotential herabgesetzt werden könnte. Redox titrationen der Mutante F88L und Mutageneseexperimente an der Position Phe161 sollten Aufschluß, darüber geben welche Rolle den einzelnen Aminosäuren im Cu<sub>A</sub>-Fragment der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase zufällt.

### 4.4 Abweichung vom linearen Verhalten

Die Untersuchung von bimolekularen Reaktionen wird normalerweise unter Bedingungen nach pseudo erster Ordnung, durch Einsatz eines Reaktionspartners im ca. 100-fachen Überschuß, durchgeführt. Dies hat den Vorteil, daß Zeitverläufe der Reaktion erhalten werden, die zu einer monoexponentiellen Funktion angepasst werden können. Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante steht hierbei im

direkten Verhältnis zur Konzentration des im Überschuß eingesetzten Reaktanden und der bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten. Bei Auftragung von  $k_{\text{obs}}$  gegen die Konzentrationen des variierten Reaktionspartners wird deshalb eine lineare Abhängigkeit beobachtet, wenn Bedingungen nach pseudo erster Ordnung vorliegen. Durch lineare Regression kann die bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die gewählten Bedingungen erhalten werden.

Wird die Reaktion unter *non-pseudo first order* Bedingungen durchgeführt, d.h. die Konzentrationen der beiden Reaktanden sind in der gleichen Größenordnung, weicht der Reaktionsverlauf von einem monoexponentiellen Relaxationsprozeß ab, und die Datenanalyse wird komplizierter. Von Malatesta [125] wurde vorgeschlagen einen Quotienten aus Exponentialfunktionen an den Reaktionsverlauf anzupassen, so daß auch Reaktionen, die unter *non-pseudo first order* Bedingungen durchgeführt wurden, analysiert werden können (siehe auch 3.1.2.5).

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Gleichungsmodell zur Analyse der Redoxreaktion zwischen dem Cytochrom  $c_{552}$  und dem  $\text{Cu}_A$ -Fragment aus *P. denitrificans* verwendet. Der Vergleich mit Daten aus der Analyse nach pseudo erster Ordnung ermöglicht eine Überprüfung der Hypothese.

Tabelle 6 zeigt den Vergleich der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion. Die ermittelten Daten zeigen die Anwendbarkeit der neuen Analyseverfahren auf diese Redoxreaktion, da ähnliche Geschwindigkeitskonstanten gemessen wurden. Auch das Verhältnis von  $k_{\text{for}}$  zu  $k_{\text{rev}}$  spiegelt sich in den nach der neuen Methode ermittelten Daten wider und ergibt eine Gleichgewichtskonstante von  $K_{\text{eq}} = 0,08$ . Dies entspricht im Großen und Ganzen den in Tabelle 2 gezeigten Daten und unterstreicht, daß die Reaktion zum reduzierten Cytochrom  $c_{552}$  tendiert. Der Vorteil dieser Datenanalyse liegt darin, daß unter *non-pseudo first order* Bedingungen gemessene Reaktionen präziser ausgewertet werden können. Außerdem können die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für Hin- und Rückreaktion aus nur einer Serie von Experimenten in einer Elektronentransferichtung ermittelt werden. Da die Abweichung vom monoexponentiellen Verhalten der Reaktionszeitverläufe und die Abweichung vom linearen Verhalten in den Diagrammen nach zweiter Ordnung berücksichtigt werden, ermöglicht die Analyse nach Formel 4 und der Eta-Funktion eine genauere Auswertung. Ein Nachteil liegt darin, daß aufgrund des nicht-linearen Verlaufs der Eta-Funktion mehr Datenpunkte aufgenommen werden müssen, um eine gute Anpassung der Funktion durch den Algorithmus zu ermöglichen. Ist  $k_{\text{rev}}$  größer als  $k_{\text{for}}$ , so bildet die Eta-Funktion ein Minimum aus, wenn die Ausgangskonzentrationen der beiden Reaktanden gleich sind. Ein Vergleich der rechnerisch durch die Anpassungsverfahren ermittelten Konzentration mit der spektroskopisch bestimmten gibt einen weiteren Hinweis auf die Qualität der



Datenanalyse. Im vorliegenden Fall wurde eine Konzentration des Cu<sub>A</sub>-Fragments von 15 μM spektroskopisch bestimmt und für die Reaktion eingesetzt. Die rechnerische Bestimmung führte in guter Übereinstimmung zu einem Wert von 16 μM. Ist das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten zueinander umgekehrt ( $k_{\text{for}} > k_{\text{rev}}$ ), dann ergibt die Eta-Funktion einen eher abflacherenden Verlauf mit einem Minimum bei [B]=0 (zur genauen Beschreibung dieser Funktion siehe [125]).

	Lineare Regression	Eta-Funktion
$k_{\text{for}}$	$0,83 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$0,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$k_{\text{rev}}$	$5,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$4,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

**Tabelle 6:** Vergleich der mit unterschiedlichen Analysemethoden ermittelten bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten. Die Analyse nach Malatesta (Eta-Funktion, [125]) liefert im Gegensatz zur klassischen Analyse nach Bedigungen pseudo-erster Ordnung gleichzeitig die Raten für Hin- und Rückreaktion.

Wenn die Messungen unter *non-pseudo first order* Bedingungen durchgeführt werden können, liegt ein Vorteil darin, daß kein großer Überschuß eines Reaktionspartners eingesetzt werden muß. Damit werden insgesamt geringere Mengen für eine Meßreihe benötigt. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von Proteinen ein großer Vorteil, da diese häufig nur in geringeren Mengen verfügbar sind.

Im Falle der Reaktion des Cu<sub>A</sub>-Fragments mit Cytochromen ist die Messung unter echten Bedingungen pseudo erster Ordnung nicht realisierbar, da bei Einsatz eines 100-fachen Überschusses die optische Dichte der Lösung in Bezug auf die Reaktionsamplituden zu groß wäre.

### 4.5 Der bc<sub>1</sub>-Komplex aus *T. thermophilus*

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden und den Informationen aus dem Sequenzierungsprojekt von *T. thermophilus* gelang die Identifizierung eines bc<sub>1</sub>-Komplexes als möglichem Bindeglied zwischen Komplex I und den terminalen Oxidasen. Zwar wurde die Klonierung des Strukturgens des Rieske Eisen-Schwefel Proteins beschrieben [20] und die Kristallstruktur eines löslichen Fragments vor kurzem veröffentlicht [126], jedoch waren die übrigen Bestandteile des membranständigen Komplexes bisher nicht bekannt. Die Operonstruktur ähnelt der Genabfolge in *D. radiodurans*, aber in diesem Organismus liegen nur drei offene Leseraster hintereinander [23]. Da der zweite offene Leseraster des *Thermus* Operons bei Sequenzvergleichen hohe Homologien zum C-terminalen Teil des

Cytochrom  $c_6$  aufweist, liegt die Vermutung nahe, daß in *Deinococcus* eine Genfusion der ersten beiden ORFs stattgefunden haben könnte. Der zweite offene Leserahmen könnte in *Thermus* strukturelle Funktionen einnehmen, da er keinerlei Bindungsmotive für Cofaktoren aufzuweisen scheint. Die „DAS“-Analyse (Dense Alignment Surface, [89]) zur Vorhersage von membrandurchspannenden Bereichen sagt eine Transmembranhelix aus den Aminosäuren 100-122 für das Cytochrom  $c_1$  voraus. Würde dies zutreffen, hätte dieses Cytochrom als Bestandteil eines  $bc_1$ -Komplex einen ungewöhnlichen hantelförmigen Aufbau aus einer N-terminalen Domäne im Cytoplasma, einer Transmembranhelix und einer C-terminalen Domäne im Periplasma, welche den Häm-Cofaktor trägt. Ein solcher Aufbau eines Cytochrom  $c_1$  mit einer zentralen Transmembranhelix wurde bisher nicht beschrieben, denn bei allen bislang bekannten Proteinen dieser Klasse liegen die Membranbereiche immer endständig (zum Vergleich siehe [23]). Die spektralen Eigenschaften des Cytochrom  $c_1$  mit der charakteristischen aufgespalteten Bande bei 555 nm wurden zuvor beschrieben [127], konnten aber keinem Enzymkomplex oder einer Funktion zugeordnet werden. Die Klonierung und die heterologe Expression eines löslichen Fragments (siehe 3.3.2) der Häm-tragenden Domäne ermöglichte die funktionelle Untersuchung des Cytochrom  $c_1$ . Durch *stopped-flow*-Spektroskopie wurden schnelle Kinetiken zwischen dem Cytochrom  $c_1$  und dem Cytochrom  $c_{552}$  aufgenommen. Die Analyse der hieraus gewonnenen Daten zeigt eine sehr schnelle bimolekulare Reaktion dieser beiden Fragmente mit Elektronentransferraten von bis zu  $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (bei 10 mM KCl und 8 °C). Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit nahe dem durch Diffusion gesetzten oberen Limit impliziert, daß es sich um eine spezifische Reaktion von nativen Partnern handelt. Das Cytochrom  $c_1$  kann somit als Elektronendonator des Cytochrom  $c_{552}$  in der Atmungskette von *T. thermophilus* betrachtet werden. Das Letztere wiederum ist der spezifische Donor der  $ba_3$  Cytochrom  $c$  Oxidase, ist aber gegenüber der alternativen  $caa_3$ -Oxidase nicht sehr reaktiv [25]. Inwieweit das Cytochrom  $c_1$  auch der direkte Elektronendonator für die  $caa_3$ -Oxidase ist oder ob ein weiteres Mediatorprotein involviert ist, bleibt vorerst offen.

Die geringe Ionenstärkeabhängigkeit der Reaktion zwischen den beiden Cytochromen verdeutlicht wiederum die Betonung nicht-ionischer Interaktionen bei der Wechselwirkung der beiden thermostabilen Proteine, wie sie auch für die Wechselwirkung Cytochrom  $c_{552}$  mit dem  $\text{Cu}_A$ -Fragment aus *Thermus* gezeigt werden konnte (siehe auch 3.2.3.3). Dieses Resultat gibt einen weiteren Hinweis darauf, daß in thermophilen Organismen die Wechselwirkung von Elektronentransferproteinen weitgehend auf Ladungsinteraktionen verzichtet und die Kontakte durch van-der-Waals und hydrophobe Kontakte vermittelt werden.

### 4.6 Expression in *T. thermophilus*

Die heterologe Expression integraler Membranproteine ist bis heute ein schwieriges Unterfangen, da eine ganze Reihe von Komplikationen auftreten können: (i) Die Integration der Proteine in die Membran und nachfolgende Faltungsschritte müssen fehlerfrei ablaufen; (ii) die Lipidzusammensetzung der Membran kann für die Funktion einiger Enzyme essentiell sein [128]; (iii) die Synthese und der Einbau von Cofaktoren, sowie (iv) die korrekte Assemblierung mit weiteren Untereinheiten können abhängig sein von der Funktion spezifischer Chaperone [129]. Darüber hinaus tendiert *E. coli* speziell bei Überexpression sehr hydrophober Proteine dazu, diese in *inclusion bodies* zu aggregieren [130]. Bei der Expression von thermophilen Proteinen in *E. coli* kommt eine weitere Schwierigkeit hinzu: Der Faltungsprozess und der Einbau der Cofaktoren müßte bei einer Temperatur fern dem Optimum erfolgen. Dabei könnte es zu inkorrekt assemblierten Proteinen kommen, die dann unter Umständen bevorzugt abgebaut werden. Um Teile der oben genannten Schwierigkeiten zu umgehen, wurde zunächst versucht, die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus* in *P. denitrificans* zu exprimieren. Ein entscheidender Vorteil von *Paracoccus* gegenüber *E. coli* liegt in der Fähigkeit, Häm *a* zu synthetisieren und möglicherweise dessen Einbau in das Protein durchzuführen. Mit diesem Expressionssystem konnte keine nachweisliche Expression der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase erzielt werden. Dies kann an den oben genannten Gründen (Temperatur, Lipidzusammensetzung der Membran, Chaperone), oder auch an einem unterschiedlichen Codongebrauch der beiden Organismen liegen. Um optimale Voraussetzungen für die Expression der membranständigen *ba*<sub>3</sub>-Oxidase, die neben beiden Häm-Cofaktoren noch drei Kupferatome trägt, zu schaffen, wurde ein homologes Expressionssystem auf Plasmidbasis für *T. thermophilus* etabliert. Dieses ermöglicht die gerichtete Mutagenese des Proteins und sollte alle notwendigen Bedingungen für die Assemblierung schaffen. Als Promotor wurde ein Element gewählt, das normalerweise vor dem Kanamycinresistenzgen liegt und damit kein zu starker Promotor sein sollte. Dies hat den Vorteil, daß es zu einer konstitutiven Expression kommt und die Gefahr von Engpässen bei der Synthese von Cofaktoren vermieden werden sollte. Die Verwendung der hitzeoptimierten Kanamycinresistenz erlaubt eine stabile Expression bei Temperaturen von über 60 °C, so daß die Zellen bei ihrer optimalen Wachstumstemperatur angezogen werden können. Die Konstruktion von Histidin-Tags an die zu exprimierenden Proteine ermöglichte die Abgrenzung von den endogen gebildeten Gegenstücken, da bisher die Generierung von Deletionsmutanten für *Thermus* noch nicht etabliert wurde. Desweiteren ermöglicht das Histidin-Tag die Aufreinigung der Proteine über Metallaffinitätschromatographie.

Das Expressionssystem wurde zunächst mit einem kleinem Protein (Cytochrom  $c_{552}$ , 131 Aminosäuren) getestet. Doch auch dieses Protein birgt die Schwierigkeit, daß neben dem Export in das Periplasma auch der korrekte Einbau des Häms, inklusive den Verknüpfungen über zwei Thioether, erfolgen muß. Diese erfolgreiche Expression und die Reinigung über eine Metallaffinitätssäule aus dem Periplasma zeigen die Anwendbarkeit des Systems. Neben dem guten Bindungsverhalten auf der Ni-NTA-Säule und dem Anti-His Western-Blot zeigt auch die massenspektrometrische Untersuchung die erfolgreiche Expression des Proteins mit Histidin-Tag.

Die Expression der  $ba_3$ -Oxidase wurde in der gleichen Vektorumgebung durchgeführt, und die Aufreinigung erfolgte aus mit Triton X-100 solubilisierten Membranen. Ein funktionelles Histidin-Tag wurde am C-terminalen Ende der Untereinheit I exprimiert und das Protein über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Auch hierbei erfolgte die Detektion des Histidin-Tags über Western-Blotting und MALDI-MS. Die Identifizierung der Oxidase erfolgte über die spektralen Eigenschaften, die durch die Häm-Cofaktoren in ihrer spezifischen Proteinumgebung bestimmt werden. Neben den charakteristischen Banden für Häm  $b$  und  $a$ , zeigte die Probe auch das charakteristische CO-Bindungsverhalten [99]. Des Weiteren wurde die Identität der beiden über die Metallaffinitätschromatographie aufgereinigten Banden durch N-terminale Sequenzierung bestätigt. Die Untereinheiten I und II wurden hierbei in einem stöchiometrischen Verhältnis zueinander gefunden, jedoch konnte die Untereinheit IIa nicht nachgewiesen werden. Diese besteht aus nur 34 Aminosäureresten, die einen kurzen Transmembranbereich ausbilden. Da diese Untereinheit auch bei Solubilisierung mit Triton X-100 nicht verloren geht und in der Kristallstruktur nachgewiesen wurde [16], könnte der Grund für das Fehlen dieser Untereinheit bei der Plasmid-gestützten Expression in der Konstruktion des Vektors liegen. Um mögliche regulatorische Elemente zu entfernen, wurde das  $ba_3$ -Operon erst nach einer palindromische Sequenz (3' - GCCGTATACGGC -5') amplifiziert, welche oberhalb des vermuteten Startcodons liegt, und in den Expressionsvektor kloniert. Damit trägt der Vektor für die Untereinheit IIa nur die Sequenzinformation für die auch in der Kristallstruktur vorkommenden Aminosäuren. Eine mögliche Signalsequenz aus 25 Aminosäureresten eines erweiterten offenen Leserahmens mit einem alternativen Startcodon steht damit nicht mehr zur Verfügung. Diese Sequenz enthält kurz vor einer möglichen Spaltstelle zwei Argininreste in direkter Folge, und man könnte vermuten, daß es sich um ein Signalpeptid des *Twin-Arginine*-Typs handelt. Dieses Exportsignal wird häufig von Proteinen genutzt, die einen Metall-Cofaktor tragen und in das Periplasma ausgeschleust werden. Die Untereinheit IIa der  $ba_3$ -Oxidase nimmt den gleichen Platz in der Kristallstruktur ein wie die erste Transmembranhelix der  $Cu_A$ -tragenden Untereinheit der  $aa_3$ -Oxidase aus *P. denitrificans*. Es könnte sich im Falle

## Diskussion

der *Thermus*-Oxidase ursprünglich um einen offenen Leserahmen gehandelt haben, der die Untereinheiten IIa und II umfaßte. Für den Export dieser Kupfer-tragenden Untereinheit könnte dann eventuell ein *Twin-Arginine*-Motiv notwendig gewesen sein. Gegen diese Theorie spricht, daß weitere Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz (SRRXFLK, [131]) nicht gefunden werden können (siehe Abbildung 40). Hierbei könnte es sich aber dennoch um eine zumindest für die Untereinheit IIa wichtige Sequenz handeln, da diese in der Plasmid-kodierten Variante scheinbar nicht exprimiert oder nicht in die Membran eingebaut wird. Die Untereinheit II wird auch ohne Vorliegen der Untereinheit IIa in die Membran importiert, da diese aus der Membranfraktion solubilisiert und aufgereinigt werden konnte. Im Gegensatz zur Untereinheit IIa der Oxidase findet sich in der Sequenz des *Thermus* Rieske-Proteins eine typische Signalsequenz für den *Twin-Arginine*-Exportweg, so daß angenommen werden kann, daß dieser Organismus über eine entsprechende Exportmaschinerie verfügt.

	<u>ATG</u> CCCCTCA	CCGCAAAGCC	CGGTTTCCGC	TACCATGGAG	GCCGTATACG	GCACCTGCCG														
1	M	P	L	T	A	K	P	G	F	R	Y	H	G	G	R	I	R	H	L	P
	TTAGGGAGGAGGG	<u>GTATG</u> GGAAGA	AAAGCCCCAAA	GGCGCACTGG	CGGTCATCCT	GGTCCTG														
21	L	G	<b>R</b>	<b>R</b>	G	M	E	E	K	P	K	G	A	L	A	V	I	L	V	L
	ACCCTC	ACCATCC	TGGTCTTCTG	GCTGGGAGTG	TACGCCGTCT	TCTTCGCTAG	GGGGTAG													
42	t	l	t	i	l	v	f	w	l	g	v	y	a	v	f	f	a	r	g	-

**Abbildung 40:** DNA- und Aminosäuresequenz der genomisch kodierten Untereinheit IIa der *ba*<sub>3</sub>-Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus*. Die beiden potentiellen Start-ATG sind unterstrichen, in der Kristallstruktur findet sich nur das Peptid beginnend mit dem zweiten Methionin. Hervorgehoben sind die beiden Arginine eines potentiellen Exportmotivs.

Das Fehlen der Untereinheit IIa könnte der Grund dafür sein, daß in kinetischen Untersuchungen unter Umsatzbedingungen nur eine stark verminderte katalytische Aktivität des über Ni-NTA aufgereinigten Materials gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden konnte. Diese sehr kleine Untereinheit bildet eine kurze transmembrane  $\alpha$ -Helix aus und ist nicht an der Bindung von Redoxcofaktoren beteiligt. Aus diesem Grund scheint die Untereinheit IIa vornehmlich strukturelle Aufgaben zu erfüllen, jedoch könnten diese essentiell für eine volle katalytische Aktivität sein.

Ausgehend von den Sequenzen für die Chinoloxidase aus *Sulfolobus acidocaldarius* und der Cytochrom *c* Oxidase aus *Natronobacterium pharaonis* wurde ermittelt, daß diese vermutlich einen ähnlichen Aufbau der Untereinheit II aufweisen: In beiden fehlt die erste Transmembranhelix, jedoch enthalten diese jeweils ein kleines zusätzliches Polypeptid (SoxD, [132] bzw. Untereinheit IV, [133]), welches eine vergleichbare wichtige Funktion einnehmen könnte.

### 5 Zusammenfassung

Der Elektronentransfer von NADH zu Sauerstoff ist ein essentieller Bestandteil im Energiehaushalt der Zelle und wird durch transmembrane Enzymkomplexe vermittelt. Hohe Geschwindigkeit und Spezifität dieser Reaktionen sind dabei von großer Bedeutung. In der Atmungskette von *Paracoccus denitrificans* und *Thermus thermophilus* wird Sauerstoff durch Cytochrom *c* Oxidasen umgesetzt. Beide Enzymkomplexe erhalten die für diese Reaktion notwendigen Elektronen von einem Cytochrom *c*<sub>552</sub> in einer sehr schnellen bimolekularen Reaktion bei hoher Selektivität für das Partnerprotein.

Hauptziel dieser Arbeit war es, lösliche Module der elektronenakzeptierenden Cu<sub>A</sub>-Domäne der Cytochrom *c* Oxidasen zu generieren, das Kupferzentrum zu rekonstituieren und die Proteine für Wechselwirkungsstudien mit den Cytochrom *c*-Partnern zugänglich zu machen. Die Charakterisierung der Elektronentransferreaktionen erfolgte durch *stopped-flow* Spektroskopie und ermöglichte die Bestimmung der bimolekularen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten unter verschiedenen Ionenstärkebedingungen. Ein Vergleich zwischen dem mesophilen Reaktionspaar aus *P. denitrificans* mit dem thermophilen aus *T. thermophilus* zeigte die unterschiedlichen Interaktionsmechanismen auf. Während die Reaktion in *T. thermophilus* weitgehend auf Ladungsinteraktionen verzichtet, wurde für die Reaktanden aus *P. denitrificans* eine Beteiligung von 2 - 3 Ladungen mit entgegengesetztem Vorzeichen auf jedem Protein festgestellt.

Die Interaktionen wurden weiterhin durch *chemical-shift-perturbation* Experimente mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Durch Isotopenanreicherung des Cytochroms *c*<sub>552</sub> aus *P. denitrificans* konnten für dieses Protein Aminosäurereste identifiziert werden, die an einer direkten Bindung mit dem Cu<sub>A</sub>-Partnerprotein beteiligt sind. In einem ähnlichen Ansatz wurde auch die Interaktionsfläche der löslichen Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *T. thermophilus* charakterisiert.

Für das Cytochrom *c*<sub>552</sub> aus *P. denitrificans* konnte gezeigt werden, daß bei direkten Kontakten zwischen den Proteinen fast keine Ladungen beteiligt sind und primär ungeladene Reste die Wechselwirkung dominieren. Ein ähnliches Bild wurde auch für die Interaktion der löslichen Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *T. thermophilus* mit ihrem Substrat ermittelt. Für die lösliche Cu<sub>A</sub>-Domäne aus *P. denitrificans* konnte aufgrund der geringen Stabilität keine Zuordnung durchgeführt werden, so daß eine Charakterisierung der Interaktionsfläche nicht möglich war.

Weiterhin wurde ein für *T. thermophilus* bisher nicht beschriebener Komplex III aufgrund von Sequenzdaten identifiziert. Eine lösliche Domäne des membranständigen

Cytochrom  $c_1$  wurde in *E. coli* heterolog exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. Die Elektronentransferkinetiken zum Cytochrom  $c_{552}$  wurden durch *stopped-flow* Spektroskopie aufgenommen, und das Cytochrom  $c_1$  wurde als effizienter Elektronendonator für das Protein identifiziert.

Für spätere Mutageneseansätze wurde ein Plasmid-basiertes Expressionssystem für das extrem thermophile Eubakterium *T. thermophilus* etabliert, um Schwierigkeiten, die bei der Expression von Cofaktor-tragenden Membranproteinen auftreten können, zu umgehen. Durch Expression eines löslichen c-Typ Cytochroms und der  $ba_3$ -Cytochrom c Oxidase in *T. thermophilus* konnte gezeigt werden, daß dieses homologe Expressionssystem funktional ist und damit rekombinante Proteine exprimiert werden können. Durch die Konstruktion von Histidin-Tags konnte die Aufreinigung der Proteine erleichtert werden und eine notwendige Abgrenzung von chromosomal kodierten Wildtyp-Formen erfolgen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Williams, R.A.D. (1989) in: Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology, Seiten 82-97, Elsevier London
- [2] Chung, A.P., Rainey, F.A., Valente, M., Nobre, M.F. & Costa da, M.S. (2000) *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 209-217
- [3] Brock, T.D. & Freeze, H. (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**, 289-297
- [4] Oshima, T. & Imahori, K. (1971) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **17**, 513-517
- [5] Oshima, T. & Imahori, K. (1974) Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb-nov, a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 102-112
- [6] Armstrong, G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colourful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 629-659
- [7] Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. & Gorodetskii, S.I. (1980) Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophylic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. *Biokhimiia* **45**, 644-651
- [8] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273
- [9] Tolner, B., Poolman, B. & Konings, W.N. (1998) Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* **118A**, 423-428
- [10] Hara, M., Yuan, H., Yang, Q., Hoshino, T., Yokoyama, A. & Miyake, J. (1999) Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 147-154
- [11] Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740
- [12] Daniel, R.M. & Cowan, D.A. (2000) Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell Mol. Life Sci.*, **57**, 250-264
- [13] Daniel, R.M., Cowan, D.A., Morgan, H.W. & Curran, M.P. (1982) A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis. *Biochem. J.* **207**, 641-644



- [14] Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. & Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339
- [15] Clemons, W.M., Jr., Brodersen, D.E., McCutcheon, J.P., May, J.L., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. & Ramakrishnan, V. (2001) Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: purification, crystallization and structure determination. *J. Mol. Biol.* **310**, 827-843
- [16] Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R. & Than, M.E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant *ba*<sub>3</sub>-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **19**, 1766-1776
- [17] Wayne, J. & Xu, S.Y. (1997) Identification of a thermophilic plasmid origin and its cloning within a new *Thermus-E. coli* shuttle vector. *Gene* **195**, 321-328
- [18] Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S., & Kagamiyama, H. (1999) Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: a convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 951-956
- [19] Yano, T., Chu, S.S., Sled', V.D., Ohnishi, T. & Yagi, T. (1997) The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. Complete DNA sequence of the gene cluster and thermostable properties of the expressed NQO2 subunit. *J Biol Chem.* **272**, 4201-4211
- [20] Gatti, D.L., Tarr, G., Fee, J.A. & Ackerman, S.H. (1998) Cloning and sequence analysis of the structural gene for the *bc*<sub>1</sub>-type Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 223-233
- [21] Collins, M.D. & Jones, D. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* **45**, 316-354
- [22] Yano, T., Chu, S.S., Sled', V.D., Ohnishi, T. & Yagi, T. (1997) The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. Complete DNA sequence of the gene cluster and thermostable properties of the expressed NQO2 subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 4201-4211
- [23] Schütz, M., Brugna, M., Lebrun, E., Baymann, F., Huber, R., Stetter, K., Hauska, G., Toci, R., Lemesle-Meunier, D., Tron, P., Schmidt, C. & Nitschke, W. (2000) Early Evolution of Cytochrome *bc* Complexes. *J. Mol. Biol.* **300**, 663-675
- [24] Knoll, A. H. (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* **26**, 622-627

- [25] Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M.E., Huber, R. & Buse, G. (1997) Cytochrome- $c_{552}$  from *Thermus thermophilus*: a functional and crystallographic investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 572-576
- [26] Keightley, J.A., Zimmermann, B.H., Mather, M.W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D.M. & Fee, J.A. (1995) Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome  $ba_3$  from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.* **270**, 20345-20358
- [27] Surerus, K.K., Oertling, W.A., Fan, C., Gurbiel, R.J., Einarsdottir, O., Antholine, W.E., Dyer, R.B., Hoffman, B.M., Woodruff, W.H. & Fee, J.A. (1992) Reaction of cyanide with cytochrome  $ba_3$  from *Thermus thermophilus*: spectroscopic characterization of the  $Fe(II)a_3-CN.Cu(II)_B-CN$  complex suggests four  $^{14}N$  atoms are coordinated to  $Cu_B$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 3195-3199
- [28] Kim, Y., Babcock, G.T., Surerus, K.K., Fee, J.A., Dyer, R.B., Woodruff, W.H. & Oertling, W.A. (1998) Cyanide binding and active site structure in heme-copper oxidases: normal coordinate analysis of iron-cyanide vibrations of  $a_3(2+)CN-$  complexes of cytochromes  $ba_3$  and  $aa_3$ . *Biospectroscopy*. **4**, 1-15
- [29] Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T., and Buse, G. (1999) Kinetic properties of  $ba_3$  oxidase from *Thermus thermophilus*: effect of temperature. *Biochemistry* **38**, 1057-1065
- [30] Keightley, J.A., Zimmermann, B.H., Mather, M.W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D.M. & Fee, J.A. (1995) Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome  $ba_3$  from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.* **270**, 20345-20358
- [31] Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E. & Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the  $ba_3$ -type cytochrome  $c$  oxidase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **434**, 17-22
- [32] Hill, B.C. (1991) The reaction of the electrostatic cytochrome  $c$ -cytochrome oxidase complex with oxygen, *J. Biol. Chem.* **266**, 2219-2226
- [33] Malatesta, F., Nicoletti, F., Zickermann, V., Ludwig, B. & Brunori, M. (1998) Electron entry in a  $Cu_A$  mutant of cytochrome  $c$  oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Conclusive evidence on the initial electron entry metal center. *FEBS Lett.* **434**, 322-324
- [34] Hill, B.C. (1994) Modeling the sequence of electron transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrom  $c$  oxidase with oxygen. *J. Biol. Chem.* **269**, 2419-2425

- [35] Lübben, M. & Morand, K. (1994) Novel prenylated hemes as cofactors of cytochrome oxidases. Archaea have modified hemes A, and O. *J. Biol. Chem.* **269**, 21473-21479
- [36] Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryotic Cells*, Yale University Press, New Haven
- [37] Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J. & Woese, C.R. (1985) Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 4443-4447
- [38] Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271
- [39] Yagi, T. (1986). Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 302-311
- [40] Ludwig, B. & Schatz, G. (1980). A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa<sub>3</sub>*) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 196-200
- [41] Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148
- [42] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-1144
- [43] Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669
- [44] de Gier, J.W., Lübben, M., Reijnders, W.N., Tipker, C.A., Slotboom, D.J., van Spanning, R.J., Stouthamer, A.H. & van der Oost, O.J. (1994). The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* **13**, 183-196.
- [45] Richter, O.-M.H., Tao, J.S., Turba, A. & Ludwig, B. (1994). A cytochrome *ba<sub>3</sub>* functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J. Biol. Chem.* **269**, 23079-23086
- [46] Harms, N. & van Spanning, R.J.M. (1991) C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*: genetics of *Paracoccus denitrificans*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 187-210
- [47] Baker, S.C., Ferguson, S.J., Ludwig, B., Page, M.D., Richter, O.-M.H. & van Spanning, R.J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1046-1078

- [48] Lappalainen, P., Watmough, N.J., Greenwood, C. & Saraste, M. (1995) Electron transfer between cytochrome *c* and the isolated Cu<sub>A</sub> domain: identification of substrate-binding residues in cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* **34**, 5824-5830
- [49] Turba, A., Jetzek, M. & Ludwig, B. (1995) Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*<sub>552</sub> and sequence analysis of the gene. *Eur. J. Biochem.* **231**, 259-265
- [50] Berry, E.A. & Trumpower, B.L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bc*<sub>1</sub> and cytochrome *caa*<sub>3</sub> complexes. *J. Biol. Chem.* **260**, 2458-2467
- [51] Turba, A. (1993) Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des membrangebundenen Cytochrom *c*<sub>552</sub> aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- [52] Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M.E., Huber, R. & Buse, G. (1997) Cytochrome-*c*<sub>552</sub> from *Thermus thermophilus*: a functional and crystallographic investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 572-576
- [53] Than, M.E., Hof, P., Huber, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Buse, G. & Soulimane, T. (1997) *Thermus thermophilus* cytochrome-*c*<sub>552</sub>: A new highly thermostable cytochrome-*c* structure obtained by MAD phasing. *J. Mol. Biol.* **271**, 629-644
- [54] Wittung-Stafshede, P. (1998) A stable, molten-globule-like cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**, 324-332
- [55] Schultz, B.E. & Chan, S.I. (2001) Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 23-65
- [56] Szundi, I., Cappuccio, J.A., Borovok, N., Kotlyar, A.B. & Einarsdottir, O. (2001) Photoinduced electron transfer in the cytochrome *c*/cytochrome *c* oxidase complex using thiouredopyrenetrisulfonate-labeled cytochrome *c*. Optical multichannel detection. *Biochemistry* **40**, 2186-2193
- [57] Lappalainen, P., Aasa, R., Malmström, B.G. & Saraste, M. (1993) Soluble Cu<sub>A</sub>-binding domain from the *Paracoccus* cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 26416-26421
- [58] von Wachenfeldt, C., de Vries, S. & van der Oost, J. (1994) The Cu<sub>A</sub> site of the *caa*<sub>3</sub>-type oxidase of *Bacillus subtilis* is a mixed-valence binuclear copper centre. *FEBS Lett.* **340**, 109-113
- [59] Slutter, C.E., Sanders, D., Wittung, P., Malmström, B.G., Aasa, R., Richards, J.H., Gray, H.B. & Fee, J.A. (1996) Water-soluble, recombinant Cu<sub>A</sub>-domain of the cytochrome *ba*<sub>3</sub> subunit II from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* **35**, 3387-3395

- [60] Randall, D.W., Gamelin, D.R., LaCroix, L.B. & Solomon E.I. (2000) Electronic structure contributions to electron transfer in blue Cu and Cu<sub>A</sub>. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 16-19
- [61] Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. & Ludwig, B. (1998) Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-*c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Involvement of a hydrophobic patch in the docking reaction. *J. Biol. Chem.* **273**, 5132-5136
- [62] Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. & Ludwig, B. (1998) Cytochrome *c* binding site on cytochrome *c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **251**, 367-373
- [63] Drosou, V., Malatesta, F. & Ludwig, B. (2002) Mutations in the docking site for cytochrome *c* on the *Paracoccus* heme *aa*<sub>3</sub> oxidase. Electron entry and kinetic phases of the reaction. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2980-2988
- [64] Bendall, D. S. (1996) Protein Electron Transfer, BIOS Scientific Publishers, Oxford
- [65] Pelletier, H. & Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. *Science* **258**, 1748-1755
- [66] Axelrod, H.L., Abresh, E.C., Okamura, M.Y. Yeh, A.P. Rees, D.C. & Feher, G. (2002) X-ray structure determination of the cytochrome *c*<sub>2</sub>: reaction center electron transfer complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Mol. Biol.* **319**, 501-515
- [67] Lange, C. & C. Hunte (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex with its bound substrate cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2800-2804
- [68] Worrall, J.A., Kolczak, U., Canters, G.W. & Ubbink, M. (2001) Interaction of yeast iso-1-cytochrome *c* with cytochrome *c* peroxidase investigated by [<sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H] heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 7069-7076
- [69] Crowley, P.B., Otting, G., Schlarb-Ridley, B.G., Canters, G.W. & Ubbink M. (2001) Hydrophobic interactions in a cyanobacterial plastocyanin-cytochrome *f* complex. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10444-10453
- [70] Zuiderweg, E.R. (2002) Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **41**, 1-7
- [71] Reincke, B., Perez, C., Pristovšek, P., Lücke, C., Ludwig, C., Löhr, F., Rogov, V.V., Ludwig, B. & Rüterjans, H. Solution structure and dynamics of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*<sub>552</sub> in both redox states. *Biochemistry* **40**, 12312-12320

- [72] Kramer, B., Kramer, W. & Fritz, H. J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**, 879-887
- [73] Zell, R. & Fritz, H. J. (1987). DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* **6**, 1809-1815
- [74] Bethesda Res. Lab., (1986). *Bethesda Res. Lab. Focus* **8**, 2
- [75] Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- [76] Kapust, R.B. & Waugh, D.S. (2000) Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. *Protein Expr. Purif.* **19**, 312-318
- [77] Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19
- [78] Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23
- [79] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- [80] Berry, E.A & Trumpower, B.L. (1987) Simultaneous determination of hemes *a*, *b* and *c* from pyridine hemochrome spectra. *Anal. Biochem.* **161**, 1-15
- [81] Al Ayash, A.I. & Wilson, M.T. (1979) The mechanism of reduction of single-site redox proteins by ascorbic acid. *Biochem. J.* **177**, 641-648
- [82] Myer, Y.P., Thallam, K.K. & Pande, A. (1980) Kinetics of the reduction of horse heart ferricytochrome *c*. Ascorbate reduction in the presence and absence of urea. *J. Biol. Chem.* **255**, 9666-9673
- [83] Brønsted, J.N. & La Mer, V.K. (1924) The activity coefficients of ions in very dilute solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 555-573
- [84] Drosou, B., Reincke, B, Schneider, M. & Ludwig, B. (2002) Specificity of the interaction between the *Paracoccus denitrificans* Oxidase and its substrate cytochrome *c*: Comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome *c*<sub>552</sub>, and its truncated and site-directed mutants. *Biochemistry* **41**, 10629-10634
- [85] Wienk, H., Maneg, O., Lücke, C., Pristovšek, P., Löhr, F., Ludwig, B. & Rüterjans, H. (2003) Interaction of cytochrome *c* with cytochrome *c* Oxidase: An NMR Study on

two soluble fragments derived from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **42**, 6005-6012

[86] Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. & Thöny-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the *cbb<sub>3</sub>* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 744-747

[87] Mukrasch, M. (2003) Untersuchung der löslichen Cu<sub>A</sub>-Domäne aus der Untereinheit II der *ba<sub>3</sub>* Cytochrom c Oxidase von *Thermus thermophilus* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

[88] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402

[89] Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* **10**, 673-676

[90] von Heijne G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol.* **225**, 487-94

[91] Rost, B., Fariselli, P. & Casadio, R. (1996) Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* **5**, 1704-18

[92] Mooser, D. (2003) Identifizierung von Komponenten eines *bc<sub>1</sub>*-Komplexes aus *Thermus thermophilus*, Diplomarbeit Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

[93] Pettigrew, G. W., Leaver, J. L., Meyer, T. E. & Ryle, A. P. (1975) Purification, properties and amino acid sequence of atypical cytochrome c from two protozoa, *Euglena gracilis* and *Crithidia oncopelti*. *Biochem. J.* **147**, 291-302

[94] Tanaka, Y., Kubota, I., Amachi, T., Yoshizumi, H. & Matsubara, H. (1990) Site-directedly mutated human cytochrome c which retains heme c via only one thioether bond. *J. Biochem.* **108**, 7-8

[95] Wayne, J & Xu, S. (1997) Identification of a thermophilic plasmid origin and its cloning within a new *Thermus-E. coli* shuttle vector. *Gene* **195**, 321- 328.

[96] Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S. & Kagamiyama, H. (1999) Directed evolution of thermostable kanamycin-resistance gene: A convenient selection marker for *Thermus thermophilus*. *J. Biochem.* **126**, 951-956

- [97] Bresser, A. (1995) Proteinchemische Charakterisierung von Endoxidasen aus *Thermus thermophilus*. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen
- [98] Einarsdóttir, O., Killough, P.M., Fee, J.A. & Woodruff, W.H. (1989) An infrared study of the binding and photodissociation of carbon monoxide in cytochrome  $ba_3$  from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **264**, 2405-2408
- [99] Zimmermann, B.H., Nitsche, C.I., Fee, J.A., Rusnak, F. & Münck E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome  $ba_3$ : A second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5779-5783
- [100] Reincke, B., Thöny-Meyer, L., Dannehl, C., Odenwald, A., Aidim, M., Witt, H., Rüterjans, H. & Ludwig, B. (1999) Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome  $c_{552}$  acting as electron donor to the *Paracoccus denitrificans* cytochrome  $c$  oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 114-120
- [101] Fee, J.A., Chen, Y., Todaro, T.R., Bren, K.L., Patel, K.M., Hill, M.G., Gomez-Moran, E., Loehr, T.M., Ai, J., Thöny-Meyer, L., Williams, P.A., Stura, E., Sridhar, V. & McRee, D.E. (2000) Integrity of *Thermus thermophilus* cytochrome  $c_{552}$  synthesized by *Escherichia coli* cells expressing the host-specific cytochrome  $c$  maturation genes, *ccm*ABCDEFGH: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein. *Protein Sci.* **9**, 2074-2084
- [102] Harrenga, A., Reincke, B., Rüterjans, H., Ludwig, B. & Michel, H. (2000) Structure of the soluble domain of cytochrome  $c_{552}$  from *Paracoccus denitrificans* in the oxidized and reduced states. *J. Mol. Biol.* **295**, 667-678
- [103] Hon-Nami, K. & Oshima, T. (1977) Purification and some properties of cytochrome  $c_{552}$  from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem. (Tokyo)* **82**, 769-776
- [104] Inmoos, C., Hill, M.G., Sanders, D., Fee, J.A., Slutter, C.E., Richards, J.H. & Gray, H.B. (1996) Electrochemistry of the  $Cu_A$  domain of *Thermus thermophilus* cytochrome  $ba_3$ . *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 529-531
- [105] Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1555**, 154-159
- [106] Margoliash, E. & Bosshard, H.R. (1983) Guided by electrostatics, a textbook protein comes of age. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 316-320.



- [107] Döpner, S., Hildebrandt, P., Rosell, F.I., Mauk, A.G., von Walter, M., Buse, G. & Soulimane, T. (1999) The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome *c* in the electron transfer to cytochrome *c* oxidase. *Eur. J. Biochem.* **261**, 379-391.
- [108] Nicholls, A., Sharp, K.A. & Honig, B. (1991) Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281-296
- [109] Drosou, V. (2001) Cytochrom *c* als Elektronendonator für die *aa*<sub>3</sub>-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*: Charakterisierung von Oberflächen-Mutanten, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main
- [110] Chen, L., Durley, R., Poliks, B.J., Hamada, K., Chen, Z., Mathews, F.S., Davidson, V.L., Satow, Y., Huizinga, E., Vellieux, F.M. & Hol, W.G.J. (1992) Crystal structure of an electron-transfer complex between methylamine dehydrogenase and amicyanin. *Biochemistry* **31**, 4959-4964
- [111] Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A. & Poulos, T.L. (1999) Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 1863-1868
- [112] Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Ariga, Y. & Hase, T. (2001) Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 117-121
- [113] Müller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K. & Heinemann, U. (2001) Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 2786-2789
- [114] Flöck, D. & Helms, V. (2002) Protein-Protein docking of electron transfer complexes: Cytochrome *c* oxidase and cytochrome *c*, *Proteins: Structure, Function and Genetics* **47**, 75-85
- [115] Liang, N., Mauk, A.G., Pielak, G.J., Johnson, J.A., Smith, M. & Hoffman, B. M. (1988) Regulation of interprotein electron transfer by residue 82 of yeast cytochrome *c*. *Science* **240**, 311-313
- [116] Reincke, B. (2000) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen löslicher Fragmente des Cytochrom *c*<sub>552</sub> aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

- [117] Moore, G.R. & Pettigrew G.W (1990) Cytochromes c: Evolutionary, structural and physiochemical aspects. Springer Verlag, Berlin
- [118] Pielak, G.J., Mauk, A.G. & Smith, M. (1985) Site-directed mutagenesis of cytochrome c shows that an invariant Phe is not essential for function. *Nature* **313**, 152-154
- [119] Calvert, J.F., Hill, J.L. & Dong, A. (1997) Redox-dependent conformational changes are common structural features of cytochrome c from various species. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 287-293
- [120] Johansson, M.K., Blomberg, M.A.R., Sundholm, D. & Wikström, M. (2002) Change in electron and spin density upon electron transfer to haem. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 183-187
- [121] Hart, S.E., Schlarb-Ridley, B.G., Delon, C., Bendall, D.S. & Howe, C.J. (2003) Role of charges on cytochrome *f* from the cyanobacterium *Phormidium laminosum* in its interaction with plastocyanin. *Biochemistry*. **42**, 4829-4836
- [122] Zhen, Y., Hoganson, C.W., Babcock, G.T. & Ferguson-Miller, S. (1999) Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase. Biochemical, spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit II of *Rhodobacter spheroides* cytochrome *aa*<sub>3</sub>. *J. Biol. Chem.* **274**, 38032-38041
- [123] Song, A.I., Li, L.Z., Yu, T., Chen, S.M. & Huang, Z.X. (2003) Role of tryptophan 121 in the soluble Cu<sub>A</sub> domain of cytochrome c oxidase: structure and electron transfer studies. *Protein engineering* **16**, 435-441
- [124] Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X. & Dutton, P.L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47-52
- [125] Malatesta, F. The study and analysis of bimolecular reactions under non pseudo-first order conditions. Manuskript in Vorbereitung
- [126] Hunsicker-Wang, L., Heine, A., Chen, Y, Luna, E.P, Todaro, T., Zhang, Y.M., Williams, P. McRee, D.E., Hirst, J., Stout, C.D. & Fee, J.A. (2003) High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison. *Biochemistry* **42**, 7303-7317
- [127] Yoshida, T., Lorence, R., Choc, M.G., Tarr, G.E., Findling, K.L. & Fee, J.A. (1984) Respiratory proteins from the extremely thermophilic aerobic bacterium *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **259**, 112-123

- [128] Opekarova, M. & Tanner, W. (2003) Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 11-22
- [129] Harrison, M.D., Jones, C.E., Solioz, M. & Dameron, C.T. (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci.* **25**, 29-32
- [130] Drew, D., Fröderberg, L, Baars, L & de Gier, J.-W.L. (2003) Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 3-10
- [131] Agarraberes, F.A. & Dice, J.F. (2001) Protein translation across membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1513**, 1-24
- [132] Lübben, M., Kolmerer, B. & Saraste, M. (1992) An archaeobacterial terminal oxidase combines core structures of two mitochondrial respiratory complexes. *EMBO J.* **11**, 805-812
- [133] Matter, S. & Engelhard, M. (1997) Cytochromr *ba*<sub>3</sub> from *Natronobacterium pharaonis*. An archaeal four-subunit cytochromr-c-type oxidase. *Eur. J. Biochem.* **250**, 332-341

## 7 Publikationsliste

Maneg, O., Ludwig, B. & Malatesta, F. (2003) Different interaction modes of two cytochrome c oxidase soluble Cu<sub>A</sub> fragments with their substrates. *J. Biol. Chem.* **278**, 46734-46740

Wienk, H.\* , Maneg, O.\*, Lücke, C., Pristovšek, P., Löhr, F., Ludwig, B. & Rüterjans, H. (2003) Interaction of cytochrome c with cytochrome c oxidase: an NMR study on two soluble fragments derived from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **42**(20), 6005-6012

\* gleichwertiger Anteil beider Autoren

Mukrasch, M.D., Lücke, C., Löhr, F., Maneg, O., Ludwig, B. & Rüterjans, H. (2003) Complete <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C assignment of the soluble domain of the ba<sub>3</sub> oxidase subunit II of *Thermus thermophilus* in the reduced state. *J. Biomol. NMR*, im Druck

Maneg, O., Malatesta, F., Ludwig, B. & Drosou, V. (2003) Different modes of interaction between oxidase and cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, im Druck

Wolpert, M., Maneg, O., Ludwig, B. & Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the Cu<sub>A</sub> center in the cytochrome c oxidase from *T. thermophilus* for the spectral range from 1800-500 cm<sup>-1</sup>. *Biospectroscopy*, eingereicht

## 8 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
Amp	Ampicillin-Resistenzgen
Asc	Ascorbat
bp	Basenpaare
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
DSC	Double sector cuvette - Doppelsektorküvette
DSS	3-(Trimethylsilyl)-1-Propansulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	desoxy-Ribonukleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HTK	Hochthermostabile Kanamycinresistenz
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
$K_{BM}$	bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
$k_{for}$	Geschwindigkeitskonstante der Reaktion in physiologischer Richtung
$k_{obs}$	beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
$k_{rev}$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante in nicht-physiologischer Richtung
Km	Kanamycin-Resistenzgen
LB	Luria-Bertani Medium
$k_{BM}$	apparente bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
$k_{obs}$	beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
NaAc	Natriumacetat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	Open reading frame

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
Pd-C <sub>552</sub>	lösliches Modul des Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub> aus <i>P. denitrificans</i>
Pd-Cu <sub>A</sub>	lösliches, funktionelles Modul der Oxidase Untereinheit II aus <i>P. denitrificans</i>
rpm	revolutions per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEG	Tris-EDTA-Glucose
TEV	Tobacco etch virus
Th-C <sub>552</sub>	Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub> aus <i>T. thermophilus</i>
Th-Cu <sub>A</sub>	Lösliches, funktionelles Modul der Oxidase Untereinheit II aus <i>T. thermophilus</i>
t <sub>max</sub>	maximale Wachstumstemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy
U	Unit

## 9 Danksagung

Diese Arbeit wurde von vielen Seiten unterstützt. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken:

Prof. Dr. B. Ludwig danke ich für die abwechslungsreiche Themenstellung, die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und die erstklassige Betreuung.

Prof. Dr. H. Rüterjans danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den NMR-spektroskopischen Fragestellungen.

Maurizio Brunori, Francesco Malatesta und Paolo Sarti für die Zeit in Rom und die Einführung in die *stopped-flow* Spektroskopie.

Oliver Richter als meinem Mentor und für seinen einzigartigen Humor.

Hans-Werner Müller für den Spaß im Labor und seine exzellente technische Unterstützung - ohne ihn wären viele Dinge im Labor einfach nicht geschehen...

Christian Lücke, Hans Wienk, Frank Löhr, Primož Pristovšek, Marko Mukrasch, Lucia Muresanu für die konstruktive Arbeit an den NMR-Interaktionsmessungen.

Tewfik Soulimane für den Zugang zu den Thermophilen.

Carsten Corvey für die MALDI-Messungen.

Petra Hellwig für die Aufnahme der Redox titration.

Dina, Enrico und Francesco für die warmherzige Aufnahme in Rom und den leckeren Fisch.

Vicky - der Abrissbirne- für die wahren Fachgespräche.

Bernd für die Einführung in das Skifahren.

Jule - ich seh` doch nix Janzon- für die gemeinsamen Experimente zur Maximierung der Entropie in unserem Labor.

## Danksagung

---

Anna - dem Information-Tower- für die langjährige Freundschaft.

Ole, Klaus, Alena, Thomas K. & Thomas S., Sibylle, Andrea, Christian, Maria, Bettina, Krishna, Britta, Ute, Annette, Ilias und Andreas für die lustige und sehr kollegiale Zeit bei den Mollies.

Daniela Mooser für die außerordentliche Zusammenarbeit in *Thermus*-Fragestellungen.

Dem Spirit of Rödelheim - Didi, Atombomben-Tommi, Rotation Rödelheim, der Fleischmütz', Agro-Peter, Loisel, Mineralwasser-Clemens, Pizzeria Rusticale, Stephan, Dave und dem Biegwaldstadion - Rödelheim ist die Macht!

Meiner Mutter und Carsten für den familiären Halt und die vielfältige Unterstützung.



## 10 Lebenslauf

### Zur Person

**Oliver Maneg**

Diplom-Biochemiker

geboren am 27.05.1974 in Frankfurt am Main

ledig

### Berufliche Tätigkeiten

- seit 09/03            Laborleiter (Post-Doc) bei Aventis Pharma Deutschland GmbH in der Abteilung Bioprozessentwicklung
- 10/99 - 09/03        Wissenschaftlicher Angestellter an der J.W. Goethe-Universität, Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik (Prof. Dr. Bernd Ludwig), Beginn der Dissertation mit dem Titel: „Elektronentransfer zwischen Redoxkomplexen aus *Thermus thermophilus* und *Paracoccus denitrificans*“

### Konferenzerfahrungen und Präsentationen

- 09/2002            O. Maneg, B. Ludwig, F. Malatesta. Electron transfer between *Paracoccus denitrificans* cytochrome  $c_{552}$  and cytochrome *c* oxidase  $Cu_A$  soluble domains. (Vortrag und Poster) European Bioenergetics Conference, Arcachon, Frankreich
- 06/2002            O. Maneg, B. Ludwig, F. Malatesta. Electron transfer between *Paracoccus denitrificans* cytochrome  $c_{552}$  and cytochrome *c* oxidase  $Cu_A$  soluble domains, (Poster) Proteine 2002 XVI. Meeting of the Protein Workgroup, L'Aquila, Italien
- 04/2002            O. Maneg, B. Ludwig, F. Malatesta. Electron transfer kinetics between cytochrome  $c_{552}$  and soluble  $Cu_A$  domains, (Vortrag) Universität „La Sapienza“ Rom, Italien
- 09/2000            O. Maneg, T. Soulimane, B. Ludwig. Expression and characterization of a Histidine-tagged cytochrome  $c_{552}$  from *Thermus thermophilus*, (Poster) European Bioenergetic Conference, Brighton, England

# Lebenslauf

---

## Fortbildung

- 03/2002 Fortbildungskurs für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit gemäß § 15 (4) GenTSV, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
- 03/2000 Fortbildungsveranstaltung „Einführung in den gewerblichen Rechtsschutz und Recherche in Patentdatenbanken“, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main

## Forschungsaufenthalte

- 04/03 Forschungsaufenthalte an der Universität „La Sapienza“ Rom,  
03/02 Italien. Elektronentransferkinetiken zwischen löslichen Fragmenten  
07/01 von Atmungsketten mittels stopped-flow Messungen

## Studium

- 10/93 - 03/95 Grundstudium der Biologie an der J.W. Goethe-Universität  
Vordiplom in Biochemie, Botanik, Zoologie, Chemie, Physik
- 04/95 – 06/98 Hauptstudium Biochemie an der J.W. Goethe-Universität
- 07/98 Diplomprüfungen
- 08/98 - 02/99 Diplomarbeit mit dem Thema „Verwendung eines synthetischen  $\sigma^{70}$ -Promotorelements für die Proteinexpression in *Paracoccus denitrificans*“, Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik (Prof. Dr. Bernd Ludwig),
- Studienabschluß Diplom-Biochemiker  
Abschlußnote: sehr gut

## Praktikum

- 04/99 – 06/99 Praktikum an der Flinders University, School of Biological Science (Prof. Dr. A. Murray), Adelaide, South Australia

## Schulbildung

- 1980 - 1984 Grundschule in Frankfurt a. M./Rödelheim
- 1984 - 1990 Helene-Lange-Gymnasium in Frankfurt a. M./Höchst
- 1990 - 1993 Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Frankfurt a. M./Höchst
- 06/1993 Allgemeine Hochschulreife mit der Note 1,9

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Oliver Maneg, geboren am 27.05.1974 in Frankfurt am Main, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Elektronentransfer zwischen Redoxkomplexen aus *Thermus thermophilus* und *Paracoccus denitrificans*- Interaktion löslicher Module und Membranproteinexpression“ selbständig angefertigt und keine anderen Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegeben benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 02.11.03