

**Spektroskopische Charakterisierung von  
P<sub>M</sub>-, F•- und F-Intermediaten der  
Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von

Kerstin Budiman  
aus Koblenz

Frankfurt, 2006  
(D 30)

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

Dekan:	Prof. Dr. Harald Schwalbe
Erster Gutachter:	Prof. Dr. B. Ludwig
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. H. Michel

Datum der Disputation:

**Publikationen**

**Budiman K., Kannt A., Lyubenova S., Richter, O. M., Ludwig, B., Michel, H., MacMillan, F.** Tyrosine 167: The Origin of the Radical Species Observed in the Reaction of Cytochrome *c* Oxidase with Hydrogen Peroxide in *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, **2004** Sep 21;43(37):11709-16.

**MacMillan, F., Budiman K., Angerer H., Michel H.** The role of tryptophan 272 in the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide in *Paracoccus denitrificans*. *FEBS. Lett.*, **2006** Feb 20; 580 (5). 1345-9.

**Budiman K., MacMillan, F., Michel H.** Radicals in the *Paracoccus denitrificans* Cytochrome *c* Oxidase. *Eur. Biophys. J.*, **2005**, 34, 546

**Budiman K., Macmillan, F., Lyubenova S., Bamann, C., Richter, O. M., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H.** Characterisation of tyrosine variants from cytochrome *c* Oxidase. *BBA*, **2004**, 1658 145.

**Bamann C., Budiman K., Bamberg E., Michel H., Fendler K.** Electrometric measurements on the N131D of cytochrome *c* oxidase from *paracoccus denitrificans*. *BBA*, **2004** 1658 144.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	V
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die mitochondriale Atmungskette .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Atmungskette von <i>Paracoccus denitrificans</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Die Röntgenkristallstruktur der <math>aa_3</math> Cytochrom <i>c</i> Oxidase von <i>Paracoccus denitrificans</i> .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Elektronen- und Protonentransfer.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Protonentranslokationswege der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Der katalytische Zyklus der Cytochrom <i>c</i> Oxidase - Modellvorstellungen .....</b>	<b>11</b>
<b>1.7. Intermediate im katalytischen Zyklus der Cytochrom <i>c</i> Oxidase .....</b>	<b>13</b>
<b>1.8. Untersuchung von biologischen Makromolekülen mit para-magnetischer Elektronenresonanzspektroskopie .....</b>	<b>16</b>
1.8.1. Die Charakterisierung des Tyrosinradikals der Cytochrom <i>c</i> Oxidase .....	17
<b>1.9. Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Kulturmedien .....	21
2.1.3. Molekularbiologische Materialien.....	24
2.1.4. Puffer für die Spektroskopie.....	28
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.2.1.1. Gerichtete Mutagenese von Aminosäuren in Untereinheit I der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	29
2.2.1.2. Herstellung von Einzelstrang DNA.....	29
2.2.1.3. Annealing-Reaktion .....	30
2.2.1.4. Synthese .....	30
2.2.1.5. Transformation des mutagenen Plasmids in BMH 71-18 mut S Zellen .....	31
2.2.1.6. Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Miniprep).....	31
2.2.1.7. Restriktionsverdau.....	32
2.2.1.8. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose Gelelektrophorese .....	32
2.2.1.9. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	32
2.2.1.10. Herstellung von kompetenten Zellen.....	33
2.2.1.11. „Sticky-end“ Ligation .....	33
2.2.1.12. Triple Mating .....	34
2.2.1.13. Lagerung .....	34
<b>2.2.2. Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.2.2.1. Gewinnung von Varianten der Cytochrom <i>c</i> Oxidase im präparativen Maßstab.....	35
<b>2.2.3. Spektroskopische Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.2.3.1. Spektroskopische Bestimmung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase Konzentration.....	38
2.2.3.2. Spektroskopische Bestimmung der Cytochrom <i>c</i> Konzentration.....	38
2.2.3.3. Aufnahme von Redoxspektren der Cytochrom <i>c</i> Oxidase .....	39
2.2.3.4. Cyanid-Differenzspektren .....	39
2.2.3.5. Aktivitätstest .....	40
2.2.3.6. Herstellung von $P_M^-$ , $F^{\bullet}$ - und F-Intermediaten.....	41

2.2.3.7 Protonenpumpexperimente.....	42
2.2.3.8 EPR-Spektroskopie .....	45
2.2.3.9 FTIR-Spektroskopie.....	45
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Erzeugung von Oxoferrylintermediaten der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....</b>	<b>46</b>
3.1.1. Erzeugung von Oxoferrylintermediaten in der Wildtyp Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	48
<b>3.2. Der Einfluss von Chloridionen auf das binukleare Zentrum der Cytochrom <i>c</i> Oxidase .....</b>	<b>50</b>
3.2.1 Umwandlung der „schnellen“ in die „langsame“ Form der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	51
3.2.2. Der Einfluss von Chloridionen auf die Ausbeute an P <sub>M</sub> -Intermediat.....	53
3.2.3. Der Einfluss von Chloridionen auf das Absorptionsspektrum der Variante Y167F.....	55
<b>3.3. Charakterisierung von Tyrosin Varianten in Untereinheit I der Cytochrom <i>c</i> Oxidase von <i>P. denitrificans</i> .....</b>	<b>56</b>
3.3.1. Die Lage der mutierten Tyrosine in Untereinheit I.....	56
3.3.2. Die katalytische Aktivität der Tyrosin Varianten .....	57
3.3.3. Reaktion der Tyrosin Varianten mit Wasserstoffperoxid bei pH 9 und nach einem pH-Sprung auf pH 6 .....	58
3.3.4. Untersuchung der Tyrosin Varianten mit Hilfe der paramagnetischen Elektronenresonanz- Spektroskopie (EPR) .....	68
3.3.5. Protonenpumpexperimente.....	71
3.3.6. Untersuchung der Variante Y167F mit FTIR-Spektroskopie.....	73
<b>3.4. Die Variante W272M.....</b>	<b>75</b>
3.4.1. Die Reaktion der Variante W267M mit Wasserstoffperoxid .....	76
3.4.2. EPR-spektroskopische Experimente mit der Variante W272M .....	78
3.4.3 Cyanidbindungsspektren der Tyrosinvarianten und der Variante W272M .....	79
<b>3.5. Erzeugung von Oxoferrylintermediaten in D- und K-Weg Varianten der Cytochrom <i>c</i> Oxidase .....</b>	<b>80</b>
<b>3.5.1 Die D-Weg Varianten D124N und Y35F .....</b>	<b>80</b>
3.5.1.1. Die Variante D124N.....	80
3.5.1.2. Die Variante Y35F.....	80
3.5.1.3. Abhängigkeit der Bildung der Intermediate F• und F bei den D-Weg Varianten D124N und Y35F von der Wasserstoffperoxidkonzentration.....	82
3.5.1.4. Die Variante N131D.....	84
3.5.1.5. Die Variante E278Q.....	84
<b>3.5.2. Die K-Weg Variante K354M.....</b>	<b>86</b>
<b>3.5.3 Die Region oberhalb der Häme: Variante R473N.....</b>	<b>88</b>
<b>3.6. Übersichtstabelle der Ergebnisse .....</b>	<b>90</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1. Die Bildung von Oxoferrylintermediaten bei Wildtyp und diversen Varianten der Cytochrom <i>c</i> Oxidase von <i>P. denitrificans</i> .....</b>	<b>91</b>
<b>4.2. Das Aminosäureradikal in den P<sub>M</sub>- und F•-Intermediaten der Cytochrom <i>c</i> Oxidase: Die Varianten Y167F, Y167W, Y280H und W272M .....</b>	<b>93</b>
<b>4.3 Die Tyrosinvarianten Y267F, Y328F und Y414F .....</b>	<b>97</b>
<b>4.4. Der D-Weg der Cytochrom <i>c</i> Oxidase .....</b>	<b>98</b>

<b>4.5. Der K-Weg der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....</b>	<b>101</b>
<b>4.6. Die Region oberhalb der Häme .....</b>	<b>102</b>
<b>4.7. Ausblick .....</b>	<b>104</b>
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>117</b>

## Zusammenfassung

Die Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* katalysiert die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und „pumpt“ zusätzlich vier Protonen von der cytoplasmatischen Seite auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran.

Die Spaltung des molekularen Sauerstoffes im binuklearen Zentrum erfolgt im katalytischen Zyklus des Enzyms bei der Umwandlung des Intermediates A, in welchem molekularer Sauerstoff an das Häm  $a_3$  Eisen gebunden ist, in das Intermediat  $P_M$  (Oxoferrylzustand  $Fe^{IV+}=O^{II-}$ ) durch spontane elektronische Umorganisation. Drei der dazu benötigten vier Elektronen werden von den Metallzentren geliefert. Das vierte Elektron wird sehr wahrscheinlich von einer Aminosäure in der Nähe des binuklearen Zentrums durch Bildung eines Aminosäureradikals beigesteuert. Dieses Radikal sollte in den Intermediaten  $P_M$  und  $F\bullet$  des katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase vorhanden sein.

Durch Reaktion von stöchiometrischen Mengen an Wasserstoffperoxid mit dem vollständig oxidierten Enzym lassen sich  $P_M$ ;  $F\bullet$  und F-Intermediate künstlich erzeugen und durch ihre Maxima in Absorptionsdifferenzspektren charakterisieren. Mit paramagnetischer Elektronenresonanzspektroskopie (EPR-Spektroskopie) können Struktur und Dynamik paramagnetischer Zentren in Proteinmolekülen untersucht werden. Mit dieser Methode konnte in mit Wasserstoffperoxid generierten  $P_M$  und  $F\bullet$ -Intermediaten ein Tyrosinradikal nachgewiesen werden.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Identifikation dieses Tyrosins mittels einer Mutagenesestudie. Dazu wurden Tyrosinvarianten (Y35F, Y167F, Y267F, Y280H, Y328F und Y414F) aus Untereinheit I, die einen maximalen Abstand von 25 Å vom binuklearen Zentrum aufweisen, mit Hilfe von Absorptions- und EPR-Spektroskopie charakterisiert.

Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass Tyrosin 167 eindeutig der Ursprungsort des Tyrosinradikals ist, das bei der Generierung von  $P_M$ - und  $F\bullet$ -Intermediaten der Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid entsteht. Da die Variante Y167F jedoch eine hohe katalytische Aktivität aufwies und in der Lage war, die Oxoferrylintermediate  $P_M$ ;  $F\bullet$  und F zu bilden, konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass dieses Tyrosin nicht der primäre Donor des vierten Elektrons sein kann, das im katalytischen Zyklus des Enzyms für die Spaltung der Sauerstoffbindung benötigt wird.

Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass Tyrosin 167 eine thermodynamische Senke darstellt, in die das von einem unbekanntem kurzlebigen Elektronendonator bei der Wasserstoffperoxidreaktion gebildete Radikal verschoben wird.

Als Donor des vierten Elektrons für die Sauerstoffspaltung kommt auch Tryptophan 272 infrage. Daher wurde auch die Variante W272M spektroskopisch charakterisiert.

Diese Variante war katalytisch inaktiv und nicht in der Lage in Reaktion mit Wasserstoffperoxid die Intermediate  $P_M$ ,  $F^\bullet$  und  $F$  zu bilden. Es ließen sich weder das Tyrosin-167-Radikal noch ein anderes Radikal nachweisen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Tryptophan 272 möglicherweise der ursprüngliche Donor des vierten Elektrons für die Sauerstoffspaltung im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase sein könnte.

Während des  $P_M \rightarrow F$ -Übergangs im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase werden zwei Protonen gepumpt. Diese können vom Enzym entweder über den D-Weg oder den K-Weg aufgenommen werden. Eine Untersuchung des  $P_M \rightarrow F$ -Übergangs von D-Weg- und K-Weg-Varianten der Cytochrom *c* Oxidase kann Aufschluss über die Beteiligung der beiden Protonenaufnahmewege des Enzyms an diesem Schritt des katalytischen Zyklus geben.

Daher wurde die Reaktion der D-Weg Varianten D124N, N131D, Y35F und E278Q und der K-Weg Variante K354M mit Wasserstoffperoxid absorptionspektroskopisch untersucht. Durch diese Experimente konnte die zentrale Bedeutung des D-Weges für die Protonentranslokation im  $P_M \rightarrow F$ -Übergang bestätigt, aber auch ein gewisser Einfluss des K-Weges nicht ausgeschlossen werden. Außerdem wurde der  $P_M \rightarrow F$ -Übergang der Variante R437N, die eventuell Teil des noch nicht konkret identifizierten Protonenaustrittsweg der Cytochrom *c* Oxidase ist, untersucht.



# 1. Einleitung

## 1.1. Die mitochondriale Atmungskette

ATP dient Organismen als ein universeller Energieträger. Die bei seiner Spaltung freigesetzte Energie kann zur Deckung des Energiebedarfs aller primären zellulären Prozesse herangezogen werden. Die im menschlichen Körper vorhandene Menge an ATP beträgt 50 mg, unterliegt aber einem gewaltigen Umsatz, der im Ruhezustand bei etwa 65 kg pro Tag liegt (Rich, 2003).

Die Gewinnung von ATP erfolgt bei eukaryotischen Organismen überwiegend durch den Prozess der oxidativen Phosphorylierung, der in der inneren Mitochondrienmembran stattfindet. Nur etwa 10 % des ATPs werden durch Substratkettenphosphorylierung erzeugt.

In der inneren Mitochondrienmembran sind eine Reihe von Proteinkomplexen angeordnet, die als so genannte Atmungskette in einem mehrstufigen Prozess Elektronen, die von den energiereichen Molekülen NADH und FADH<sub>2</sub> bereitgestellt werden, auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dies ist ein exergonischer Vorgang, bei dem Energie frei wird, die einer Redoxenthalpie von -220 kJ/mol entspricht. Diese Energie wird als elektrochemische Potentialdifferenz (protonenmotorische Kraft) über der inneren Mitochondrienmembran gespeichert. Beim Rückfluss von Protonen durch die sich ebenfalls in dieser Membran befindende ATP-Synthase kann das elektrochemische Potential zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt werden (Mitchell, 1961; Trumpower und Gennis, 1994).

In Abbildung 1 sind die Proteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette und die ATP-Synthase dargestellt.

Komplex I, die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, katalysiert die Übertragung von zwei Elektronen von NADH auf Ubichinon (Coenzym Q).

Die Elektronen werden zunächst auf FMN, dann auf die Eisen-Schwefel-Zentren des Komplexes und schließlich auf Ubichinon übertragen. Gleichzeitig werden zwei Protonen pro Elektron über die Membran transloziert, die zur Bildung des elektrochemischen Potentials beitragen (Brandt, 1997; Brandt *et al.*, 2003). Die Röntgenkristallstruktur der hydrophilen Domäne von Komplex I aus *Thermus thermophilus* wurde vor Kurzem veröffentlicht (Hinchliffe und Sazanov, 2005; Sazanov und Hinchliffe, 2006).

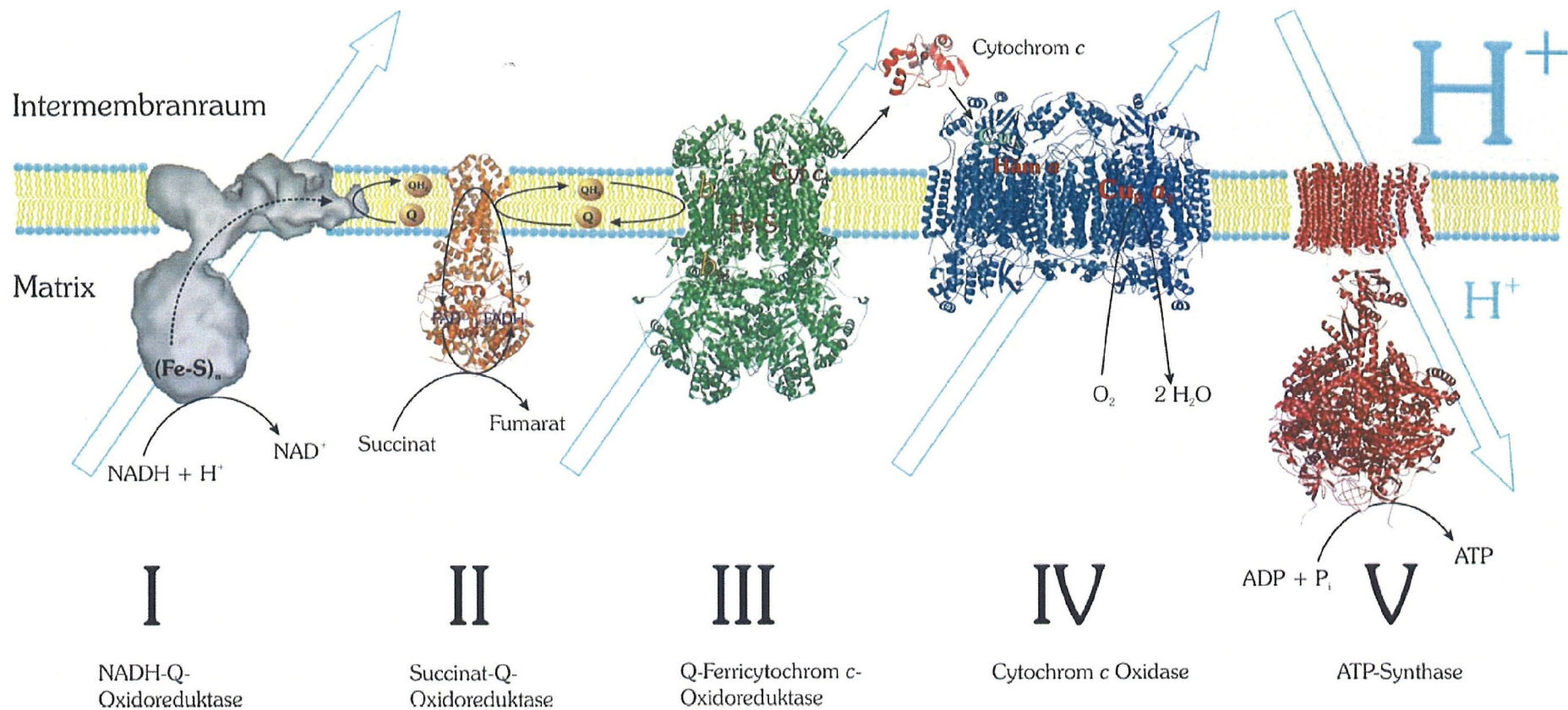
Im Zitratzyklus wird bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat FADH<sub>2</sub> gebildet. Die Elektronen des FADH<sub>2</sub> werden von Komplex II der Atmungskette (Succinat:Ubichinon-

Oxidoreduktase) auf Eisen-Schwefel-Zentren und schließlich auf Ubichinon übertragen. Bei der Reaktion werden keine Protonen über die Membran gepumpt.

Komplex III wird auch als Ubichinon-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase oder *bc<sub>1</sub>*-Komplex bezeichnet. Seine Funktion ist die Übertragung der Elektronen vom reduzierten Ubichinon auf Cytochrom *c*, ein kleines wasserlösliches Protein, welches im Intermembranraum lokalisiert ist (Hatefi *et al.*, 1967; Hatefi, 1976; Trumpower und Gennis, 1994).

Der Elektronentransfer ist durch einen als Q-Zyklus bezeichneten Mechanismus an die Translokation von einem Proton pro übertragenem Elektron gekoppelt (Trumpower, 1976; 1990, Brandt und Trumpower, 1994; Schulz und Chan, 2001).

Das reduzierte Cytochrom *c* überträgt Elektronen auf Komplex IV, die Cytochrom *c* Oxidase. Dieser Proteinkomplex wirkt als redoxgetriebene Protonenpumpe. Er katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser und pumpt außerdem Protonen über die Membran. Zur Reduktion des Sauerstoffes werden nach einem bis jetzt ungeklärten Mechanismus vier Protonen von der Matrixseite der Membran her aufgenommen und zusätzlich vier weitere Protonen von der Matrixseite her in dem Intermembranraum gepumpt. Auf diese Weise trägt die Cytochrom *c* Oxidase sowohl durch den Verbrauch von Protonen für die Wasserbildung auf der Matrixseite als auch durch die Translokation von Protonen in den Intermembranraum zum Aufbau des elektrochemischen Potentials bei, dessen Energie von Komplex V, der ATP-Synthase, durch den von ihr bewerkstelligten kontrollierten Rückfluss von Protonen vom Intermembranraum in den Matrixraum zur Bildung von ATP aus ADP und Orthophosphat genutzt wird.



**Abbildung 1:** Darstellung der mitochondrialen Atmungskette mit Proteinkomplexen I-V. Die blauen Pfeile stellen den gerichteten Transport von Protonen über die innere Mitochondrienmembran dar. Die Energie, die in dem durch die Komplexe I-IV aufgebauten Protonengradienten gespeichert ist, wird von der ATP-Synthase (Komplex V) für die Synthese von ATP verwendet. Abbildung entnommen aus der Diplomarbeit von Katharina Dürr.

## 1.2. Die Atmungskette von *Paracoccus denitrificans*

*Paracoccus denitrificans* ist ein kokkoidförmiges, gramnegatives Bodenbakterium, das zur  $\alpha_3$ -Untergruppe (*Rhodobacter*- Untergruppe) der Purpurbakterien (Proteobakterien) gehört.

Die Proteinkomplexe der Atmungskette von *P. denitrificans* weisen starke Homologien zu denen der mitochondrialen Atmungskette auf. Allerdings bestehen sie nur aus den katalytischen und wenigen anderen Untereinheiten, was sie, auch wegen ihrer leichten Zugänglichkeit durch molekularbiologische Methoden, zu idealen Studienobjekten für das Verständnis der mechanistischen Vorgänge des Elektronen- und Protonentransfers in der Atmungskette macht (John und Whatley, 1975, 1977; van Spanning *et al.*, 1995).

Zusätzlich zu der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase homologen  $aa_3$ -Cytochrom *c* Oxidase (Ludwig und Schatz, 1980; Hatila *et al.*, 1988) besitzt *P. denitrificans* noch zwei weitere terminale Oxidasen, die  $ba_3$ -Cytochrom Oxidase (Richter *et al.*, 1994; Zickermann *et al.* 1997) und die  $cbb_3$ -Cytochrom *c* Oxidase (de Gier *et al.*, 1992). Auch sie gehören zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen, die durch ein binukleares Häm-Kupfer-Zentrum, an welchem die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser stattfindet, und durch ein *low-spin*-Häm, das die Elektronen zum binuklearen Zentrum hinleitet, gekennzeichnet sind (Saraste, 1990; Saraste *et al.* 1991, Ludwig, 1992; de Gier *et al.*, 1994).

Die  $cbb_3$ -Cytochrom *c* Oxidase unterscheidet sich deutlich von den beiden anderen terminalen Oxidasen von *P. denitrificans*. So fehlen ihr das dimere Kupfer A Zentrum sowie viele konservierte Aminosäurereste. Außerdem besitzt die  $cbb_3$  Cytochrom *c* Oxidase eine deutlich höhere Sauerstoffaffinität ( $K_M = 7$  nM) als die beiden anderen Oxidasen und wird verstärkt bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck exprimiert (Bosma *et al.*, 1987).

*Paracoccus denitrificans* ist nicht nur zur aeroben Atmung befähigt, bei der die Elektronen von NADH bzw. Succinat über Ubichinol, den  $bc_1$ -Komplex, Cytochrom  $c_{550}$  bzw. Cytochrom  $c_{552}$  zur  $aa_3$ -Cytochrom *c* Oxidase und damit auf molekularen Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptoren transferiert werden. Es ist außerdem in der Lage unter anaeroben Bedingungen alternativ diverse Stickstoffverbindungen als terminale Elektronenakzeptoren zu nutzen (Denitrifikation). Die NO-Reduktase, die den letzten Schritt der anaeroben Atmung katalysiert, zeigt eine entfernte Verwandtschaft zu den Häm-Kupfer-Oxidasen (Saraste und Castresana, 1994)

### **1.3. Die Röntgenkristallstruktur der $aa_3$ Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans***

Durch Röntgenstrukturanalyse konnten die dreidimensionalen Strukturen der Cytochrom *c* Oxidasen von *P. denitrificans* (Iwata *et al.*, 1995; Ostermeier *et al.*, 1997) und die des mitochondrialen Enzyms aus Rinderherz (Tsukihara *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998) aufgeklärt werden.

Während die mitochondriale Cytochrom *c* Oxidase als Dimer aus je 13 Untereinheiten vorliegt, besteht die Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* lediglich aus vier Untereinheiten. Die Untereinheiten I, II und III der bakteriellen Cytochrom *c* Oxidase weisen starke Homologien zu den drei mitochondrial kodierten Untereinheiten des Rinderherzenzyms auf.

Untereinheit I (siehe Abbildung 2) besteht aus zwölf Transmembranhelices, die in drei Halbkreisen angeordnet sind. Sie ist die am stärksten konservierte Untereinheit und bindet das aus einem *high spin* Häm  $a_3$  und einem  $Cu_B$  Atom bestehende binukleare Zentrum, an dem die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser stattfindet. Außerdem bindet Untereinheit I ein *low spin* Häm, dessen Funktion in der Weiterleitung der vom  $Cu_A$ -Zentrum der Untereinheit II kommenden Elektronen zum binuklearen Zentrum besteht.

Das *high spin* Häm  $a_3$  wird durch Histidin 411 und das Kupfer Atom durch die Histidine 276, 325 und 326 gebunden. Das Eisenion des Häm  $a_3$  und das  $Cu_B$ -Ion haben einen Abstand von 4,5 Å. Auf Grund der starken antiferromagnetischen Kopplung zwischen den beiden Metallzentren (Palmer *et al.*, 1976) und einer zwischen  $Cu_B$  und Häm  $a_3$  beobachteten Elektronendichte (Ostermeier *et al.*, 1997) geht man davon aus, dass sich zwischen ihnen ein Ligand, sehr wahrscheinlich ein Wassermolekül oder ein Hydroxidion, befindet (Fann *et al.*, 1995; Ostermeier *et al.*, 1997).

Außerdem wurde eine Verbrückung zwischen dem  $Cu_B$ -Liganden Histidin 276 und Tyrosin 280 festgestellt. Dies führte zu der Annahme, dass diese Konstellation durch die Bildung eines Radikals am Aminosäurerest Tyrosin 280 das „fehlende“ Elektron im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase liefern könnte.

Zusätzlich zu den redoxaktiven Metallzentren besitzt die Cytochrom *c* Oxidase eine nicht redoxaktive Mg/Mn-Bindestelle (Seelig *et al.*, 1981, Espe *et al.*, 1995, Hosler *et al.*, 1995) und wird von Aminosäureresten aus beiden Untereinheiten sowie mindestens einem Wassermolekül gebunden (Haltia T. 1992, Ostermeier *et al.*, 1997).

Ein weiteres nicht redoxaktives Metallion, wahrscheinlich ein Calciumion, konnte nahe des periplasmatischen Endes der Membranhelix I der Untereinheit I identifiziert werden (Ostermeier *et al.*, 1997).

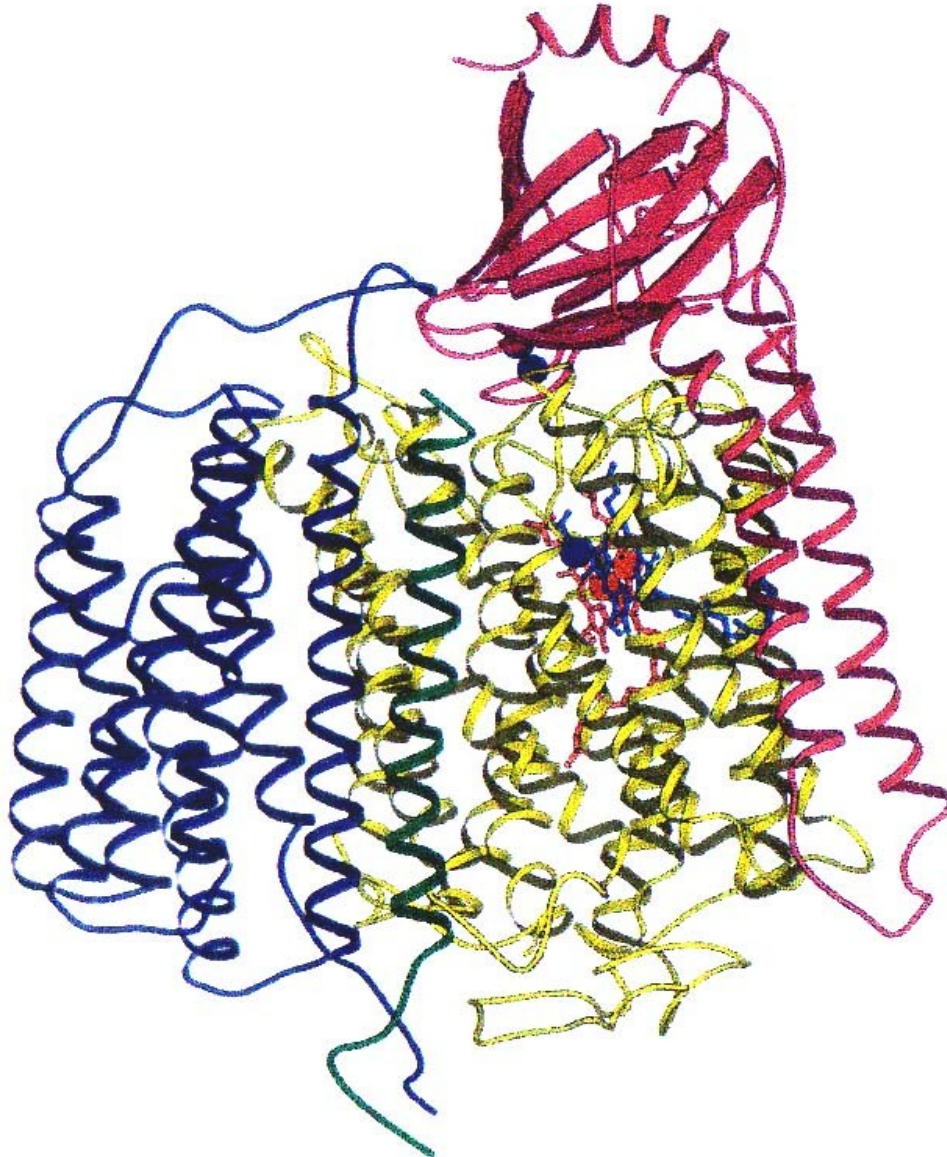
Die Funktion dieser Metallionen konnte noch nicht aufgeklärt werden. Untereinheit II besteht aus zwei Transmembranhelices und einer großen periplasmatischen globulären Domäne mit einer Anordnung von zehn  $\beta$ -Faltblattsträngen, die in ihrer Faltung an die Struktur von Klasse I-Kupferproteinen erinnern (Adman, 1991).

In der periplasmatischen Domäne von Untereinheit II befindet sich die Cytochrom *c* Bindestelle der Cytochrom *c* Oxidase. Von dort aus werden Elektronen zunächst auf das ebenfalls in Untereinheit II gelegene  $\text{Cu}_A$ -Zentrum und von dort aus via Häm *a* ins binukleare Zentrum übertragen (siehe Abschnitt 1.4.).

Die Untereinheiten I und II stellen die minimale Funktionseinheit der Cytochrom *c* Oxidase dar, die noch Protonenpumpaktivität besitzt (Solioz *et al.*, 1982, Hendler *et al.*, 1991).

Die Untereinheit III der Cytochrom *c* Oxidase besteht aus sieben Transmembranhelices. In Abwesenheit von Untereinheit III konnte sowohl bei der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* als auch bei der von *Rhodobacter sphaeroides* ein spontaner, durch Sauerstoffumsatz ausgelöster Aktivitätsverlust (Suizidinaktivierung) nachgewiesen werden (Haltia *et al.*, 1994). Dieser konnte beim *Rhodobacter sphaeroides* Enzym auf einen Verlust von  $\text{Cu}_B$  zurückgeführt werden (Bratton *et al.*, 1999). Die Funktion von Untereinheit III könnte demnach in einer Stabilisierung des binuklearen Zentrums während des katalytischen Zyklus liegen. Die verringerte Protonenpumpaktivität der Cytochrom *c* Oxidase in Abwesenheit von Untereinheit III könnte damit zusammenhängen, dass diese die pK-Werte einiger Aminosäuren im D-Weg (Gilderson *et al.*, 2003) und im putativen Protonenaustrittsweg (Mills *et al.*, 2003) beeinflusst.

Die Untereinheit IV der Cytochrom *c* Oxidase besteht aus lediglich einer Transmembranhelix. Sie grenzt an die Untereinheiten I und III an (Iwata *et al.*, 1995). Nach Deletion des Untereinheit IV kodierenden Gens konnte keine Änderung des Bakterienwachstums, der Expression und der enzymatischen Eigenschaften der Cytochrom *c* Oxidase nachgewiesen werden (Witt und Ludwig, 1997). Die Funktion dieser Untereinheit für das Enzym ist nach wie vor unklar.



**Abbildung 2:** Röntgenstruktur der  $aa_3$ -Cytochrom  $c$  Oxidase von *P. denitrificans* (Auflösung 2,8 Å) (Iwata *et al.*, 1995)

Dargestellt sind Untereinheit I (gelb) mit Häm  $a$  und dem binuklearen Zentrum bestehend aus Häm  $a_3$  und  $Cu_B$ , Untereinheit II (magenta) mit dem  $Cu_A$  Dimer, sowie die Untereinheiten III (blau) und IV (grün).

### 1.4. Elektronen- und Protonentransfer

An der Oberfläche von Untereinheit II befindet sich eine Anhäufung saurer Aminosäurereste, die zusammen mit einem periplasmatischen Teil der Oberfläche von Untereinheit I als Andockstelle für das positiv geladene Substrat Cytochrom *c* dienen (Witt *et al.*, 1998a). Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen (Rieder und Bosshard, 1980; Antalis und Palmer, 1982). Von Cytochrom *c* fließen die Elektronen zunächst zu dem konservierten Aminosäurerest Tryptophan 121 und gelangen dann zum binuklearen Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Untereinheit II. Die Elektronentransferrate zwischen Cytochrom *c* und Cu<sub>A</sub> beträgt 70.000 s<sup>-1</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cytochrom *c* Oxidase Reaktion ist. (Antalis und Palmer, 1982). Von dort aus werden die Elektronen über eine Distanz von 19,5 Å zum *low spin* Häm *a* der Untereinheit I weitergeleitet (Witt *et al.*, 1998b; Hill, 1993). Anhand der Röntgenkristallstruktur wurde ein Elektronentransferweg vorgeschlagen, der unter Einbeziehung des Cu<sub>A</sub>-Liganden Histidin-II-224 über 14 kovalente Bindungen, zwei Wasserstoffbrücken, den konservierten Aminosäurerest Arginin 473 und die Häm Propionate verläuft (Iwata *et al.*, 1995). Von dort können zwei Elektronen nacheinander zum binuklearen Zentrum transferiert werden. Das reduzierte binukleare Zentrum ist dann in der Lage molekularen Sauerstoff zu binden (Lindsay *et al.*, 1975; Malatesta *et al.*, 1990).



## 1.5. Protonentranslokationswege der Cytochrom *c* Oxidase

Durch Mutagenesestudien (Gennis, 1992; Brown *et al.*, 1993; Hosler *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1993 b; Fetter *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 1996) und anhand der Röntgenkristallstruktur (Iwata *et al.*, 1995 (*Paracoccus denitrificans*); Tsukihara *et al.*; 1996 (Rinderherz)) der Cytochrom *c* Oxidase konnten zwei Aufnahmewege für Protonen nachgewiesen werden.

Der K-Weg (siehe Abbildung 3) wurde nach der Aminosäure Lysin 354 (K354) benannt. Ein Austausch dieser Aminosäure durch ein Methionin führt zu einem starken Aktivitätsverlust der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* und *Rb. sphaeroides* und in der *bo* Ubichinol Oxidase von *E. coli* (Pfitzner *et al.*, 1998, Fetter *et al.*, 1995; Hosler *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 1993a). Außerdem sind die Aminosäuren S291, S257, T351 und Y280 an der Weiterleitung der Protonen zum binuklearen Zentrum beteiligt. Tyrosin 280 (Y280) ist kovalent mit dem Cu<sub>B</sub>-Liganden H276 verbunden (Ostermeier *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1998).

Der D-Weg (siehe Abbildung 3) wurde nach der Aminosäure Aspartat 124 (D124) benannt. Der Austausch dieser Aminosäure durch ein Asparagin führt zum Verlust der Protonenpumpaktivität bei nur leicht verminderter Elektronentransferaktivität (Thomas *et al.*, 1993a; Fetter *et al.*, 1995).

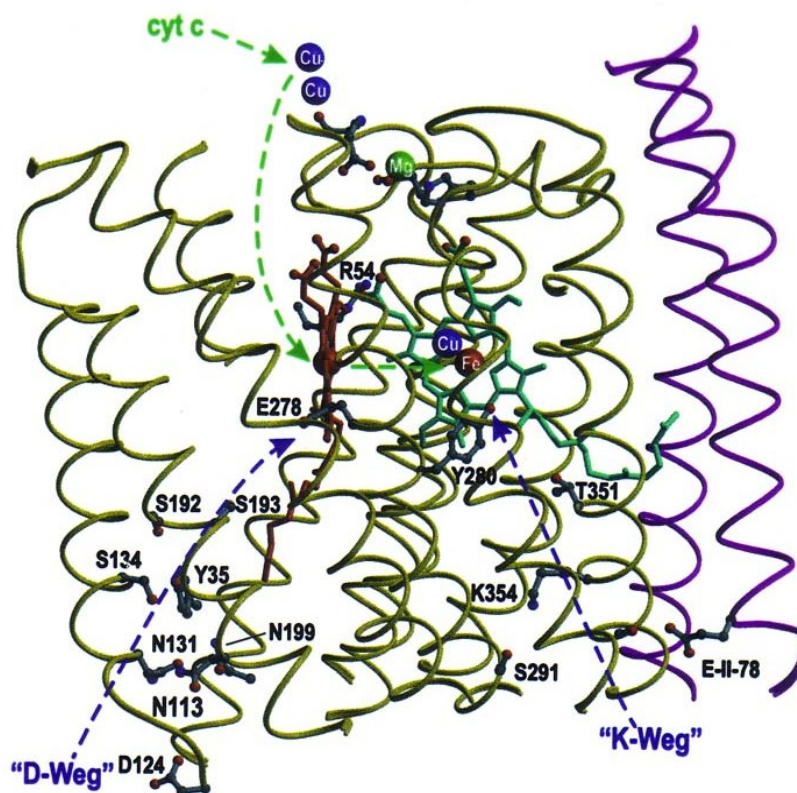
Von D124 führt der D-Weg über N199, N113, N131, Y35, S134 und S193 zu der stark konservierten Aminosäure Glutamat 278 (E278).

Ursprünglich nahm man an, dass durch den D-Kanal nur gepumpte Protonen und durch den K-Kanal nur die für die Reduktion des Sauerstoffes benötigten Protonen aufgenommen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der P→O Übergang im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase (Konstantinov *et al.*, 1997) bei der enzymatisch inaktiven Enzymvariante K345M kaum beeinträchtigt wird, wohingegen der O→R Übergang (siehe Abschnitt 1.6.) stark beeinträchtigt ist. Dies führte zu der Annahme, dass die beiden Protonenaufnahmewege des Enzyms nicht zur räumlichen Trennung der für verschiedene Zwecke verwendeten Protonen dienen, sondern für verschiedene Teilschritte des katalytischen Zyklus verwendet werden.

Diese Erkenntnis wirft die Frage auf, wie verhindert wird, dass über den D-Weg aufgenommene Protonen, die gepumpt werden sollen, ins binukleare Zentrum gelangen können, dieses aber andererseits zugänglich für die Protonen bleibt, die für die Reduktion des Sauerstoffes benötigt werden.

Zur Lösung dieses Problems wurde eine Modellvorstellung entwickelt, bei der die Aminosäure Glutamat 278 eine zentrale Rolle einnimmt. Danach kann die Seitenkette von Glutamat 278 verschiedene Positionen einnehmen und auf diese Weise Protonen einerseits zum binuklearen Zentrum und andererseits in Richtung des noch nicht identifizierten Protonenausgangsweges dirigieren (Iwata *et al.*, 1995, Pomès *et al.*, 1998; Hofacker und Schulten, 1998).

In der Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase wurde ein weiterer Protonenaufnahmeweg postuliert. Der H-Weg wurde nach Histidin 448 benannt. Redoxinduzierte Konformationsänderungen des Enzyms führen zu einer Beeinflussung des pK-Wertes der Aminosäure D51 im H-Weg und lassen auf eine Protonentranslokationsfunktion des H-Weges schließen (Yoshikawa *et al.*, 1998). Obwohl viele dem H-Weg zugeordnete Aminosäuren auch in den Cytochrom *c* Oxidasen von *P. denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997) und *Rb. sphaeroides* konserviert sind, konnte bei den bakteriellen Enzymen keine Beteiligung des H-Weges an der Protonentranslokation nachgewiesen werden (Pfitzner *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000).



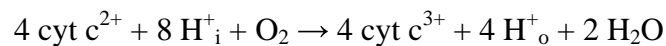
**Abbildung 3:** Ausschnitt aus Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase (Pfitzner Dissertation).

Die blauen Pfeile zeigen die Wege der Protonen, die grünen Pfeile den Weg der Elektronen zum binuklearen Zentrum.

## 1.6. Der katalytische Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase - Modellvorstellungen

Die Bildung der Intermediate des katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase ist von der Einspeisung von Elektronen ins binukleare Zentrum, von der Protonenaufnahme aus dem Medium, der Bildung von Wasser und vier Protonenpumpschritten abhängig. Im katalytischen Zyklus müssen Elektronen- und Protonentransfer funktionell miteinander gekoppelt sein. Über die Frage, wie genau die Cytochrom *c* Oxidase diese Kopplung bewerkstelligt, konnte bis heute keine Einigung erzielt werden.

1977 gelang Wikström der Nachweis, dass bei der Cytochrom *c* Oxidase zusätzlich zu den für die chemische Reaktion der Wasserbildung verbrauchten Protonen noch vier weitere Protonen gepumpt werden (Wikström, 1977; Wikström und Saari, 1977). Damit war der Beweis erbracht, dass die Cytochrom *c* Oxidase eine redoxgetriebene Protonenpumpe ist. Die katalytische Reaktion des Enzyms lässt sich durch folgende Reaktionsgleichung darstellen:



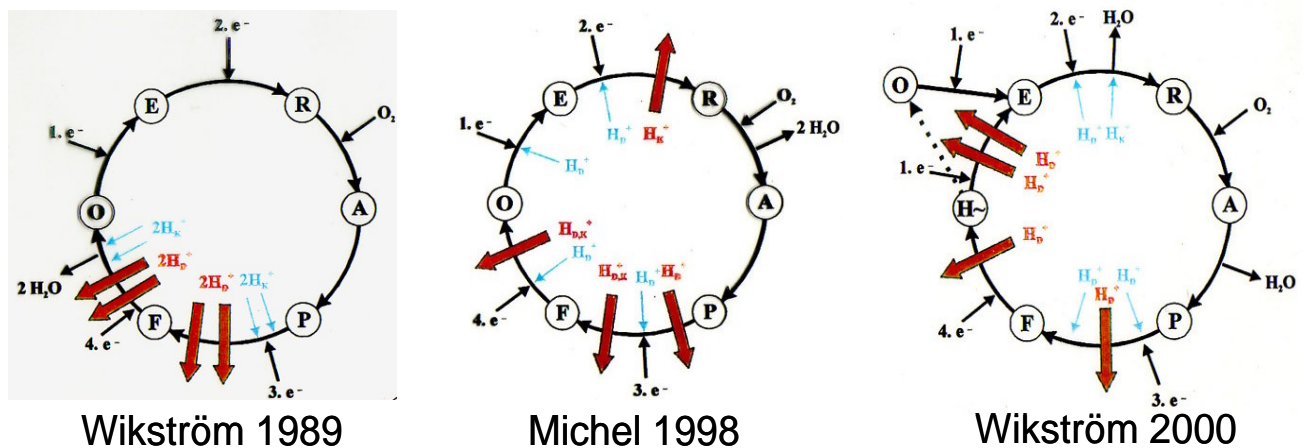
Dabei stehen  $\text{H}^+_i$  für Protonen, die vom Cytoplasma her aufgenommen werden, und  $\text{H}^+_o$  für Protonen, die auf der periplasmatischen Seite der Membran freigesetzt werden.

1989 veröffentlichte Wikström das erste Kopplungsmodell für den katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase (Wikström, 1989). Bei Gleichgewichtstitrations an Rattenlebermitochondrien in Anwesenheit eines elektrochemischen Gradienten stellte er fest, dass der oxidative Teil des katalytischen Zyklus (der P/F und der F/O Übergang) umkehrbar ist. Daraus folgerte er, dass sämtliche Protonen in diesem Teil des katalytischen Zyklus gepumpt werden müssen (siehe Abbildung 4 A).

1998 konnte Michel jedoch nachweisen, dass einige Annahmen Wikströms falsch waren. Er entwickelte ein neues Modell, bei dem jede Elektronenaufnahme mit der Aufnahme eines Protons gekoppelt ist (Michel, 1998). Eines der vier gepumpten Protonen wird nach dieser Modellvorstellung (siehe Abbildung 4 B) im reduktiven Teil (E→R Übergang) des katalytischen Zyklus transloziert (Ruitenbergh *et al.*, 2000).

Darauf hin antworteten Wikström und Verkhovsky mit einem neuen Modell (Verkhovsky *et al.*, 1999; Wikström, 2000). Nach diesem Modell werden die Hälfte der translozierten Protonen im reduktiven Teil des katalytischen Zyklus gepumpt, *wenn* zuvor der oxidative Teil des Zyklus durchlaufen wurde (siehe Abbildung 4 C). Nach Durchlaufen der oxidativen Phase

befindet sich das Enzym in einem aktivierten Zustand ( $H\sim$ ), der die für die Sauerstoffreduktion notwendige Energie speichert und in der darauf folgenden reduktiven Phase des Zyklus freisetzt. Dadurch wird die Translokation von zwei Protonen in dieser Phase ermöglicht. Nach diesem Modell wird sämtliche für das Protonenpumpen nötige Energie in der oxidativen Phase gewonnen. Daher steht dieses Modell nicht im Widerspruch zu dem ursprünglich von Wikström vorgestellten Modell.



**Abbildung 4:** Modellvorstellungen des katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase (entnommen aus der Dissertation von M. Ruitenberg). Blaue Pfeile bezeichnen die Aufnahme von Substratprotonen, rote Pfeile beschreiben Protonenpumpschritte. D= D-Weg, K= K-Weg,  $e^-$  = Elektron.

## 1.7. Intermediate im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase

Der katalytische Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase wird seit vielen Jahren intensiv untersucht. Dabei wurde eine Fülle von Daten über die Struktur der in diesem Zyklus vorkommenden Intermediate gewonnen (siehe Übersichtsartikel: Ferguson-Miller und Babcock, 1996; Kitagawa und Ogura, 1997; Michel *et al.*, 1998).

Der katalytische Zyklus (siehe Abbildung 5) beginnt mit der vollständig oxidierten Form des Enzyms (O-Zustand). Nach Aufnahme des ersten Elektrons bildet sich das erste Intermediat, der E-Zustand (E = electronated). Dabei equilibriert das aufgenommene Elektron zwischen  $\text{Cu}_A$ , Häm *a* und dem binuklearen Zentrum (Moody *et al.*, 1991). Nach Aufnahme eines weiteren Elektrons entsteht das zweielektronen-reduzierte Intermediat (R-Zustand). Dieses ist in der Lage molekularen Sauerstoff zu binden. Es wird vermutet, dass das Sauerstoffmolekül zunächst an  $\text{Cu}_B$  (Woodruff *et al.*, 1991) und schließlich an das reduzierte Häm  $a_3$  bindet (Chance *et al.*, 1975). Es entsteht das Intermediat A. Dieses wird durch spontane elektronische Umorganisation in das Intermediat  $\text{P}_M$  (P = peroxy) überführt.

Das  $\text{P}_M$ -Intermediat der Cytochrom *c* Oxidase ist experimentell auf verschiedene Weise zugänglich. Zum einen besteht die Möglichkeit es durch Reaktion des mixed-valence-Zustandes des Enzyms mit Sauerstoff zu gewinnen (Morgan *et al.*, 1996), zum anderen entsteht es durch die Reaktion der vollständig oxidierten Cytochrom *c* Oxidase mit stöchiometrischen Mengen an Wasserstoffperoxid (Bickar *et al.*, 1982; Fabian und Palmer, 1996). Das Absorptions-Differenzspektrum des  $\text{P}_M$ -Intermediat ist durch ein charakteristisches Maximum bei 607 nm (610 nm beim *Paracoccus* Enzym) charakterisiert. Ursprünglich nahm man an, dass es sich bei diesem Intermediat um einen Peroxyzustand handelt (Babcock und Wickström, 1992; Morgan *et al.*, 1996).

Da Raman-spektroskopische Untersuchungen des  $\text{P}_M$ -Intermediates jedoch Hinweise darauf gaben, dass die Sauerstoffbindung in diesem Intermediat bereits gespalten ist (Kitagawa und Ogura, 1997), wird heute davon ausgegangen, dass das  $\text{P}_M$ -Intermediat eine Oxoferrylstruktur ( $\text{Fe(IV)=O Cu(II)}$ ) mit einem am  $\text{Cu}_B$  gebundenen Hydroxidion aufweist. Diese Annahme wirft allerdings die Frage auf, woher die vier Elektronen stammen, die für die Spaltung der Sauerstoffbindung benötigt werden. Drei dieser Elektronen können normalerweise durch die Metallzentren zur Verfügung gestellt werden (zwei Elektronen durch die Oxidation von Fe (II) zu Fe (IV) und ein Elektron durch die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II)). Für die Herkunft des vierten Elektrons werden verschiedene Möglichkeiten

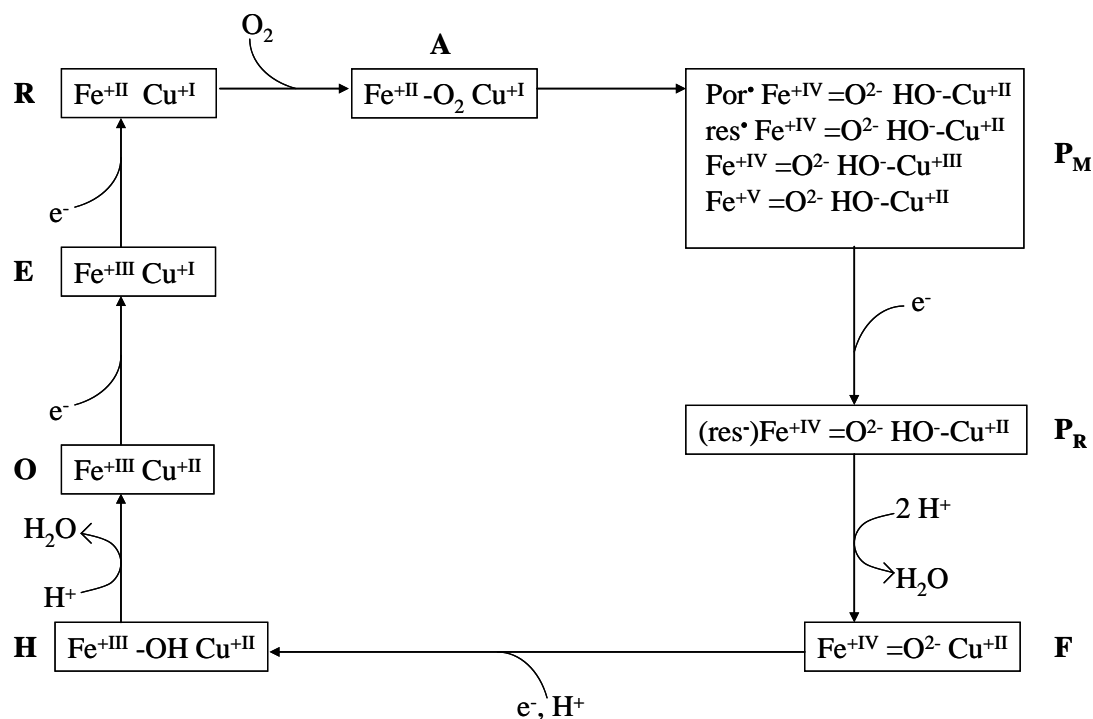
diskutiert, die als alternative Strukturen in Abbildung 5 dargestellt sind. Es wurde einerseits vorgeschlagen, dass die Metallzentren noch weiter oxidiert werden könnten und sich so Fe (V) (Ogura *et al.*, 1996) bzw. Cu (III) (Fabian und Palmer, 1995) Strukturen bilden könnten. Eine andere Möglichkeit ist, dass das „fehlende“ vierte Elektron durch Radikalbildung innerhalb des Enzyms bereitgestellt werden kann. In diesem Zusammenhang wurde die Möglichkeit der Bildung eines Porphyrinkationradikals (Watmough *et al.*, 1994) diskutiert. Das Vorkommen eines solchen Radikals wurde bei den Enzymen Katalase (Chuang und van Wart, 1992; Benecky *et al.*, 1993) und Ascorbat Peroxidase (Patterson *et al.*, 1995) nachgewiesen.

Die Existenz eines Porphyrinkationradikals im  $P_M$ -Intermediat der Cytochrom *c* Oxidase konnte jedoch weder durch optische Spektroskopie (Weng und Baker, 1991; Fabian und Palmer, 1995; Watmough *et al.*, 1994) noch durch Raman-Spektroskopie (Proshlyakov *et al.*, 1996) nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Bereitstellung des „fehlenden Elektrons“ durch die Oxidation einer Aminosäure im Protein, was wie bei der Prostaglandin H Synthase (Karthein *et al.*, 1988) und der Cytochrom *c* Peroxidase (Siravaja *et al.*, 1989) zur Entstehung eines Aminosäureradikals führen würde. Da in den Röntgenkristallstrukturen der Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase (Yoshikawa *et al.*, 1998) und der von *Paracoccus denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997) ein Tyrosin (Y280 in *P. denitrificans*) entdeckt wurde, das kovalent mit dem  $Cu_B$ -Liganden Histidin 276 verbrückt ist und nur 5,3 Å vom Häm  $a_3$ -Eisen entfernt liegt, wurde vorgeschlagen, dass dieses Tyrosin als Quelle für das „fehlende“ vierte Elektron dienen könnte, das für die Spaltung der Sauerstoffbindung benötigt wird (Ostermeier *et al.*, 1997; Hoganson *et al.*, 1998; Gennis *et al.*, 1998; Michel, 1998; Proshlyakov *et al.*, 1998). Die Existenz eines Tyrosinradikals konnte mit Hilfe von EPR-Spektroskopie in  $P_M$ - und  $F\cdot$ -Intermediaten der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans*, die durch Reaktion des vollständig oxidierten Enzyms mit Wasserstoffperoxid erzeugt wurden, nachgewiesen werden (MacMillan *et al.*, 1999). Außer einem Tyrosin wird auch die Beteiligung eines Tryptophans (W272 bzw. W164) an der Bereitstellung des „fehlenden Elektrons“ diskutiert (Wiertz *et al.*; Svistunenko *et al.*, Siegbahn und Blomberg, 2004). Durch Absenkung des pH-Wertes von pH 8 auf pH 6 kann das  $P_M$ -Intermediat ohne die Aufnahme eines weiteren Elektrons in das  $F\cdot$ -Intermediat überführt werden (Moody und Rich, 1994). Bei diesem Intermediat handelt es sich um einen Ferrylzustand, der durch ein 575 nm Maximum im Absorptions-Differenzspektrum charakterisiert ist. Auch im  $F\cdot$ -Intermediat lässt nach Zugabe stöchiometrischer Mengen an

Wasserstoffperoxid das Tyrosinradikal nachweisen (MacMillan *et al.*, 1999). Nach Aufnahme des dritten Elektrons entsteht das Intermediat  $P_R$ , das ebenso wie  $P_M$  ein Maximum bei 607 nm im Absorptionsdifferenzspektrum aufweist. Seine Struktur unterscheidet sich nicht von der des Intermediates  $P_M$ , außer dass bei  $P_R$  kein Aminosäureradikal mehr vorliegt (Michel, 1998).

Im weiteren Verlauf des katalytischen Zyklus kommt es zur Bildung des F-Intermediates, das durch ein Maximum bei 580 nm im Absorptionsdifferenzspektrum charakterisiert ist. Es kann durch die Oxidation des binuklearen Zentrums in reversen Sauerstoffreduktions-Experimenten (Wikström, 1981; Wikström und Morgan, 1992), durch Reduktion des Enzyms mit drei Elektronen und Hinzufügung von Sauerstoff (Witt *et al.*, 1986, 1987) oder durch Zugabe eines Überschusses an Wasserstoffperoxid zur vollständig oxidierten Cytochrom *c* Oxidase (Fabian und Palmer, 1995; Vygodina und Konstantinov, 1992) hergestellt werden. Wie auch beim Intermediat  $F^\bullet$  handelt es sich beim Intermediat F um einen Ferrylzustand. Das Aminosäureradikal liegt im F-Zustand jedoch nicht mehr vor. Durch die Einspeisung des vierten Elektrons ins binukleare Zentrum wird das F-Intermediat reduziert. Es entsteht das H-Intermediat, eine Eisen-Hydroxy-Species. Aus dieser kann durch Aufnahme eines Protons der vollständig oxidierte O-Zustand regeneriert werden.



**Abbildung 5:** Intermediate im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase. Dargestellt ist jeweils die Konfiguration des binuklearen Zentrums. Für das Intermediat  $P_M$  sind die in der Diskussion befindlichen alternative Strukturen aufgeführt, wobei  $Por^\bullet$  für Porphyrinkationradikal und  $res^\bullet$  für ein Aminosäureradikal steht.

### **1.8. Untersuchung von biologischen Makromolekülen mit paramagnetischer Elektronenresonanzspektroskopie**

Mit paramagnetischer Elektronenresonanzspektroskopie (EPR-Spektroskopie) können Struktur und Dynamik paramagnetischer Zentren in Proteinmolekülen untersucht werden. Diese können zum Beispiel Häm-Moleküle, Metallionen oder Eisen-Schwefel-Zentren sein, aber auch transient entstehende Radikale innerhalb des Reaktionszyklus eines Proteins, wie Chromophore, Kofaktoren oder Aminosäureradikale.

Mit dieser Technik wird die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Zentren in einem statischen magnetischen Feld gemessen, die mindestens einen ungepaarten Elektronen-Spin aufweisen. Die Cytochrom *c* Oxidase besitzt mehrere paramagnetische Zentren. Zum einen die redoxaktiven Metallzentren Cu<sub>A</sub> und Häm a, zum anderen ein nicht redoxaktives Manganion.

Auch die Untersuchung des im P<sub>M</sub>- und F•-Intermediat vorliegenden Aminosäureradikals ist mit dieser Methode möglich.

Befinden sich mehrere paramagnetische Zentren in einem Protein, wie es in der Cytochrom *c* Oxidase der Fall ist, so können sich deren Anteile im EPR-Spektrum überlagern, was dessen Interpretation erschweren kann. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die EPR-Spektroskopie durch Einführung von Puls-Techniken weiterentwickelt und verfeinert. Dadurch können die überlappenden spektralen Komponenten verschiedener paramagnetischer Zentren anhand ihrer Relaxationszeiten oder ihres Spin-magnetischen Momentes aufgelöst werden. Durch diese Techniken, bei denen zusätzlich Pulse von Radio- oder Mikrowellen zum Einsatz kommen, werden nicht nur die Vorgänge am paramagnetischen Zentrum zugänglich, sondern auch benachbarte magnetisch gekoppelte Kernspins (ENDOR), der Elektronen-Spin eines anderen paramagnetischen Zentrums (PELDOR) oder beide zugleich (ESEEM) (Prisner *et al.* 2001).



### 1.8.1. Die Charakterisierung des Tyrosinradikals der Cytochrom *c* Oxidase

Durch Zugabe stöchiometrischer Mengen Wasserstoffperoxids zur Cytochrom *c* Oxidase wenige Sekunden vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff lassen sich Oxoferryllintermediate mittels EPR-Spektroskopie auf die Anwesenheit von Strukturen mit ungepaarten Elektronen hin untersuchen. Generell lassen sich in der Cytochrom *c* Oxidase die paramagnetischen Zentren Cu<sub>A</sub> und Häm *a* nachweisen (MacMillan *et al.*, 1999). Das Cu<sub>A</sub>-Signal wird allerdings in Oxidase, die aus auf herkömmliche Weise angezogenen Zellen gewonnenen wurde, vom EPR-Signal des Mn<sup>2+</sup> überlagert (siehe Abbildung 7 A). Daher muss die für EPR-Experimente verwendete Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus* Zellen gewonnen werden, die im manganfreien Medium gewachsen sind (siehe Abbildung 7 B).

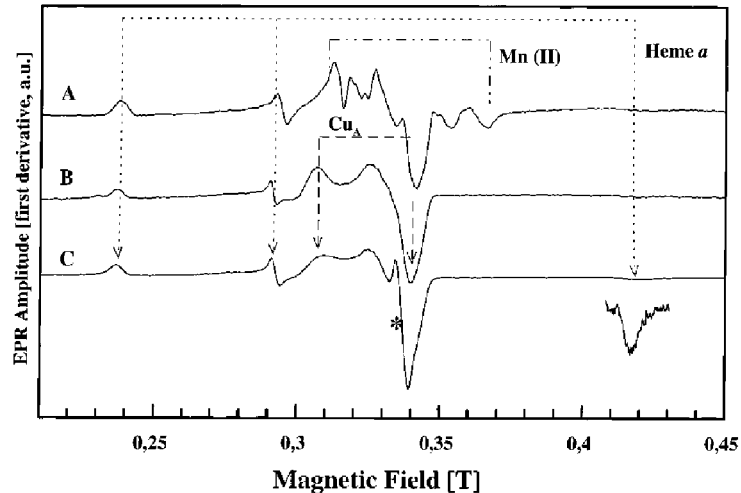
Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid lässt sich in den Oxoferryllintermediaten P<sub>M</sub> und F• ein weiteres EPR-Signal mit  $g \sim 2$  nachweisen, welches typisch für organische Radikale wie zum Beispiel Semiquinonanionen oder neutrale Tyrosinradikale ist. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Radikals und der Redoxchemie im binuklearen Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase ließ sich dadurch bestätigen, dass nach einer Inhibierung des Enzyms durch Bindung von Cyanid im binuklearen Zentrum und anschließender Zugabe von Wasserstoffperoxid das Tyrosinradikal-Signal nicht mehr auftrat.

Abbildung 7 C zeigt das Radikalsignal als Differenzspektrum, wobei das Cu<sub>A</sub>-EPR-Spektrum von unbehandelter Cytochrom *c* Oxidase von dem mit Wasserstoffperoxid versetzten abgezogen wurde. Dieses Differenzspektrum zeigt eine teilweise aufgelöste Struktur, die auf der Hyperfeinen-Kopplung der  $\beta$ -Methyl-Protonen am C <sub>$\beta$</sub> -Atom, welches mit dem C<sub>4</sub>-Atom des Tyrosinringes verbunden ist, beruht.

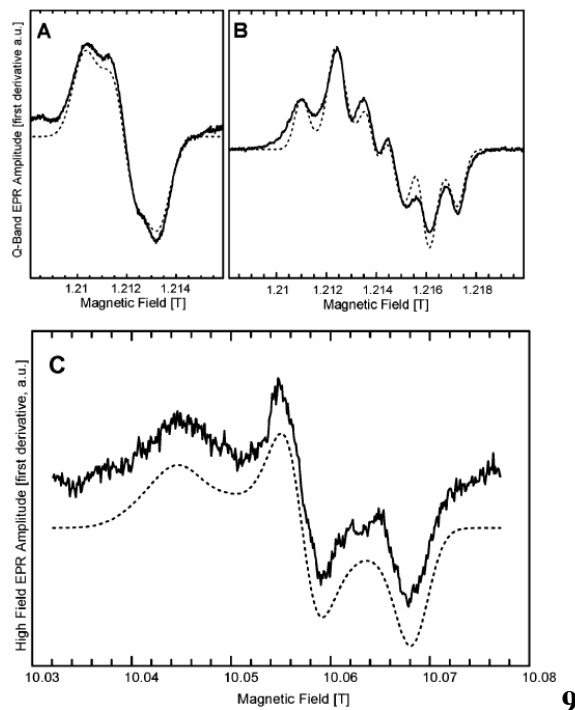
Um den Ursprung des Radikalsignals zu klären, wurde ringdeutertes Tyrosin (<sup>2</sup>H<sub>4</sub>) in die Cytochrom *c* Oxidase inkorporiert.

Dadurch kam es zu einer deutlichen Veränderung des Radikalsignals (Abbildung 8). Die von den  $\alpha$ -Protonen stammenden hyperfeinen Kopplungen sind nicht mehr aufgelöst. Nur die Einflüsse der nicht deuterierten  $\beta$ -Methyl-Protonen bleiben sichtbar.

Zur Quantifizierung des EPR-Signals wurde die gepulste EPR-Technik verwendet. Mit ihrer Hilfe konnte eine Ausbeute an Radikalsignal von ca. 20 % bezogen auf Cu<sub>A</sub> bestimmt werden.



**Abbildung 7:** (A) EPR Spektrum von nativer Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans*. (B) EPR Spektrum von nativer CcO, die aus manganfrei angezogenen *Paracoccus* Zellen isoliert wurde. (C) EPR Spektrum von CcO (manganfrei) nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Das EPR Radikal Signal ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die dritte Komponente des Häm *a* Signal ist vergrößert dargestellt. Versuchsbedingungen: Mikrowellen Leistung 20 mW, Feldmodulation 12,5 kHz; Amplitude 0,5 mT, Temperatur 20 K. Bei Kurve C: Mikrowellenleistung 0.1 mW, T=10K. (Abbildung entnommen aus MacMillan *et al.* 1999)



**Abbildung 8:** EPR-Spektren und spektroskopische Simulationen (gepunktete Linien) von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (manganfrei angezogen). (A): Vollständig deuteriertes Tyrosin gemessen bei 34 GHz, (B): ringdeuteriertes Tyrosin gemessen bei 34 GHz, (C): vollständig protoniertes Tyrosin gemessen bei 285 GHz.

## 1.9. Zielsetzung

Nach Reaktion mit stöchiometrischen Mengen an Wasserstoffperoxid konnte im F•- und im P<sub>M</sub>-Intermediat der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* durch EPR-Spektroskopie ein Tyrosinradikal nachgewiesen werden (MacMillan *et al.*, 1999). Da dieses Tyrosin als Lieferant des „fehlenden“ Elektrons für die Spaltung des Sauerstoffmoleküls in katalytischen Zyklus des Enzyms infrage kommt, war es das Hauptziel dieser Arbeit herauszufinden, von welchem Tyrosinrest das Radikal gebildet wird.

1.) Um dieses Ziel zu erreichen, sollte zunächst die Reaktion der Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid genauer charakterisiert werden. Es sollten optimale Reaktionsbedingungen für den spektroskopischen Nachweis der Oxoferryllintermediate gefunden werden, bei denen die Ausbeute hoch und gleichzeitig das Auftreten von durch das Wasserstoffperoxid ausgelösten unspezifischen Nebenreaktionen möglichst gering ist.

Dazu sollten einerseits der Einfluss verschiedener Wasserstoffperoxidkonzentrationen und andererseits die Auswirkungen der Anwesenheit von Chloridionen auf die Ausbeuten an Oxoferryllintermediaten untersucht werden.

2.) Um den Ursprungsort des Radikalsignals zu finden, sollte die Reaktion diverser Tyrosinvarianten der Untereinheit I (Y35F, Y167F, Y167W, Y267F, Y280H, Y328F und Y414F) des Enzyms mit Wasserstoffperoxid mit Hilfe von optischer Spektroskopie und EPR-Spektroskopie untersucht werden.

Da sich alle diese Tyrosinvarianten in ihrer Reaktion mit Wasserstoffperoxid sowohl in Bezug auf die Ausbeute an den Intermediaten P<sub>M</sub>, F• und F als auch durch das Auftreten unspezifischer Nebenprodukte deutlich vom Wildtyp unterschieden, bestand die Notwendigkeit die Reaktion der Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid genauer zu charakterisieren. Dazu sollten zunächst für den Wildtyp und später für die oben genannten Varianten die maximalen Ausbeuten der verschiedenen Oxoferryllintermediate bei pH 9 und nach einem pH-Sprung auf pH 6, bei Zugabe verschiedener Mengen an Wasserstoffperoxid, sowie in An- und Abwesenheit von Chloridionen mit optischer Spektroskopie bestimmt werden. Ziel dieser Untersuchungen sollte die Etablierung standardisierter Versuchsbedingungen sein, bei denen einerseits die Reaktivität der Varianten mit Wasserstoffperoxid hoch genug ist, um spektroskopisch nachweisbare Mengen an Oxoferryllintermediaten zu erzeugen, andererseits die durch das Wasserstoffperoxid

verursachten unspezifischen Nebenreaktionen, die zu einer Schädigung des Enzyms führen, möglichst gering gehalten werden.

In EPR-Experimenten mit den Tyrosinvarianten sollte das Auftreten des Tyrosinradikals, das in der Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase nach Reaktion des Enzyms mit Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden konnte, untersucht werden.

3) Da es Hinweise dafür gibt, dass statt eines Tyrosins ein Tryptophan der Donor des „fehlenden“ Elektrons für die Sauerstoffspaltung sein könnte (Siegbahn und Blomberg, 2004; Wiertz *et al.*, 2004), sollte das Tryptophan 272, welches sich zwischen Tyrosin 167 und dem binuklearen Zentrum befindet, mittels gerichteter Mutagenese durch ein Methionin ersetzt werden. Auch die Wasserstoffperoxid-Reaktion dieser Variante sollte mit Hilfe von optischer und EPR-Spektroskopie untersucht werden.

4.) Beim  $P_M \rightarrow F$ -Übergang im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase werden den gängigen Modellvorstellungen zufolge mehrere Protonen gepumpt. Durch Reaktion von Enzymvarianten mit Wasserstoffperoxid, bei denen Mutationen im D-Weg (D124N, N131D, E278Q) oder im K-Weg (K354M) vorliegen, sollte untersucht werden, inwieweit die Protonenaufnahme beim  $P_M \rightarrow F$  Übergang durch die Mutation beeinträchtigt ist.

In der Cytochrom *bo*<sub>3</sub> Oxidase von *E. coli* wird für Arginin 481 (Arginin 473 in *P. denitrificans*) eine eventuelle Beteiligung am putativen Protonenaustrittsweg diskutiert (Puustinen und Wickström, 1999). Durch Reaktion der Variante R473N mit Wasserstoffperoxid sollte ein möglicher Einfluss dieser Mutation auf den  $P_M \rightarrow F$  Übergang untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. *Material*

#### 2.1.1. Kulturmedien

##### **Succinatmedium (Ludwig 1986)**

50 mM	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (x 3 $\text{H}_2\text{O}$ )
10 mM	$\text{NH}_4\text{Cl}$
1 mM	$\text{Na}_2\text{SO}_4$
1 mM	$\text{MgCl}_2$ (x 6 $\text{H}_2\text{O}$ )
1 mM	Citrat
40 mM	Succinat
1 ml/l	Spurenelementelösung

ad pH 6,2 mit KOH

##### **Spurenelementelösung:**

ad 1000 ml:

100 mM	$\text{CaCl}_2$
10 mM	$\text{CoCl}_2$
4 mM	$\text{CuSO}_4$
90 mM	$\text{FeCl}_3$
5 mM	$\text{H}_3\text{BO}_3$
50 mM	$\text{MnCl}_2$
10 mM	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$
25 mM	$\text{ZnCl}_2$

in halbkonzentrierter HCl

**LB-Medium** (Sambrook *et al.*; 1989)

ad 1000 ml:

10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

(15 g Agar für Platten)

**Gefriermedium**

ad 100 ml:

1,6 g Pepton

1 g Hefe-Extrakt

5 g NaCl

15 % (v/v) Glycerin

**Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration der Stamm- lösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50mg/ml in 50 % Glycerin	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 50 % Gyzerin	50 µg/ml
Kanamycinsulfat	25 mg/ml in 50 % Glycerin	25 µg/ml
Streptomycinsulfat	25 mg/ml in 50 % Glycerin	25 µg/ml
Tetracyclinhydrochlorid	10 mg/ml in 70 % Ethanol	10 µg /ml

## 2.1.2. Mikrobiologische Arbeiten

**Bakterienstämme*****Escherichia coli* Stämme:**

Stamm	Beschreibung	Herkunft
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983, Bethesda Research Laboratories, 1986
JM-109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), ( <i>r<sub>K</sub></i> , <i>m<sub>K+</sub></i> ), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sub>q</sub></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Yanisch-Rerron <i>et al.</i> , 1985
MM294	<i>supE44</i> , <i>hsdR</i> , <i>endA1</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , [RP4-7: <i>tra</i> <sup>+</sup> , <i>mob</i> <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup> , Km <sup>s</sup> , TC <sup>r</sup> ::Tn7(Tp <sup>r</sup> )]	R. Simon, Bielefeld helper strain for triparental conjunction
BmH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi</i> , <i>supE</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [ <i>mutS</i> :Tn10], [F' <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> , <i>lac I<sub>q</sub></i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Promega Corp., Madison, WI, USA; Wallace <i>et al.</i> , 1981

***Paracoccus denitrificans* Stämme:**

Stamm	Beschreibung	Herkunft
PD1222	wild-type strain, Rif <sup>r</sup> , Spc <sup>r</sup> , high conjunction frequency	de Vries <i>et al.</i> , 1989
AO1	pD1222 Derivat, <i>ctaDI</i> und <i>ctaDII</i> Gene deletiert, Insertion in das <i>cbb<sub>3</sub></i> Operon	Pfützner <i>et al.</i> , 1998

**Plasmide**

Plamid	Beschreibung	Herkunft
pSelect1	Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	Promega #corp., Madisom, WI, USA
pUP6	pSelect1 + cta1-Promoter (KpnI / XbaI Fragment, 137bp) + ctaDII Gen (XbaI / HindIII Fragment)	U. Pfitzner, Frankfurt/M.
pUP39	pRI (pBBR1mcs + Sm Resistenzgen (2kb, NaeI) + cta2-Promoter (300 bp, KpnI / XbaI Fragment) + ctaDII Residual Fragment (200 bp, XbaI / HindIII)	Kovach <i>et al.</i> , 1994; U. Pfitzner, Frankfurt/M.

**2.1.3. Molekularbiologische Materialien****Phage:**

Helferphage 408 (Promega, Heidelberg)

**Oligonukleotide:**

für Varianten der Cytochrom *c* Oxidase (Untereinheit I):

W272M: 5'-tac cag cac atc ctg atg ttc ttc ggc cat cca gag agg tct-3'

H326G: 5'-gtc tgg gcg cac ggc atg tat acg gcc gcc atg-3'

R473N: 5'-ggc atg ccg aat cgc tat atc gac tat-3'

Ampicillin-Repair-Oligonucleotid (Promega, Heidelberg)



**Puffer und Lösungen für die Mutagenese:****Phagenpräzipitationslösung:**

3,75 M	Ammoniumacetat pH 7,5
20 %	Polyethylenglycol (MW 8000)

**TE-Puffer:**

10 mM	Tris-HCl pH 8
1 mM	EDTA pH 8

**Annealing Puffer (10 x)**

200 mM	Tris-HCl pH 7,5
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
500 mM	NaCl

**Synthese Puffer (10 x)**

100 mM	Tris-HCl pH 7,5
5mM	dNTPs
10 mM	ATP
20 mM	DTT

**Puffer für die Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Präparation von Plasmid-DNA werden die Puffer aus dem Miniprep-Kit von Qiagen verwendet.

**Puffer für Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese****DNA-Probenpuffer**

5 % (v/v) Glyzerin

30 mM EDTA

0,02 % (w/v) Bromphenolblau in TBE

**10x TBE-Puffer (pH 8)**

1 M Tris

1 M Borsäure

25 mM EDTA

**Herstellung kompetenter Zellen****TFB I-Puffer**

100 mM	RbCl
100 mM	MnCl <sub>2</sub>
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
30 mM	KAc
15 % (v/v)	Glyzerin

**TFP II-Puffer**

10 mM	RbCl
10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
30 mM	KAc
15 % (v/v)	Glyzerin

## 2.1.4. Puffer für die Spektroskopie

### **Dialysepuffer für die Herstellung von Proteoliposomen**

#### **Puffer A:**

100 mM Hepes, pH 7,3

10 mM KCl

#### **Puffer B:**

10 mM Hepes, pH 7,3

50 mM KCl

50 mM Sucrose

#### **Puffer C (COV-Puffer)**

55  $\mu$ M Hepes, pH 7,30

55 mM KCl

55 mM Sucrose

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Gerichtete Mutagenese von Aminosäuren in Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase

Die Mutagenese von Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase wurde nach dem Altered Sites *in vitro* Mutagenese System von Promega durchgeführt.

#### 2.2.1.2. Herstellung von Einzelstrang DNA

20 ml LB-Medium werden mit 20 µl Tetracyclin-Stammlösung versetzt und mit 400 µl JM109-Zellen, welche den Plasmid pUP 6 enthalten, in einem sterilen Erlenmeyerkolben angeimpft und 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Danach werden 400 µl Helferphage 408 hinzugefügt und das Ganze über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Am nächsten Morgen werden die Zellen im SS34 Rotor bei 4 °C für 15 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand der Zentrifugation nochmals auf die gleiche Weise zentrifugiert.

Zum Überstand werden 0,25 Volumen Phagenpräzipitationslösung hinzugegeben und für dreißig Minuten auf Eis gefällt.

Danach wird die Lösung im HB 6 Rotor bei 4°C für 45 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Der Niederschlag der Zentrifugation wird in 400 µl TE-Puffer resuspendiert.

Es folgt eine Extraktion mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol. Dabei werden zum resuspendierten Pellet 400 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und die Mischung gevortext. Es folgt eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rpm.

Anschließend wird mehrmals mit je 400 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)

extrahiert. Dazu werden zunächst 1 ml Phenol und 1 ml der Isoamylalkohol-Chloroform Mischung (24:1) gut gemischt. Anschließend werden 400 µl dieser Mischung zur DNA gegeben und gevortext. Danach wird die Mischung 5 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Die Extraktion muss solange wiederholt werden, bis keine weißen Partikel mehr in der Phasengrenzschicht zu erkennen sind.

Dann werden 200 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol zur DNA hinzugegeben und die Mischung für 1 Stunde bei -80°C gefällt.

Es folgt eine dreißigminütige Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rpm. Das Pellet wird anschließend mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 10 Minuten zentrifugiert.

Danach wird die Einzelstrang DNA für 10 bis 20 Minuten in der Speed-Vac getrocknet und in 20 µl *Aqua dest.* resuspendiert.

#### 2.2.1.3. Annealing-Reaktion

Zu 1 µl Einzelstrang DNA werden 1 µl Ampicillin-Repair-Oligo, 2 µl phosphorylierter mutagener Oligo, 2 µl Annealing-Puffer (10 x) und 16 µl *Aqua dest.* gegeben.

Der Ansatz wird in einem Heizblock für 5 Minuten auf 75 °C erhitzt. Dann wird der Heizblock abgeschaltet und der Ansatz im Heizblock langsam auf 40 °C abgekühlt.

#### 2.2.1.4. Synthese

20 µl Annealingansatz werden mit 3 µl Synthese-Puffer (10x), 10 u T<sub>4</sub>-DNA-Polymerase und 2 u T<sub>4</sub>-DNA-Ligase versetzt und mit *Aqua dest.* auf 30 µl aufgefüllt.

Der Syntheseansatz wird für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.1.5. Transformation des mutagenen Plasmids in BMH 71-18 mut S Zellen

Zu 15 µl Syntheseansatz werden 150 µl kompetenten BMH 71-18 mut S Zellen hinzugefügt und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 60 Sekunden werden 0,8 ml LB-Medium dazugegeben und der Ansatz für 45 Minuten bei 37 °C geschüttelt.

Anschließend wird der gesamte Ansatz in 3 ml LB-Medium überführt mit 4 µl Ampicillin- und 4 µl Tetracyclinstammlösung versetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am nächsten Tag kann dann das mutierte Plasmid zur weiteren Verwertung aus den Zellen isoliert werden.

### 2.2.1.6. Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Miniprep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA wird mit Hilfe der Miniprep-Kits von Qiagen durchgeführt. Übernachtkulturen (2-5 ml) werden bei 4500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wird abgesaugt. Das Pellet der Zentrifugation wird in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Lysis der Zellen werden 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und durch mehrmaliges invertieren des Eppendorfgefäßes gemischt. Bei *E. coli* Zellen sollte die Lysis eine Zeit von 5 Minuten nicht überschreiten. Bei *Paracoccus* Zellen hingegen sollte die Lysis 30 Minuten dauern, da sonst die Ausbeute an Plasmid DNA zu gering ist.

Danach werden dem Ansatz 350 µl Puffer N3 zur Ausfällung genomischer DNA zugefügt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Der weiße Niederschlag wird 10 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand der Zentrifugation auf ein Säulchen gegeben. Dieses wird 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird mit den Puffern PB und PE gewaschen. Nach der Zentrifugation mit dem Puffer PE sollte noch ein zweites Mal zentrifugiert werden, um sicherzustellen, dass sämtliches Ethanol entfernt ist.

Danach werden 30 bis 50 µl Puffer EB auf das Säulchen aufgetragen und eine Minute lang inkubiert. Der obere Teil des Säulchens wird in ein Eppendorfgefäß eingesetzt und die Plasmid-DNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm eluiert. Isolierte Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert werden.

#### 2.2.1.7. Restriktionsverdau

5  $\mu$ l Plasmid-DNA werden mit 1  $\mu$ l eines geeigneten Restriktionspuffers (10x), 2,5  $\mu$ l Restriktionsenzym sowie falls erforderlich 1  $\mu$ l BSA-Lösung (10 x) versetzt und mit *Aqua dest.* auf 10  $\mu$ l aufgefüllt. Dann wird der Ansatz für 1 Stunde bei der für das Restriktionsenzym geeigneten Temperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l DNA-Probenpuffer kann der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

#### 2.2.1.8. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten verschiedener Größe werden 0,8-1,5%ige Agarosegele verwendet. Die gewünschte Menge Agarose wird in 1x TBE-Puffer durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst und 5  $\mu$ l / 100 ml Ethidiumbromid zugegeben. Wenn die Agaroselösung etwas abgekühlt ist kann das Gel gegossen werden. Nach dem Erstarren des Gels wird die Gelkammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt und die Restriktionsansätze sowie ein geeigneter Marker in die Geltaschen pipettiert. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 5 Volt /cm werden die DNA-Fragmente im Gel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese kann das Bandenmuster durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 2.2.1.9. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die benötigte DNA-Bande wird mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion des DNA-Fragmentes aus der Agarose erfolgt mit Hilfe des Qiagen Gel-Extraction Kits.



### 2.2.1.10. Herstellung von kompetenten Zellen

50 ml LB-Medium werden 0,5 %ig mit einer Übernachtskultur des benötigten *E. coli* Stammes angeimpft und solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD von 0.5 erreicht ist. Die Kultur wird dann für 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 7,5 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert.

Darauf folgt eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C und 3.000 g im HB 6-Rotor. Das Pellet dieser Zentrifugation wird in 2 ml eiskaltem TFB II-Puffer vorsichtig resuspendiert, in 100 µl Aliquots aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.11. „Sticky-end“ Ligation

Zur Ligation werden DNA-Fragmente benötigt, die über miteinander kompatible Enden verfügen.

Für die Klonierung von Cytochrom *c* Oxidase Varianten muss das mutierte *ctaDII*-Gen, welches sich zunächst in dem p-Alter Derivat pUP 6 befindet, aus diesem herausgeschnitten und dann in den Vektor pUP 39 ligiert werden. Dazu müssen sowohl das Insert als auch der Vektor pUP 39 mit den Restriktionsenzymen Xba I und Hind III geschnitten und die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert werden.

Für einen Ligationsansatz werden 1 µl geschnittener Vektor und 3 µl geschnittenes Insert gemischt und mit 1 µl 10 x T<sub>4</sub>-Ligasepuffer, 3,5 ml *Aqua dest.* sowie mit 2 u T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (0,5 µl) versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei 14 °C inkubiert. Anschließend wird die Ligase durch einen Hitzeschock bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert.

Das Ligationsprodukt kann nun transformiert werden.

### 2.2.1.12. Triple Mating

Zur Produktion von Cytochrom *c* Oxidase Varianten muss das Plasmid pUP 39 aus dem für die gerichtete Mutagenese verwendeten *E. coli* Stamm (DH5 $\alpha$  bzw. JM-109) in den *Paracoccus* Stamm AO1 überführt werden. Dazu bedient man sich der Methode der triparentalen Konjugation (Triple Mating).

Dazu werden 2 ml Übernachtskulturen der Donorstämme DH5 $\alpha$  bzw. JM-109, welche das Plasmid pUP 39 enthalten (streptomycinresistent), des *E. coli* Helferstamms mM294 (Ampicillin resistent) und des Rezipienten AO1 (Kanamycin resistent) angesetzt.

An nächsten Tag werden je 1,5 ml der Übernachtskulturen in Eppendorfgefäße überführt und 3 Minuten bei 6.000 rpm abzentrifugiert. Die Zellen werden in je 500  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert.

Dann werden 400  $\mu$ l Rezipient (AO1) mit 100  $\mu$ l Donor (DH5 $\alpha$  bzw. JM-109) und 100  $\mu$ l Helferstamm (MM294) gemischt und erneut für 3 Minuten bei 6.000 rpm abzentrifugiert.

Die Zellen werden in 100  $\mu$ l LB-Medium aufgenommen, auf eine antibiotikafreie Agarplatte getropft und 24 Stunden bei 32 °C inkubiert.

Anschließend wird der Tropfen in 2 ml LB-Medium resuspendiert und Verdünnungen von 1:4, 1:8 und 1:16 hergestellt. Je 100  $\mu$ l der konzentrierten Suspension und der Verdünnungen werden auf mit Kanamycin und Streptomycin versetzten Agarplatten ausplattiert und zwei Tage bei 32 °C inkubiert.

### 2.2.1.13. Lagerung

Die kurzzeitige Lagerung von *E. coli* und *Paracoccus* Kulturen erfolgt auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agarplatten bei 4°C (*E. coli*) bzw. bei Raumtemperatur (*Paracoccus*).

Für die langfristige Lagerung von Kulturen wird zunächst eine Übernachtskultur angezogen. Diese wird für 3 Minuten bei 6.000 rpm abzentrifugiert und in 800  $\mu$ l Gefriermedium aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

## 2.2.2. Proteinchemische Methoden

### 2.2.2.1. Gewinnung von Varianten der Cytochrom c Oxidase im präparativen Maßstab

#### 2.2.2.1.1. Zellanzucht und Zellaufschluss (Ludwig, 1986)

Vorkultur: 1 x 5 ml Succinatmedium (Kan / Strep)  
werden mit 1 ml Gefrierkultur angeimpft 8 Stunden  
1 x 100 ml Succinatmedium (Kan / Strep) 15 Stunden  
1 x 500 ml Succinatmedium (Kan / Strep) 8 Stunden  
Hauptkultur: 6 x 2000 ml Succinatmedium (Kan / Strep) 15 Stunden

Die *Paracoccus*- Zellen werden mit 8.000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge: Beckman Coulter Avanti J-20 XPI, Rotor: JLA-8.1000).

Anschließend werden sie in ca. 200 ml Puffer (50 mM Phosphatpuffer, 1 mM EDTA pH 8) resuspendiert und durch feine Gaze filtriert.

#### 2.2.2.1.2. Membranpräparation (Ludwig, 1986)

Nach Zusatz von 10 mg des Proteaseinhibitors Pefablock werden die Zellen im Microfluidizer aufgeschlossen. Die aufgebrochenen Zellen werden 60 Minuten bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert (GSA-Rotor).

Die Überstand dieser Zentrifugation wird bei 39.000 rpm im 45 Ti-Rotor und 4°C über Nacht zentrifugiert.

Der Niederschlag der Ultrazentrifugation wird in 20 ml 50 mM Phosphatpuffer, 1mM EDTA pH 8 mit Hilfe des Ultraturrax resuspendiert.

### 2.2.2.1.3. Solubilisierung und Aufreinigung (ohne Chlorid)

Cytochrom *c* Oxidase wird durch indirekte Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurde ein Fv-Antikörperfragment (7E2) konstruiert, welches einerseits spezifisch an die Oberfläche der Cytochrom *c* Oxidase bindet, und andererseits über ein mit dem Carboxy-Terminus der VH-Kette fusioniertes Strep-tag Affinitätspeptid auf einer Streptavidin Sepharose Säule immobilisiert werden kann (Kleymann *et al.*, 1995).

20 ml Membranen (ca. 50 mg Protein / ml) werden mit 20 ml einer 10 %igen LM-Lösung sowie 5 mg Pefablock, 4 mg Avidin 150 µl, 0,5 M EDTA und 3,5 ml 1 M Phosphatpuffer pH8 versetzt und 5 bis 10 Minuten auf Eis gerührt.

Danach wird ein Aliquot des F<sub>V</sub>-Fragmentes 7E2 hinzugegeben und weitere 5 Minuten gerührt.

Das Solubilisat wird bei 60000 rpm im 70 Ti-Rotor und 4°C für 1 Stunde zentrifugiert.

Der Überstand der Ultrazentrifugation wird durch einem 1,2 µm Filter filtriert und kann dann auf die zuvor mit 50-100 ml LM-Puffer (50 mM Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, 0.05 % LM) equilibrierte Streptavidinsäule aufgetragen werden (reduzierte Flussrate 1 ml / min).

Die Elution der Cytochrom *c* Oxidase erfolgt durch 50 ml 2,5 mM Desthiobiotin (Flussrate 1.5 ml /min).

Zur Entfernung des Desthiobiotins wird das aufgereinigte Protein mehrmals mit einem Centriprep Konzentrator (cut off 50.000) ankonzentriert und wieder mit LM-Puffer verdünnt. Schließlich wird das Protein auf ca. 1 ml Volumen ankonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.1.4. Produktion des Fv-Fragmentes 7E2 (Kleymann et al. 1995)

Das Fv-Fragment 7E2 wird in *E. coli* nach Induktion mit IPTG exprimiert (Kleymann et al. 1995).

Vorkultur: 3 x 200 ml LB-Medium (Amp) werden mit je 50 µl Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt.

Hauptkultur: 12 x 2000 ml LB-Medium werden über Nacht bei 24 °C temperiert. Am nächsten Tag werden sie mit Ampicillin und jeweils 50 ml der Vorkultur versetzt und bei 22,5°C geschüttelt. Wenn die Zellen bis zu einer Zelldichte von OD<sub>550</sub> = 0,5 gewachsen sind,

---

wird die Produktion des Fv-Fragmentes durch Zugabe von jeweils 1ml einer 1M IPTG-Lösung induziert und weitere 3 Stunden geschüttelt.

Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation im Rotor JLA-8.1000. Anschließend werden die Zellen sorgfältig in insgesamt 250 ml Periplasmapuffer (500 mM Saccharose, 100 mM Phosphatpuffer pH 8, 1 mM EDTA) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellüberreste werden durch zwei 30-minütige Zentrifugationsschritte bei 10.000 rpm und 4°C (GSA-Rotor) abzentrifugiert. Die periplasmatische Zellfraktion wird in 30 ml Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3. Spektroskopische Methoden

#### 2.2.3.1. Spektroskopische Bestimmung der Cytochrom *c* Oxidase Konzentration

Von der vollständig oxidiert vorliegenden Probe wird eine geeignete Verdünnung in LM-Puffer (50 mM Phosphatpuffer, 1 mM EDTA pH 8, 0.05 % LM) hergestellt und ein Absorptionsspektrum vom 380 bis 650 nm aufgenommen. Die Konzentration der Probe ergibt sich aus der Absorption des Soret-Peaks der Cytochrom *c* Oxidase und kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes und dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon = 158 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  berechnet werden.

#### 2.2.3.2 Spektroskopische Bestimmung der Cytochrom *c* Konzentration

10 mg Pferdeherz Cytochrom *c* werden in 200  $\mu\text{M}$  Puffer (10 mM Phosphatpuffer pH 8, 50 mM KCl, 1 mM EDTA) gelöst und mit einigen wenigen Kriställchen Natriumdithionit reduziert.

Das Dithionit wird über eine PD 10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) abgetrennt, die zuvor mit einigen Säulevolumen desselben Puffers equilibriert wurde. Eine geeignete Verdünnung des reduzierten Cytochrom *c* wird auf zwei Halbmikroküvetten verteilt. Einer Küvette werden einige Kriställchen Kaliumhexacyanoferrat (III) zugesetzt, welches das Cytochrom *c* wieder oxidiert. Die Küvette mit dem reduzierten Cytochrom *c* wird im Probenstrahl, die mit dem oxidierten Cytochrom *c* im Referenzstrahl des Photometers platziert und ein Absorptionsspektrum von 500-600 nm aufgenommen.

Aus dem Peak bei 550 nm kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{550} = 18,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  die Konzentration des reduzierten Cytochrom *c* bestimmt werden.

### 2.2.3.3. Aufnahme von Redoxspektren der Cytochrom *c* Oxidase

Die Varianten der Cytochrom *c* Oxidase bzw. das Wildtyp Protein werden mit einigen Körnchen Kaliumhexacyanoferrat (III) versetzt, um das Enzym vollständig in den oxidierten Zustand zu versetzen, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Da die Eigenabsorption des Kaliumhexacyanoferrates das Absorptionsspektrum der Cytochrom *c* Oxidase überlagern würde, wird es mittels einer PD 10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) abgetrennt, die zuvor mit Puffer equilibriert wurde.

Eine geeignete Verdünnung des Proteins wird auf zwei Halbmikroküvetten verteilt. Einer der Küvetten werden wenige Kristalle Natriumdithionit zugesetzt, um die Cytochrom *c* Oxidase zu reduzieren.

Die Küvette mit dem reduzierten Enzym wird in den Probenstrahl des Photometers gestellt, die mit dem oxidierten Enzym in den Referenzstrahl. Dann wird im Bereich von 380 bis 650 nm ein Absorptionsdifferenzspektrum aufgenommen.

### 2.2.3.4. Cyanid-Differenzspektren

Cyanid bindet kompetitiv an das Häm  $a_3$  der Cytochrom *c* Oxidase und fixiert dieses im oxidierten Zustand. Die Bindung des Cyanids im binuklearen Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase lässt sich durch ein charakteristisches Maximum bei 590 nm im Differenzspektrum nachweisen (Vanneste, 1966). Außerdem erschließt sich dadurch eine Möglichkeit die Spektren von Häm *a* und Häm  $a_3$  zu separieren.

700 µl einer 2-3 µM Cytochrom *c* Oxidase Lösung werden mit 10 µl Kaliumhexacyanoferrat (III) (10 mM) oxidiert und zentrifugiert. Der Überstand wird auf zwei Mikroküvetten verteilt.

Die Messungen werden nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsschritt	Küvette 1	Küvette 2
1	+20 µl KCN (350 mM), pH 7,0	+20 µl SAS Gelfiltrationspuffer
2	Inkubation ( 2 Stunden bei Raumtemperatur)	
3	Spektrenaufnahme A I	Spektrenaufnahme A II
4	+7,4 µl TMPD (3 mM) +3,7 µl Ascorbat (200 mM)	+11,1 µl SAS- Gelfiltrationspuffer +Natriumdithionit
5	Spektrenaufnahme B I	Spektrenaufnahme B II

Durch Verrechnung der aufgenommenen Absolutspektren ergeben sich die folgenden Differenzspektren:

A II minus A I	Cyanidbindungsspektrum
B I minus A I	Häm $a$ -Spektrum
B II minus A II	Redoxspektrum ( $a + a_3$ )
(B II minus A II)-(B I minus A I)	Häm $a_3$ -Spektrum

#### 2.2.3.5. Aktivitätstest

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase erfolgt durch Zugabe einer bekannten Menge oxidierten Enzyms (siehe 2.2.3.1) zu einer 50 µM reduzierten Cytochrom *c* Lösung (Witt *et al.*, 1998). (siehe 2.2.3.2)

Währenddessen wird die Änderung der Absorption des Cytochrom *c* bei 550 nm für 3 Minuten photometrisch verfolgt. Aus der Steigung der abfallenden Gerade lässt sich der Verbrauch an reduzierten Cytochrom *c* pro Sekunde berechnen und daraus bei bekannter Enzymkonzentration die Wechselzahl der Cytochrom *c* Oxidase für Cytochrom *c*.



### 2.2.3.6. Herstellung von P<sub>M</sub>-, F•- und F-Intermediaten

#### 2.2.3.6.1. Probenvorbereitung

Zum Austausch des Puffers wird die Cytochrom *c* Oxidase in einem Centriprep Konzentrator (cut off 50.000) ankonzentriert und anschließend mit dem Puffer 5 mM TAPS-NaOH, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 % LM, pH 9 wieder verdünnt. Dieser Schritt wird viermal wiederholt. Dann wird die Probe in einem Centricon Konzentrator (cut off 50.000) auf ein Volumen von ca. 100-200 µl aufkonzentriert.

Um die Cytochrom *c* Oxidase Varianten in den vollständig oxidierten Zustand zu überführen, werden einige Kriställchen Kaliumhexacyanoferrat (III) zugesetzt und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Kaliumhexacyanoferrat (III) durch eine Gelfiltration entfernt und die Cytochrom *c* Oxidase Konzentration bestimmt.

#### 2.2.3.6.2. Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Wasserstoffperoxid

Ein Milliliter einer 1 M Wasserstoffperoxidlösung, die durch Verdünnung einer 30 %igen Stammlösung hergestellt wurde, wird in eine Quarzküvette gefüllt.

Es wird ein Absorptionsspektrum im Bereich von 200 bis 300 nm aufgenommen. Aus der Absorption bei 240 nm kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  die exakte Konzentration des Wasserstoffperoxides bestimmt werden.

#### 2.2.3.6.3. Herstellung der Oxoferrylintermediate P<sub>M</sub> und F bei hohen pH-Werten

Vollständig oxidierte Cytochrom *c* Oxidase wird mit Puffer (1 mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0,05 % LM bzw. 5 mM TAPS-NaOH, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 % LM, pH 9) auf eine Konzentration von 10,5 µM verdünnt.

Die Bildung der P<sub>M</sub>- und F-Intermediate wird für 15 Minuten am Agilent Spektrophotometer verfolgt. Dazu werden 95 µl der Probe in eine volumenreduzierte Küvette gefüllt, 5 µl Wasserstoffperoxidlösung der gewünschten Konzentration hinzugegeben und gründlich gemixt (Endkonzentration der Cytochrom *c* Oxidase: 10 µM).

#### 2.2.3.6.4. pH-Sprung Experiment: Herstellung der Oxoferrylintermediate ( $P_M$ , $F_1$ , $F_2$ )

Proben werden wie in oben beschrieben vorbereitet und vermessen. Allerdings wird vor der Zugabe des Wasserstoffperoxides durch Versetzen mit 5  $\mu$ l 1M MES-KOH pH 6 ein pH-Sprung von pH 9 nach pH 6 durchgeführt.

#### 2.2.3.6.5. Herstellung des $P_M$ -Zustandes durch Inkubation mit Kohlenstoffmonoxid und Sauerstoff

3-4  $\mu$ M vollständig oxidierte Cytochrom *c* Oxidase wird in einer luftdicht verschlossenen Küvette drei Minuten lang mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast (Puffer: 50 mM Phosphatpuffer pH 8,0, 0,05 % LM). Danach wird die Küvette abgedunkelt und die Probe eine Minute mit Kohlenstoffmonoxid begast. Im Perkin Elmer Spektrophotometer werden im Abstand von 10 Minuten solange Spektren aufgenommen, bis sich der *mixed valence* Zustand vollständig eingestellt hat. Dann wird die Küvette für ca. eine Minute mit Sauerstoff begast und die Bildung des  $P_M$ -Zustandes spektroskopisch verfolgt (Chance *et al.*, 1975).

### 2.2.3.7 Protonenpumpexperimente

#### 2.2.3.7.1. Aufreinigung von Asolectin (Darley-Usmar, 1987)

20 ml Asolectin werden in einem Rundkolben mit 400 ml Aceton versetzt und unter Lichtabschluss und Schutzgasatmosphäre (Argon) für 48 Stunden gerührt. Nachdem sich das Lipidgemisch abgesetzt hat, wird das Aceton mittels einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Nach Zugabe weiter 400 ml Aceton wird die Suspension erneut für 48 Stunden gerührt.

Die Suspension wird abgenutscht und der Rückstand mit 200 ml Aceton gewaschen.

Zur Umfällung wird der Rückstand in 80 ml Diethylether gelöst. Dann wird unter Rühren solange Aceton zugegeben, bis die Ausfällung vollständig abgeschlossen ist. Der Überstand wird erneut abgenutscht und die Umfällung solange wiederholt, bis der Überstand farblos ist.

Der Rückstand wird in 80 ml Diethylether gelöst und 20 Minuten bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Diethylether wird durch Begasung mit Stickstoff verdampft und das gereinigte Asolectin über Nacht bei 4°C unter Vakuum getrocknet.

Das gereinigte Asolectin wird aliquotiert und unter Schutzgas und Lichtabschluss bei -20 °C gelagert.

#### *2.2.3.7.2. Umkristallisierung von Cholsäure*

50 g Cholsäure werden in 100 ml Ethanol gelöst und nach Zugabe von 500 mg Aktivkohle drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung der Aktivkohle durch Filtration wird das Filtrat im Rotationsverdampfer auf circa ein Drittel des Ausgangsvolumens aufkonzentriert.

Die Lösung wird mit Wasser auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt und die Cholsäure bei 4°C auskristallisiert. Die Cholsäure-Kristalle werden mehrmals mit Diethylether gewaschen und anschließend über Nacht im Exsikator getrocknet.

#### *2.2.3.7.3. Reduktion der Detergenzkonzentration*

Die Laurylmaltosidkonzentration von Cytochrom *c* Oxidase Proben, die zur Rekonstitution in Proteoliposomen verwendet werden sollen, muss auf 0,02 % reduziert werden, da das Laurylmaltosid bei der Dialyse nur unzureichend entfernt wird und eine hohe Detergenzkonzentration die Dichtigkeit der Vesikel herabsetzen kann.

Dazu wird die Cytochrom *c* Oxidase auf eine Q-Sepharose Säule aufgetragen, die zuvor mit Puffer (10 mM Hepes-KOH, pH 7,3, 50 mM KCl, 0,02 % LM) equilibriert wurde, aufgetragen. Nach Waschen mit 10 Gelvolumen Puffer wird die Cytochrom *c* Oxidase mit Hochsalzpuffer (10 mM Hepes-KOH pH 7,3, 500 mM KCl, 0,02% LM) eluiert.

#### *2.2.3.7.4. Herstellung von Proteoliposomen*

Die Rekonstitution von Cytochrom *c* Oxidase in Proteoliposomen erfolgt durch die Detergenz-Dialyse-Methode (modifiziert nach Darley-Usmar, 1987). Gereinigtes Asolectin wird in Rekonstitutionspuffer gelöst (Konzentration 40 mg/ml) und 2% (w/v) umkristallisierte Cholsäure zugegeben. Die Mischung wird eine Stunde bei 4°C unter Schutzgas gerührt und

dann mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Sonifier II 250, Branson) auf Eis in Intervallen von 30 Sekunden beschallt. Dabei ist darauf zu achten, dass es nicht zur Schaumbildung kommt. Nachdem die Lösung klar geworden ist, werden Titanpartikel von der Spitze des Ultraschallgerätes durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4°C entfernt. Anschließend wird Cytochrom *c* Oxidase bis zu einer Endkonzentration von 4 µM hinzugegeben.

Zur Entfernung des Cholates werden die folgenden Dialyseschritte durchgeführt:

Dauer	Puffer	Dialysevolumen
4-12 Stunden	Puffer A	200 Vol.
12 Stunden	Puffer B	200 Vol.
12 Stunden	Puffer B	200 Vol.
12 Stunden	Puffer C	500 Vol.
12 Stunden	Puffer C	500 Vol.

Durch eine Zentrifugation (15 Minuten, 6.000 rpm, 4°C) werden größere Protein-Lipidaggregate entfernt.

Die fertigen Proteoliposomen werden auf Eis gelagert und sollten möglichst bald verwendet werden.

#### 2.2.3.7.5. Photometrische Messung der Protonentranslokation mit der stopped-flow Methode

Mit Hilfe einer *stopped-flow* Apparatur ist es möglich, die Protonentranslokation von in Proteoliposomen rekonstituierter Cytochrom *c* Oxidase als Absorptionsänderung des pH-Indikators Phenolrot an dessen isosbestischem Punkt zu bestimmen. Gemessen wird die Ansäuerung (Abfall der Absorption des pH-Indikators), welche durch den Ausstrom von gepumpten Protonen aus dem Vesikelinnern in das die Vesikel umgebenden Medium verursacht wird. Der Einbau von Valinomycin in die Vesikel bewirkt, dass der Aufbau eines dem Protonenausstrom entgegen gerichteten Potentials durch Kaliumtransport in die Vesikel verhindert wird. Durch diese Messung der rekonstituierten Cytochrom *c* Oxidase im

gekoppelten Zustand lässt sich eine Aussage über die Fähigkeit der Cytochrom *c* Oxidase Protonen zu translozieren machen.

Die Zugabe des Entkopplers CCCP macht die Vesikel für Protonen durchlässig.

Es kommt zu einer Alkalisierung des Mediums, da ständig Protonen bei der Wasserbildung verbraucht werden. Durch die Messung rekonstituierter Cytochrom *c* Oxidase im entkoppelten Zustand kann eine Aussage über die Fähigkeit der Cytochrom *c* Oxidase gemacht werden die vom Cytochrom *c* gelieferten Elektronen effektiv zu verwerten.

Lösung A (2000 ml): 400  $\mu$ l rekonstituierte Cytochrom *c* Oxidase (4  $\mu$ M) werden mit 120  $\mu$ l des pH-Indikator Phenolrot-Natriumsalz (Stammlösung 1 mM in Wasser), 1480  $\mu$ l COV-Puffer und 4  $\mu$ l Valinomycin (Stammlösung 5 mM in Ethanol) versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird exakt auf 7,30 eingestellt. (Für Messungen im entkoppelten Zustand wird zusätzlich 1  $\mu$ l CCCP (Stammlösung 10 mM in Ethanol) zugegeben.

Lösung B (2000 ml): 200 $\mu$ M reduziertes Pferdeherz Cytochrom *c* in COV-Puffer (pH ad 7,30)

Die Lösungen A und B werden in der *stopped-flow* Apparatur im Verhältnis 1:1 gemixt und die Absorptionsänderungen des pH-Indikators Phenolrot bei 555 nm gemessen.

#### 2.2.3.8 EPR-Spektroskopie

Sämtliche EPR-Spektren wurden von Dr. Fraser MacMillan (Arbeitsgruppe Prof. Prisner, Institut für physikalische und theoretische Chemie, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M.) aufgenommen und ausgewertet.

#### 2.2.3.9 FTIR-Spektroskopie

FTIR-Spektren wurden von Dr. Perta Hellwig (Arbeitsgruppe Prof. Mäntele, Institut für Biophysik, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M.) aufgenommen und ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Erzeugung von Oxoferryllintermediaten der Cytochrom *c* Oxidase

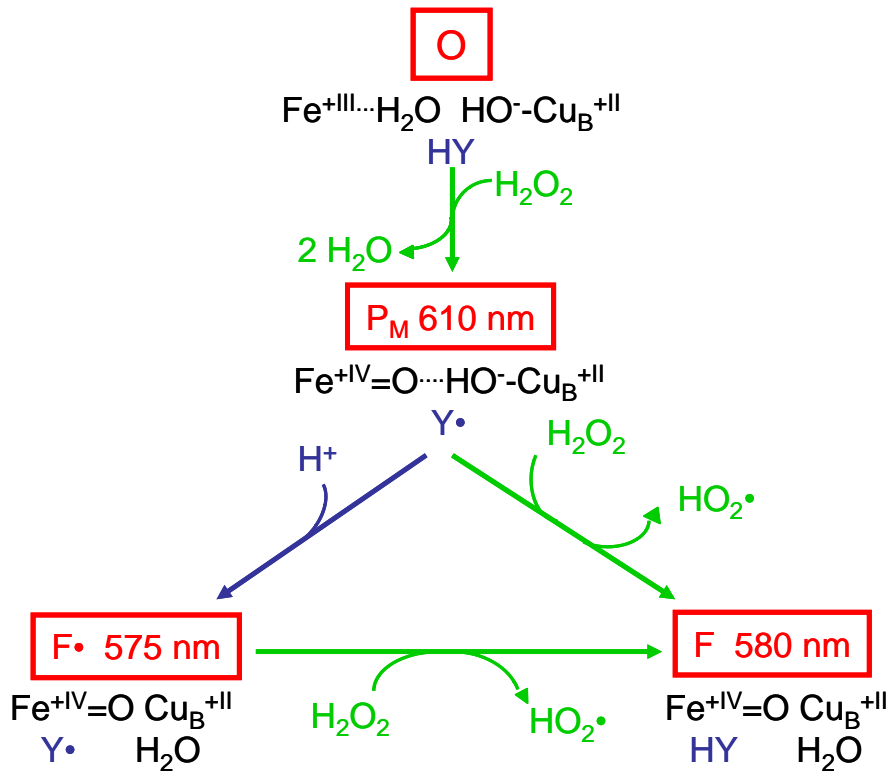
Um  $P_M^-$ ,  $F^\bullet$ - und F-Intermediate der Cytochrom *c* Oxidase experimentell zu charakterisieren, bietet es sich an Methoden zu verwenden, die es ermöglichen diese Oxoferryllintermediate unter Umgehung des katalytischen Zyklus auf künstlichem Wege zu erzeugen (Fabian und Palmer 1995; Jünemann *et al.* 2000).

Eine Möglichkeit dazu stellt die Inkubation des vollständig oxidierten Enzyms mit Kohlenmonoxid unter aeroben Bedingungen dar (Chance *et al.*, 1975).

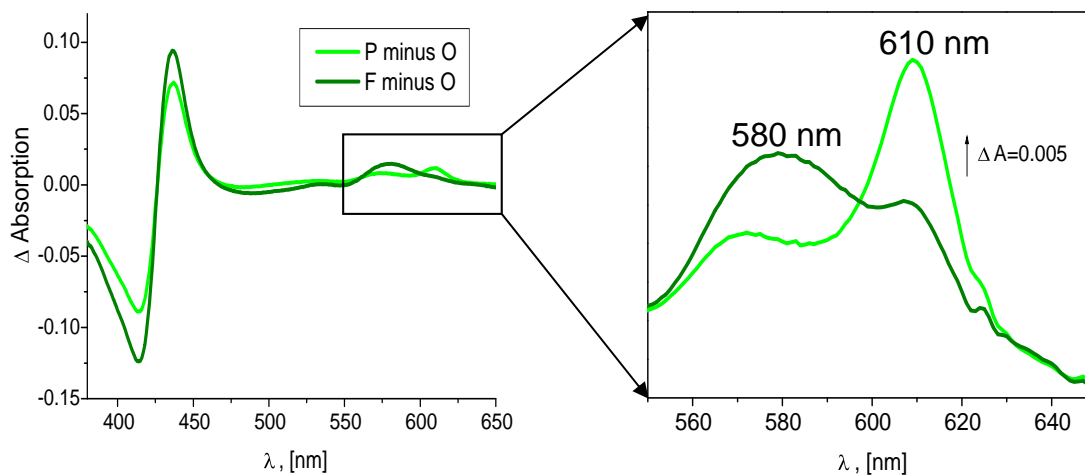
Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe stöchiometrischer Mengen an Wasserstoffperoxid zu vollständig oxidierten Cytochrom *c* Oxidase (Fabian und Palmer 1995; Jünemann *et al.* 2000). Wird die Reaktion bei hohem pH durchgeführt, bildet sich zunächst überwiegend das  $P_M^-$ -Intermediat, welches in der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* durch ein 610 nm Maximum im  $P_M^-$ -minus-O-Differenzspektrum gekennzeichnet ist (schematische Darstellung: siehe Abbildung 9; Absorptionsdifferenzspektren: siehe Abbildung 10). In Verlauf einiger Minuten reagiert das  $P_M^-$ -Intermediat mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid zum F-Intermediat, welches im F-minus-O-Differenzspektrum ein Maximum bei 580 nm aufweist.

Wird die Reaktion von Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid bei einem niedrigen pH-Wert durchgeführt, ändert sich der Reaktionsablauf. Unter diesen Bedingungen ist das  $P_M^-$ -Intermediat viel instabiler als bei hohem pH-Werten. Es wandelt sich rasch in das  $F^\bullet$ -Intermediat um, welches durch ein Maximum bei 575 nm charakterisiert ist. Im weiteren Verlauf des Experimentes kommt es wahrscheinlich durch Reaktion mit einem zweiten Wasserstoffperoxidmolekül zur Weiterreaktion des Intermediates  $F^\bullet$  zu F.

Durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Cytochrom *c* Oxidase sind somit alle Oxoferryllintermediate des Enzyms auf einfache Weise experimentell zugänglich. Diese Methode eignet sich daher gut zur Untersuchung der Fähigkeit verschiedener Varianten der Cytochrom *c* Oxidase Oxoferryllintermediate zu bilden.



**Abbildung 9:** Vereinfachtes Reaktionsschema für die Herstellung von P<sub>M</sub>-, F•- und F- Intermediaten mit Hilfe von Wasserstoffperoxid.



**Abbildung 10:** Photometrische Charakterisierung des P<sub>M</sub>- und des F- Intermediates in der Reaktion von vollständig oxidiertem Cytochrom c Oxidase mit Wasserstoffperoxid bei pH 9. Der P<sub>M</sub>-Zustand ist durch ein 610 nm Maximum im P<sub>M</sub>-minus-O-Differenzspektrum, der F-Zustand durch ein 580 nm Maximum im F-minus-O-Differenzspektrum gekennzeichnet.

### 3.1.1. Erzeugung von Oxoferrylintermediaten in der Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase

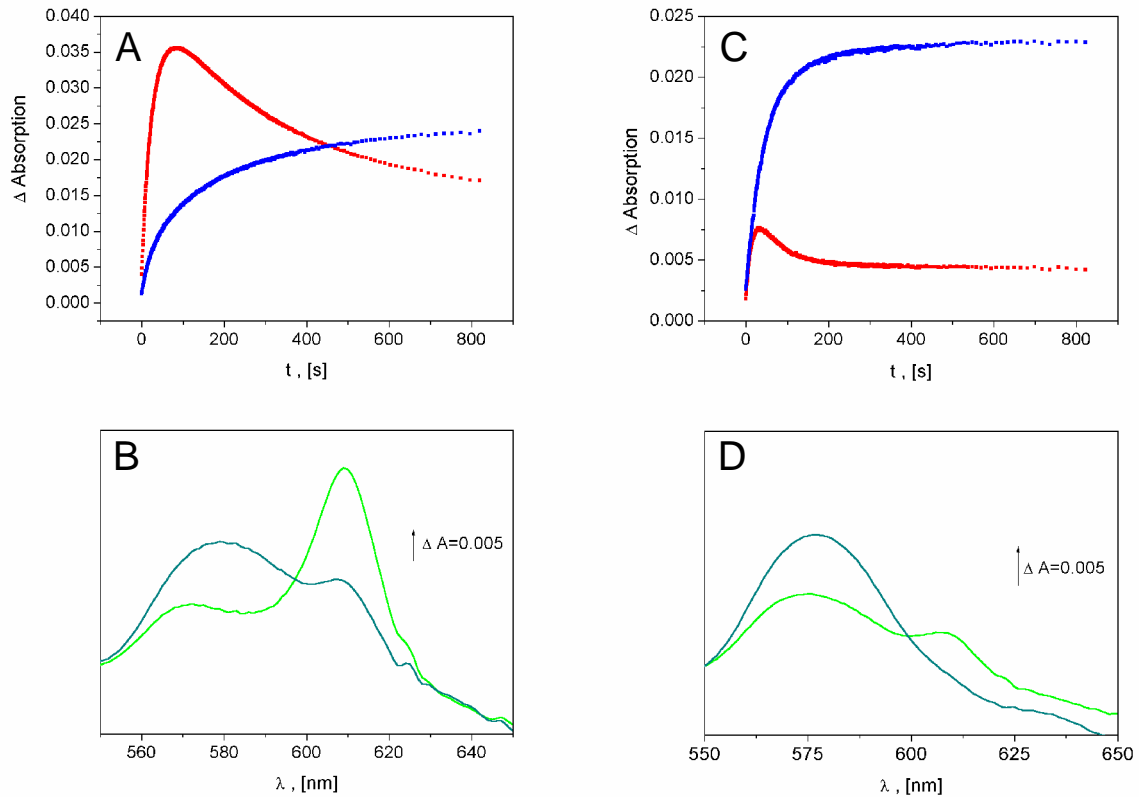
Die Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (Puffer: 1mM Tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 0,05 % LM) mit fünf Äquivalenten Wasserstoffperoxid wird bei pH 9 und nach einem pH-Sprung auf pH 6 jeweils mehrere Minuten lang verfolgt (siehe Abbildung 11).

Im Experiment bei pH 9 wird zunächst überwiegend das Intermediat  $P_M$  gebildet (610 nm Maximum im  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum), welches im Laufe der Reaktion in den F-Zustand (580 nm Maximum im F-minus-O-Differenzspektrum) überführt wird. Die maximale Ausbeute an  $P_M$ , die in diesem Experiment erzielt werden konnte, liegt bei 32 % bezogen auf die eingesetzte Ausgangskonzentration an Cytochrom *c* Oxidase.

Wird vor der Zugabe des Wasserstoffperoxides ein pH-Sprung nach pH 6 durchgeführt (durch Zugabe einer geeigneten Menge an 1M MES-KOH), ist der  $P_M$ -Zustand wesentlich instabiler als bei pH 9. Stattdessen wird überwiegend das Intermediat  $F\bullet$  (575nm Maximum im  $F\bullet$ -minus-O-Differenzspektrum) gebildet. Die maximale Ausbeute an  $F\bullet$  beträgt 42 %.

Versuche mit niedrigeren (1 Äquivalent, 2 Äquivalente) bzw. höheren Wasserstoffperoxidkonzentrationen (bis zu 50 Äquivalente) führen zwar zu Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch nicht zu einer Steigerung der Ausbeute an Oxoferrylintermediaten.





**Abbildung 11:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Wildtyp CcO mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . **A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **B:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\cdot$  bzw. F max. bei pH 9. **C:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\cdot$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

### **3.2. Der Einfluss von Chloridionen auf das binukleare Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase**

Cytochrom *c* Oxidase ist in der Lage im binuklearen Zentrum ein Chloridion zu binden (Li *et al.*, 1987, Scott *et al.*, 1988, Fabian *et al.*, 2001). Unter chloridfreien Bedingungen wird an dieser Stelle stattdessen ein Hydroxidion vermutet.

Die Frage, ob die Anwesenheit von Chloridionen im binuklearen Zentrum einen Einfluss auf den katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase hat, und ob dieses von physiologischer Bedeutung ist, konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden. Bei Experimenten, die mit Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die Bindung von Chlorid im binuklearen Zentrum einen Einfluss auf die an die Häm  $a_3$ -Cu<sub>B</sub>-Reduktion gekoppelte Nettoprotonenaufnahme hat (Forte *et al.*, 2002). Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Chlorid und der Ausbildung von so genannten „schnellen“ und „langsamen“ Formen der Cytochrom *c* Oxidase, welche wahrscheinlich zwei verschiedene Konformationen des binuklearen Zentrums darstellen, nachgewiesen werden (Cooper *et al.*, 1993).

Vor kurzem werden eine weitere Chloridbindungsstelle in der Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase entdeckt (Fabian *et al.*, 2004), welche sich möglicherweise an der Magnesium- bzw. Manganbindungsstelle oder in der Region der Häm-Propionate befindet.

Um die Auswirkungen von Chloridionen auf die Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* zu untersuchen, wurden in allen für die Membranpräparation und die Proteinaufreinigung verwendeten Puffern Tris-HCl und NaCl durch 50 mM Phosphatpuffer pH 8 ersetzt. Die auf diese Weise aufgereinigte Cytochrom *c* Oxidase unterscheidet sich weder in ihrer Aktivität mit reduziertem Pferdeherz Cytochrom *c* noch in ihrem Absorptionsspektrum von dem auf die herkömmliche Weise aufgereinigten Enzym.

### 3.2.1 Umwandlung der „schnellen“ in die „langsame“ Form der Cytochrom *c* Oxidase

Oxydierte Cytochrom *c* Oxidase kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, die man als „schnelle“ oder auch „gepulste“ bzw. „langsame“ Form bezeichnet (Moody *et al.*, 1991, Cooper *et al.*, 1993).

Die „schnelle“ Konformation der Cytochrom *c* Oxidase ist durch ein Soretmaximum bei 425 nm und durch eine schnelle Cyanidbindungskinetik charakterisiert.

Die „langsame“ Form weist hingegen ein Soretmaximum von 418 nm und eine langsame Cyanidbindungskinetik auf. Außerdem wurde bei dieser Konformation ein EPR-Signal bei  $g'=12$  nachgewiesen. Aus der „langsamen“ Form der Cytochrom *c* Oxidase lässt sich die „schnelle“ Form herstellen, indem man das Enzym einen katalytischen Zyklus durchlaufen lässt. Aus der „schnellen“ lässt sich die „langsame“ Konformation durch Absenkung des pH-Wertes in den sauren Bereich unter chloridfreien Bedingungen erzeugen. (Moody *et al.*, 1991) Die Charakterisierung dieser beiden Formen wurde an Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase durchgeführt. Der konkrete Nachweis dieser Konformationen für die Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* steht hingegen noch aus.

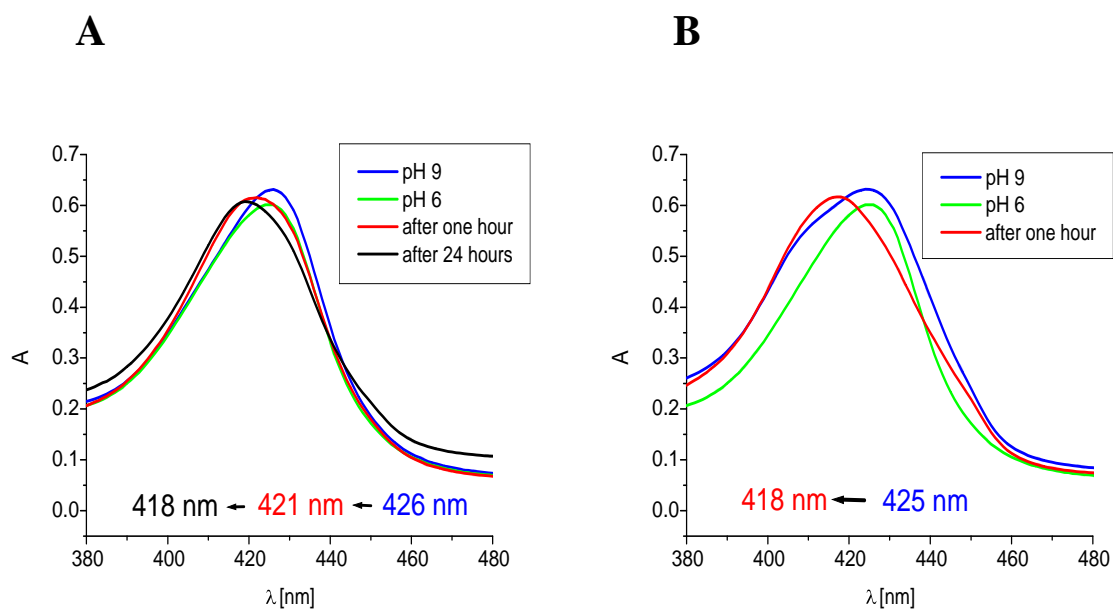
Nach der Umstellung der Cytochrom *c* Oxidase Aufreinigung auf chloridfreie Bedingungen kann auch für das *Paracoccus* Enzym eine pH-abhängige Verschiebung des Soretmaximums gezeigt werden (siehe Abbildung 12 A). So verschiebt sich das Soretmaximum von 425 nm bei pH 9 nach einem pH-Sprung auf pH 6 nach 418 nm. Dies ist ein sehr langsamer Prozess, der erst nach Inkubation des Enzyms über Nacht abgeschlossen ist. Nach dem Durchlaufen eines katalytischen Zyklus kann das 425 nm Maximum wieder hergestellt werden.

Bei der chloridfrei aufgereinigten Variante Y167F ist die Ausbildung des 418 nm Maximums besonders begünstigt.

Nach einem pH-Sprung von pH 8 auf pH 6 verschwindet zunächst die in Abschnitt 3.2.3. beschriebene Schulter bei 407 nm. Anschließend kommt es zu einer im Vergleich zum Wildtyp raschen Verschiebung des 425 nm Maximums nach 418 nm. Dieser Prozess ist bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde abgeschlossen. Auch diese Verschiebung lässt sich durch das Durchlaufen eines katalytischen Zyklus wieder rückgängig machen (siehe Abbildung 12 B).

Bei einer EPR-spektroskopischen Untersuchung der 418 nm Form kann kein  $g'=12$  Signal festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch kann kein signifikanter Unterschied bei den Cyanidbindungskinetiken der beiden Formen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die EPR-Messungen wurden von Dr. Fraser MacMillan (Arbeitsgruppe Prof. Prisner, Institut für physikalische und theoretische Chemie, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M.) durchgeführt und die Cyanidbindungskinetiken wurden von Dr. Ernst Grell und Christian Bamann (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt / M.) gemessen.



**Abbildung 12:** Umwandlung der Cytochrom *c* Oxidase von der „schnellen“ in die „langsame“ Form: (A) Wildtyp CcO, (B) Variante Y167F. Puffer: 5 mM TAPS-NaOH pH 9, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05% LM. Der pH-Sprung wurde durch Zugabe einer von 20 µl 1M MES-NaOH pH 6 durchgeführt.

### 3.2.2. Der Einfluss von Chloridionen auf die Ausbeute an $P_M$ -Intermediat

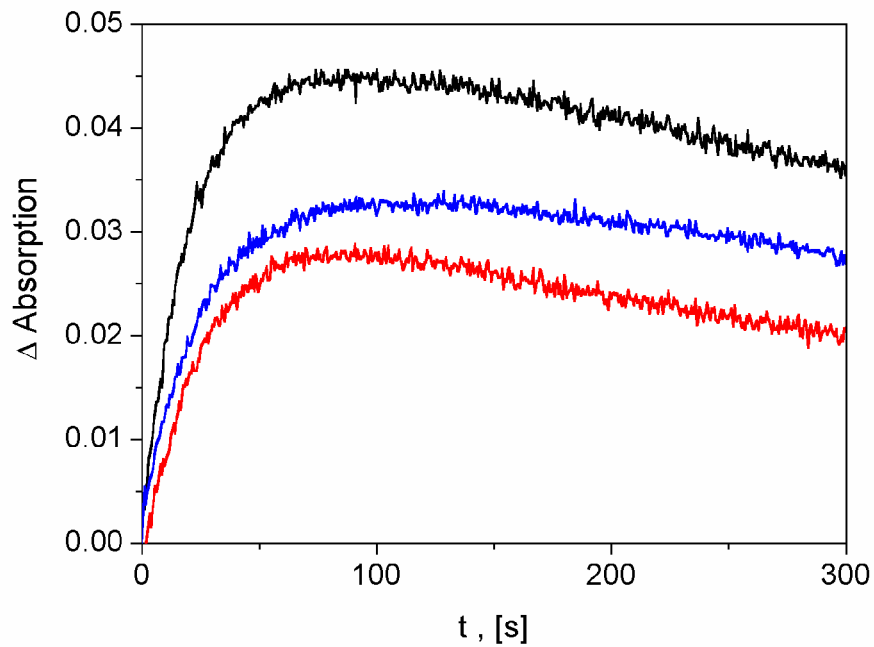
Das im binuklearen Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase gebundene Chlorid kann zu einer Verminderung der Reaktivität des Enzyms führen, da das Chloridion zunächst aus dem binuklearen Zentrum entfernt werden muss, bevor es zu einem normalen Ablauf des katalytischen Zyklus kommen kann. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass mit der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* keine hundertprozentigen Ausbeuten an Oxoferrylintermediaten zu erzielen sind.

Um die Ausbeute an  $P_M$  zu steigern wird untersucht, ob die Anwesenheit von Chloridionen im binuklearen Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase deren Fähigkeit  $P_M$  zu bilden, beeinflussen kann.

Um den Einfluss der Anwesenheit von Chloridionen auf die Bildung des  $P_M$ -Zustandes zu messen, wird die maximale Ausbeute an  $P_M$  nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid zu 10  $\mu\text{M}$  chloridfrei aufgereinigter Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase bei pH 9 bestimmt und mit der Menge an  $P_M$  verglichen, die mit herkömmlich aufgereinigter Oxidase zu erreichen ist. In einem dritten Experiment wird chloridfrei aufgereinigtes Enzym kurz vor der Zugabe des Wasserstoffperoxides mit 50 mM KCl versetzt. Diese Experimente zeigen, dass chloridfrei aufgereinigte Cytochrom *c* Oxidase (Abbildung 13, schwarze Kurve) mit 41 %  $P_M$  (max.) eine deutlich höhere  $P_M$ -Ausbeute aufweist, als das in der blauen Kurve dargestellte, auf herkömmliche Weise aufgereinigte Protein (30 %  $P_M$  (max.)). Die Zugabe von KCl zum chloridfrei aufgereinigten Enzym (rote Kurve) führt zu einer Erniedrigung der maximalen  $P_M$  Ausbeute auf 26 %.

Somit ist also durch eine Umstellung auf chloridfreie Bedingungen eine eindeutige Erhöhung der Ausbeute an Oxoferrylintermediaten zu erreichen. Diese liegt aber weiterhin weit von 100% aktivem Enzym entfernt.

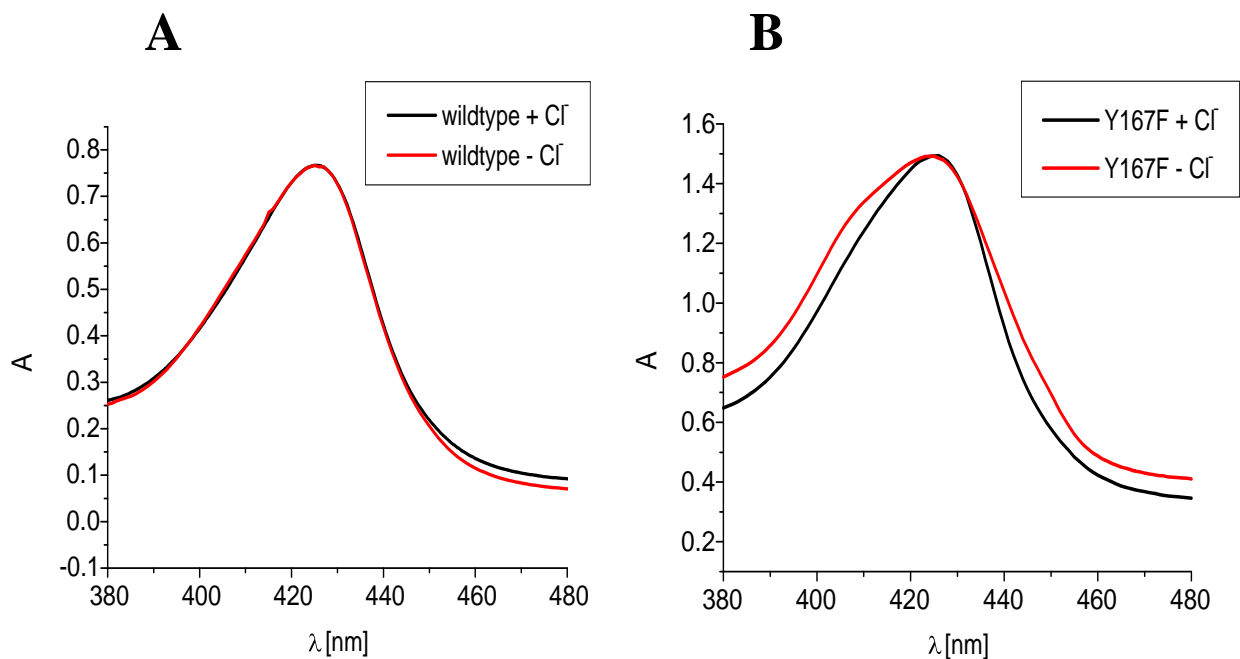
Da mit chloridfrei aufgereinigter Cytochrom *c* Oxidase jedoch etwas bessere Ausbeuten zu erzielen sind, werden die in den folgenden Abschnitten dargestellten Messungen von Oxoferrylintermediaten diverser Varianten der Cytochrom *c* Oxidase mit chloridfrei aufgereinigtem Protein und in chloridfreien Puffern durchgeführt.



**Abbildung 13:** Bildung des  $P_M$ -Intermediates nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $10 \mu\text{M}$  Cytochrom *c* Oxidase dargestellt als Differenz von 610 minus 630 nm. Schwarze Kurve: chloridfrei aufgereinigte CcO in 50 mM Phosphatpuffer pH 9, 0,05 % LM; blaue Kurve: Auf herkömmliche Art aufgereinigte CcO in 50 mM Tris-HCl pH 9, 0,05 % LM; rote Kurve: chloridfrei aufgereinigte CcO in 50 mM Phosphatpuffer pH 9, 0,05 % LM + 50 mM KCl kurz vor dem Experiment zugegeben.

### 3.2.3. Der Einfluss von Chloridionen auf das Absorptionsspektrum der Variante Y167F

Nach Umstellung der Membranpräparation und Proteinaufreinigung auf chloridfreie Bedingungen zeigt die Variante Y167F interessante Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Während sich das Absorptionsspektrum der vollständig oxidierten Variante unter chloridhaltigen Bedingungen nicht von dem der Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase unterscheidet, kommt es bei chloridfreier Y167F zu einer Verbreiterung des Soretmaximums sowie der Ausbildung einer Schulter bei 407 nm.



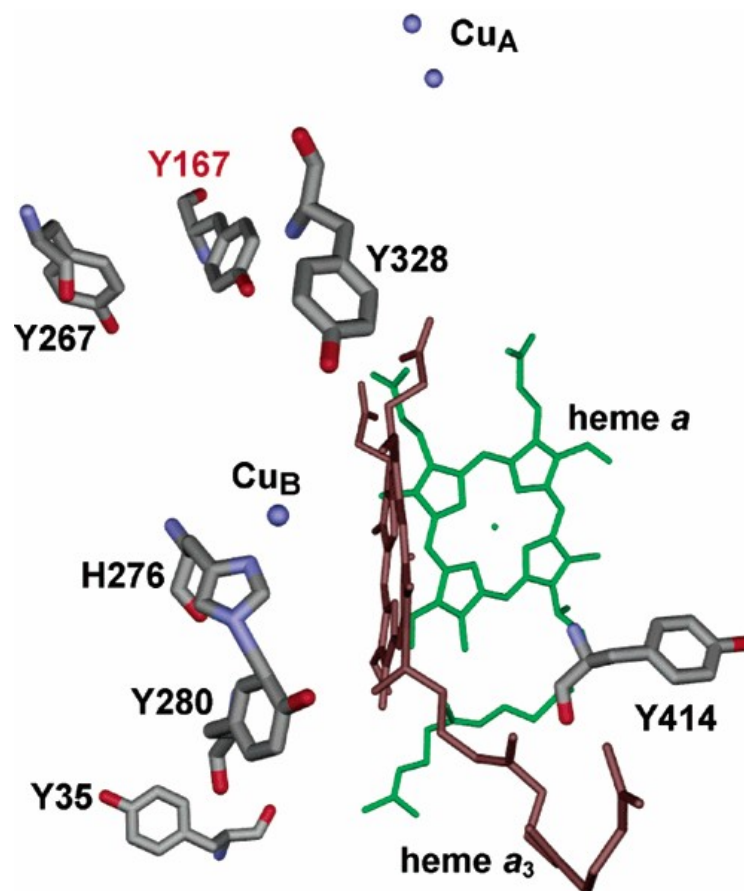
**Abbildung 14:** Vergleich der Soretbanden der Absorptionsspektren von oxidiertem Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (A) und der Variante Y167F (B) in Anwesenheit (schwarz) und in Abwesenheit (rot) von Chloridionen. (Puffer: 50 mM Phosphatpuffer pH 8, 1 mM EDTA, 0,05 % LM bzw. 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,05 % LM)

### 3.3. Charakterisierung von Tyrosin Varianten in Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans*

#### 3.3.1. Die Lage der mutierten Tyrosine in Untereinheit I

In diesem Kapitel wird die Reaktion diverser Tyrosinvarianten der Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid beschrieben. Ziel dieser Experimente ist es, den Ursprungsort des Tyrosinradikals zu finden, welches nach Wasserstoffperoxidzugabe zu vollständig oxidiertes Cytochrom *c* Oxidase mittels EPR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte (MacMillan *et al.*, 1999).

Abbildung 15 zeigt Tyrosinreste in der Umgebung des binuklearen Zentrums der Cytochrom *c* Oxidase. Zur Mutation werden Tyrosine ausgewählt, die nicht nur im *Paracoccus* Enzym, sondern auch in Cytochrom *c* Oxidasen anderer Organismen konserviert sind, und die in Abständen zum binuklearen Zentrum liegen (bis maximal 25 Å), in denen ein Elektronentransfer möglich ist (siehe Tabelle 2).



**Abbildung 15:** Konservierte Tyrosine in der Umgebung des binuklearen Zentrums der CcO von *P. denitrificans*.



	Cu <sub>A</sub> [Å]	Häm <i>a</i> [Å]	Häm <i>a</i> <sub>3</sub> [Å]	Cu <sub>B</sub> [Å]
TYR 35	37,43	22,87	25,24	24,33
TYR 167	13,91	17,35	13,60	10,72
TYR 267	18,05	18,44	18,03	14,77
TYR 280	27,65	17,58	5,34	5,39
TYR 328	22,95	22,43	10,74	9,23
TYR 414	28,43	13,31	14,78	19,64

**Tabelle 2:** Position der mutierten Tyrosine in Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase relativ zu Cu<sub>A</sub>, Häm *a* und dem binuklearen Zentrum (Häm *a*<sub>3</sub>, Cu<sub>B</sub>).

Die ermittelten Distanzen beziehen sich jeweils auf den Abstand zwischen dem Sauerstoffatom des Tyrosins und den jeweiligen Metallzentren.

### 3.3.2. Die katalytische Aktivität der Tyrosin Varianten

Die katalytische Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase lässt sich anhand ihrer Fähigkeit reduziertes Cytochrom *c* zu oxidieren, bestimmen. Die Aktivität kann photometrisch als lineare Abnahme der Absorption des Cytochrom *c* bei 550 nm gemessen werden. Sind die eingesetzten Cytochrom *c*- und Cytochrom *c* Oxidase-Konzentrationen bekannt, so lässt sich aus der Steigung der Geraden die Wechselzahl der Cytochrom *c* Oxidase berechnen.

Eine verringerte katalytische Aktivität zeigt bei einem varianten Enzym eine funktionelle Störung an, die z. B. Folge einer durch die Mutation hervorgerufene Änderung der Redoxpotentiale der Häme oder einer Beeinträchtigung des Elektronentransfers von Cytochrom *c* zum binuklearen Zentrum sein kann. Auch eine Blockade der Protonenaufnahme über den D- bzw. K-Weg oder eine Verminderung der Fähigkeit Protonen zu translozieren kann die katalytische Aktivität einer Variante beeinträchtigen.

In Tabelle 3 sind typische Werte für die Wechselzahlen und die katalytische Aktivität der untersuchten Tyrosinvarianten aufgeführt.

Eine starke Beeinträchtigung der Aktivität zeigen die Varianten Y280H und Y267F. Die größte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wurde für die Variante Y328F ermittelt. Bei allen anderen Tyrosinvarianten ist die katalytische Aktivität zwar deutlich, aber nicht drastisch vermindert.

	Wechselzahl [ $s^{-1}$ ]	katal. Aktivität [%]
Wildtyp	417	100
Y35F	187	45
Y167F	257	62
Y167W	79	19
Y267F	33	7
Y280H	<1	<1
Y328F	303	73
Y414F	167	40

**Tabelle 3:** Darstellung der Wechselzahlen und der katalytischen Aktivität der Tyrosinvarianten im Vergleich zum Wildtyp.

### 3.3.3. Reaktion der Tyrosin Varianten mit Wasserstoffperoxid bei pH 9 und nach einem pH-Sprung auf pH 6

Um zu überprüfen, ob die Tyrosinvarianten in der Lage sind die Oxoferrylintermediate  $P_M$ ,  $F^\bullet$  und  $F$  zu bilden, wird deren Entstehung nach Zugabe von Wasserstoffperoxid sowohl bei hohem pH als auch nach einem pH-Sprung auf pH 6 mittels optischer Spektroskopie verfolgt. Dabei wird jeweils in Abständen von 0,6 Sekunden Absorptionsspektren von 380 bis 650 nm aufgenommen.

Aus diesen Spektren kann dann der zeitliche Verlauf der Bildung des  $P_M$ -Intermediates, durch Messung der Differenz der Absorption zwischen den Wellenlängen 610 nm und 630 nm, und der Bildung der  $F^\bullet$ - bzw. des  $F$ -Intermediates, durch Messung der Differenz der Absorption zwischen den Wellenlängen 580 nm und 630 nm, rekonstruiert werden.

Um die Identität der Oxoferrylintermediate zu überprüfen, werden zu Zeitpunkten maximaler Ausbeute Absorptionsspektren ( $P_M$  minus O,  $F$  minus O und  $F^\bullet$  minus O) berechnet.

Anfangs wurden den Varianten Wasserstoffperoxid in stöchiometrischer Menge zugesetzt.

Dabei zeigte sich jedoch, dass die Reaktivität aller Varianten mit Wasserstoffperoxid unter den gegebenen Reaktionsbedingungen so gering ist, dass sich keine detektierbaren Mengen an Oxoferrylintermediaten nachweisen lassen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wird für die im Folgenden beschriebenen Experimente immer ein fünffacher Überschuss an Wasserstoffperoxid verwendet. Bei diesen Reaktionsbedingungen ist es möglich Oxoferrylintermediate auch bei den Varianten nachzuweisen. Gleichzeitig sind die durch das

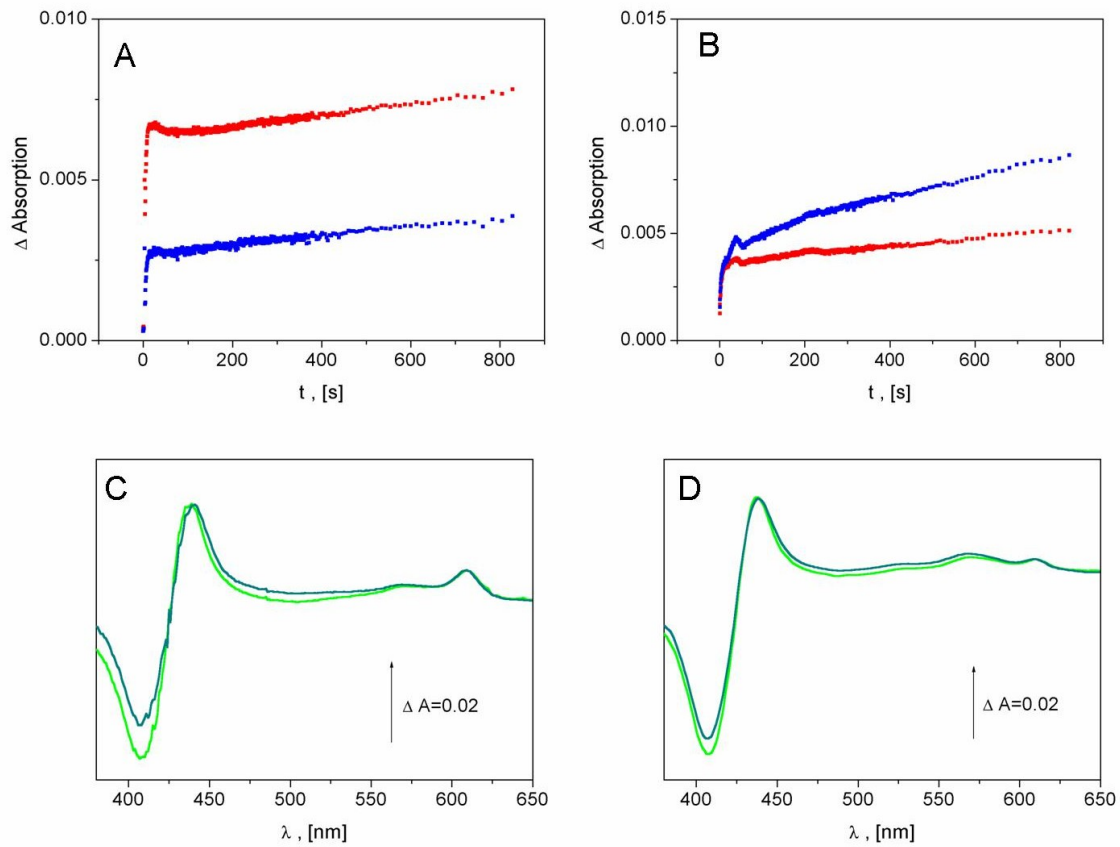
Wasserstoffperoxid verursachten unspezifischen Nebenreaktionen noch gering. Eine Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration führt zu einer Verstärkung dieser Nebenreaktionen, jedoch nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute an Oxoferrylintermediaten. Eine Ausnahme von dieser Regel zeigte sich jedoch bei den in Abschnitt 3.5.1.3 beschriebenen Wasserstoffperoxidexperimenten mit den D-Weg-Varianten D124N und Y35F.

Die **Variante Y35F** reagiert mit 50  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid bei pH 9 zu 8 %  $\text{P}_\text{M}$ -Intermediat. Eine Umwandlung von  $\text{P}_\text{M}$  zu F findet unter diesen Bedingungen nicht statt (siehe Abbildung 16).

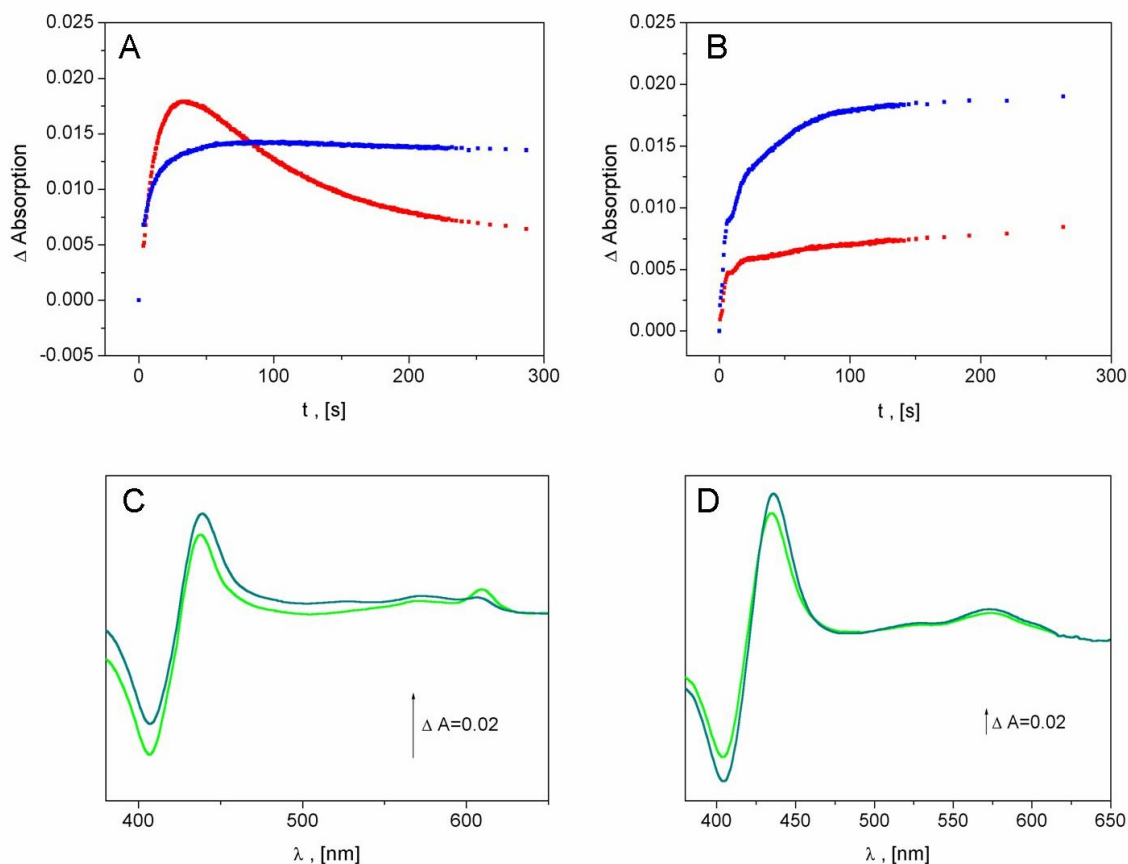
Nach einem pH-Sprung auf pH 6 bilden sich zu Beginn des Experimentes 3 %  $\text{P}_\text{M}$ -Intermediat. Anschließend kommt es zu einer Verschiebung des 610 nm Maximums nach 607 nm und zu einem Anstieg der Maxima bei 565 nm und 520 nm sowie zu einer Verschiebung des 438 nm Maximums nach 442 nm. Dies deutet darauf hin, dass es nach längerem Verlauf der Reaktion bei niedrigem pH nicht zur Bildung des F-Intermediates, sondern zu einer teilweisen Reduktion der Häme kommt.

Nach Reaktion mit Wasserstoffperoxid bei pH 9 bildet die **Variante Y167F** 18 %  $\text{P}_\text{M}$ -Zustand (siehe Abbildung 17). Diese Ausbeute ist erheblich höher als die Ausbeute von 8 %, welche bei Experimenten, die in Anwesenheit von Chlorid durchgeführt wurden, erzielt werden konnte. Der Anstieg des Maximums bei 575 nm deutet darauf hin, dass das F•-Intermediat in dieser Variante auch bei hohem pH stabil ist.

Bei niedrigem pH lässt sich bei der Variante Y167F unter den gegebenen Messbedingungen der  $\text{P}_\text{M}$ -Zustand nicht nachweisen. Es werden allerdings 36 % F• gebildet.



**Abbildung 16:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante Y35F mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . **A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\cdot$  bzw. F max. bei pH 9. **B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\cdot$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.



**Abbildung 17:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Y167F mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

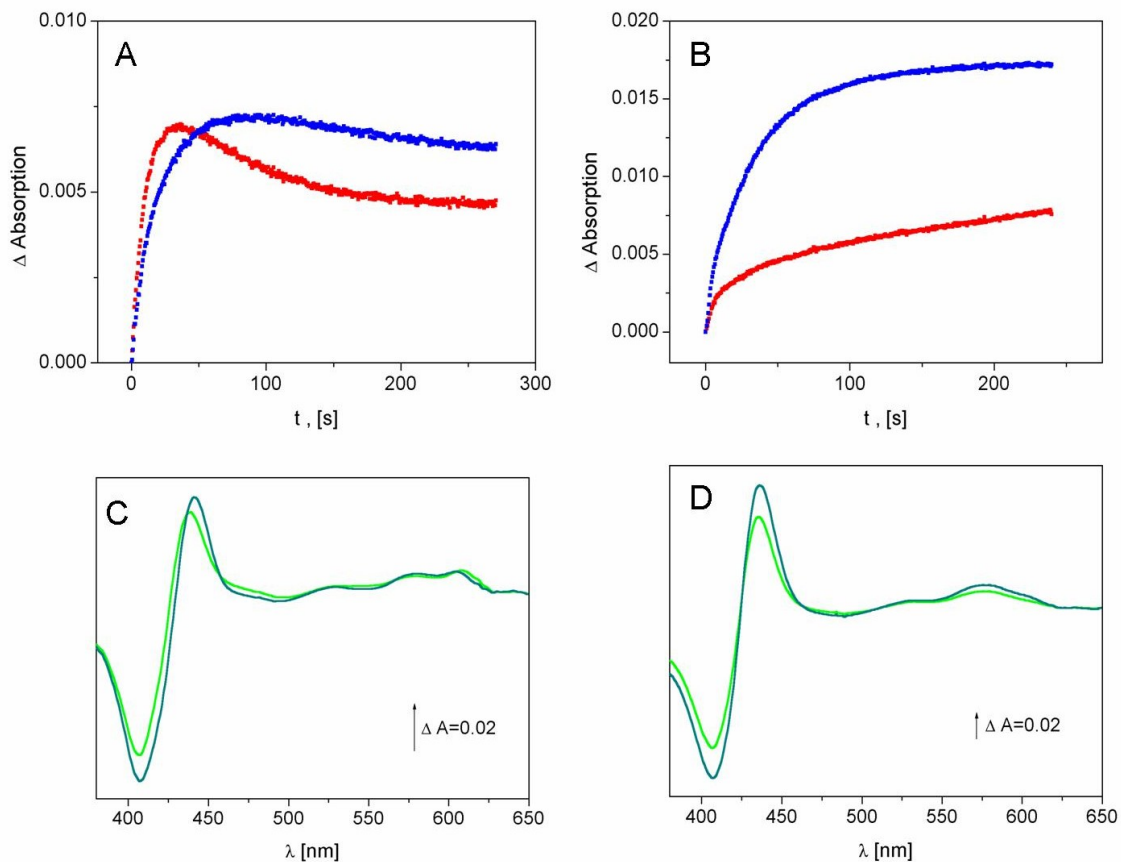
**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}^\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}^\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}^\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}^\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}^\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}^\bullet$  bzw. F max. nach einem pH-Sprung auf pH 6.

Die **Variante Y167W** zeigt eine deutlich geringere Reaktivität mit Wasserstoffperoxid als Y167F (siehe Abbildung 18). So kann bei pH 9 nur eine Ausbeute von 6 %  $\text{P}_\text{M}$ -Zustand erreicht werden. Außerdem kommt es im Unterschied zu Y167F trotz eines leichten Anstiegs des F-bzw.  $\text{F}^\bullet$ -Maximums im Bereich 575 bis 580 nm in Verlauf des Versuches zu einer Verschiebung des 610 nm Maximums nach 606 nm und einer Verschiebung des Maximums bei 436 nm nach 442 nm, was darauf hindeutet, dass in Y167W der Übergang vom  $\text{P}_\text{M}$ -Zustand zum F-Zustand teilweise gestört ist.

Wird das Wasserstoffperoxidexperiment bei niedrigem pH durchgeführt, so ist bei Y167W genauso wie bei Y167F unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein  $\text{P}_\text{M}$ -Intermediat

nachzuweisen. Die Bildung des F•-Zustandes ist bei einer Ausbeute von 40 % durch die Mutation Y167W nicht beeinträchtigt.

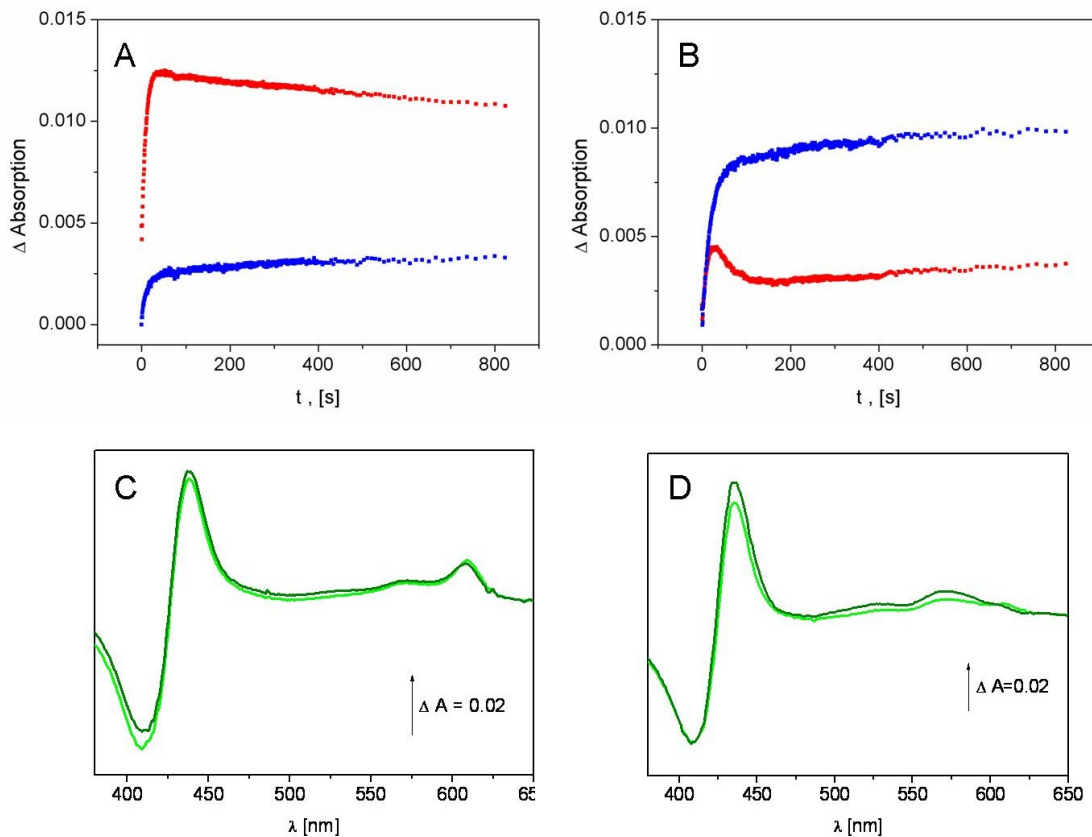


**Abbildung 18:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertem Variante Y167W mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

Beim Wasserstoffperoxidexperiment mit der **Variante Y267F** ist der  $P_M$ -Zustand bei insgesamt geringer Ausbeute (11 %) bei pH 9 sehr stabil. Es kommt nicht zur Bildung des F-Zustandes. Im pH-Sprung Experiment mit dieser Tyrosin Variante entsteht, ähnlich wie beim Wildtyp-Enzym, zunächst eine kleine Menge  $P_M$  und darauf folgend 19 %  $F^\bullet$ - bzw. F-Intermediat.



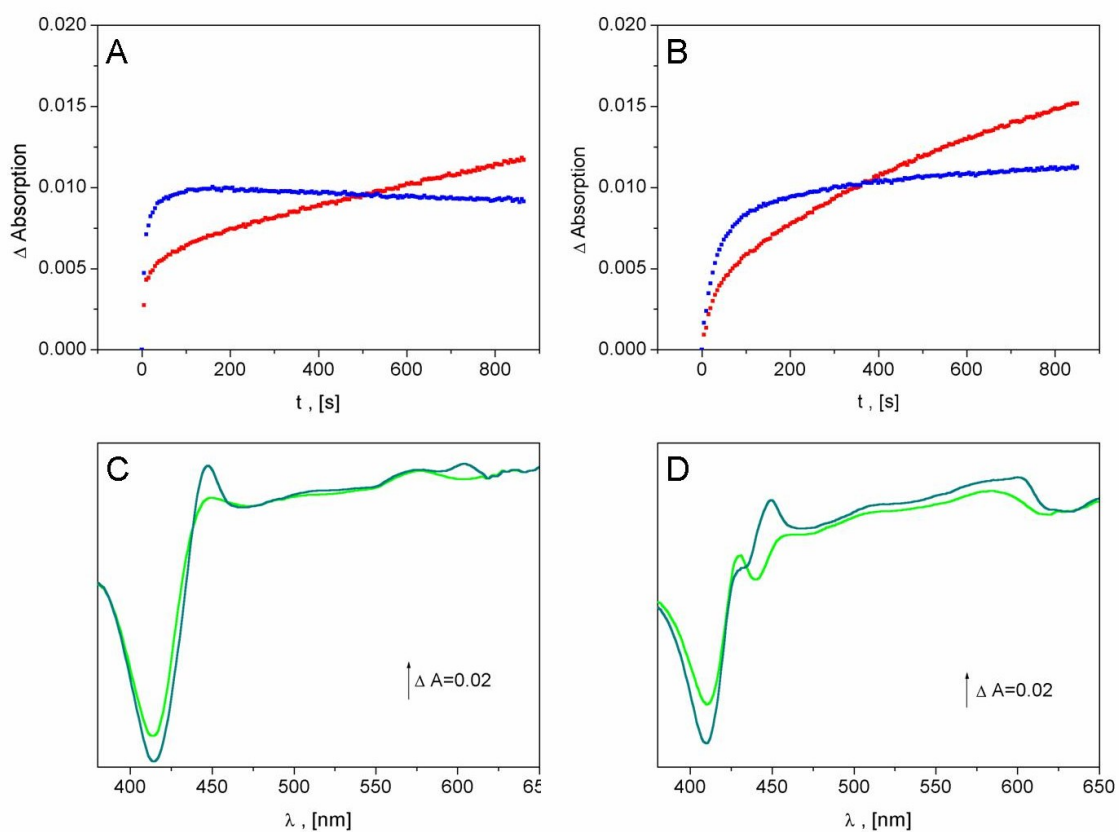
**Abbildung 19:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante Y267F mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F^\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F^\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F^\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F^\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F^\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F^\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

Bei der **Variante Y280H** ist die Bildung von Oxoferrylintermediaten unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht möglich (siehe Abbildung 20). Sowohl bei pH 9 als auch nach dem pH-Sprung auf

pH 6 kommt es zwar zunächst zu einem Anstieg des 575 nm Maximums, was ein Anzeichen für die Bildung des F•- oder/und F-Zustandes sein könnte. Allerdings weist das Differenzspektrum statt eines Maximums bei 438 nm ein Maximum bei 448 nm auf. Im weiteren Verlauf des Experimentes entsteht ein Maximum bei 604 nm. Dies ist ein Indiz dafür, dass es bei Y280H zu einer teilweisen Reduktion des Enzyms kommt.



**Abbildung 20:** Reaktion von 10 µM vollständig oxidiertem Variante Y280H mit 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

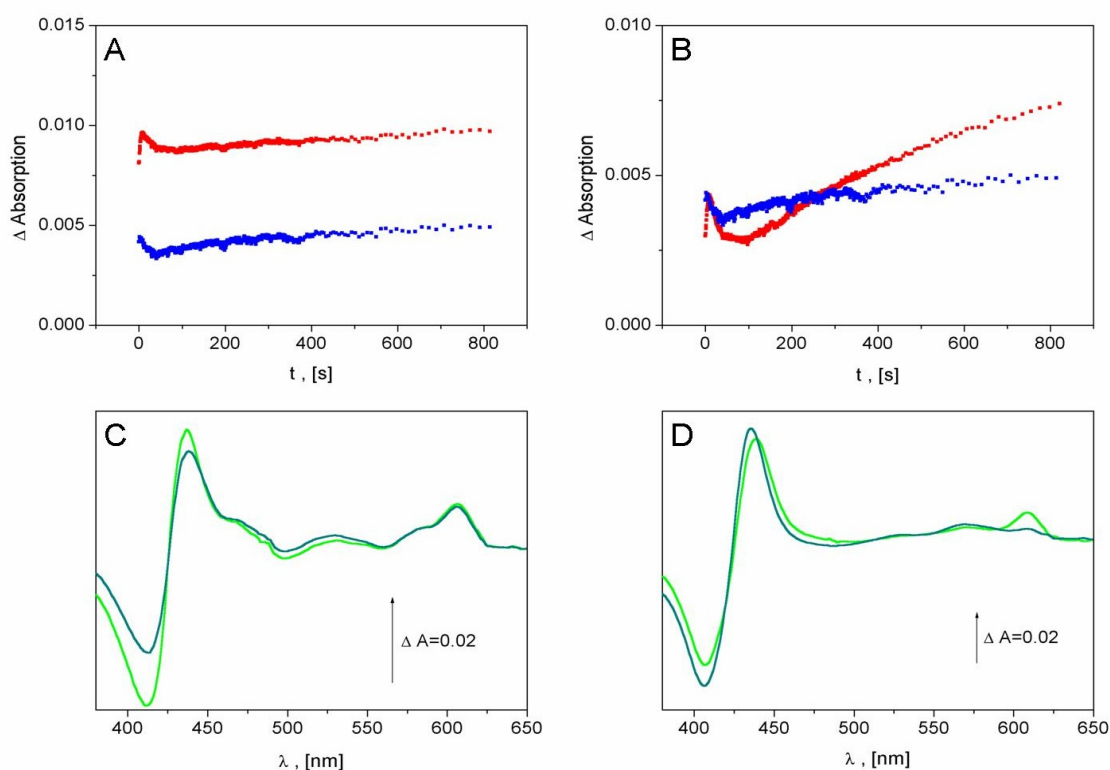
**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von P<sub>M</sub> bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw. F• als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:** P<sub>M</sub>-minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt P<sub>M</sub> max. und F• bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt F• bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von P<sub>M</sub> nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw. F• als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:** P<sub>M</sub>-minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt P<sub>M</sub> max. und F• bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt F• bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.



Die **Variante Y328F** bildet bei pH 9 geringe Mengen an  $P_M$ -Intermediat (9 %). Die 570 nm Schulter des  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrums ist jedoch nach 580 nm verschoben, was eventuell ein Anzeichen für die Anwesenheit kleiner Mengen des F-Intermediates sein könnte, oder aber eine charakteristische Eigenschaft des  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum dieser Tyrosinvariante ist. Während der gesamten Dauer des Experimentes ändert sich das Differenzspektrum nicht. Es kommt nicht zu einer Anreicherung von F.

Nach dem pH-Sprung auf pH 6 bilden sich zunächst kleine Mengen an  $P_M$  und  $F\bullet$ . Diese sind aber so instabil, dass es im weiteren Verlauf des Versuchs zu unspezifischen Reaktionsprodukten kommt, was an der Verschiebung des 610 nm Maximums nach 604 nm und des 575 nm Maximums nach 567 nm zu erkennen ist (siehe Abbildung 21).

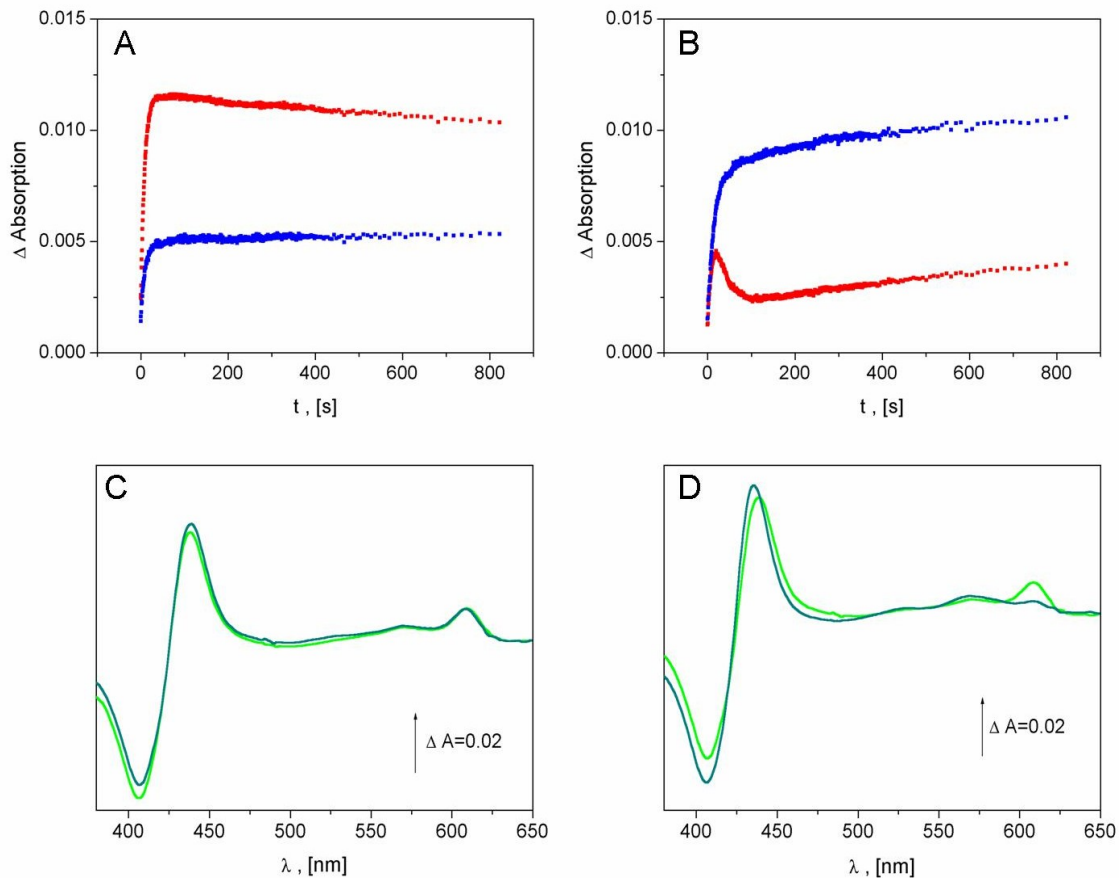


**Abbildung 21:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante Y328F mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

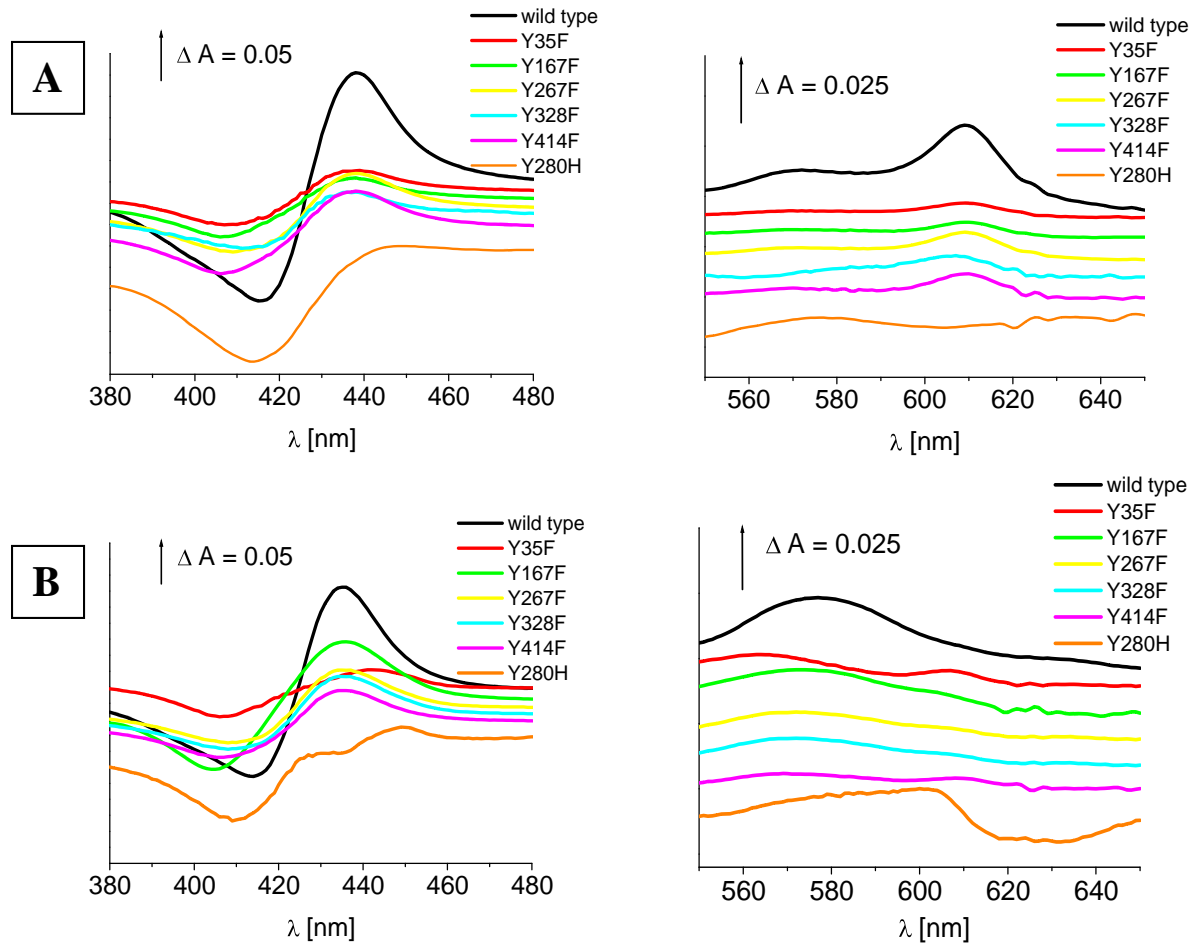
**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

Die **Variante Y414F** bildet bei hohem pH 12 % stabiles  $P_M$ -Intermediat. Es kommt nicht zur Umwandlung von  $P_M$  nach F. Bei pH 6 bilden sich  $P_M$  und  $F\bullet$  (19 %). Insgesamt verhält sich Y414F sehr ähnlich wie die Variante Y267F (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante Y414F mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .  
**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve).  
**C:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.  
**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve).  
**D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.



**Abbildung 23:** Tyrosinvarianten und Wildtyp CcO im Vergleich. Optische Differenzspektren von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase und den Tyrosinvarianten. (A) Maximale Ausbeute an  $P_M$ -Intermediat nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu 10  $\mu\text{M}$  CcO bei pH 9. (B) Maximale Ausbeute an  $F^\bullet$ -Intermediat nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu 10  $\mu\text{M}$  CcO nach einem pH-Sprung auf pH 6.

### 3.3.4. Untersuchung der Tyrosin Varianten mit Hilfe der paramagnetischen Elektronenresonanz-Spektroskopie (EPR)

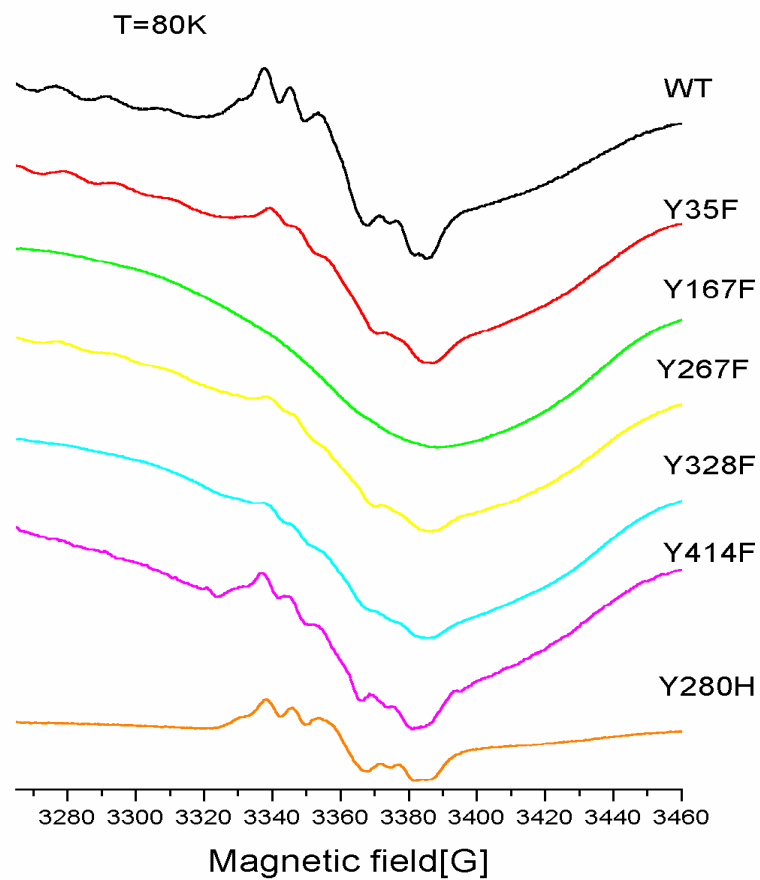
Um den Ursprungsort des bei der Reaktion von Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid zu beobachtenden Tyrosinradikals zu klären, werden EPR-Spektren der Tyrosinvarianten Y35F, Y167F, Y267F, Y280H, Y328F und Y414F aufgenommen (siehe Abbildung 24). Die Messungen erfolgen sowohl bei pH 9 (Entstehung der P<sub>M</sub>-Intermediates) als auch nach einem pH-Sprung auf pH 6 unmittelbar vor der Wasserstoffperoxidzugabe (Entstehung des F•-Intermediates). Dabei zeigt sich eindeutig, dass sich das Tyrosinradikal bei der Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase und bei allen Tyrosinvarianten, außer der Variante Y167F, sowohl im P<sub>M</sub>- als auch im F•- Intermediat nachweisen lässt. Daraus lässt sich folgern, dass der Ursprung des Tyrosinradikals, nicht Tyrosin 280 ist, sondern Tyrosin 167, welches 13,6 Å von Häm *a*<sub>3</sub> und 10,6 Å von Cu<sub>B</sub> entfernt ist (Abbildung 15).

Eine weitere Bestätigung dieses Ergebnisses ist ein Vergleich zwischen den dihedralen Winkeln, die anhand der EPR-Daten für das Tyrosinradikal ermittelt werden können, mit den dihedralen Winkeln der Tyrosine, die sich aus der Röntgenstruktur (PDB Datenbank:1 QLE 4) bestimmen lassen. Der dihedrale Winkel ist definiert als der Winkel zwischen den β-Methyl-Protonen H<sub>β1</sub> und H<sub>β2</sub> und der Normalen zur Ringplanaren (entspricht der Ausrichtung des P<sub>z</sub>-Orbitals) der Tyrosinkopfgruppe. Das Vorzeichen des dihedralen Winkels ist davon abhängig, ob er im Uhrzeigersinn (positives Vorzeichen) oder gegen den Uhrzeigersinn (negatives Vorzeichen) im Verhältnis zum P<sub>z</sub>-Orbital des Tyrosinringes verschoben ist. Die isotropische Kopplung der β-Methyl-Protonen (*A*<sub>iso</sub>) lässt sich aus dem EPR-Spektrum ermitteln. Aus diesem Wert und aus der Spindichteverteilung am C<sub>4</sub>-Kohlenstoffatom ( $\rho^{\pi}_{C4}$ ), sowie den empirischen Konstanten *B*' und *B*'' lässt sich der dihedrale Winkel  $\theta$  mit folgender Gleichung berechnen:

$$A_{iso}(H_{\beta}) = \rho^{\pi}_{C4} (B' + B'' \cos^2 \theta)$$

Ein Vergleich der für das Tyrosinradikal mittels EPR-Spektroskopie bestimmten Winkel von  $\theta_1 = 20 \pm 5^\circ$  und  $\theta_2 = 140 \pm 3^\circ$  zeigt die beste Übereinstimmung mit den aus der Röntgenstruktur ermittelten Winkeln für Tyrosin 167 von 20,8 bzw. 138,1° (siehe Tabelle 4).

Sämtliche EPR-Spektren wurden von Dr. Fraser MacMillan (Arbeitsgruppe Prof. Prisner, Institut für physikalische und theoretische Chemie, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M.) aufgenommen und ausgewertet.



**Abbildung 24:** EPR-Spektren des Tyrosinradikals nach Behandlung von Wildtyp und Tyrosinvarianten der Cytochrom *c* Oxidase mit stöchiometrischen Mengen an Wasserstoffperoxid. Versuchsbedingungen: 0,1 mW, 12,5 kHz, 80K.

Tyrosin	Dihedraler Winkel		Abstand [Å]	
	$\theta_1$	$\theta_2$	zu Fe $a_3$	zu Cu <sub>B</sub>
Y280	61,1°	-57,8°	5,3	5,0
Y328	58,7°	186,7°	10,7	9,3
Y167	20,8°	138,1°	13,6	10,7
Y407	-68,9°	49,9°	10,7	14,3
Y339	64,6°	-55,9°	15,9	12,7
Y267	-57,6°	61,6°	18,0	14,7
Y414	85,7°	-33,8°	14,8	19,3
Y406	85,5°	-33,7°	17,0	19,2
Y93	63,7°	-54,9°	24,0	28,2
Y35	-81,2°	37,3°	25,2	24,1
<b>Erwartetes Ergebnis</b>	20°±5°	140°±3°	-	-

**Tabelle 4:** Orientierung der Methylprotonen der Tyrosine ermittelt aus der Kristallstruktur (PDB file 1QLE 4). und Abstand des Tyrosin-Carbonylsauerstoffes zum Häm  $a_3$  Eisen bzw. zu Cu<sub>B</sub> in Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* (Daten entnommen aus Budiman *et al.*, 2004).

### 3.3.5. Protonenpumpexperimente

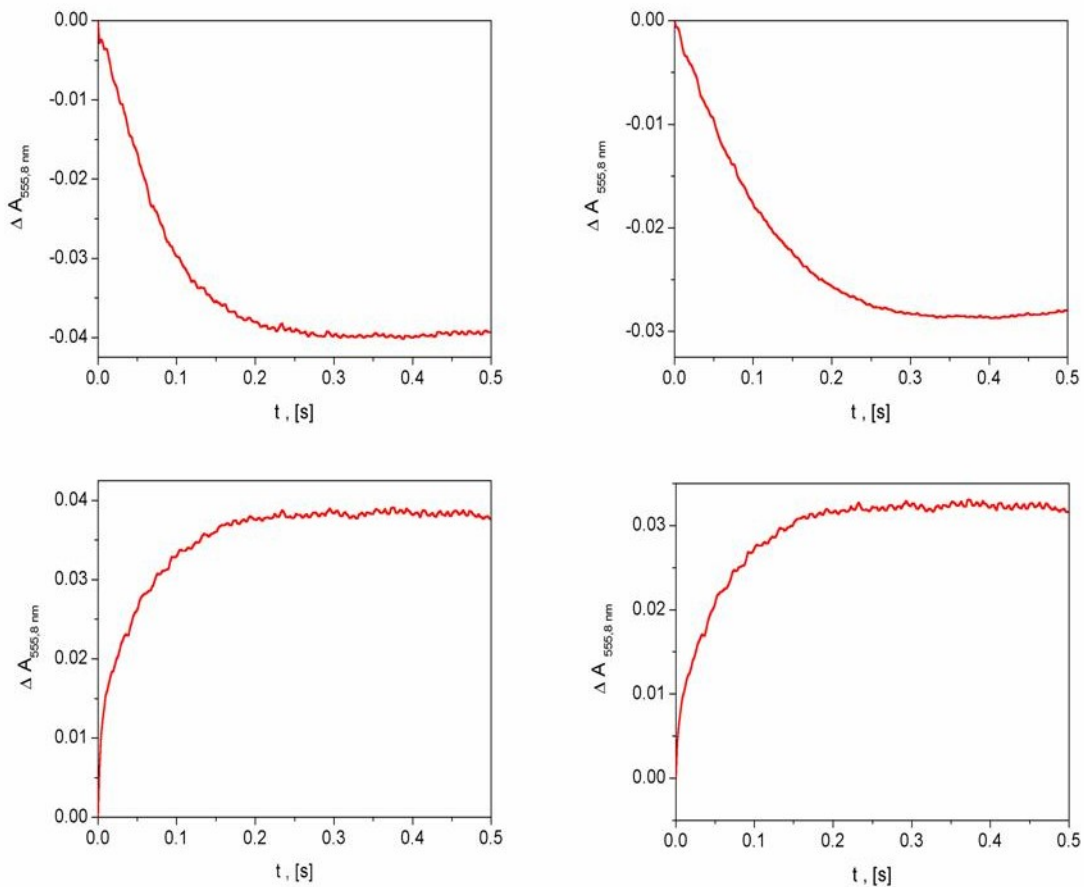
Zur Bestimmung der Protonenpumpaktivität der Cytochrom *c* Oxidase wird das Enzym in Proteoliposomen in einem schwach gepufferten Medium rekonstituiert und mit dem pH-Indikator Phenolrot versetzt. Startet man die katalytische Reaktion durch schnelles Mischen der Proteoliposomen mit reduziertem Cytochrom *c*, so werden Protonen von der Innenseite der Proteoliposomen auf die Außenseite gepumpt, was als Ansäuerung des Außenmediums durch einen Absorptionsabfall des Phenolrots gemessen werden kann.

Durch den von Valinomycin vermittelten Einstrom von Kalium-Ionen in die Proteoliposomen wird die Bildung elektrischer Spannung verhindert, die einem dauerhaften Protonenpumpen der Cytochrom *c* Oxidase Moleküle entgegenwirken würde. Die Messung der Ansäuerung des Außenmediums bei Durchführung des Protonenpumpexperimentes im gekoppelten Zustand ist daher ein Maß für die Fähigkeit der Cytochrom *c* Oxidase Protonen zu translozieren.

Gibt man zu den Proteoliposomen den Entkoppler CCCP hinzu, so werden diese durchlässig für Protonen. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem Absorptionsanstieg des pH-Indikators.

Zur Alkalisierung des Außenmediums kommt es dadurch, dass Protonen im Inneren der Proteoliposomen für die Wasserbildung verbraucht werden, was einen Einstrom von Protonen vom Außenmedium ins Innere der Proteoliposomen bewirkt.

Da für die Redoxchemie am binuklearen Zentrum pro Reaktionszyklus vier Elektronen für die Reaktion der vier chemischen Protonen mit dem Sauerstoff benötigt werden, lässt dieses Experiment einen Rückschluss auf die Anzahl der Elektronen zu, die pro Reaktionszyklus für die Wasserbildung verbraucht werden. Das Verhältnis der Amplituden des Absorptionsabfalls bzw. -anstiegs in beiden Experimenten gibt an, wie viele Protonen pro Elektron gepumpt werden. Bei Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase liegt dieses Verhältnis bei  $1 \text{ H}^+$  pro  $1 \text{ e}^-$ . Auch bei den Varianten Y167F (siehe Abbildung 24) und Y328F (Daten nicht gezeigt) ließ sich keine verringerte Protonenpumpaktivität im Vergleich zum Wildtyp feststellen.



**Abbildung 25:** Protonenpumpexperiment mit in Proteoliposomen rekonstituierter Cytochrom *c* Oxidase: **A)** Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase: Absorptionsabfall von Phenolrot auf Grund der Ansäuerung des Außenmediums im gekoppelten Zustand. **B)** Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase: Absorptionsanstieg von Phenolrot auf Grund der Alkalisierung des Außenmediums im entkoppelten Zustand. **C)** Variante Y167F: Absorptionsabfall von Phenolrot auf Grund der Ansäuerung des Außenmediums im gekoppelten Zustand. **D)** Variante Y167F: Absorptionsanstieg von Phenolrot auf Grund der Alkalisierung des Außenmediums im entkoppelten Zustand.



### 3.3.6. Untersuchung der Variante Y167F mit FTIR-Spektroskopie

Mittels FTIR-Spektroskopie können redoxinduzierte Absorptionsänderungen von Aminosäureseitenketten der Cytochrom *c* Oxidase nachgewiesen werden. Ändert sich während der Redoxreaktion das Dipolmoment einer Aminosäure z. B. durch deren Protonierung oder Deprotonierung, so ändert sich auch die Schwingungsfrequenz der Aminosäure und damit deren Absorption. Durch Experimente mit Varianten oder durch Isotopenmarkierung konnten den verschiedenen Aminosäureseitenketten der Cytochrom *c* Oxidase charakteristische Absorptionsbanden zugeordnet werden.

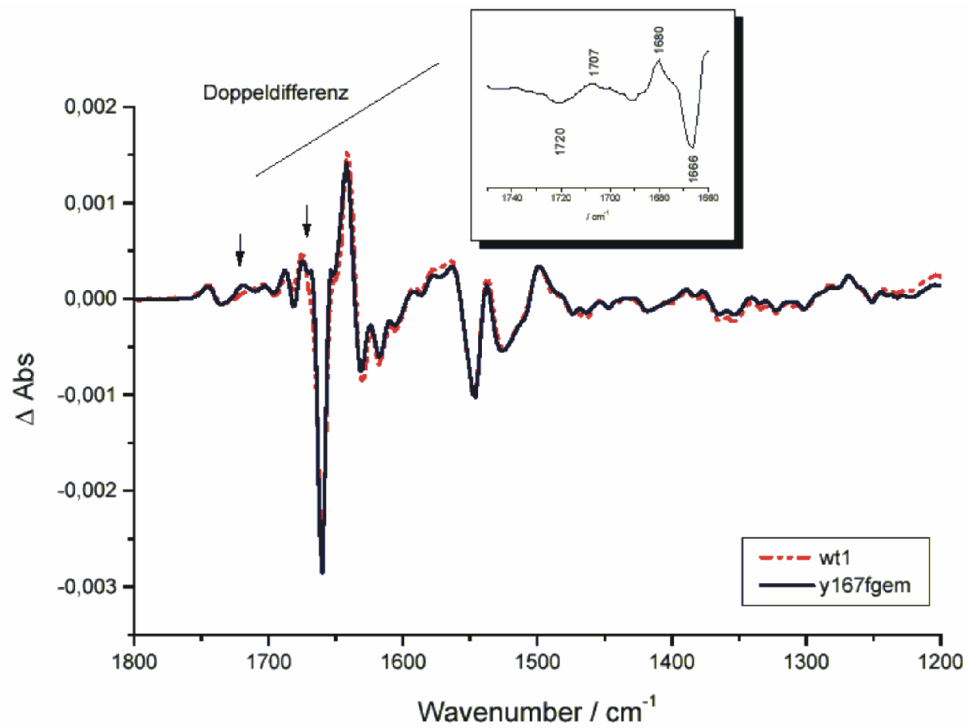
Daher ist es möglich Protonierungsänderungen von Aminosäuren der Variante Y167F im Verlauf eines Redoxzyklus mit denen des Wildtyps zu vergleichen.

In Abbildung 26 sind FTIR-Differenzspektren von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase und der Variante Y167F dargestellt.

Das Differenzspektrum von Y167F weist einige kleine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf.

Die Signale bei  $1720 / 1707 \text{ cm}^{-1}$  können ausschließlich auf protonierte Aspartat- und Glutamatseitenketten zurückgeführt werden. Aus den Änderungen, die bei der Variante Y167F im Vergleich zum Wildtyp auftreten, kann daher geschlossen werden, dass es im varianten Enzym im Laufe eines Redoxzyklus zur Deprotonierung eines Aspartates oder Glutamates kommt. Die Verschiebungen bei  $1680 / 1666 \text{ cm}^{-1}$  könnten auf die Änderungen bei den Häm-Propionaten hindeuten.

Die FTIR- Experimente wurden von Dr. Petra Hellwig am Institut für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.



**Abbildung 26:** FTIR-Differenzspektren bei pH 7 von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (rote gestrichelte Linie) und der Variante Y167F (schwarz).

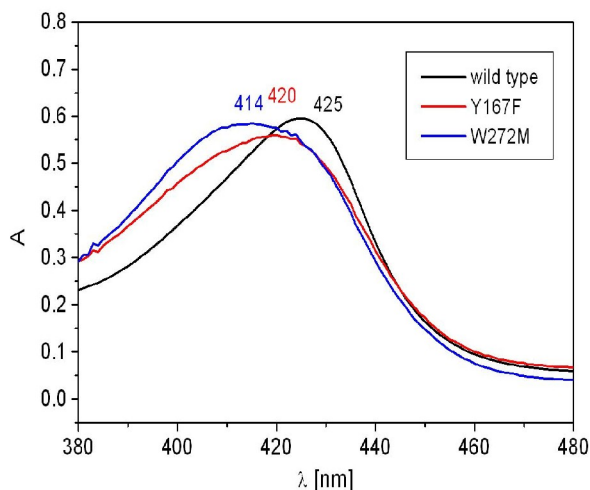
### 3.4. Die Variante W272M

Obwohl das EPR-Signal, das nach der Behandlung von Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid auftritt, eindeutig dem Tyrosin 167 zugeordnet wurde, konnte die Frage, ob dieses Tyrosin wirklich das „fehlende“ Elektron im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase liefert, nicht geklärt werden. Einerseits wird kein EPR-Signal beobachtet, wenn das binukleare Zentrum mit Cyanid blockiert wird, andererseits sollte die Mutation einer Aminosäure, die von zentraler Bedeutung für den Mechanismus der Cytochrom *c* Oxidase ist, die Aktivität des Enzyms drastisch reduzieren. Auch ist es überraschend, dass in der Variante Y167F der P→F-Übergang immer noch möglich ist. Es besteht somit die Möglichkeit, dass Y167 an der Bereitstellung des Elektrons nur indirekt beteiligt ist. Dadurch rücken andere potentiell elektronenliefernde Aminosäuren in der Umgebung von Y167 ins nähere Interesse.

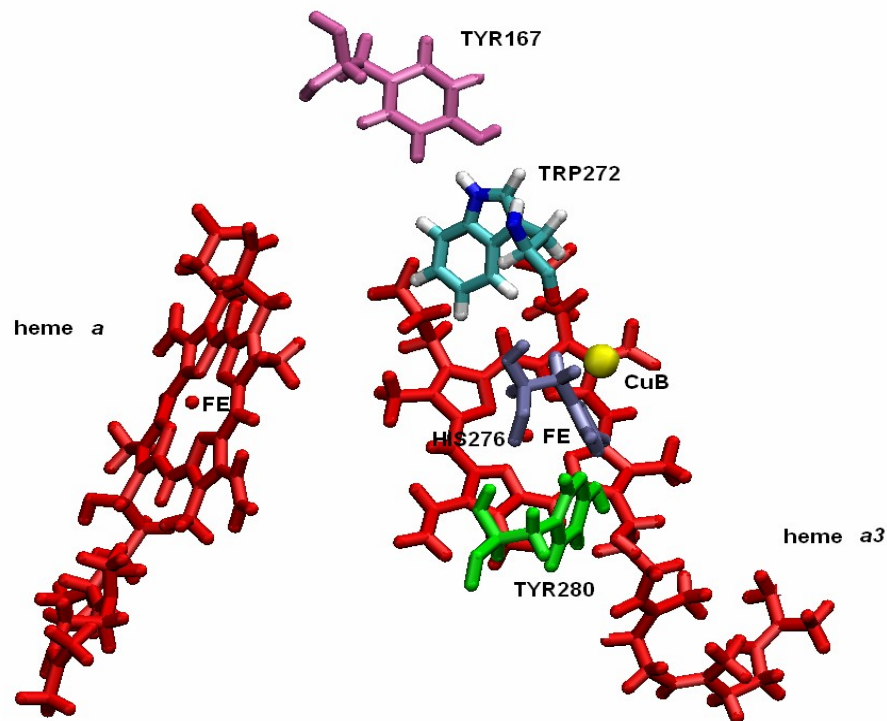
Eine dieser Aminosäuren ist das Tryptophan 272 (siehe Abbildung 28). Es liegt nur circa. 3 Å von Tyrosin 167 und 8,5 Å vom Häm  $a_3$  Eisen entfernt.

Wird Tryptophan 272 zu einem Methionin mutiert, zeigt dies drastische Auswirkungen auf die katalytische Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase mit reduziertem Cytochrom *c*. So kann bei Aktivitätstests mit dieser Variante nur 1,5 % der Wildtypaktivität nachgewiesen werden.

Auch das VIS-Spektrum der zuvor mit Ferricyanid vollständig oxidierten Variante W272M weist deutliche Veränderungen gegenüber dem Wildtypspektrum auf. So ist bei der Variante das Soretmaximum um 9 nm kurzwellig verschoben. (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Vergleich der Soretmaxima der vollständig oxidierten Absorptionsspektren von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (schwarz) und den Y167F (rot) und W272M (blau) unter chloridfreien Bedingungen. Puffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 8, 1 mM EDTA, 0,05 % LM.



**Abbildung 28:** Veranschaulichung der Position von Tryptophan 272 im Verhältnis zu Tyrosin 167 und dem Histidin 276 Tyrosin 280 Crosslink. Häm *a* (rot) und binukleares Zentrum der Cytochrom *c* Oxidase (Häm *a*<sub>3</sub> (rot), Cu<sub>B</sub> (gelb)).

### 3.4.1. Die Reaktion der Variante W267M mit Wasserstoffperoxid

Die Fähigkeit der Variante W272M Oxoferryllintermediate zu bilden wird durch die Reaktion des Enzyms mit Wasserstoffperoxid untersucht.

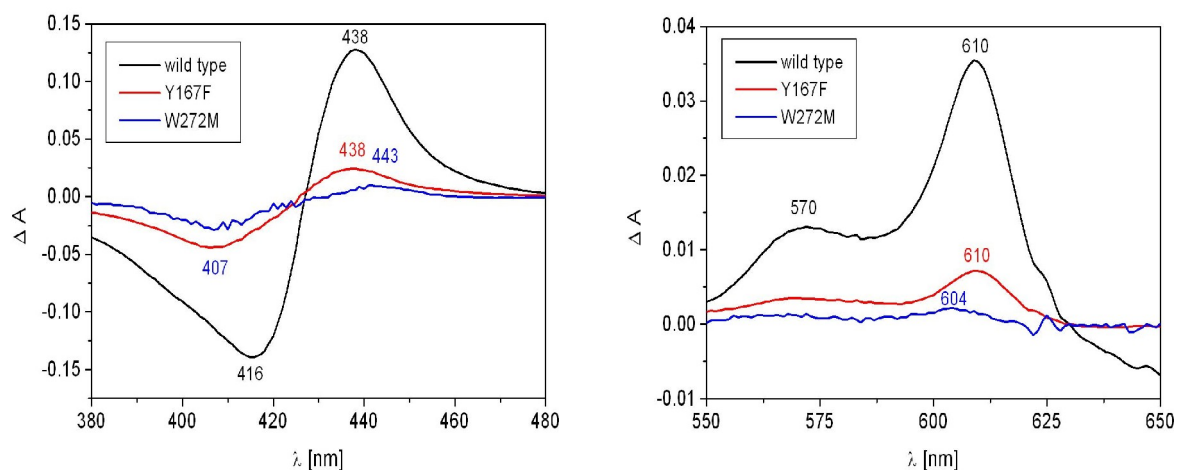
Abbildung 29 zeigt einen Vergleich der maximalen Ausbeuten an P<sub>M</sub>-Intermediat von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (schwarz) mit den Varianten Y167F (rot) und W272M (blau) nach Zugabe eines fünffachen Überschusses an Wasserstoffperoxid bei pH 9. Während sowohl der Wildtyp als auch die Variante Y167F, wenngleich in geringerem Ausmaß, das für den P<sub>M</sub>-Zustand charakteristische 610 nm Maximum im P<sub>M</sub>-minus-O-Differenzspektrum

aufweisen und auch im Soretbereich des Spektrums weitestgehend übereinstimmen, zeigt das Differenzspektrum der Variante W272M deutliche Abweichungen.

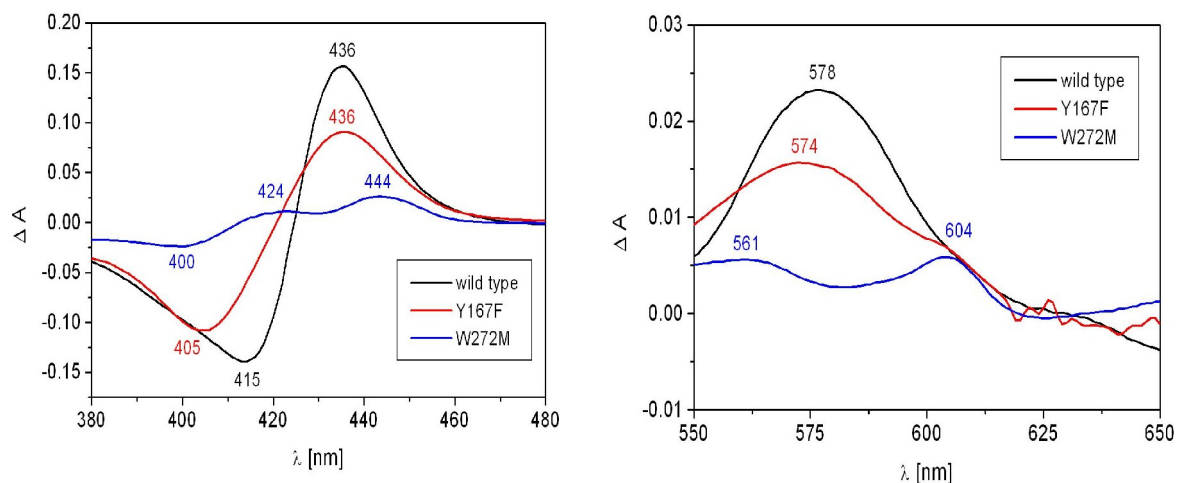
Bei insgesamt äußerst geringer Reaktivität mit Wasserstoffperoxid liegt das  $\alpha$ -Maximum des Differenzspektrums der Variante W272M bei 604 nm. Das Soretmaximum ist nach 443 nm verschoben. Diese Werte weichen deutlich von den für den  $P_M$ -Zustand charakteristischen Wellenlängen ab und sprechen eher für schwache Teilreduzierung des Enzyms.

Vergleicht man die maximalen Ausbeuten an  $F^\bullet$ -Intermediaten bei Zugabe von Wasserstoffperoxid nach einem pH-Sprung auf pH 6, so sehen die Ergebnisse für Wildtyp Oxidase und die beiden Varianten ähnlich aus wie bei pH 9 (siehe Abbildung 30). Während der Wildtyp und die Variante Y167F eindeutig den  $F^\bullet$ -Zustand mit Maxima bei 578 nm bzw. 574 nm bilden, weist das Differenzspektrum der Variante W272M deutliche Unterschiede auf. Bei insgesamt sehr geringer Reaktivität des Enzyms mit Wasserstoffperoxid liegen die Maxima im  $\alpha$ -Bereich des Spektrums bei 604 und 561 nm. Im Soretbereich sind zwei Maxima zu erkennen, eines bei 444 nm und ein weiteres bei 424 nm. Das Maximum bei 424 nm konnte auch im Cyanidbindungsspektrum von W272M (siehe Abschnitt 3.4.3) nachgewiesen werden.

Insgesamt lässt sich aus diesen Messungen folgern, dass die Variante W272M unter den Standardversuchsbedingungen (Verhältnis von Cytochrom *c* Oxidase zu Wasserstoffperoxid: 1:5) weder bei hohem noch bei niedrigem pH-Wert in der Lage ist, die Oxoferryllintermediate  $P_M^-$ ,  $F^\bullet$ - und F zu bilden.



**Abbildung 29:** Maximale Ausbeute an  $P_M$ -Intermediat bei pH 9:  $P_M$  minus O-Differenzspektren von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (schwarz), Y167F (rot) und W272M (blau) nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid zu 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertem Enzym.



**Abbildung 30:** Maximale Ausbeute an F•-Intermediat nach pH-Sprung auf pH 6: F• minus O-Differenzspektren von Wildtyp Cytochrom c Oxidase (schwarz), Y167F (rot) und W272M (blau) nach Zugabe von 50 µM Wasserstoffperoxid zu 10 µM vollständig oxidiertem Enzym.

### 3.4.2. EPR-spektroskopische Experimente mit der Variante W272M

Genauso wie bei den in Abschnitt 3.3.4. beschriebenen Tyrosinvarianten werden mit der Variante W272M EPR-Messungen durchgeführt. Dabei soll untersucht werden, ob das Tyrosinradikal, welches nach Wasserstoffperoxidzugabe bei Tyrosin 167 zu beobachten ist, durch die Mutation des nur 3 Å entfernten Tryptophan 272 beeinflusst wird.

Die Messungen zeigen, dass sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH-Wert das Radikal bei Tyrosin 167 nicht mehr auftritt (Daten nicht gezeigt). Auch kann kein anderes Radikalsignal nachgewiesen werden. Das Auftreten des Tyrosin-167-Radikals wird folglich durch die Mutation W267M vollständig unterbunden.

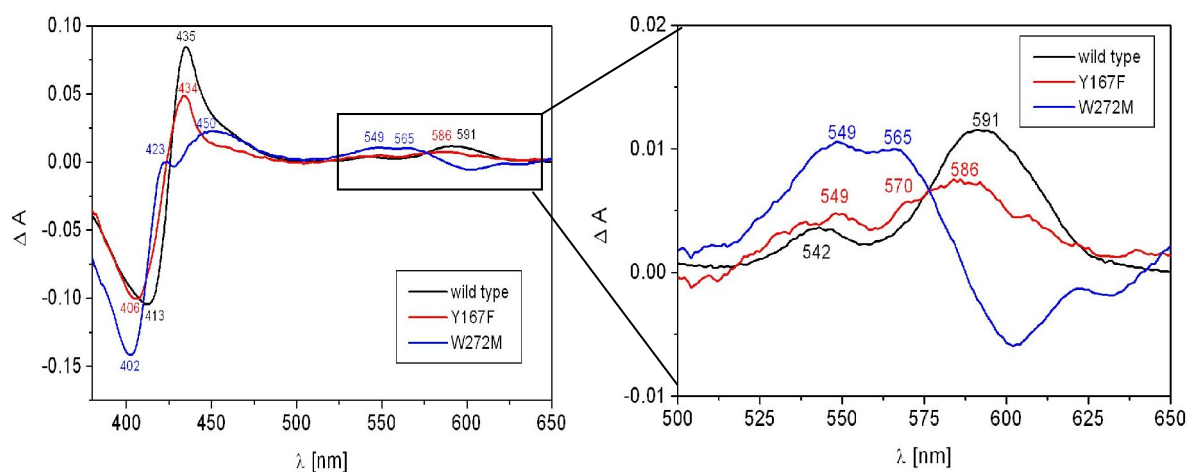
### 3.4.3 Cyanidbindungsspektren der Tyrosinvarianten und der Variante W272M

Inkubiert man vollständig oxidierte Cytochrom *c* Oxidase mit Kaliumcyanid, so bindet das Cyanidion dauerhaft am Häm  $a_3$  und fixiert dieses im oxidierten Zustand. Die Bindung des Cyanidions am Häm  $a_3$  ist durch das Auftreten eines 590 nm Maximums im ((Häm  $a_3$ -CN) minus O)- Differenzspektrum charakterisiert. Die Bindung des Cyanidions an das Häm  $a_3$  ist nach circa einer Stunde abgeschlossen.

In Abbildung 31 sind die Cyanid-Differenzspektren von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (schwarz) und den Varianten Y167F (rot) und W272M (blau) dargestellt. Während der Wildtyp eindeutig das charakteristische Maximum bei 591 nm aufweist, kommt es bei den beiden Varianten zu mehr oder weniger deutlichen Abweichungen.

Bei der Variante Y167F ist das Maximum deutlich kleiner und nach 586 nm hin verschoben, während das Maximum im Soretbereich des Spektrums einen ähnlichen Wert wie beim Wildtyp aufweist.

Das Cyanidbindungsspektrum der Variante W272M zeigt gravierende Abweichungen von dem des Wildtyps. Ein Maximum im Bereich von 590 nm ist nicht zu erkennen. Dafür ist ein breites Doppelmaximum bei 549 und 566 nm zu erkennen. Auch der Soretbereich des Spektrums weist starke Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Das Maximum bei 435 nm ist verschwunden. Stattdessen ist ein breites Maximum bei 450 nm und ein schmales bei 423 nm zu erkennen.



**Abbildung 31:** Cyanidbindungsdifferenzspektren von Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase (schwarz) und den Varianten Y167F (rot) und W272M (blau). Links: Differenzspektren zwischen 380 und 650 nm. Rechts: Vergrößerter Ausschnitt der  $\alpha$ -Region der Differenzspektren.

### **3.5. Erzeugung von Oxoferrylintermediaten in D- und K-Weg Varianten der Cytochrom c Oxidase**

#### 3.5.1 Die D-Weg Varianten D124N und Y35F

##### 3.5.1.1. Die Variante D124N

Aspartat 124 liegt in Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase am Beginn des D-Weges. Durch die Mutation D124N wird die Protonenaufnahme durch den D-Weg vollständig blockiert und somit die Protonenpumpaktivität unterbunden (Thomas *et al.*, 1993a; Fetter *et al.*, 1995).

Demnach müsste der Übergang vom P<sub>M</sub>- zum F-Intermediat in der Variante D124N deutlich beeinträchtigt sein.

Die Reaktion der Variante D124N mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid bei pH 9 führt zur Entstehung von 16 % P<sub>M</sub>-Intermediat. Unter diesen Versuchsbedingungen kann eine Bildung des F-Zustandes nicht nachgewiesen werden (Abbildung 32).

Auch bei pH 6 bildet sich bei D124N mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid nur der P<sub>M</sub>-Zustand (11 %). Allerdings kommt es sowohl bei pH 9 als auch bei pH 6 bei längerer Versuchsdauer zu einer charakteristischen Änderung des Absorptionsdifferenzspektrums. Aus der für den P<sub>M</sub>-Zustand typischen Schulter bei 570 nm wird ein 570 nm Maximum.

##### 3.5.1.2. Die Variante Y35F

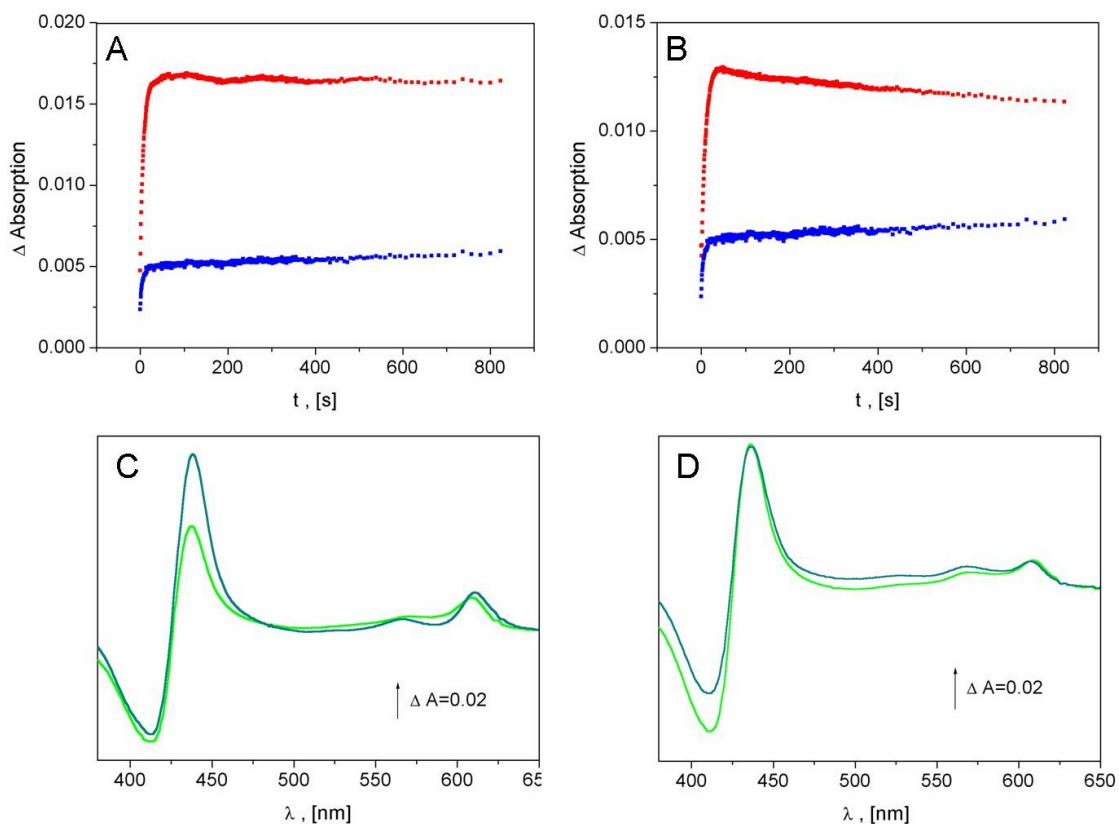
Tyrosin 35 ist genauso wie Aspartat 124 ein Teil des D-Weges. Es liegt jedoch in dessen oberen breiteren Bereich. Die Variante Y359F zeigt im Unterschied zur Variante D124N volle Protonenpumpaktivität (Pfitzner *et al.*, 1998), was die Vermutung nahe legt, dass die Passage von Protonen durch den D-Weg trotz der Mutation weiterhin möglich bleibt. Die katalytische Aktivität liegt bei 45 % des Wildtyps, was auf eine gewisse Beeinträchtigung der Redoxvorgänge in dieser Variante schließen lässt.

Bei pH 9 reagiert die Variante Y35F mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid zu 7 % P<sub>M</sub>-Intermediat. Genauso wie bei der Variante D124N kommt es unter diesen Bedingungen im weiteren Verlauf des Experimentes nicht zu zur Bildung des F-Zustandes.



Nach einem pH-Sprung auf pH 6 ist neben einem Maximum bei 610 nm (entspricht 3,5 %  $P_M$ -Zustand) ein deutlicher Anstieg des Maximums bei 570 nm, aber keine Verschiebung dieses Maximums in Richtung 575 nm zu erkennen. (siehe Abbildung 15, Abschnitt 3.3.3.)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei beiden D-Weg Varianten D124N und Y35F nach Zugabe eines fünffachen Überschusses an Wasserstoffperoxid sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH der Übergang vom  $P_M$ -Intermediat zum F- bzw.  $F\bullet$ -Zustand deutlich gehemmt ist.



**Abbildung 32:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante D124N mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

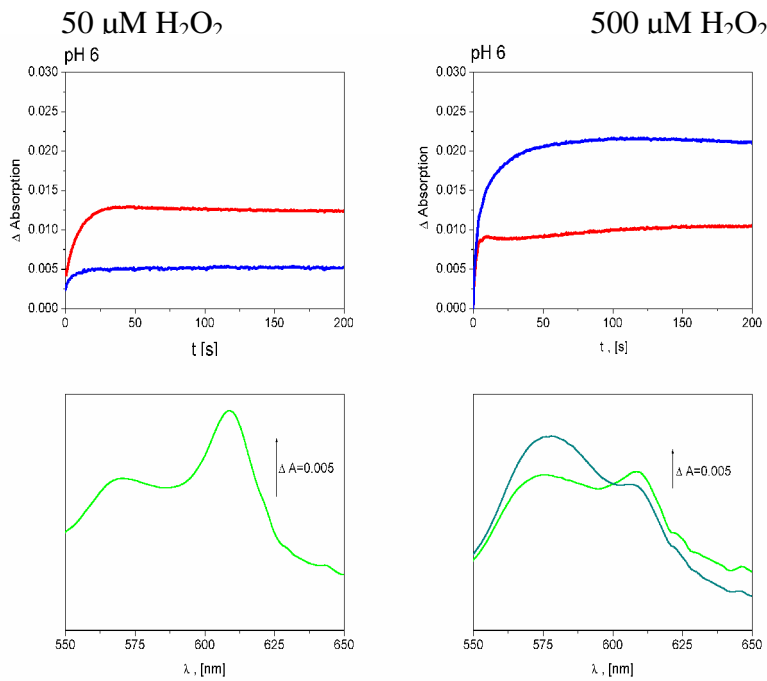
**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

### 3.5.1.3. Abhängigkeit der Bildung der Intermediate $F\bullet$ und F bei den D-Weg Varianten D124N und Y35F von der Wasserstoffperoxidkonzentration

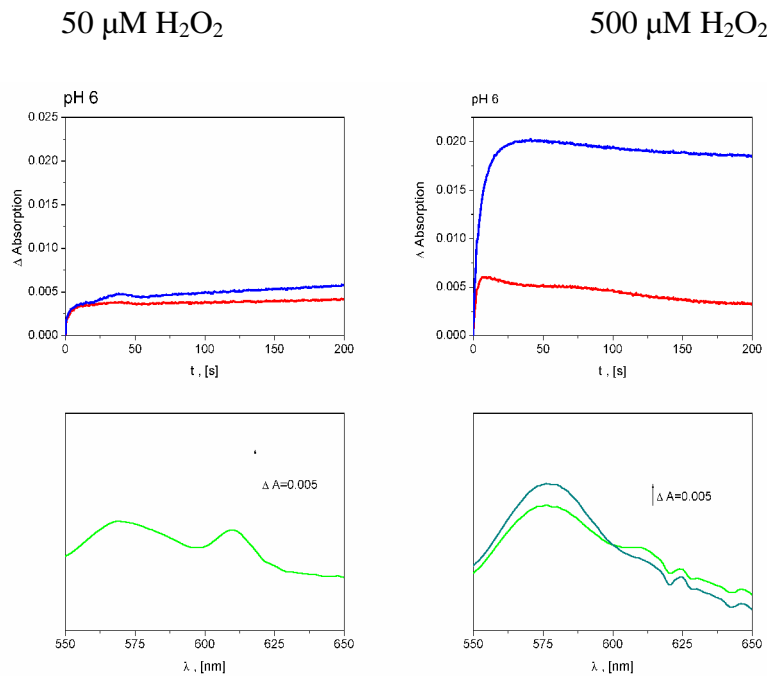
Ein interessantes Verhalten zeigen die D-Weg Varianten D124N und Y35F in der Reaktion mit verschiedenen hohen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid. Während beim Wildtyp-Enzym und auch bei der K-Weg Variante K354M bei einer Erhöhung der eingesetzten Wasserstoffperoxidmenge um den Faktor zehn keinerlei signifikante Änderungen in der Ausbeute der Reaktionsprodukte bei pH 6 zu beobachten ist, kommt es bei den beiden D-Weg Varianten zu einer drastischen Veränderung des Reaktionsverlaufes. In Abbildung 33 ist die Abhängigkeit der Bildung der Intermediate  $F\bullet$  und F bei den Varianten D124N und Y35F in Abhängigkeit von der eingesetzten Wasserstoffperoxidkonzentration dargestellt. Bei Zugabe eines fünfzigfachen Überschusses an Wasserstoffperoxid bilden sich maximal 42 % bzw. 38 %  $F\bullet$ -Intermediat, während die Bildung dieser Intermediate bei Zugabe eines fünffachen Peroxidüberschusses überhaupt nicht beobachtet werden kann.

Dieses Experiment zeigt, dass es bei hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen verstärkt zu protonenbildenden Nebenreaktionen kommen kann, die eventuell gravierende Auswirkungen auf das Resultat eines Experimentes und dessen Interpretierbarkeit haben können.

## Variante D124N:



## Variante Y35F:



**Abbildung 33:** Die Abhängigkeit der Bildung der Intermediate  $\text{F}^\bullet$  und F nach einem pH-Sprung auf pH 6 bei den D-Weg Varianten D124N (oben) und Y35F (unten) von der Wasserstoffperoxidkonzentration. Jeweils links: Reaktionsverlauf nach Zugabe von 50  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  zu 10  $\mu\text{M}$  Cytochrom c Oxidase. Jeweils rechts: Reaktionsverlauf nach Zugabe von 500  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  zu 10  $\mu\text{M}$  Cytochrom c Oxidase.

Der zeitliche Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  ist als Differenz von 610 minus 630 nm (rote Kurve) dargestellt und die Bildung von F bzw.  $\text{F}^\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve).  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}^\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}^\bullet$  bzw. F max.

#### 3.5.1.4. Die Variante N131D

Auch Aspartat 131 liegt im D-Weg der Cytochrom *c* Oxidase. Die Variante N131D zeigt jedoch ein sehr abweichendes Verhalten von den zuvor beschriebenen D-Weg Varianten.

So wurde gezeigt, dass die Aktivität dieser Variante mit reduziertem Cytochrom *c* bei 100 % liegt, die Protonenpumpaktivität aber vollständig unterbunden ist (Pfitzner *et al.* 2000). Die Variante N131D ist somit ein Beispiel für einen vollständig entkoppelten Phänotyp.

Bei Reaktion mit Wasserstoffperoxid bei hohem pH (siehe Abbildung 35) ist in N131D der  $P_M$ -Zustand sehr instabil. Bereits nach 200 Sekunden wandelt sich  $P_M$  vollständig in den F- bzw.  $F\bullet$ -Zustand um. Die Ausbeute an  $P_M$  und F ist bei diesem Experiment mit nur 5 % sehr gering.

Bei pH 6 lässt sich der  $P_M$ -Zustand unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachweisen. Es bildet sich direkt 24 %  $F\bullet$ -Intermediat. Bei längerem Reaktionsverlauf kommt es sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH-Wert zu unspezifischen Sekundärreaktionen, die auf Teilreduzierungen der Häm zurückgeführt werden können (Anstieg der 610 minus 630 nm Kurven).

#### 3.5.1.5. Die Variante E278Q

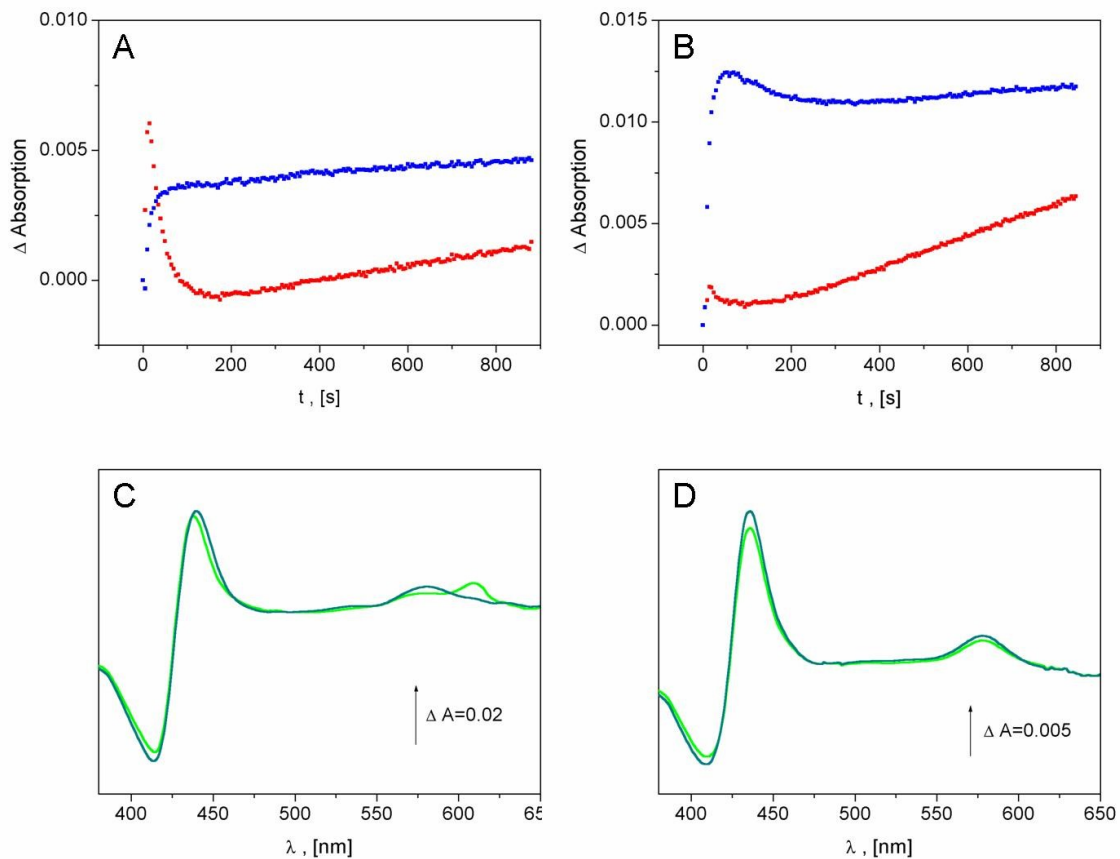
Glutamat 278 hat eine zentrale Bedeutung für die Funktion der Cytochrom *c* Oxidase. Es überträgt einerseits über den D-Weg aufgenommene Substratprotonen ins binukleare Zentrum. Andererseits ist es in der Lage durch einen Positionswechsel seiner funktionellen Seitenkette vektorielle Protonen in Richtung der Häm-Propionate zu transferieren (Pomès *et al.*, 1998; Hofacker und Schulten, 1998).

Der Austausch des Glutamats gegen ein Glutamin an dieser für den Protonenpumpprozess zentralen Schaltstelle des Enzyms führt zu einem vollständigen Verlust der Protonenpumpaktivität der Cytochrom *c* Oxidase und sollte daher einem drastischen Einfluss auf den  $P_M$ - zu F- Übergang haben (siehe Abbildung 35).

So kommt es nach Wasserstoffperoxidzugabe bei pH 9 zwar zunächst zur Bildung einer geringen Menge an  $P_M$ -Intermediat (4%) mit einem Maximum bei 610 nm und einer recht stark ausgeprägten Schulter bei 570 nm. Im weiteren Verlauf der Reaktion jedoch kommt es nicht zur Bildung des F-Zustandes, sondern zu einer Teilreduktion der Häm, was sich in einer Verschiebung des Maximums von 610 nm auf 606 nm äußert. Im Soretbereich des

Differenzspektrums (nicht gezeigt) kommt es zu einer Verschiebung des Maximums vom 435 nach 445 nm.

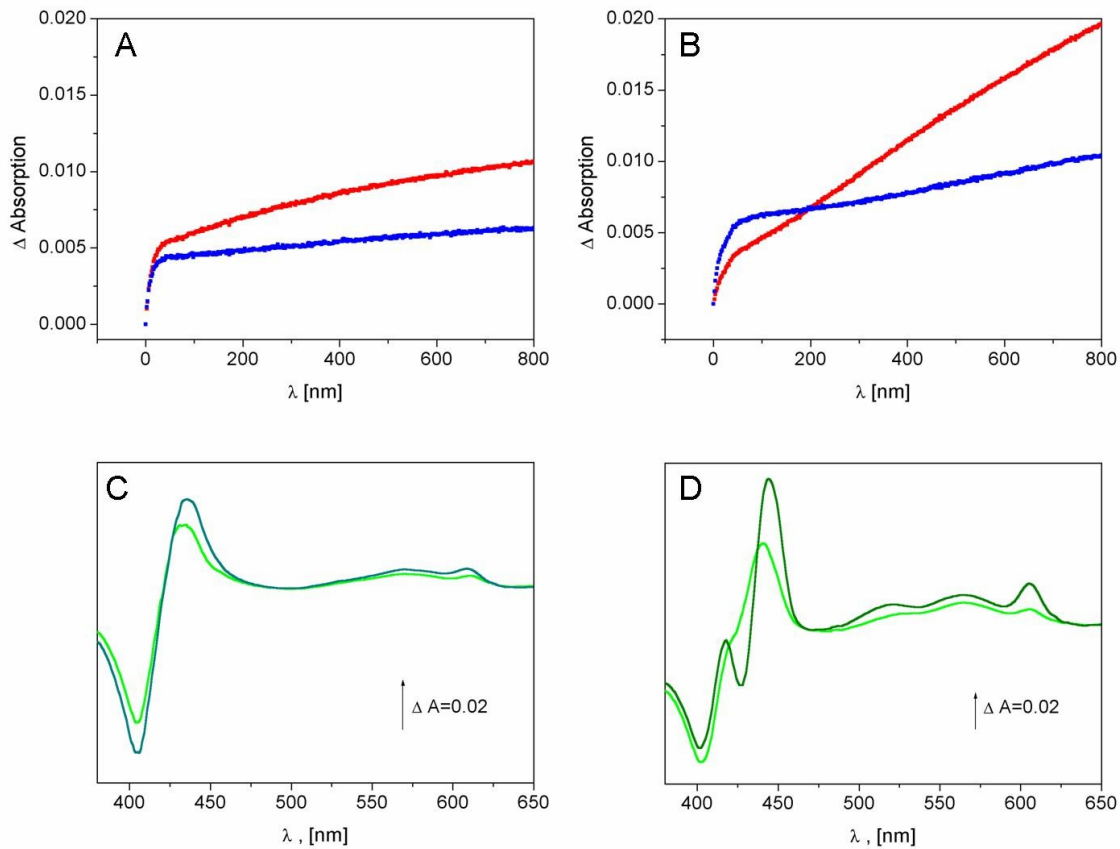
Nach dem pH-Sprung auf pH 6 verhält sich die Variante E278Q ähnlich wie bei pH 9. Nach anfänglicher Bildung des  $P_M$ -Intermediates (9%) kommt es zur Teilreduktion des Enzyms. Allerdings ist dieser Vorgang bei niedrigem pH noch etwas ausgeprägter als bei hohem pH.



**Abbildung 34:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertem Variante N131D mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.



**Abbildung 35:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante E278Q mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\cdot$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\cdot$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

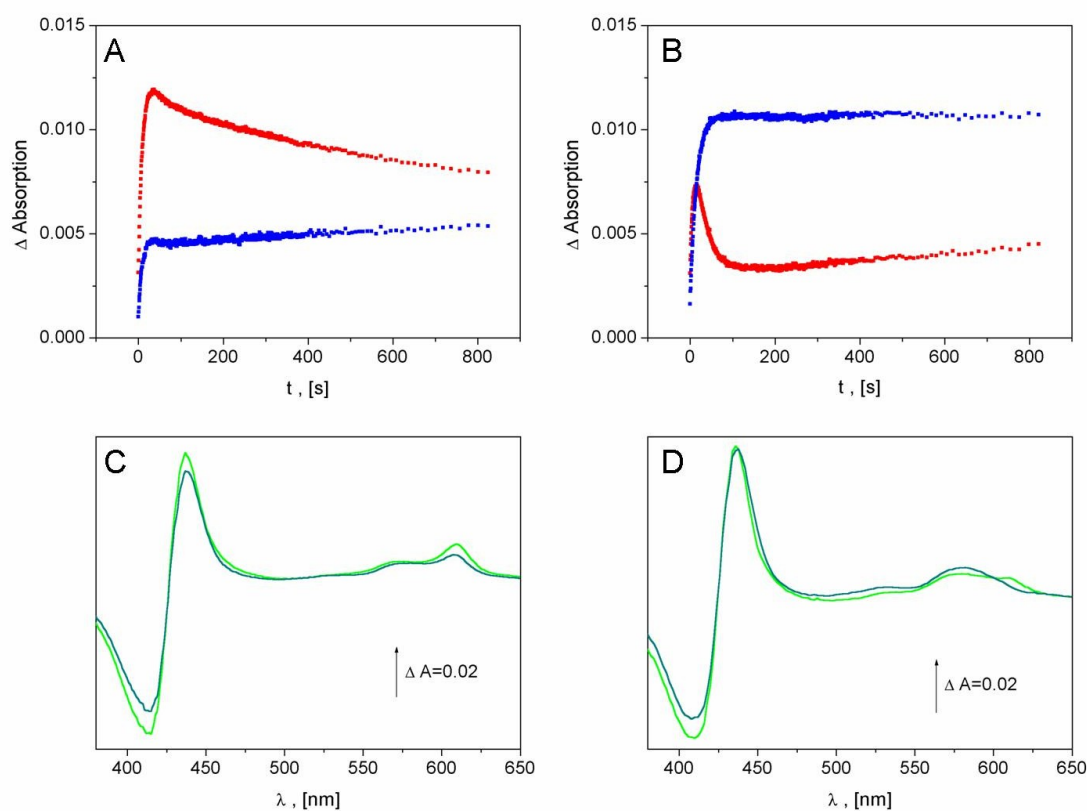
### 3.5.2. Die K-Weg Variante K354M

Lysin 354 liegt an Eingang des K-Weges in Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase. Der Austausch des Lysins mit einem Methionin führt zu einer vollständigen Blockierung des K-Weges. Dadurch wird die Aufnahme von Protonen durch den K-Weg und damit die katalytische Aktivität der Cytochrom *c* Oxidase unterbunden (Pfitzner *et al.*, 1998, Fetter *et al.*, 1995; Hosler *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 1993a). Im Zusammenhang mit dem  $\text{P}_\text{M}$ - zu F-Übergang wird eine gewisse Beteiligung des K-Weges am zweiten Protonenpumpschritt nicht

ausgeschlossen. Das Wasserstoffperoxidexperiment mit der Variante K345M (siehe Abbildung 36) kann daher einem Hinweis auf eine eventuelle Beteiligung des K-Weges an dieser Phase des katalytischen Zyklus liefern.

Bei pH 9 werden in der Reaktion mit Wasserstoffperoxid 11 %  $P_M$ -Intermediat gebildet. Die Umwandlung zum F-Zustand ist bei hohem pH stark verlangsamt. So kommt es zwar im Verlauf des Experimentes zu einer deutlichen Abnahme von  $P_M$  aber nur zu einer leichten Verschiebung der 570 nm Schulter nach 580 nm.

Nach pH-Sprung auf pH 6 entsteht zunächst  $P_M$ , welches ähnlich wie beim Wildtyp-Enzym rasch in  $F\cdot$  umgewandelt wird. Die Ausbeute an beiden Intermediaten ist aber auch hier im Vergleich zum Wildtyp mit 7 %  $P_M$ - und 21 %  $F\cdot$ -Intermediat deutlich geringer.



**Abbildung 36:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante K345M mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\cdot$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $P_M$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $F\cdot$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $P_M$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $P_M$  max. und  $F\cdot$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $F\cdot$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

### 3.5.3 Die Region oberhalb der Häme: Variante R473N

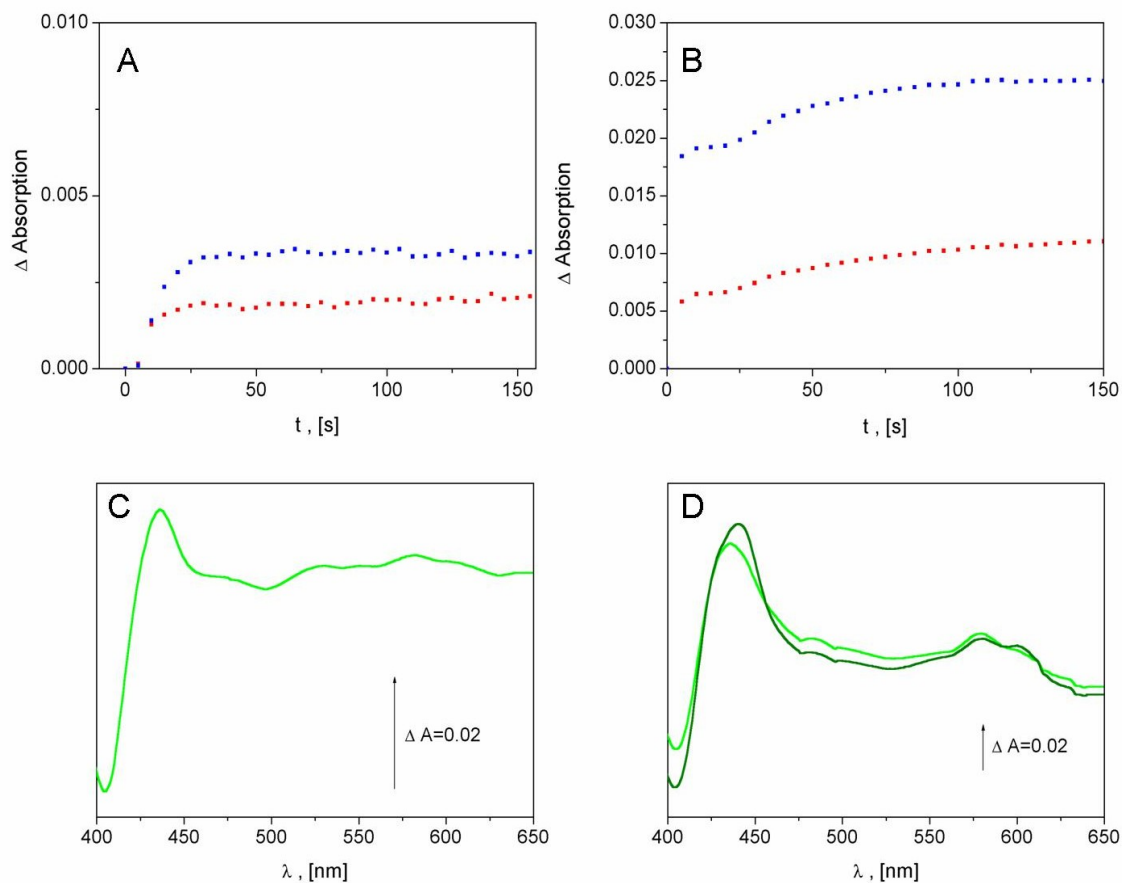
Arginin 473 bildet zusammen mit Arginin 474 ein oberhalb der Häme gelegenes Paar stark konservierter Aminosäuren, die von einer großen Anzahl an Wassermolekülen umgeben sind. Beide Arginine stehen mit den Häm Propionaten in Verbindung und sollen eventuell am Protonenausgangsweg der Cytochrom *c* Oxidase bzw. am Elektronentransfer von Cu<sub>A</sub> zum binuklearen Zentrum beteiligt sein.

Der Austausch von Arginin 473 durch ein Asparagin bewirkt eine starke Abnahme der Aktivität der Variante mit Cytochrom *c*. Sie weist nur noch 6% der Wildtypaktivität auf.

Auch im Experiment mit Wasserstoffperoxid zeigt R473N ein stark vom Wildtyp abweichendes Verhalten (siehe Abbildung 37). So lässt sich das P<sub>M</sub>-Intermediat weder bei pH 9 noch bei pH 6 nachweisen. Allerdings lässt sich in geringem Maße bei hohem pH (4% Ausbeute) und in sehr ausgeprägtem Maße nach dem pH-Sprung (45% Ausbeute), im Differenzspektrum ein Maximum bei 580 nm erkennen, welches auf die Bildung des F<sup>•-</sup>- bzw. des F-Zustandes hindeutet.

Ein EPR-Experiment, das bei pH 6 durchgeführt wird, zeigt die Anwesenheit des Tyrosinradikals.





**Abbildung 37:** Reaktion von 10  $\mu\text{M}$  vollständig oxidiertes Variante R354N mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**A:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  bei pH 9, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **C:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\bullet$  bzw. F max. bei pH 9.

**B:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von  $\text{P}_\text{M}$  nach einem pH-Sprung auf pH 6, dargestellt als Differenz 610 minus 630 nm (rote Kurve) und der Bildung von F bzw.  $\text{F}\bullet$  als Differenz von 580 minus 630 nm (blaue Kurve). **D:**  $\text{P}_\text{M}$ -minus-O-Differenzspektrum (hellgrün) zum Zeitpunkt  $\text{P}_\text{M}$  max. und  $\text{F}\bullet$  bzw. F-minus-O-Differenzspektrum (dunkelgrün) zum Zeitpunkt  $\text{F}\bullet$  bzw. F max. nach einem pH Sprung auf pH 6.

### 3.6. Übersichtstabelle der Ergebnisse

Variante	Aktivität [%]	$P_{M(pH9)}$ [%]	$F_{(pH9)}$ [%]	$P_{M(pH6)}$ [%]	$F/F_{(pH6)}$ [%]	EPR-Signal
Wildtyp mit $Cl^-$	100	32	+	7	42	+
Wildtyp ohne $Cl^-$	100	44	+	+	43	+
Y35F	45	9	-	7	-	+
D124N	<1	16	-	11	-	+
N131D	100	5	3,5	-	23	+
Y167F	62	18	(-)	-	36	-
Y167W	19	6	-	-	40	-
Y267F	7	11	-	+	19	+
W272M	1	-	-	-	-	-
E278Q	<1	4	-	9	-	n.b.
Y280H	<1	-	-	-	-	+
Y328F	73	9	-	(+)	(+)	+
K354M	<1	11		7	21	n.b.
Y414F	40	12	-	+	19	+
R473N	6	-	4	-	45	+

## 4. Diskussion

### **4.1. Die Bildung von Oxoferrylintermediaten bei Wildtyp und diversen Varianten der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bildung von Oxoferrylintermediaten durch Zugabe von geringen Mengen an Wasserstoffperoxid zu vollständig oxidiertem Cytochrom *c* Oxidase untersucht. Die Standardisierung dieses Experimentes für die Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase bzw. für die diversen untersuchten Varianten bildete die Grundlage für die Durchführung und Beurteilung von EPR-Experimenten, bei denen das Aminosäureradikal, das sich während der Reaktion bildet, beobachtet werden kann.

Die größte Schwierigkeit bei der Etablierung des Wasserstoffperoxidexperimentes ergab sich aus der Tatsache, dass selbst bei Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase keine hundertprozentige Ausbeute der verschiedenen Oxoferrylintermediate erzielt werden konnte. So bildeten sich bei pH 9 maximal 32 %  $P_M$  bezogen auf die Ausgangskonzentration der Cytochrom *c* Oxidase und bei pH 6 42 % eines Gemisches der Intermediate  $F^\bullet$  und  $F$ . Diese Werte waren unabhängig von der eingesetzten Oxidasekonzentration und der zugegebenen Menge an Wasserstoffperoxid konstant. Selbst wenn man davon ausgeht, dass zu dem Zeitpunkt des Experimentes, an dem die Ausbeuten an den Oxoferrylintermediaten  $P_M$  und  $F^\bullet$  am größten sind, auch immer ein gewisser Anteil des Enzyms im jeweils anderen Oxoferrylzustand vorliegt, erreicht man bei Weitem keine hundertprozentige Ausbeute an aktivem Protein, so wie dies in der Literatur beschrieben ist (Rich *et al.*, 2002).

Auch Kontrollexperimente mit Rinderherz und mit *R. sphaeroides* Cytochrom *c* Oxidase ergaben vergleichbare Ausbeuten an Oxoferrylintermediaten.

Um die Ausbeute an Oxoferrylintermediaten zu erhöhen, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen einem möglicherweise im binuklearen Zentrum gebundenen Chloridion und der Bildung von Oxoferrylintermediaten besteht. Bei Wasserstoffperoxidzugabe zu chloridfrei aufgereinigter Cytochrom *c* Oxidase zeigte sich ein gewisser Einfluss der Abwesenheit von Chlorid in Enzym und Puffern. So konnte die maximale Ausbeute des  $P_M$ -Intermediates auf 41 % bei pH 9 gesteigert werden. Durch Zugabe von Chloridionen verringerte sich die Ausbeute wieder auf ca. 30 %. Darauf hin wurden alle Experimente auf chloridfreie Bedingungen umgestellt. Dies stellte jedoch keine grundsätzliche Lösung des Problems der niedrigen Ausbeute an Oxoferrylintermediaten dar.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich durch „Pulsen“ des Enzyms die Ausbeute an Oxoferrylintermediaten erhöhen lässt. Nach Durchführung eines Redoxzyklus lässt sich die Cytochrom *c* Oxidase in einen aktiveren Zustand versetzen lassen (sog. „schnelle Form“) bzw. durch eine Absenkung des pH-Wertes in eine inaktivere Form (sog. „langsame Form“). Diese Formen wurden bis jetzt überwiegend für Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase beschrieben und lassen sich durch ein verändertes Absorptionsmaximum des vollständig oxidierten Spektrums sowie durch schnelle bzw. langsame Cyanidbindungskinetiken voneinander unterscheiden (Baker *et al.*, 1986). Man geht davon aus, dass es sich bei den verschiedenen Formen der oxidierten Cytochrom *c* Oxidase um verschiedene Konformationen des binuklearen Zentrums handeln könnte (Cooper *et al.*, 1993).

Für chloridfreie Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* konnten die „schnelle“ und „langsame“ Konformation anhand verschiedener Soretmaxima des Absorptionsspektrums nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich jedoch nicht signifikant in ihren Cyanidbindungskinetiken (Die Cyanidbindungskinetiken wurden von Christian Bamann in Zusammenarbeit mit Dr. Ernst Grell, MPI für Biophysik Frankfurt, Abteilung für biophysikalische Chemie durchgeführt.). Auch ließen sich mit gepulstem Enzym keine höheren Ausbeuten an Oxoferrylintermediaten erzielen. Inwieweit die für die *P. denitrificans* Cytochrom *c* Oxidase gefundenen Konformationen mit denen für das Rinderherz Enzym beschriebenen identisch sind, kann an dieser Stelle nicht genauer geklärt werden. Auf die Aktivität des Enzyms und die Bildung von Oxoferrylintermediaten im *steady-state* schienen diese verschiedenen Konformationen jedoch keinen Einfluss zu haben.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich die Ausbeute an Oxoferrylintermediaten nicht in entscheidendem Maße steigern ließ, aber dass die in verschiedenen Experimenten mit Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase und den Varianten erzielten Ausbeuten sehr gut reproduzierbar waren. Daher wurde bei weiteren Experimenten so verfahren, dass die für die diversen Varianten ermittelten Ausbeuten mit den real für das Wildtyp Enzym erzielten Ausbeuten verglichen wurden.

Für die Standardisierung der Experimente erwies es sich außerdem als zweckmäßig jeweils mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid zu arbeiten, da es sich zeigte, dass eine niedrigere Wasserstoffperoxidkonzentration bei vielen der untersuchten Enzymvarianten zu Ausbeuten führten, die mit optischer Spektroskopie nicht mehr nachweisbar waren. Ein zu großer Überschuss an Wasserstoffperoxid musste jedoch ebenso vermieden werden, da dieser mit einer Zunahme unspezifischer Nebenreaktionen einherging (vergl. Abschnitt 3.5.1.3.).

## **4.2. Das Aminosäureradikal in den $P_M$ - und $F^\bullet$ -Intermediaten der Cytochrom *c* Oxidase: Die Varianten Y167F, Y167W, Y280H und W272M**

Der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit lag darin, Aufschluss über die Natur und den Ursprungsort der Aminosäure zu gewinnen, die das „fehlende“ Elektron bei der Spaltung der Sauerstoffbindung im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase liefert.

Da EPR-Experimente mit Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* gezeigt hatten, dass nach Reaktion des vollständig oxidierten Enzyms mit Wasserstoffperoxid im *steady state* ein Tyrosinradikal entsteht (MacMillan *et al.*, 1999), wurden verschiedene Tyrosinvarianten der Cytochrom *c* Oxidase sowohl auf ihre Fähigkeit die Oxoferryllintermediate  $P_M$ ,  $F^\bullet$  und  $F$  zu bilden als auch auf das Erscheinen des Tyrosinradikals in den Intermediaten  $P_M$  und  $F^\bullet$  hin untersucht.

Von besonderem Interesse für die Diskussion dieser Experimente ist die **Variante Y167F**. Als einzige der untersuchten Tyrosinvarianten war bei ihr das für das Tyrosinradikal charakteristische EPR-Signal nicht nachweisbar. Somit konnte Y167 eindeutig als Ursprungsort des nach Wasserstoffperoxidzugabe zu beobachtenden Tyrosinradikalsignals identifiziert werden. Dies ließ sich auch durch einen Vergleich der spektroskopisch bestimmten dihedralen Winkel von Tyrosin 167 mit denen aus der Röntgenstruktur der Cytochrom *c* Oxidase bestätigen (PDB file 1QLE 4).

Interessanterweise zeigte die Mutation dieses Tyrosins aber keinen entscheidenden Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Enzyms. Die Variante Y167F wies eine hohe Aktivität mit reduziertem Cytochrom *c* auf und war immer noch in der Lage Oxoferryllintermediate zu bilden.

Aus diesem Grund kommt Y167 nicht der Donor des „fehlenden“ Elektrons für die reduktive Spaltung der Sauerstoffbindung infrage, denn die Unterbindung eines zentralen Vorgangs für den katalytischen Mechanismus des Enzyms sollte drastischen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Cytochrom *c* Oxidase haben.

Auch eine Beteiligung von Tyrosin 167 am Protonenpumpprozess, der beim  $P_M \rightarrow F$  Übergang eine wichtige Rolle spielt, da dabei möglicherweise zwei Protonenpumpschritte stattfinden, konnte ausgeschlossen werden, da die Variante Y167F im Protonenpumpexperiment volle Protonenpumpaktivität zeigte. Tyrosin 167 ist also auch nicht Teil des bis jetzt noch nicht genau identifizierten Protonenausgangswegs der Cytochrom *c* Oxidase.

Der Grund für die reduzierte katalytische Aktivität der Variante Y167F scheint daher eher auf eine Beeinträchtigung der Funktion der Häme, insbesondere des Häm  $a_3$ , welches möglicherweise ein verändertes Redoxpotential aufweist, zurückzuführen zu sein. Dies lässt sich aus den leicht veränderten Cyanidbindungseigenschaften schließen (vergl. Abschnitt 3.4.3.).

Außerdem sprechen die Veränderungen des vollständig oxidierten Absorptionsspektrums der Variante Y167F in Abwesenheit von Chloridionen für eine Veränderung des binuklearen Zentrums durch die Mutation, da die Abwesenheit von Chloridionen bei der Wildtyp Cytochrom *c* Oxidase und bei verschiedenen anderen untersuchten Varianten nicht zu Veränderungen des Absorptionsspektrums des vollständig oxidierten Enzyms führte.

Eine weitere Chloridbindungsstelle wurde für die *bo* Ubichinol Oxidase von *E. coli* (Hirano *et al.*, 1997) und für Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase (Fabian *et al.* 2004) beschrieben. Sie soll entweder in der Region der beiden konservierten Aspartate 473 und 474 oder aber an der Manganbindungsstelle lokalisiert sein und könnte daher ebenso das Verhalten der Y167F beeinflussen. Ob diese Chloridbindungsstelle für die verminderte Aktivität der Variante Y167F mitverantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Was ist also die Funktion des Radikals, das Tyrosin 167 nach Wasserstoffperoxidzugabe bildet? Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Radikal lediglich um ein Artefakt handelt, welches sich zufällig durch die Zugabe des aggressiven Reagens Wasserstoffperoxid an dieser Stelle ausbildet. Dies wurde durch EPR-Experimente, bei denen vor der Zugabe des Peroxids das binukleare Zentrum des Wildtyp Enzyms durch Cyanid blockiert wurde, untersucht (MacMillan *et al.* 1999). Bei diesen Experimenten trat das Radikal nicht mehr auf, was den Rückschluss zulässt, dass für die Bildung des Radikals ein funktionsfähiges binukleares Zentrum erforderlich ist.

Die ebenfalls untersuchte Variante Y280H (siehe dazu auch Abschnitt 4.5) wurde ursprünglich als wahrscheinlichster Lieferant des „fehlenden“ Elektrons angesehen. Anhaltspunkte dafür ergaben sich hauptsächlich aus der Röntgenstruktur der Cytochrom *c* Oxidase (Ostermeier *et al.*, 1997), die zeigt, dass Y280 kovalent mit dem  $Cu_B$  Liganden Histidin 276 verbunden ist und die funktionelle Gruppe des Tyrosins ideal in Richtung des binuklearen Zentrums ausgerichtet ist. Allerdings war, obwohl Y280H katalytisch inaktiv ist und mit UV/VIS-Spektroskopie keine Oxoferryllintermediate zu erzeugen waren, das Tyrosinradikalsignal nachweisbar.

Dies bedeutet nicht zwangsläufig, dass Y280 nicht der Donor des „fehlenden“ Elektrons sein kann, da bei allen diesen Experimenten das Enzym im *steady state* beobachtet wurde. Es

besteht daher auch die Möglichkeit, dass es sich bei dem von Tyrosin 167 gebildeten Tyrosinradikal um eine „thermodynamische Senke“ handelt, in die das ursprünglich an einem anderen Ort gebildete Radikal im Gleichgewichtszustand verschoben wird.

Bei ENDOR-Experimenten mit Rinderherz Cytochrom *c* Oxidase konnte ein Tryptophanradikal und ein Porphyrinkationradikal nach Reaktion des Enzyms mit Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden (Fabian und Palmer, 1995; Rigby *et al.*, 2000).

In zeitaufgelösten EPR-Experimenten, bei denen die Reaktion der Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid im Mikrosekundenbereich verfolgt wurde (Wietz *et al.*, 2004), konnte im P<sub>M</sub>-Zustand ein Tryptophanradikal nachgewiesen werden, dass sich im Gleichgewicht mit einem Tyrosinradikal befindet. Als Ursprungsort dieses Tryptophanradikals wurde von den Autoren Tryptophan 272 vorgeschlagen. Auch Svistunenko *et al.* (2004) diskutieren ein Tryptophanradikal als möglichen Übergangszustand zwischen dem primär durch Tyrosin 280 gebildeten Radikal und dem im Reaktionsgleichgewicht vorliegenden Radikal an Tyrosin 167. Dies wirft die Frage auf, ob das „fehlende“ Elektron nicht ursprünglich von einem Tryptophan stammen könnte.

Um diese Frage zu klären, wurde die **Variante Y167W** hergestellt und spektroskopisch untersucht. Durch den Austausch des Tyrosins durch ein Tryptophan sollte geklärt werden, ob ein Tryptophanrest an dieser Stelle in der Lage ist, die Rolle des Tyrosins zu übernehmen, was zur Bildung eines Tryptophanradikals an dieser Position führen würde.

Die Tryptophanvariante zeigte, wahrscheinlich wegen der größeren Ausmaße des Tryptophans, eine etwas stärker reduzierte katalytische Aktivität als die Tyrosinvariante und die Reaktivität mit Wasserstoffperoxid war etwas eingeschränkt. Im EPR-Experiment ließ sich kein Tryptophanradikal nachweisen, was zu dem Schluss führt, dass ein Tryptophan an dieser Stelle das radikalbildende Tyrosin nicht ersetzen kann.

Die Herstellung der **Variante W272M** sollte Aufschluss darüber liefern, ob diese Aminosäure, wie von Wietz *et al.* (2004) vorgeschlagen, der eigentliche Donor des „fehlenden“ Elektrons sein könnte.

Tryptophan 272 liegt in 3 Å Tyrosin 167 und 8.5 Å vom Eisen des Häm *a*<sub>3</sub> entfernt. Im Gegensatz zur Variante Y167F zeigte sich bei der Charakterisierung der Variante W272M ein starker Einfluss der Mutation auf die Funktion der Cytochrom *c* Oxidase. So konnte bei W272M eine drastische Reduzierung der katalytischen Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem beeinflusst die Mutation dieses Tryptophans zu einem Methionin stark das Absorptionsspektrum und die Cyanidbindungseigenschaften der Enzymvariante.

Des Weiteren war die Variante W272M weder bei niedrigen Enzymkonzentrationen, wie sie bei der optischen Spektroskopie verwendet werden, noch bei den höheren, für die EPR-Experimente verwendeten Enzymkonzentrationen in der Lage nach Zusatz geringer Mengen an Wasserstoffperoxid die Oxoferryllintermediate  $P_M$ ,  $F^\bullet$  und  $F$  bzw. das Tyrosinradikal zu bilden.

Diese Eigenschaften der Variante W272M werfen die Frage auf, ob Tryptophan 272 in entscheidender Weise an der reduktiven Spaltung der Sauerstoffbindung in katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase bzw. an der Bereitstellung des für diese Bindungsspaltung „fehlenden“ Elektrons beteiligt ist.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Tryptophan 272 am Prozess der Sauerstoffbindungsspaltung. Auf jeden Fall ist es von entscheidender Bedeutung für die Bildung des Tyrosin-167-Radikals. Ob Tryptophan 272 jedoch der Donor des „fehlenden“ Elektrons ist oder aber ein Intermediat zwischen dem eigentlichen Elektronendonator (z. B. Y280) und Tyrosin 167 bildet, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden. Zeitaufgelöste EPR-Experimente mit den Varianten W272M und Y167F könnten hier Aufschluss bringen.

Ein mögliches Indiz dafür, dass Tryptophan 272 der Donor des „fehlenden“ Elektrons sein könnte, ist die Tatsache, dass die Variante Y280H im EPR-Experiment das Tyrosin-167-Radikal zeigt, obwohl auch diese Variante katalytisch inaktiv ist und vom Wildtyp abweichende spektrale Eigenschaften aufweist, die auf einen Verlust an  $Cu_B$  und eine andere Hämkomposition hindeuten (Dissertation Ute Pfitzner (2000)), und Oxoferryllintermediate bei Zugabe geringer Mengen an Wasserstoffperoxid nicht nachweisbar waren. Dies spricht gegen eine Rolle von Tyrosin 280 als primärem Elektronendonator, was jedoch die Existenz eines anderen, bis jetzt noch unbekanntem, primären Elektronendonors nicht ausschließt.

Ein weiteres Indiz für die besondere Bedeutung von Tryptophan 272 ist die Tatsache, dass im EPR-Experiment mit der Variante R473N das Tyrosin-167-Radikal nachzuweisen war, obwohl das mutierte Arginin, genauso wie Tryptophan 272, in räumlicher Nähe zu Y167 liegt und eine geringe katalytische Aktivität aufwies.

Gegen eine funktionelle Beteiligung von Tryptophan 272 an der Spaltung der Sauerstoffbindung sprechen die strukturellen Änderungen, die der Austausch des Tryptophans durch das Methionin an den Hämen, insbesondere am Häm  $a_3$  auslösten, und die zu den beschriebenen spektralen Änderungen und den starken Abweichen des Cyanidbindungsverhaltens führten.



### 4.3 Die Tyrosinvarianten Y267F, Y328F und Y414F

Außer der Variante Y167F und Y280H wurden noch weitere Tyrosinvarianten der Cytochrom *c* Oxidase untersucht. Obwohl diese eindeutig nichts mit der Bildung des Tyrosinradikals zu tun hatten, sind die vorläufigen Ergebnisse ihrer Charakterisierung dennoch interessant und könnten Ideen für weiterführende Experimente liefern.

Die **Variante Y267F** zeigte eine stark verminderte katalytische Aktivität (7% Wildtypaktivität), obwohl dieses Tyrosin in räumlicher Nähe zu Tyrosin 167 liegt, dessen Mutation die katalytische Aktivität kaum beeinträchtigt.

Im Experiment mit Wasserstoffperoxid wurde bei pH 9 nur das P<sub>M</sub>-Intermediat gebildet. Nach einem pH-Sprung auf pH 6 hingegen führte die Zugabe von Wasserstoffperoxid sowohl zur Bildung von P<sub>M</sub> als auch von F•.

Ein ähnliches Verhalten in der Reaktion mit Wasserstoffperoxid zeigte auch die **Variante Y414F**. Die katalytische Aktivität dieser Variante war jedoch wesentlich weniger stark beeinträchtigt als die von Y267F.

Ob die Tyrosine 267 und 414 am Elektronentransfer innerhalb des Enzyms beteiligt sind, einen Teil des Protonenausgangsweges darstellen, oder ob durch die Mutationen das Redoxverhalten der Häm e verändert wird, kann an dieser Stelle nicht eindeutig entschieden werden. Weiterführende Experimente, z.B. eine Analyse des Protonenpumpverhaltens der Varianten oder eine Bestimmung der Redoxpotentiale der Häm e, könnten zu einem besseren Verständnis der Funktion dieser beiden Tyrosine beitragen.

Auch die **Variante Y328F** zeigte einige Besonderheiten. Sie war die von allen untersuchten Tyrosinvarianten diejenige mit der höchsten katalytischen Aktivität. Dennoch zeigte sie bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxid ein stark vom Wildtyp abweichendes Verhalten.

So konnte weder bei pH 9 noch nach einem pH-Sprung auf pH 6 die Bildung von F-Intermediaten beobachtet werden. Bei niedrigem pH kam es nach kurzer Versuchsdauer zur Teilreduktion des Enzyms.

Im Protonenpumpexperiment zeigte diese Variante keinerlei Abweichungen vom Wildtyp.

Eine Erklärung für das Verhalten von Y328F könnte eventuell in einer Destabilisierung des binuklearen Zentrums durch die Mutation zu suchen sein, die den P<sub>M</sub>→F-Übergang

verhindert. Auch hier könnte eine Untersuchung des Redoxverhaltens der Häm e genaueren Aufschluss geben.

#### **4.4. Der D-Weg der Cytochrom c Oxidase**

Bei der Umwandlung des  $P_M$ -Zustandes zum  $F^{\bullet}$ - bzw. F-Intermediat im oxidativen Teil des katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase spielt der D-Weg eine wichtige Rolle, denn die Protonen, die während dieser Reaktionsschritte aufgenommen bzw. gepumpt werden, werden über den D-Weg aufgenommen.

Eine Blockierung des D-Weges, wie bei der **Variante D124N**, sollte daher die Bildung der Intermediate  $F^{\bullet}$  und F unterbinden. Dies ließ sich bei den *steady-state* Wasserstoffperoxidexperimenten mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid sowohl bei pH 9 als auch nach einem pH-Sprung auf pH 6 beobachten. Bei diesen Experimenten bildete sich ausschließlich der  $P_M$ -Zustand.

Wurde die Reaktion allerdings mit einem fünfzigfachen Überschuss an Wasserstoffperoxid durchgeführt, verhielt sich die Variante D124N grundlegend anders. Sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH bildeten sich  $F^{\bullet}$ - und F-Intermediate und dies mit Ausbeuten, die denen des Wildtyps (bei einem fünffachen Wasserstoffperoxidüberschuss) entsprachen. Ein ähnliches Phänomen konnte bei der Variante Y35F beobachtet werden. Bei anderen Varianten und beim Wildtyp führte ein erhöhter Überschuss an Wasserstoffperoxid jedoch zu keinerlei Änderungen bei der Bildung bzw. bei den Ausbeuten an Oxoferryliintermediaten.

Dieses Phänomen könnte dadurch zu erklären sein, dass sich bei hoher Wasserstoffperoxidkonzentration durch unspezifische Nebenreaktionen Protonen bilden. Diese Protonen könnten, wie auch das Wasserstoffperoxid selbst, entweder über den K-Weg oder durch den Protonenausgangsweg im Laufe des *steady-state* Experimentes zum binuklearen Zentrum gelangen und dort die Umwandlung von  $P_M$  zu F vollziehen. Die Bildung von  $F^{\bullet}$ - und F-Intermediaten unter diesen Reaktionsbedingungen ist also kein Indiz für eine eventuelle Protonentranslokationsfähigkeit der Variante D124N, sondern stellt vielmehr ein Artefakt dar, welches auf der hohen Wasserstoffperoxidkonzentration beruht.

Aus diesem Experiment lässt sich jedoch grundsätzlich folgern, dass bei der Herstellung von Oxoferryliintermediaten mit Wasserstoffperoxid auf eine möglichst niedrige

Wasserstoffperoxidkonzentration zu achten ist, da ansonsten das Ergebnis durch unspezifische Nebenreaktionen beeinflusst werden könnte.

Die **Variante N131D** unterschied sich in ihrem Verhalten deutlich von D124N. Nach Reaktion mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid wurden bei pH 9 zunächst geringe Mengen an  $P_M$ -Intermediat gebildet. Dieses war jedoch äußerst instabil und wandelt sich sehr rasch in den F-Zustand um.

Bei pH 6 ließ sich das  $P_M$ -Intermediat unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachweisen. Stattdessen bildeten sich sofort geringe Mengen an  $F\bullet$ .

Da N131D nicht in der Lage ist Protonen zu pumpen, für die Bildung des  $F\bullet$ - bzw. F-Intermediates jedoch ein bzw. zwei Protonenpumpschritte erforderlich sind, erscheint die beschleunigte Umwandlung des  $P_M$ - in den F-Zustand zunächst überraschend. Allerdings wurde auch bei *single turnover* Experimenten mit der analogen Variante von *Rhodobacter sphaeroides*, bei der die Reaktion des vollständig reduzierten Enzyms mit Sauerstoff untersucht wurde, ein beschleunigter  $F \rightarrow O$  Übergang beobachtet (Pawate *et al.*, 2002). Dieses Phänomen wurde durch ein erhöhtes Redoxpotential des Häm *a* in der Variante erklärt, welches dazu führt, dass Elektronen schneller zum binuklearen Zentrum gelangen können.

Eine andere Erklärung für das Verhalten der Variante N131D könnte der erhöhte pK-Wert der Aminosäure E278 liefern, der für N131D postuliert wurde (Namslauer *et al.*, 2003). Dadurch kann E278 sehr schnell wieder reprotoniert werden und sehr rasch das nächste Proton zum binuklearen Zentrum leiten. Welcher dieser Aspekte von N131D bei den hier beschriebenen Experimenten der entscheidende Faktor ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Wasserstoffperoxid-Experimenten mit den Varianten D124N und N131D der Schluss ziehen, dass eine Verhinderung der Protonenaufnahme, wie bei der Variante D124N, zu einer Stabilisierung des  $P_M$ -Intermediates führt, während eine Verhinderung der Protonenpumpschritte, wie bei N131D, zu einer Destabilisierung von  $P_M$  führt.

Die **Variante Y35F** ähnelte in ihrem Verhalten mit Wasserstoffperoxid der Variante D124N. Sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH wurde das  $P_M$ -Intermediat stabilisiert. Bei einer starken Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Experiment kam es wie bei D124N zur Bildung von F-Intermediaten.

Obwohl Y35F und D124N auf ähnliche Weise mit Wasserstoffperoxid reagierten unterscheiden sich die beiden Varianten ansonsten stark in ihren Eigenschaften. So ist der D-Weg bei Y35F nicht blockiert und die Variante zeigt noch eine recht hohe katalytische Aktivität. Eine mögliche Erklärung für die Stabilisierung des  $P_M$ -Intermediates in der Variante Y35F könnte eine durch die Mutation bedingte Verlangsamung der Protonenaufnahme durch den D-Weg sein (Ute Pfitzner, Dissertation, 2000). Diese Verlangsamung der Protonenaufnahme könnte dazu führen, dass Protonen nicht in ausreichendem Maße zum binuklearen Zentrum gelangen können.

Von Glutamat 278 werden die Protonen zum binuklearen Zentrum bzw. zu den Häm-Propionaten weitergeleitet. Bei der **Variante E278Q** ist diese wichtige Schaltstelle im Enzym blockiert. E278Q reagierte daher mit Wasserstoffperoxid sowohl bei hohem als auch bei niedrigem pH nur zu sehr geringen Mengen an  $P_M$ -Intermediat (ca. 4 %). Allerdings blieb dieses, anders als bei D124N, bei längerer Versuchsdauer nicht stabil, sondern es kam insbesondere bei pH 6 zu Verschiebungen der Maxima des Differenzspektrums, die als Teilreduktion der Häme interpretiert werden können. Bei keinem Experiment konnten F-Intermediate nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu vergleichbaren Experimenten (Inkubation der Variante mit Wasserstoffperoxid bzw.  $CO/O_2$ ), die mit der analogen Variante (E286Q) der *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrom *c* Oxidase durchgeführt wurden. Diese Experimente zeigten, dass E286Q mit Wasserstoffperoxid nicht zum  $P_M$ -Intermediat reagiert. Bei diesen Versuchen bildete sich nur das F-Intermediat, dieses allerdings mit einer Ausbeute von 25% (Jünemann *et al.*, 1999). Auf Grund dieses Ergebnisses schlagen Jünemann *et al.* eine Beteiligung von Glutamat 286 an der Wasserstoffperoxidbindung im binuklearen Zentrum vor. Die Ursache des unterschiedlichen Verhaltens der analogen *Paracoccus denitrificans* und der *Rhodobacter sphaeroides* Varianten kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

#### 4.5. Der K-Weg der Cytochrom c Oxidase

Die **Variante K354M** zeigte in der Reaktion mit Wasserstoffperoxid ein vom Wildtyp deutlich abweichendes Verhalten. So war bei hohem pH die Ausbeute an  $P_M$ -Intermediat im Vergleich zum Wildtyp viel geringer und eine Umwandlung zum F-Zustand fand nicht statt. Nach dem pH-Sprung auf pH 6 waren sowohl  $P_M$  als auch  $F^\bullet$  bzw. F nachweisbar.

Diese Experimente bestätigen den Einfluss des K-Weges im oxidativen Teil des katalytischen Zyklus der Cytochrom c Oxidase (Konstantinov *et al.*, 1997). So könnte die Beeinträchtigung der F-Bildung bei hohem pH dadurch zu erklären sein, dass die Ladungskompensation innerhalb des K-Weges durch den Austausch von Lysin gegen Methionin gehemmt ist.

Bei niedrigem pH jedoch können im Laufe des *steady state* Experimentes ausreichend Protonen in den K-Weg gelangen, um die Ladungskompensation zu bewerkstelligen.

Die **Variante Y280H** reagierte mit einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid weder bei hohem noch bei niedrigem pH zu Oxoferryllintermediaten. Bei sehr hohem Wasserstoffperoxidkonzentration konnten Pinakoulaki *et al.* jedoch eine geringe Menge des  $P_M$ -Intermediates nachweisen. Das F-Intermediat zeigte jedoch ein Maximum bei 593 nm, was die Autoren auf Veränderungen bei der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die beim P→F Übergang für die starke Absorptionsänderung verantwortlich sind, zurückführen (Pinakoulaki *et al.*, 2003; Proshlyakov *et al.*, 1996). Die Bedeutung von Tyrosin 280 als Lieferant des „fehlenden“ Elektrons für die Spaltung der Sauerstoffbindung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. So konnte auch in der Variante Y280H nach Wasserstoffperoxidzugabe mittels EPR-Spektroskopie ein Tyrosinradikal nachgewiesen werden, was die Annahme nahe legt, dass ein anderes Tyrosin (Tyrosin 167) an der Bereitstellung des „fehlenden“ Elektrons beteiligt ist. Eine weitere Bestätigung für die Annahme, dass Tyrosin 280 nicht die Quelle des „fehlenden“ Elektrons sein kann, lieferten *steady-state* Raman und FTIR Experimente an Oxoferyllintermediaten von Wildtyp Cytochrom c Oxidase und der Variante Y280H (Pinakoulaki *et al.*, 2002, Pinakoulaki *et al.*, 2003). Demnach liegt die zentrale Bedeutung des Tyrosin-Histidin *Crosslinks* nicht in der Bildung des Tyrosinradikals oder in einer Stabilisierung des binuklearen Zentrums, sondern eher darin, das  $Cu_B$  in einem bestimmten Abstand zum Häm  $a_3$  und einer bestimmten Konfiguration zu fixieren.

#### 4.6. Die Region oberhalb der Häme

Oberhalb der Häme der Cytochrom *c* Oxidase befindet sich ein Wasserstoffbrückennetzwerk, welches die konservierten Arginine 473 und 474 einschließt. Beide Arginine stehen über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Häm *a* und Häm *a*<sub>3</sub> Propionaten wie auch mit den Liganden der nicht redoxaktiven Mg/Mn-Bindungsstelle in Verbindung. Dieses Wasserstoffbrückennetzwerk liegt an der Schnittstelle Untereinheiten I und II und bildet möglicherweise einen Teil des Protonenausgangswegs, dessen Verlauf bis heute ungeklärt ist. Desweiteren wird vermutet, dass die beiden Arginine und das diese miteinander verbindende Proteinrückgrat am Elektronentransfer zwischen Cu<sub>A</sub> und Häm *a* beteiligt sein könnte.

Bei der **Variante R473N** wurde das positiv geladene Arginin durch das polare aber ungeladene Asparagin ersetzt. Dadurch wurde die Wasserstoffbrückenbindung zum D-Ring Propionat des Häm *a*<sub>3</sub> destabilisiert. Die Mutation führte zu einer drastischen Reduzierung der Aktivität der Variante mit reduziertem Cytochrom *c* auf 9 % der Wildtypaktivität. Dies zeigte, dass in der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* die Auswirkungen dieser Mutation viel stärker sind als bei der analogen Mutation der Cytochrom *bo*<sub>3</sub> Oxidase von *E. coli*, die nur zu einer leicht reduzierten katalytischen Aktivität führte (Puustinen und Wickström, 1999). Die geringe katalytische Aktivität von R473N könnte einerseits für eine Beteiligung von Arginin 473 am Elektronentransfer von Cu<sub>A</sub> zu den Hämen sprechen (Qian *et al.*, 2004), andererseits könnte die Struktur des Enzyms durch eine Mutation, die an der Schnittstelle zwischen den Untereinheiten I und II der Cytochrom *c* Oxidase liegt, so stark gestört sein, dass sich allein dadurch die geringe Aktivität erklären lässt.

Ein Protonenpumpexperiment mit R473N wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Protonenpumpexperimente (Puustinen und Wikström, 1999) mit der analogen Variante der Cytochrom *bo*<sub>3</sub> Oxidase von *E. coli* (R481N) zeigten einen Verlust der Protonenpumpaktivität, während Experimente mit den Varianten R473K und R481K Cytochrom *aa*<sub>3</sub> Oxidase von *Paracoccus* bzw. von *Rhodobacter* zu keinem nennenswerten Verlust der Protonenpumpaktivität führten.

Die Ergebnisse des Wasserstoffperoxidexperimentes mit R473N sprechen für einen Verlust von Protonenpumpaktivität bei dieser Variante, da sie ein ähnliches Verhalten wie die nicht pumpende Variante N131D zeigte. So war bei dieser Variante der P<sub>M</sub>-Zustand so instabil,

---

dass er sich im *steady state* Experiment nicht nachweisen ließ. Die Bildung von  $F\bullet$  bzw. F war jedoch insbesondere bei niedrigem pH nicht beeinträchtigt. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte darin liegen, dass die Verbindung zwischen dem für die Weiterleitung wichtigen Glutamat 278 und dem putativen Protonenausgangsweg durch den Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem D-Ring-Propionat des Häm  $a_3$  und Arginin 473 gestört ist. Dadurch könnten Protonen nur noch zum binuklearen Zentrum weitergeleitet werden.

#### **4.7. Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte das Aminosäureradikal, das bei der Herstellung des  $P_M$ - bzw. des  $F\cdot$ -Intermediates durch Reaktion von vollständig oxidiertes Cytochrom *c* Oxidase mit Wasserstoffperoxid im „*steady state*“ der Reaktion beobachtet werden kann, eindeutig der Aminosäure Tyrosin 167 zugeordnet werden. Gleichzeitig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Tyrosin 167 nicht der Donor des „fehlenden“ Elektrons sein kann, welches im katalytischen Zyklus der Cytochrom *c* Oxidase entsteht und das Hinweise dafür gefunden werden, dass Tryptophan 272 für die Entstehung des Tyrosin-167-Radikals von Bedeutung ist. Die Identität des Donors des „fehlenden“ Elektrons ist jedoch weiterhin unbekannt. Um Aufschluss über den wirklichen Ursprungsort des „fehlenden“ Elektrons zu erhalten, könnte der zeitliche Verlauf der Wasserstoffperoxidreaktion der Varianten Y167F und W272M mit MHQ (*microsecond freeze hyperquenching*)-EPR-Experimente untersucht werden.

Außerdem könnte eine weitere Charakterisierung der anderen Tyrosinvarianten vorgenommen werden. Insbesondere sind Protonenpumpexperimente mit der Variante Y267F, die nur eine geringe Aktivität mit reduziertem Cytochrom *c* aufweist, von Interesse. Eine verringerte Protonenpumpaktivität könnte für eine Beteiligung dieser Variante am Protonenaustrittsweg sprechen.

Weitere Informationen über die Funktion der Cytochrom *c* Oxidase kann durch einen Vergleich der Röntgenkristallstruktur des Wildtyp Enzyms mit Röntgenkristallstrukturen der Varianten liefern. So konnte vor kurzem die Röntgenkristallstruktur der Varianten N131D und D124N im unserem Labor gelöst werden. Die Lösung der Röntgenkristallstruktur der Variante Y167F ist in Arbeit.



## 5. Literaturverzeichnis

**Adman, E.T. (1991)** Copper protein structures. *Adv. Protein Chem.* 42, 145-197.

**Altmann, R. (1890)** Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig, Viet.

**Antalis, T.M. und Palmer, G. (1982)** Kinetic characterization of interaction between cytochrome oxidase and cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 257, 6194-6206.

**Babcock, G. T. und Wikström, M. (1992)** Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356, 301-309.

**Babcock, G. T. und Varotsis, C. (1993)** Discrete steps in dioxygen activation – the cytochrome oxidase / O<sub>2</sub> reaction. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 71-80.

**Baker G. M, Noguchi, M., Palmer, G (1986)** The Reaction of Cytochrome Oxidase with Cyanide: Preparation of the rapidly reacting form and its conversion to the slowly reacting form. *JBC*, 262, 59544,1987.

**Benecky, M. J., Frew, J. E., Scowen, N., Jones, P., Hoffman, B. M. (1993)** EPR and ENDOR detection of compound I from *Micrococcus lysodeikticus* catalase. *Biochemistry* 32, 11929-11933.

**Bickar, D., Bonaventura, J., Bonaventura, C. (1982)** Cytochrome *c* oxidase binding of hydrogen peroxide. *Biochemistry* 21, 2661-2666.

**Boogerd, F. C., van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H. (1980)** Electron transport to nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett* 113 (2), 279-84.

**Bosma, G., Braster, M., Stouthamer, A. H., van Verseveld, H. W. (1987)** Subfractionation and characterization of soluble *c*-type cytochromes from *Paracoccus denitrificans* cultured under various limiting conditions in the chemostat. *Eur J Biochem* 165 (3), 665-70.

**Bränden, M., Sigurdson, H., Namslauer, A., Gennis, R.B., Adelroth, P., Brzezinski, P. (2001)** On the role of the K-proton transfer pathway in cytochrome *c* Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 5013–5018.

**Brandt, U. und Trumppower, B. (1994).** The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29(3),165-97.

**Brandt, U. (1997)** Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* 1318 (1-2), 79-91.

**Brandt, U., Kerscher, S., Drose, S., Zwicker, K., Zickermann, V. (2003)** Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett* 545(1), 9-17.

- Bratton, M. R., Pressler, M. A., Hosler, J. P. (1999)** Suicide inactivation of cytochrome *c* oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site. *Biochemistry* 38 (49): 16236-45.
- Brown, S., Moody, A. J., Mitchell, R., Rich, P. R. (1993)** Binuclear centre structure of terminal protonmotive oxidases. *FEBS Lett* 316 (3): 216-23.
- Brzezinski, P und Ädelroth, P. (1998)** Proton-controlled electrontransfer in cytochrome *c* oxidase: functional role of the pathways through Glu 286 and Lys 362. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643, 7-16.
- Brzezinski, P. und Larsson, G. (2003)** Redox-driven protonpumping by heme-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1606, 1-13.
- Chance, B., Saronio, C., Leigh, J. S. (1975)** Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen. *J. Biol. Chem.* 250, 9226-9237.
- Chuang, W.-J. und van Wart, H. E. (1992)** Resonance Raman spectra of horseradish peroxidase and bovine liver catalase compound I species. Evidence for predominant 2A<sub>2u</sub> pication radical ground state configurations. *J. Biol. Chem.* 267, 13293-13301.
- Cooper, C. E., Jiinemann, S., Ioannidis, N., Wrigglesworth, J. M. (1993)** Slow ('resting') forms of mitochondrial cytochrome *c* Oxidase consist of two kinetically distinct conformations of the binuclear Cu<sub>B</sub>/a<sub>3</sub> centre - relevance to the mechanism of proton translocation. *BBA* 1144, 149-160.
- Darley-Usmar, V. M., Capaldi, R. A., Takamiya, S., Millett, F., Wilson, M.T., Malatesta, F., Sarti, P. (1987)** Mitochondria- A practical approach (Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D., Wilson, M.T. Eds.), pp. 143-144, IRL Press Ltd. Oxford.
- 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, J. (1994)** The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol Microbiol* 13 (2): 183-96.
- de Gier, J. W. , van Spanning, R. J. M., Oltmann, L. F., Stouthamer, A. H. (1992)** Oxidation of methylamine by *Paracoccus denitrificans* mutant impaired in the synthesis of the *bc1* complex and the *aa3*-type oxidase. Evidence for the existence of an an alternative cytochrome *c* oxidase in this bacterium. *FEBS Lett* 306, 23-26.
- De Vries, G.E., Harms, N., Hoogendijk, J., Stouthammer, A.H. (1989)** *Arch. Microbial.* 152, 52-57.
- Dürr, K.:** Gerichtete Mutagenese im D-Kanal der Untereinheit I der *aa3*-Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*  
Diplomarbeit, Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, 2003
- Espe M.P., Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., Babcock, G.T., McCracken, J. (1995)** A continuous wave and pulsed EPR characterization of the Mn<sup>2+</sup> binding site in *Rhodobacter spaeroides* cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* 34 (23): 7593-602.

- Fabian, M., Jancura D., Palmer G. (2004)** Two Sites of Interaction of Anions with Cytochrome *a* in Oxidized Bovine Cytochrome *c* Oxidase. *JBC* 279, 16170-16177.
- Fabian, M. und Palmer, G. (1995)** The interaction of Cytochrome *c* Oxidase with hydrogen peroxide: The relationship of compounds P and F. *Biochemistry* 34, 13802-13810.
- Fann, Y. C., Ahmed, I., Blackburn, N. J., Boswell, J.s., Verkhovskaya, M. L., Hoffmann, B. M., Wickström, M. (1995)** Structure of Cu<sub>B</sub> in the binuclear Heme-copper center of the Cytochrome aa<sub>3</sub>-type quinol oxidase from *Bacillus subtilis*: an ENDOR and EXAFS Study. *Biochemistry* 34, 10245-10255.
- Ferguson-Miller, S. und Babcock, G. T. (1996)** Heme/copper terminal oxidases. *Chem. Rev.* 96, 2889-2907.
- Fetter, J. R., Quian, J., Shapleigh, J., Thomas, J. W., Garcia-Horsman, J. A., Schmidt, E., Hosler, J., Babcock, G. T., Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S. (1995)** Possible proton relay pathways in cytochrome *c* Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1604-1608.
- Forte, E., Barone, M. C, Brunori, M., Sarti, P., Giuffre, A (2002)** Redox-Linked Protonation of Cytochrome *c* Oxidase: The Effect of Chloride Bound to Cu<sub>B</sub>. *Biochemistry* 41, 13046-13052.
- Gennis, R. B. (1992)** Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa<sub>3</sub>-type cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochim Biophys Acta* 1101 (2), 184-7.
- Gennis, R. B., (1998)** Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine. *Biochim. Biophys. Acta* 1356, 241-248.
- Gilderson, G., Salomonsson, L., Aagaard, A., Gray, J., Brzezinski, P., Hosler, J. (2003)** Subunit III of Cytochrome *c* Oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* Is Required To Maintain Rapid Proton Uptake through the D Pathway at Physiologic pH. *Biochemistry* 42 (24), 7400-7409.
- Gray, M. W., Burger, G., Lang, B. F. (1999)** Mitochondrial evolution. *Science* 283 (5407), 1476-81.
- Gray, M. W., Burger, G., Lang, B. F. (2001)** The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2 (6): REVIEWS1018.
- Grigorieff, N. (1998)** Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J Mol Biol* 277 (5), 1033-46.
- Haddock, B. A. und Jones, C. W. (1977)** Bacterial respiration. *Bacteriol Rev* 41 (1), 47-99.
- Hanahan, G. (1983)** *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Haltia T. (1992)** Reduction of Cu<sub>A</sub> induces a conformational change in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 22;1098 (3): 343-50.

- Haltia, T., Puustinen, A., Finel, M. (1988)** The *Paracoccus denitrificans* cytochrome *aa3* has a third subunit. *Eur J Biochem* 172 (3), 543-6.
- Haltia, T., Semo, N., Arrondo, J. L., Goni, F. M., Freire, E. (1994)** Thermodynamic and structural stability of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 33 (32), 9731-40.
- Hatefi, Y. und Stempel, K. E. (1967)** Resolution of complex I (DPNH-coenzyme Q reductase) of the mitochondrial electron transfer system. *Biochem Biophys Res Commun* 26 (3), 301-8.
- Hatefi, Y. (1976)** Composition and enzymatic properties of the mitochondrial NADH- and NADPH-ubiquinone reductase (complex I). *Adv Exp Med Biol* 74, 150-60.
- Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., v. Donk, W., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., Mäntele, W (2002)** Vibrational Modes of Tyrosines in Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*: FTIR and Electrochemical Studies on Tyr-D4-labeled and on Tyr280His and Tyr35Phe Mutant Enzymes. *Biochemistry* 41, 9116-9125.
- Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B., Ludwig, B. (1991)** Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes *aa3* from *Paracoccus denitrificans* and the 13-subunit beef heart enzyme. *Biophys J* 60 (2), 415-23.
- Hill, B. C. (1993)** The sequence of electron carriers in the reaction of cytochrome *c* oxidase with oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 25 (2), 115-20.
- Hinchliffe, P., Sazanov, L. A. (2005)** Organization of Iron-Sulfur Clusters in Respiratory Complex I. *Science* 309 (5735), 771-774.
- Hirano, T., Mogi, T., Tsubaki, M., Hori, H., Orii, Y., Anraku, Y., (1997)** A Novel Chlorid-Binding Site Modulates the Heme-Copper Binuclear Center of the *Escherichia coli* *bo*-Type Ubiquinol Oxidase. *J. Biochem.* 122 430-37.
- Hofacker, I. und Schulten, K. (1998)** Oxygen and proton pathways in cytochrome *c* oxidase. *Proteins* 30 (1), 100-7.
- Hoganson, C. W., Pressler, M. A., Proshlyakov, D. A., Babcock, G. T. (1998)** From water to oxygen and back again: Mechanistic similarities in the enzymatic redox conversions between water and oxygen. *Biochem. Biophys. Acta* 1365, 170-174.
- Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S., Calhoun, M. W., Thomas, J. W., Hill, J., Lemieux, L., Ma, J., Georgiou, C., Fetter, J., Shapleigh, J. (1993)** Insight into the active-site structure and function of cytochrome oxidase by analysis of site-directed mutants of bacterial cytochrome *aa3* and cytochrome *bo*. *J Bioenerg Biomembr* 25 (2), 121-36.
- Hosler, J.P., Espe, M.P., Zhen, Y., Babcock, G.T. Ferguson-Miller, S. (1995)** Analysis of site-directed mutants locates a non-redox-active metal near the active site of cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter spaeroides*. *Biochemistry* 34 (23): 7586-92.

- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. (1995)** Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376, 660-69.
- John, P. und Whatley, F. R. (1975)** *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* 254, 495-8.
- John, P. und Whatley, F. R. (1977)** The bioenergetics of *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 463(2), 129-53.
- Jünemann, S., Meunier, B., Fisher, N., Rich, P.R. (1999)** Effects of the Conserved Glutamic Acid-286 in Subunit I of Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 38, 5248-5255.
- Jünemann, S., Heathcote, P., Rich, P. R. (2000)** The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome *c* Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1456, 56-66.
- Karlson, P., Doeneke, D., Koolman, J. (1994)** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler 14. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York,
- Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W., Ruf, H. H. (1988)** Higher oxidationstates of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzymes during the Peroxidase reaction. *Eur. J. Biochem.* 171, 321-328.
- Kitagawa, T. und Ogura, T. (1997)** Oxygen activation mechanism at the binuclear site of heme-copper Oxidase superfamily as revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy. *Progr. Inorg. Chem.* 45, 431-479.
- Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., Michel, H. (1995)** Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes, *Biotechnology (N. Y.)* 13, 155-160.
- Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., Gennis, R. B. (1997)** The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9085-9090.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1994)** *Biotechniques* 16, 800-802.
- Lee, H. M., Das, T. K., Rousseau, D. L., Mills, D., Ferguson-Miller, S., Gennis, R. B. (2000)** Mutations in the putative H-channel in the cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* show that this channel is not important for proton conduction but reveal modulation of the properties of heme *a*. *Biochemistry* 39 (11), 2989-96.
- Lindsay, J. G., Owen, C. S., Wilson, D. F. (1975)** The invisible copper of cytochrome *c* oxidase. pH and ATP dependence of its midpoint potential and its role in the oxygen reaction. *Arch Biochem Biophys* 169 (2), 492-505.

- Ludwig, B. und Schatz, G. (1980)** A two-subunit cytochrome *c* oxidase (Cytochrome *aa3*) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1),: 196-200.
- Ludwig, B. (1986)** Cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Methods Enzymol* 126, 153-9.
- Ludwig, B. (1992)** Terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 1101 (2), 195-7.
- MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner T., Michel H. (1999)** Direct Evidence for a Tyrosine Radical in the Reaction of Cytochrome *c* Oxidase with Hydrogen Peroxide. *Biochemistry* 38, 9179-9183.
- Malatesta, F., Sarti, P., Antonini, G., Vallone, B., Brunori, M. (1990)** Electron transfer to the binuclear center in cytochrome oxidase: catalytic significance and evidence for an additional intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (19), 7410-3.
- Margulis, L. (1970)** Origin of Eukaryotic Cells. *New Haven CT, Yale Univ. Press.*
- Margulis, L. (1981)** Symbiosis in Cell Evolution. *San Francisco, Freeman*
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A. (1998)** Cytochrome *c* oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27,: 329-56.
- Michel, H. (1998)** The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12819-12824.
- Mills, D. A. und Ferguson-Miller, S. (1998)** Proton uptake and release in cytochrome *c* oxidase: separate pathways in time and space? *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 46-52.
- Mills, D. A., Tan, Z., Ferguson-Miller, S., Hosler, J. (2003)** A Role for Subunit III in Proton Uptake into the D Pathway and a Possible Proton Exit Pathway in *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome *c* Oxidase. *Biochemistry* 42 (24),7410-7.
- Mitchell, D. M., Fetter, J. R., Mills, D. A., Adelroth, P., Pressler, M. A., Kim, Y., Aasa, R., Brzezinski, P., Malmstrom, B. G., Alben, J. O., Babcock, G. T., Ferguson-Miller, S., Gennis, R. B. (1996)** Site-directed mutagenesis of residues lining a putative proton transfer pathway in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 35 (40),: 13089-93.
- Mitchell, P. (1961)** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191,: 144-148.
- Moody, A. J., Brandt, U., Rich, P. R. (1991)** Single electron reduction of 'slow' and 'fast' cytochrome *c* oxidase. *FEBS Lett* 293(1-2), 101-5.
- Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., Wikström, M. (1994)** The histidine cycle: a new model for proton translocation in the respiratory heme-copper oxidases. *J Bioenerg Biomembr* 26 (6), 599-608.

- Morgan, J.E., Verkhovsky, M. I., Wikström, M. (1996)** Observation and assignment of peroxy and ferryl intermediates in the reduction of dioxygen to water by cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* 35, 12235-12240.
- Namslauer, A., Pawate, A. S., Gennis, R. B., Brzezinski, P. (2003)** Redox-coupled proton translocation in biological systems: Proton shuttling in cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 15543-15547.
- Ogura, T., Hirota, S., Proshlyakov, D. A., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996)** Time-Resolved Resonance Raman Evidence for Tight Coupling between Electron Transfer and Proton Pumping of Cytochrome *c* Oxidase upon the Change from the Fe<sup>V</sup> Oxidation Level to the Fe<sup>IV</sup> Oxidation Level. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5443-5449.
- Olkhova, E., Hutter, M. C., Lill, M. A., Helms, V., Michel, H. (2004)** Dynamic Water Networks in Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans* Investigated by Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* 86 1873–1889.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., Michel, H. (1997)** Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10547-10553.
- Palmer, G., Babcock, G. T., Vickery, L. E. (1976)** A model for cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2206-2210.
- Patterson, W. R., Poulos, T. L., Goodin, D. B. (1995)** Identification of a porphyrin pi cation radical in ascorbate Peroxidase compound I. *Biochemistry* 34, 4342-4345.
- Pawate, A. S., Morgan, J., Namslauer, A., Mills, D., Brzezinski, P., Ferguson-Miller, S., Gennis, R. B. (2002)** A Mutation in Subunit I of Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Results in an Increase in Steady-State Activity but Completely Eliminates Proton Pumping. *Biochemistry* 41, 13417-13423.
- Penttilä, T. (1983)**. Properties and reconstitution of a cytochrome oxidase deficient in subunit III. *Eur J Biochem* 133 (2),: 355-61.
- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B, Richter, O.-M. H. (1998)** Cytochrome *c* Oxidase (Heme *aa3*) from *Paracoccus denitrificans*: Analysis of Mutations in Putative Proton Channels of Subunit I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 30, 89-97.
- Pfützner, U.:** Protonentranslokation in der Häm *aa3*- Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*- eine Mutagenesestudie  
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften; Fachbereich 15: Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, 2000
- Pfützner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O.-M. H., Ludwig, B. (2000)** Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry* 39, 6756-6762.

- Pinakoulaki, E., Pfitzner, U, Ludwig, B., Varotsis, C (2002)** Direct Detection of Fe(IV)=O Intermediates in the Cytochrome *aa3* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reaction. *JBC*, 277, 13563-13568.
- Pinakoulaki, E., Pfitzner, U, Ludwig, B., Varotsis, C (2003)** The Role of the Cross-link His-Tyr in the Functional Properties of the Binuclear Center in Cytochrome *c* Oxidase. *JBC* 278, 21, 18761-18766.
- Pomès, R., Hummer, G., Wikström, M. (1998)** Structure and dynamics of a proton shuttle in cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1365,: 255-260.
- Prisner, T., Rohrer, M., MacMillan, F. (2001)** Pulsed EPR spectroscopy: Biological Applications. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52, 279–313.
- Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996)** Resonance Raman / absorption characterization of the oxo intermediates of Cytochrome *c* Oxidase generated in its reaction with hydrogen peroxide: pH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration dependence. *Biochemistry* 35, 8580-8586.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., Babcock, G. T. (1998)** Dioxygen activation and bond cleavage by mixed valence cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8020-8025.
- Puettner, I., Carafoli, E., Malatesta, F. (1985)** Spectroscopic and functional properties of subunit III-depleted cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 260 (6),: 3719-23.
- Puustinen, A. und Wikström, M. (1999)** Proton exit from the heme-copper Oxidase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 35-37.
- Qian, J., Mills, D.A., Geren, L., Wang, K., Hoganson, C.W., Schmidt, B., Hiser, C., Babcock, G.T., Durham, B., Millett, F., Ferguson-Miller, S. (2004)** Role of the Conserved Arginin Pair in Proton and Elektron Transfer in Cytochrome *c* Oxidase. *Biochemistry* 43, 5748-5756.
- Rich P. R., Rigby, S. E., Heathcote, P. (2002)** Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome *c* Oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1554, 137–146.
- Rich, P. (2003)** Chemiosmotic coupling: The cost of living. *Nature* 421 (6923): 583.
- Richter, O.-M. H. und Ludwig, B. (2003)** Cytochrome *c* oxidase- structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147, 47-74.
- Richter, O.-H. M., Tao, J. S., Turba, A., Ludwig, B. (1994)** A cytochrome *ba3* functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J Biol Chem* 269 (37),: 23079-86.
- Rieder, R. und Bosshard, H.R. (1980)** Comparison of the binding sites on cytochrome *c* for cytochrome *c* oxidase, cytochrome *bc<sub>1</sub>*, and cytochrome *c<sub>1</sub>*. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 225, 4732-4739.



- Rigby, S. E., Jünemann, S., Rich, P. R., Heathcote, P. (2000)** Reaction of bovine cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide produces a tryptophan cation radical and a porphyrin cation radical, *Biochemistry* 39, 5921-5928.
- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel H., Fendler, K. (2000).** Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4632-6.
- Ruitenbergh, M. (2001)** Elektronen- und Protonentransport der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Frankfurt am Main.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual (Ford, N., Nolan, C. und Ferguson, M. Eds.), Cold Spring Harbor, N.Y.
- Saraste, M., Penttila, T., Wikström, M. (1981)** Quaternary structure of bovine cytochrome oxidase. *Eur J Biochem* 115 (2), 261-8.
- Saraste, M. (1990)** Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23 (4),: 331-66.
- Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lübber, M., van der Oost, J. (1991)** The happy family of cytochrome oxidases. *Biochem Soc Trans* 19 (3), 608-12.
- Saraste M. und Castresana J. (1994)** Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Letters* 341, 1-4.
- Sazanov, L. A. und Hinchliffe, P. (2006)** Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 9 February 2006.
- Schultz, B. E. und Chan, S. I. (2001)** Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30,: 23-65.
- Seelig, A., Ludwig, B., Seelig, J., Schatz, G. (1981)** Copper and manganese electron spin resonance studies of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 636(2): 162-7.
- Siravaja, M., Goodin, D. B., Smith, M., Hoffman, B. M. (1989)** *Science* 245, 738-740.
- Soloz, M., Carafoli, E., Ludwig, B. (1982)** The cytochrome *c* oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system. *J Biol Chem* 257(4),: 1579-82.
- Stouthamer, A. H., Boogerd, F. C., van Verseveld, H. W. (1982)** The bioenergetics of denitrification. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48 (6),: 545-53.
- Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Cooper, C. E. (2004)** Tryptophan or tyrosine? On the nature of the amino acid radical formed following hydrogen peroxide treatment of cytochrome *c* Oxidase. *BBA* 1655 372-80.
- Thelen, M., O'Shea, P. S., Petrone, G., Azzi, A. (1985)** Proton translocation by a native and subunit III-depleted cytochrome *c* oxidase reconstituted into phospholipid vesicles. Use of fluorescein-phosphatidylethanolamine as an intravesicular pH indicator. *J Biol Chem* 260 (6), 3626-31.

- Thomas, J. W., Lemieux, L. J., Alben, J. O., Gennis, R. B. (1993a)** Site-directed mutagenesis of highly conserved residues in helix VIII of subunit I of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*: an amphipathic transmembrane helix that may be important in conveying protons to the binuclear center. *Biochemistry* 32 (41): 11173-80.
- Thomas, J. W., Puustinen, A., Alben, J. O., Gennis, R. B., Wikström, M. (1993b)** Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity. *Biochemistry* 32 (40), 10923-8.
- Trumpower, B. L. (1976)** Evidence for a protonmotive Q cycle mechanism of electron transfer through the cytochrome *bc1* complex. *Biochem Biophys Res Commun* 70 (1), 73-80.
- Trumpower, B. L. (1990)** The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc1* complex. *J Biol Chem* 265 (20): 11409-12.
- Trumpower, B. L. und Gennis, R. B. (1994)** Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu Rev Biochem* 63, 675-716.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1995)** Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 269, 1069-1074.
- 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.
- Vanneste, W. H. (1966)** The Stoichiometry and Absorption Spectra of Components *a* and *a*<sub>3</sub> in Cytochrome *c* Oxidase. *Biochemistry* 5, 838-848.
- van Spanning, R. J., de Boer, A. P., Reijnders, W. N., De Gier, J. W., Delorme, C. O., Stouthamer, A. H., Westerhoff, H. V., Harms N., van der Oost, J. (1995)** Regulation of oxidative phosphorylation: the flexible respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr* 27 (5), 499-512.
- van Verseveld, H. W., Meijer, E. M., Stouthamer, A. H. (1977)** Energy conservation during nitrate respiration in *Paracoccus denitrificans*. *Arch Microbiol* 112 (1), 17-23.
- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan J. E., Wikström, M. (1999)** Proton translocation by cytochrome *c* oxidase. *Nature* 400 (6743): 480-3.
- Vygodina T. V. und Konstantinov, A. A. (1992).** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced conversion of Cytochrome *c* oxidase peroxy complex to oxoferryl state. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 550, 124-138.

- Vygodina T. V., Pecoraro C., Mitchell D., Gennis R., Konstantinov, A. A. (1998)** Mechanism of Inhibition of Electron Transfer by Amino Acid Replacement K362M in a Proton Channel of *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome *c* Oxidase *Biochemistry*, 37, 3053-3061.
- Watmough, N. J., Cheesman, M. R., Greenwood, C., Thomson, A. J. (1994)** Cytochrome *bo* from *Escherichia coli*: Reaction of the oxidized enzyme with hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 300, 469-475.
- Weng, L., Baker, G. M. (1991)** Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* 30, 5727-5733.
- Wiertz, F. G. M., Richter, O-M. H., Cherepanov, A. V., MacMillan, F., Ludwig, B., de Vries, S. (2004)** An oxo-ferryl tryptophan radical catalytic intermediate in cytochrome *c* and quinol oxidases trapped by microsecond freeze-hyperquenching (MHQ). *FEBS Letters* 575 127-130.
- Wikström, M. K. (1977)** Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria. *Nature* 266 (5599): 271-3.
- Wikström, M. K. und Saari, H. T. (1977)** The mechanism of energy conservation and transduction by mitochondrial cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* 462 (2), 347-61.
- Wikström, M. (1981)** Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4051-4054.
- Wikström, M. (1989)** Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton pumping. *Nature* 338, 776-778.
- Wikström M. und Morgan, J.E. (1992)** The dioxygen cycle: Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction. *J. Biol. Chem.* 267, 10266-73.
- Wikström, M. (2000)** Mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase: a new four-stroke histidine cycle. *Biochim Biophys Acta* 1458 (1), 188-98.
- Wikström, M. (2000)** Proton translocation by cytochrome *c* oxidase: A rejoinder to recent criticism, *Biochemistry* 39, 3515-19.
- Witt, H. und Ludwig, B. (1997)** Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome *c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* 272, 5514-5517.
- Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M., Ludwig, B. (1998a)** Cytochrome-*c* binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*, *Eur. J. Biochem.* 251, 367-373.
- Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M., Ludwig, B. (1998b)** Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome *c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Involvement of a hydrophobic patch in the docking reaction. *J Biol Chem* 273 (9): 5132-6.

**Witt, S. N., Blair, D. F., Chan, S. I. (1986)** Chemical and spectroscopic evidence for the formation of a ferryl  $F_{a_3}$  intermediate during turnover of cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 261, 8104-7.

**Witt, S. N. und Chan, S. I. (1987)** Evidence for a ferryl  $F_{a_3}$  in oxygenated cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 262, 1446-48.

**Woodruff, W. H., Einarsdottir, O., Dyer, R. B., Bagley, K. A., Palmer, G., Atherton, S. J., Goldbeck, R. A., Dawes, T. D., Kliger, D. S. (1991)** Nature and functional implications of the cytochrome  $a_3$  transients after photodissociation of CO-cytochrome Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2588-2592.

**Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki T., Tsukihara, T. (1998)** Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Science* 280 (5370), 1723-9.

**Zaslavsky, D. und Gennis, R. B. (1998)** Substitution of Lysine-362 in a Putative Proton-Conducting Channel in the Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Blocks Turnover with  $O_2$  but Not with  $H_2O_2$ . *Biochemistry* 37, 3062-3067.

**Zaslavsky, D. und Gennis, R. B. (2000)** Proton pumping by cytochrome oxidase: progress, problems and postulates, *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 164-179.

**Zickermann, I., Tautu, O. S., Link, T. A., Korn, M., Ludwig, B., Richter, O. M. (1997).** Expression studies on the *ba3* quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A *bb3* variant is enzymatically inactive. *Eur J Biochem* 246 (3), 618-2.

## Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-dihosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CcO	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FMN	Flavinmononukleotid (oxidierte Form)
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
F <sub>V</sub>	Antigenbindende Domäne eines Antikörpers (bestehend aus V <sub>L</sub> und V <sub>H</sub> )
G	Erdschwerebeschleunigung, Gramm
Gm	Gentamycin
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
min	Minuten
NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
Rif	Rifampicin
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>

RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylphosphat
Sm	Streptomycin
Spc	Spektinomycin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbarer Spektralbereich
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

# Lebenslauf

## Zur Person

Kerstin Eva Budiman geb. Haupt  
verheiratet, eine Tochter (geb. 20.01.2005)  
22.01.1973 in Koblenz

## Schullaufbahn

1979-1983	Grundschule
1983-1992	staatliches Gymnasium auf der Karthause (Koblenz)
1992	Abitur

## Studium

1992-1993	Studium der ev. Theologie an der kirchlichen Hochschule Bethel (Bielefeld)
1993-2000	Studium der Biologie und Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Juni 2000	1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien (Biologie und Chemie) Diplom in Biologie Thema der Diplomarbeit: „Isolierung und Reassoziaton von Teilkomplexen des Photosystems II aus <i>Zea Mais</i> “ vorgelegt im Fachbereich Allgemeine Botanik (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Paulsen)
10/2000-3/2005	Doktorandin am Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt am Main (Abteilung Molekulare Membranbiologie Prof. Dr. H. Michel)

## Danke

Die Zeit, die ich während meiner Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik verbringen durfte, war für mich in vielerlei Hinsicht etwas Besonderes. So konnte ich das Wissen, das ich in meinem Studium gewonnen hatte, auf vielen Gebieten erweitern und vertiefen. Dies wäre nicht möglich gewesen, ohne das harmonische Arbeitsklima am Institut und die Hilfsbereitschaft, die mir von allen meinen Kollegen stets entgegengebracht wurde.

Bei Prof. Dr. Hartmut Michel bedanke ich für die Aufnahme als Doktorandin am MPI, für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und für deren Betreuung.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Vertretung meiner Doktorarbeit im Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie und dafür, dass er ein stets offenes Ohr für alle auftretenden Fragen und Probleme hatte.

Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. Fraser MacMillan für die intensive und erfolgreiche Zusammenarbeit aussprechen. Die von ihm und Sevdalina Lyubenova durchgeführten EPR-Experimente und unsere häufigen Diskussionen hatten einen großen Anteil am Erfolg meiner Arbeit.

Christian Bamann und Prof. Dr. Klaus Fendler danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Protonenpumpexperimente und für die vielen intensiven Diskussionen über die Oxidase.

Bei Dr. Petra Hellwig bedanke ich mich für die Durchführung der FTIR-Experimente.

Dr. Aimo Kannt danke ich für die Hilfe zu Beginn meiner Doktorarbeit, die mir den Einstieg in die Thematik sehr erleichtert hat.

Mein besonders herzlicher Dank gilt allen meinen Kollegen aus unserem Labor für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft, die sie mir insbesondere auch während meiner Schwangerschaft entgegengebracht haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Hannelore Müller dafür bedanken, dass sie mir viele Tricks und Kniffe für die Laborarbeit beigebracht und mir sehr häufig bei Zellanzuchten und Proteinaufreinigungen geholfen hat. Bei Cornelia Münke bedanke ich mich für die Hilfe bei molekularbiologischen Problemen. Bei Kristina Kirchberg, Elena Olkhova und Chitra Radjendran bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im „Oxidase-Team“ und dafür, dass wir bei einer Tasse Kaffee nicht nur über die Arbeit sprechen konnten.



Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für ihre Liebe und Unterstützung danken. Meiner Mutter danke ich insbesondere dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht hat und dass sie mich immer ermutigt hat meinen eigenen Weg durchs Leben zu finden. Bei meinem Mann Thomas bedanke ich mich dafür, dass er mir stets mit seiner Liebe und mit seinem Rat zur Seite stand. Last but not least möchte ich mich bei meiner Tochter Elisabeth dafür bedanken, dass sie mir ab und zu die Zeit gelassen hat diese Arbeit fertig zu stellen.