

NMR-spektroskopische Untersuchungen
der Excisionase aus Bakteriophage HK022 sowie des
Elektronentransferkomplexes des Cytochrom c_{552} und der
 Cu_A -Domäne aus *Thermus thermophilus*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Naturwissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Lucia Mureşanu
aus Cluj-Napoca,
Rumänien

Frankfurt am Main, 2005
(DF1)

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

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

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

Datum der Disputation: _____

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Bakterienstämme	16
2.1.2 Plasmide	16
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Stammlösungen	18
2.1.5 Nährmedien	19
2.1.6 Geräte	20
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 Bakterienstammhaltung	20
2.2.2 Transformation	21
2.3 Proteinchemische Methoden	21
2.3.1 Expression und Aufreinigung der Excisionase	21
2.3.2 Expression und Aufreinigung des Cytochrom c_{552}	22
2.3.2.1 Periplasma-Präparation	24
2.3.2.2 Säulenchromatographie	24
2.3.2.3 Kinetische Untersuchungen	25
2.3.3 Expression und Aufreinigung der Cu_A -Domäne	26
2.4 NMR-spektroskopische Methoden	28
2.4.1 Excisionase	28
2.4.1.1 Probenvorbereitung	28
2.4.1.2 NMR-Experimente	28
2.4.1.3 Strukturrechnung	29

2.4.2 Cytochrom c_{552} und Cu_A -Domäne	30
2.4.2.1 Probenvorbereitung	30
2.4.2.2 NMR-Experimente	32
2.4.2.3 Analyse der Kontaktregionen	32
2.4.2.4 Berechnung des Proteinkomplexes	33
3. Ergebnisse und Diskussion	35
3.1 Excisionase	35
3.1.1 Zuordnung der ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -Resonanzen	35
3.1.2 Strukturuntersuchung	44
3.2 Cytochrom c_{552}	53
3.2.1 Zuordnung der ^1H - und ^{15}N -Resonanzen	53
3.2.1.1 Reduziertes Cytochrom c_{552}	53
3.2.1.2 Oxidiertes Cytochrom c_{552}	59
3.2.2 Funktionelle Untersuchungen	63
3.2.3 Histidintitrationsen	64
3.2.4 Analyse der Kontaktfläche	65
3.3 Cu_A-Domäne	72
3.3.1 Zuordnung der ^1H - und ^{15}N -Resonanzen	72
3.3.1.1 Reduzierte Cu_A -Domäne	72
3.3.1.2 Oxidierte Cu_A -Domäne	74
3.3.2 Histidintitrationsen	79
3.3.3 Analyse der Kontaktfläche	80
3.3.4 Kontakte zwischen der Cu_A -Domäne und Cytochrom c_{552}	82
4. Zusammenfassung	92
5. Literaturverzeichnis	94
6. Abkürzungsverzeichnis	104

1. Einleitung

In fast allen biologischen Prozessen sind Proteine anzutreffen, die vielfältige Funktionen ausführen, wie beispielsweise DNA-Rekombination, Elektronentransport, Metabolismus, Immunabwehr, Zellwachstum, etc. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten drei Proteine mittels hochaufgelöster NMR-Spektroskopie strukturell untersucht werden: die Excisionase (Xis) aus dem Bakteriophagen HongKong022, welche eine Rolle bei der DNA-Rekombination spielt, sowie die Elektronentransportproteine Cytochrom c_{552} und Cu_A -Domäne aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus thermophilus*.

I. Excisionase

Bakteriophagen sind Viren, die Bakterienzellen wie z.B. *Escherichia coli* infizieren können. Sie sind aus zwei Komponenten aufgebaut: einem Nukleinsäuremolekül und einer aus mehreren Proteinbausteinen bestehenden Hülle. Entsprechend der Art der Nukleinsäure werden die verschiedenen Bakteriophagen entweder in sogenannte DNA-haltige, wie die Bakteriophagen λ , T2, T4 und T7, oder in RNA-haltige, wie die Bakteriophagen f2, MS2 und R17, unterteilt. Das Bakteriophage λ beispielsweise gehört zu den temperenten Phagen, d.h., es kann alternative Infektionswege einschlagen. Dies ist zum einen der lytische Zyklus, d.h. die Vermehrung innerhalb der Wirtszelle und die Zerstörung der Zelle durch Lyse, und zum anderen der lysogene Zyklus, d.h. der Einbau der Phagen-DNA in das Genom der Wirtszelle verbunden mit einer temporären Hemmung der Phagenvermehrung sowie der Lyse.

Die beiden eng miteinander verwandten Bakteriophagen λ und HK022 (Dhillon et al., 1981) verwenden im Laufe eines Lebenszyklus den gleichen Mechanismus für die Integration und Excision ihrer Genome in der Wirtszelle. Die Excisionasen beider Bakteriophagen unterscheiden sich außerdem in nur einem einzigen Aminosäurerest und können daher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* miteinander vertauscht werden (Yagil und Dolev, 1989).

Die Excisionase aus dem Bakteriophagen HK022 ist ein typisches DNA-bindendes Protein mit vielen basischen Aminosäuren. Es besteht aus insgesamt 72 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 8635 Da. Das Protein ist *in vitro* sehr instabil aufgrund seiner ausgeprägten Neigung zur Aggregatbildung, hervorgerufen durch intermolekulare Disulfid-

brücken des einzigen Cysteinrestes. Um die Bildung solcher Disulfidbrücken zu verhindern, wurde das Cys28 durch ein Serin ersetzt (Rogov et al., 2003). Bei allen für die Strukturaufklärung der Excisionase relevanten Experimenten wurde in dieser Arbeit die C28S Mutante verwendet.

Die Excisionase hat eine besondere Funktion in der genetischen Rekombination, bei der größere DNA-Fragmente umgeordnet werden, wodurch die Bildung neuer Genanordnungen auf einem Chromosom ermöglicht wird. Bei diesen Umordnungen der Gensegmente unterscheidet man zwischen Transposition, homologer Rekombination und sequenzspezifischer Rekombination. Die sequenzspezifische Rekombination eines temperenten Bakteriophagen in seinem bakteriellen Wirt ist für die Integration und Excision des Phagengenoms in und aus dem bakteriellen Chromosom verantwortlich. Die Excisionase besitzt hierbei eine Schlüsselrolle in der Reorientierung der Rekombinationsrichtung.

Die DNA-Bindung der Excisionase erfolgt kooperativ an zwei Stellen, den durch 7 Basenpaare getrennten Positionen X1 und X2. X1 ist die Bindungsstelle mit der höheren Affinität; wenn diese besetzt ist, wird die Bindung an X2 erleichtert. Die X2 Bindungsstelle ist überlagert mit der FIS Bindungsstelle F. Der zelluläre Proteinfaktor für umgekehrte Stimulation, FIS, fördert zwar auch die Excision, kann aber die Excisionase letztendlich nicht ersetzen (Landy, 1989; Nash, 1996).

Die Excisionase fördert außerdem die Bindung von Integrase an deren zweiter spezifischer Bindungsstelle, P2, welche eine niedrige Affinität gegenüber Integrase zeigt (Bushman et al., 1984). In der Regel sind 4 Integrasemoleküle an der komplizierten Rekombinationsreaktion beteiligt (Abb. 1); sie generieren die korrekte räumliche Anordnung für den DNA-Austausch. Dies geschieht sowohl durch Wechselwirkungen untereinander als auch durch Wechselwirkungen mit ihren verschiedenen DNA-Bindungsstellen (B, B', C, C', P1, P'1, P2 und P'2). DNA-DNA-Wechselwirkungen sind hierbei nicht von Bedeutung (Nunes-Düby et al., 1989).

Der Verlauf dieser Reaktion wird wie folgt beschrieben (siehe Abb. 1): ein Integrasemolekül bindet zuerst mit seiner C-terminalen Domäne an B im Kern von *attL* und bildet dann eine Brücke, indem sein N-Terminus an P2 auf *attR* bindet. Die zwei Hilfsproteine IHF und Excisionase begünstigen diesen Vorgang, indem sie die erforderlichen DNA-Krümmungen einführen. Das bereits gebundene Integrasemolekül erleichtert das Einfangen von zwei weiteren Integrasemolekülen, welche im Kernbereich mit ihren C-Termini an C auf *attR* bzw. an C' auf *attL* binden. Die relativ schwache Protein-DNA-Bindung in der Kernregion wird durch stabile

Protein-Protein-Wechselwirkungen ausgeglichen. Das an C gebundene Integrasemolekül kann jetzt mit seinem N-Terminus an die P'2 Bindungsstelle auf *attL* binden, während das an C' gebundene Molekül mit P'1 wechselwirkt. Die B' Bindungsstelle wird in diesem Modell nicht direkt in den Excisionsvorgang einbezogen, bietet aber Platz für noch ein viertes Integrasemolekül. Diese Anordnung stellt einen möglichen Ausgangspunkt für den sich anschließenden exzisen Rekombinationsvorgang dar (Kim und Landy 1992).

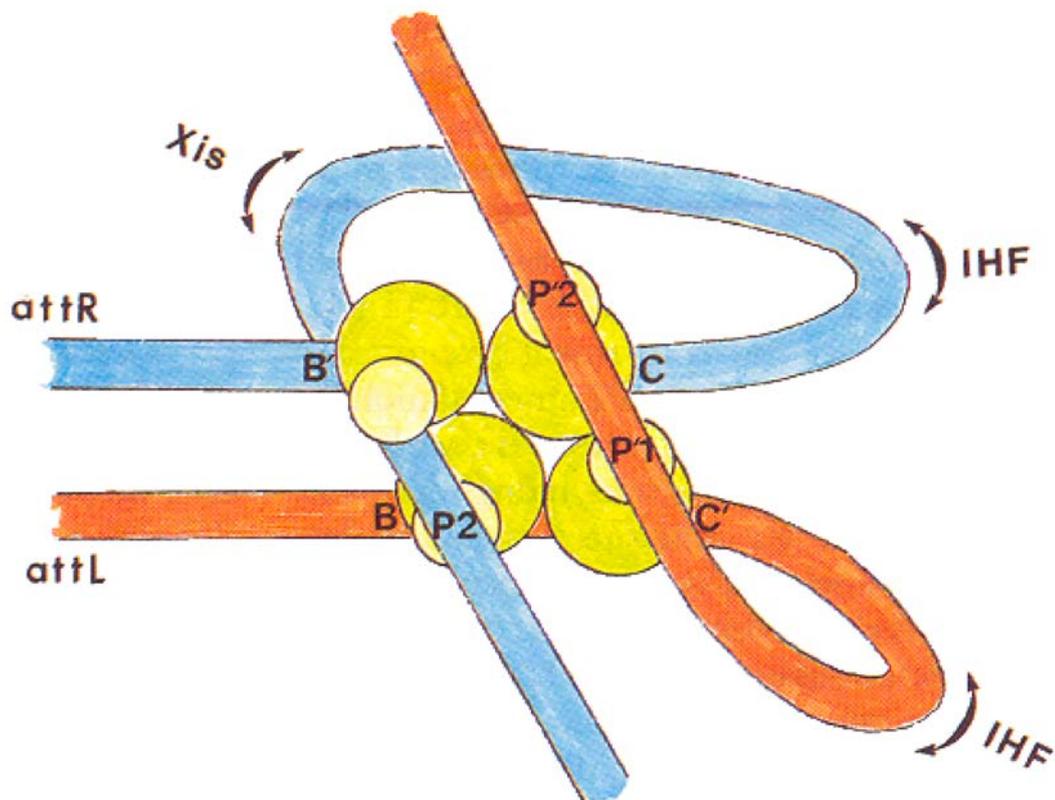


Abb. 1: Modell für die Integrase-vermittelten Wechselwirkungen zwischen Arm- und Kernbindungsstellen von *attL* (orange) und *attR* (blau) während der exzisen Rekombination. IHF und Excisionase (Xis) führen Krümmungen in *attR* und *attL* ein. Die bivalenten Integrasemoleküle (gelb) bildet intra- und intermolekulare Brücken, indem die kleineren N-terminalen Domänen an die Arme und die größeren C-terminalen Domänen, die außerdem das katalytisch aktive Zentrum enthalten, an die Kerne binden. [Abbildung adaptiert nach (Kim und Landy, 1992).]

II. Cytochrom c_{552}

In der mitochondrialen Atmungskette von Eukaryoten wird mit Hilfe verschiedener Enzyme, die als Redoxkatalysatoren fungieren, der größte Teil der für einen Organismus notwendigen Energie gewonnen. Bakterien hingegen weisen analoge nicht-mitochondriale Atmungsketten auf, bei denen das Zytosol die Rolle der mitochondrialen Matrix und die Zellmembran die Aufgabe der inneren Mitochondrienmembran übernehmen. Die Redoxkatalysatoren sind in den meisten Fällen Metalloproteine wie beispielsweise Cytochrome, Flavoproteine oder Fragmente eines größeren Enzymkomplexes. Im Laufe der Evolution haben sich diese Proteine nur wenig verändert; dies zeigt die Tatsache, daß sogar das Cytochrom c von einfachen Bakterien in der Lage ist Elektronen auf nahezu jede beliebige eukaryotische Cytochrom c Oxidase zu übertragen. Die Charakterisierung von Elektronentransferproteinen aus einfachen Organismen läßt daher durchaus Rückschlüsse auf analoge Proteine in der Atmungskette des Menschen zu. Cytochrome sind Häm-haltige Proteine, die mit einer reversiblen Änderung des Oxidationszustandes ihrer prosthetischen Gruppe assoziiert werden (Reedijk, 1992). Diese Redoxänderung ruft ein reversibles Gleichgewicht zwischen dem reduzierten Ferrohäm (Fe^{2+}) und oxidierten Ferrihäm (Fe^{3+}) Zustand des zentralen Eisenatoms hervor. Nach der Art wie die prosthetische Hämgruppe an das Protein gebunden ist, teilt man die Cytochrome in fünf Klassen ein: a , b , c , d oder o .

Die c -Typ Cytochrome, welche in pro- und eukaryotischen Organismen vorkommen, sind Substrate der terminalen Oxidasen in der oxidativen Phosphorylierung. Sie sind in der Regel kleine lösliche Proteine mit einem Häm c als prosthetische Gruppe, welche durch 2 Cysteinreste (Cys11 und Cys14), die in einem Cys-X-Y-Cys-His Motiv liegen, kovalent gebunden wird, und deren zentrales Eisenatom von dem Histidinrest des gleichen Motivs (His15) sowie einem Methionin (Met 69) als axiale Liganden koordiniert wird.

Das in dieser Arbeit untersuchte Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus* ist ein globuläres Protein, bestehend aus 133 Aminosäureresten (14405 Da) und einem Häm c . Die Sekundärstruktur weist 7 α -Helices und 4 kurze β -Faltblattstränge auf (Abb. 2). Das C-terminale Ende besteht in den letzten 25-30 Aminosäuren aus einer sogenannten Thermoklammer, die dem Protein vermutlich einen Schutz vor hohen Temperaturen bietet.

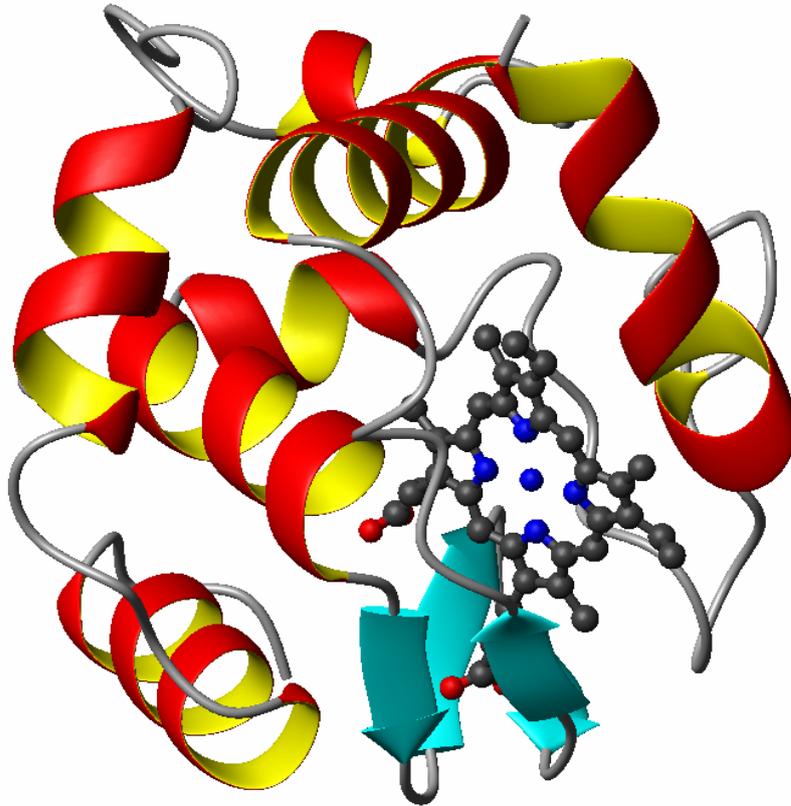


Abb. 2: Räumliche Struktur des Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus* (Soulimane et al., 1997). Das Häm (Kugelmodell) liegt in einer Bindungstasche, umgeben von verschiedenen α -Helices (gelb/rot) und β -Faltblattsträngen (zyan).

Es wurden mittels NMR bereits Strukturuntersuchungen an dem Cytochrom c_{552} aus *Paracoccus denitrificans* durchgeführt (Reincke, 2000; Reincke et al., 2001) und Wechselwirkungsstudien zwischen diesem entsprechenden Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne der aa_3 -Oxidase unternommen (Wienk et al., 2003); da sich aber die Cu_A -Domäne aus *P. denitrificans* während der NMR-Messungen als zu instabil erwies, wurde nun zu dem System aus *T. thermophilus* gewechselt.

Letzteres Bakterium ist extrem thermophil und kann bei 72 °C in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck zwei Oxidasen exprimieren, die c_1aa_3 - und die ba_3 -Oxidase; unter sauerstoffarmen Bedingungen wird die ba_3 -Typ Oxidase bevorzugt gebildet (Fee et al., 1980; Soulimane et al., 1995). Bei dem c_1aa_3 -Typ bilden das Cytochrom c_{552} und die Cytochrom c Oxidase funktionale Domänen einer gemeinsamen strukturellen Einheit, während bei der ba_3 -

Oxidase das Cytochrom c_{552} im Periplasma als mobiler Elektronentransporter zur Untereinheit II fungiert (Soulimane et al., 1997).

III. Cu_A -Domäne

Oxidasen sind terminale Membranproteinkomplexe in der Atmungskette von pro- und eukaryotischen aeroben Organismen, welche die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser katalysieren und dabei reduziertes Cytochrom c_{552} oxidieren. Die Untereinheiten I und II der komplexeren Cytochrom c Oxidasen in Säugetieren sind homolog zu den beiden Untereinheiten der ba_3 -Oxidase aus dem Bakterium *T. thermophilus*. Hieraus kann gefolgert werden, daß die Untereinheiten I und II ein funktionales Kernstück dieser Oxidasen sind (Saraste, 1990).

Die ba_3 -Typ Oxidase ist die kleinste bekannte Cytochrom c Oxidase (84,9 kDa, 764 Aminosäurereste). Sie besteht aus mehreren Untereinheiten (Abb. 3): Untereinheit I sitzt in der Membran und enthält 2 Häm Moleküle (Häm a_3 und Häm b) sowie ein Cu_B -Zentrum, Untereinheit II ragt in das Periplasma und ist durch einen Transmembrananker an die Membran gebunden und Untereinheit IIa stellt eine einzelne Transmembranhelix mit bisher unbekannter Funktion dar. Das binukleäre Cu_A -Zentrum, über das die Elektronen vom Cytochrom c_{552} zur Oxidase gelangen, befindet sich in Untereinheit II. Im Gegensatz zu anderen Cytochrom c Oxidasen, die pro Elektron ein Proton durch die Membran transportieren können, pumpt die ba_3 -Oxidase jedoch nur 0,5 Protonen pro Elektrontransfer (Kannt et al., 1998).

Die in dieser Arbeit untersuchte wasserlösliche Cu_A -Domäne, von der der Transmembrananker entfernt wurde, besteht aus 136 Aminosäureresten (Ala34-Glu168 sowie einem N-terminalen Methionin für die rekombinante Expression) und 2 Kupferatomen. Sie hat ein Molekulargewicht von 15062 Da (inklusive der beiden Kupferatome) und ist aus 10 β -Strängen und 2 kurzen α -Helices aufgebaut (Abb. 4).

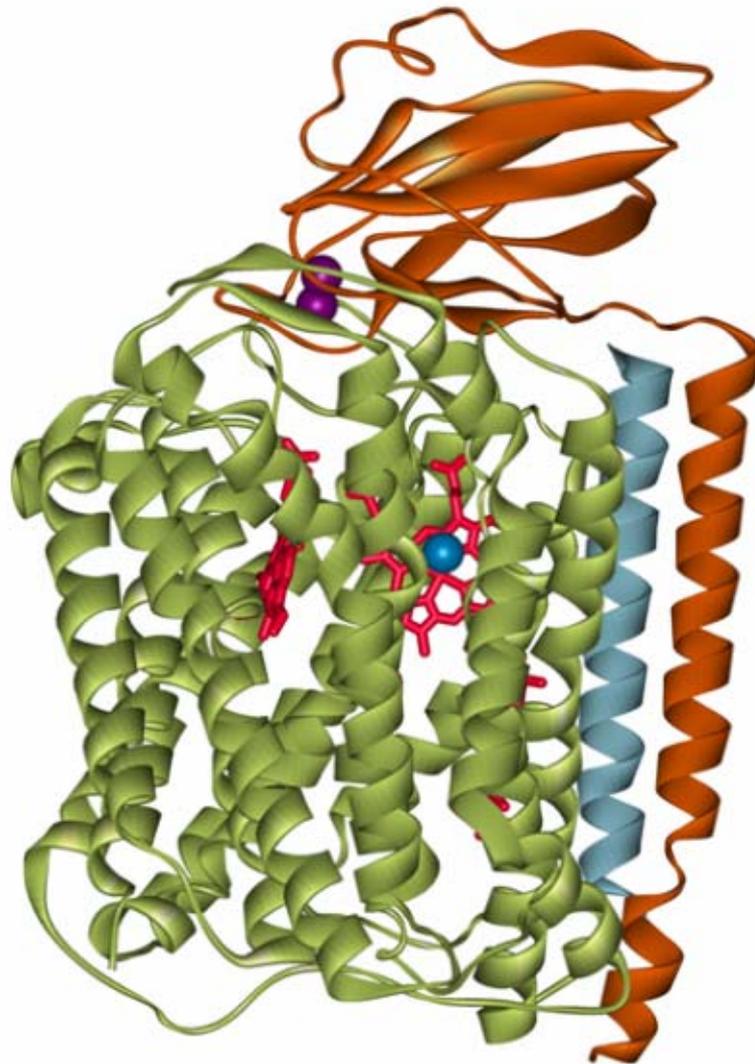


Abb. 3: Räumliche Struktur der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* (Soulimane et al., 2000). Die Untereinheiten I (grün), II (orange) und IIa (hellblau) sind als Bänder dargestellt. Zusätzlich sind die Hämringe a_3 und b (rot) sowie die Cu_A - (lila) und Cu_B -Zentren (dunkelblau) erkennbar.

Das Cu_A -Zentrum ist asymmetrisch; eines der beiden Kupferatome ist tetraedrisch von 2 Thiolgruppen (Cys149 und Cys153), einem Imidazolstickstoff (His114) und einem Schwefelatom (Met160) koordiniert, während das andere Kupfer trigonal mit den gleichen Thiolgruppen und einem weiteren Imidazolstickstoff (His157) verbunden ist (Williams et al., 1999). Die beiden Kupferionen liegen im reduzierten Zustand einwertig vor; makroskopisch ist in diesem Zustand keinerlei Färbung im sichtbaren Licht zu erkennen. Im oxidierten Zustand, der einen

lila Farbton zeigt, haben beide Metallionen im Mittel eine Ladung von +1,5; d.h., es liegt eine gemischte Valenz bezüglich des Elektronenzustandes vor (Antholine et al., 1992; Kelly et al., 1993).

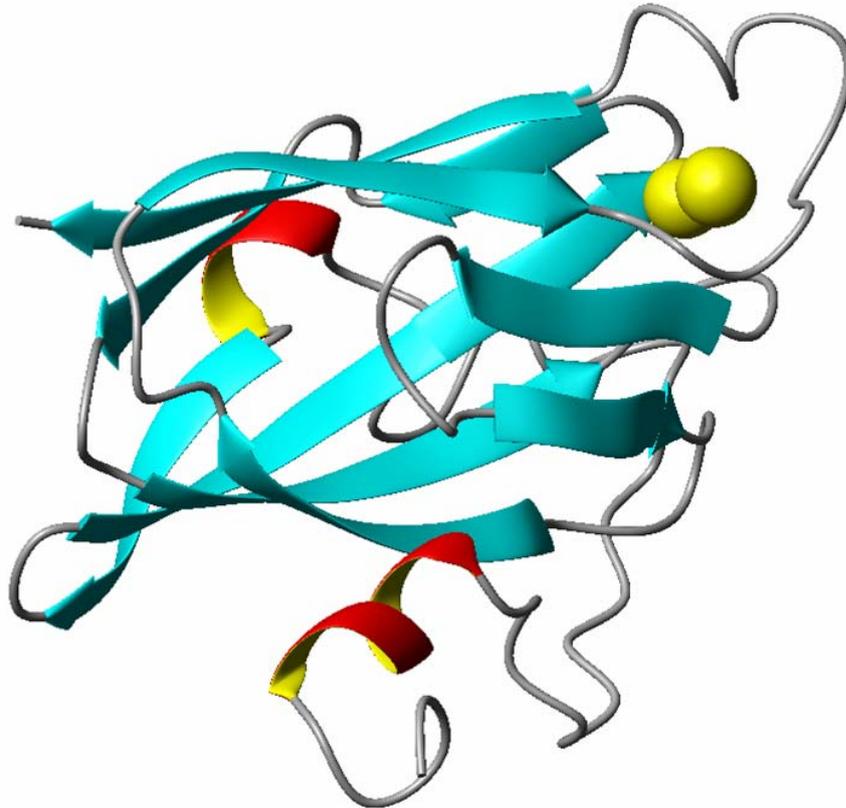


Abb. 4: Räumliche Struktur der löslichen Cu_A -Domäne der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* (Williams et al., 1999). Die 2 α -Helices (gelb/rot) und 10 β -Faltblattstränge (zyan) sind als Bänder dargestellt. Die beiden Kupferatome des Cu_A -Zentrums sind als gelbe Kugeln eingezeichnet.

Die Funktion der Cu_A -Domäne besteht in der Weiterleitung von Elektronen vom Cytochrom c_{552} zu den beiden Hämzentren in der Untereinheit I der ba_3 -Oxidase. Bis jetzt gab es bereits einige Studien über den Elektronentransportweg vom Cu_A - zum Cu_B - Zentrum (Soulimane et al., 2000) und weiter zum Häm a_3 . Es fehlen hingegen genaue Informationen über den ersten Schritt dieses Weges, wenn das Elektron vom Cytochrom c_{552} zum Cu_A -Zentrum übertragen wird.

Bei der Elektronenübertragung zwischen zwei Proteinen spielen weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle in der räumlichen Orientierung der beiden Bindungspartner (Bendall, 1996). Hydrophobe Wechselwirkungen über kurze Distanzen sind dann für die Feinjustierung der beiden Proteine und für die Spezifität des Elektronentransfers zuständig. Mit Hilfe von Mutagenesestudien, kinetischen Messungen, Kristallstrukturanalyse und Wechselwirkungsuntersuchungen mittels NMR konnte man für die Cytochrom c_{552} / Cu_A -Systeme aus *P. denitrificans* sowie *T. thermophilus* bereits einige Erkenntnisse hierüber gewinnen (Maneg et al., 2003; Soulimane et al., 2000). Anhand der NMR-Strukturen des Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* (Pristovšek et al., 2000) konnte anschließend gezeigt werden, daß die Bindungsstelle der Cu_A -Domäne an Cytochrom c_{552} hauptsächlich durch Lysinreste definiert wird (Wienk et al., 2003). Auf der Untereinheit II der aa_3 -Oxidase befinden sich dementsprechend nahe der Bindungsstelle verschiedene saure Reste (Witt et al., 1998a und b; Drosou et al., 2002a und b). Außerdem wurde nachgewiesen, daß im *P. denitrificans* System die Ionenstärke des Medium den Elektronentransfer zwischen Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne beeinflusst (Maneg et al., 2003); d.h., in diesem Fall beruht der Elektronentransfer auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Bei dem Cytochrom c_{552} / Cu_A -System aus *T. thermophilus* hingegen fehlen diese geladenen Reste an der Moleküloberfläche, weshalb die Wechselwirkungen in diesem Fall hydrophober Natur zu sein scheinen (Abb. 5). Diese Hydrophobizität gibt der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* eine hohe Spezifität gegenüber ihrem Cytochrom c_{552} Substrat (Williams et al., 1999). Eine Reaktion der Cu_A -Domäne aus *T. thermophilus* mit dem Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* findet daher beispielsweise nicht statt (Reincke, 2000).

Desweiteren konnte an der Cu_A -Domäne aus *P. denitrificans* durch Punktmutationen gezeigt werden, daß der Elektronentransfer ohne Trp121 nicht erfolgt, also dieser Tryptophanrest essentiell ist (Drosou et al., 2002b). Der analoge Aminosäurerest in der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus* sollte das Phe88 sein. Kinetische Untersuchungen mit einer F88L Mutante haben jedoch gezeigt, daß aufgrund dieser Mutation nur 50% der Aktivität verloren geht (Maneg et al., 2003; Witt et al., 1998b). Mit anderen Worten, der aromatische Phenylring ist für die Elektronenübertragung im *T. thermophilus* System nicht unbedingt notwendig.

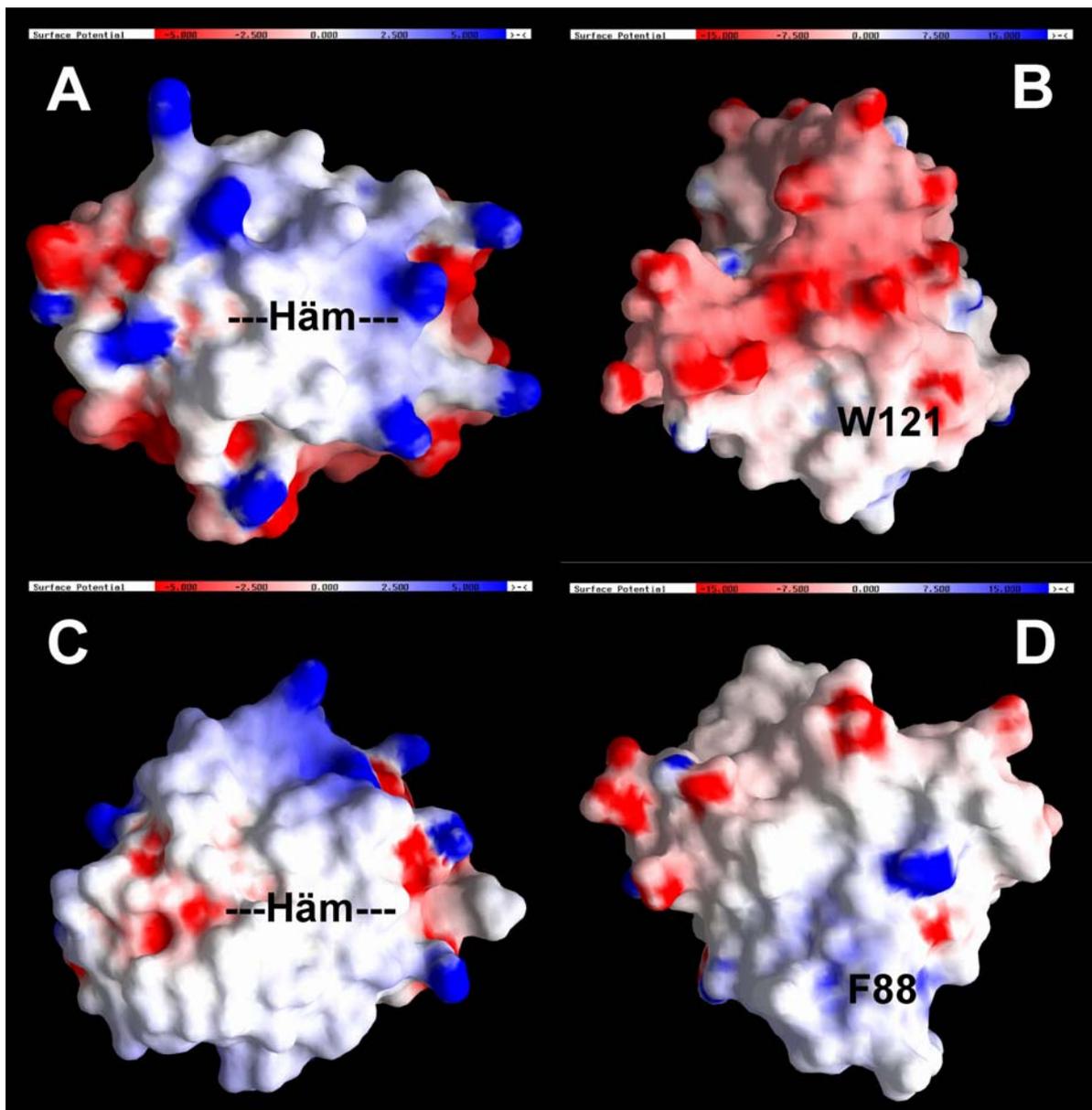


Abb. 5: Graphische Darstellung der elektrostatischen Oberflächenpotentiale von Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne (Maneg et al., 2003). Die sauren Aminosäuren (Asp und Glu) sind in Rot, die stark basischen Reste (Lys und Arg) in Blau eingefärbt. Im *P. denitrificans* System (A und B) weist das Cytochrom c_{552} mehrere positiv geladene Lysinreste rund um die Hämspalte auf, während in der Cu_A -Domäne negativ geladene Reste in der Nähe des für die Elektronenübertragung essentiellen Trp121 liegen. Im *T. thermophilus* System (C und D) sind hingegen deutlich weniger geladene Reste an den potentiellen Interaktionsflächen um das Häm bzw. Phe88 herum zu finden.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren die strukturellen Charakterisierungen der Proteine Excisionase, Cytochrom c_{552} und Cu_A -Domäne mit Hilfe von NMR-Experimenten. Die hochaufgelöste NMR-Spektroskopie ist neben der Röntgenstrukturanalyse insbesondere für die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen geeignet. Im Rahmen der Studie mit der Excisionase sollte die dreidimensionale Struktur der aktiven Domäne bestimmt werden, um die physiologische Bedeutung des Proteins besser deuten und verstehen zu können.

Zur Ermittlung des möglichen Elektronentransferweges zwischen Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne aus *T. thermophilus* sollten die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Redoxpartnern analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die löslichen Fragmente beider Proteine im Vorfeld für die heterologe Expression in *E. coli* kloniert (Maneg et al., 2003). Die Interaktionsflächen der beiden Fragmente im transient gebildeten Komplex konnten anhand von Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte ermittelt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS (Studier und Moffat, 1990) wurde von AGS GmbH, Heidelberg, bezogen.

2.1.2 Plasmide

Excisionase:

Das Plasmid pPG14_C28S wurde von I. Kleinhaus hergestellt (unveröffentlichte Daten) und durch Transformation in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen eingeführt. Diese Konstrukte enthalten das Excisionase-Gen aus dem Bakteriophagen HK022 mit einem His-Tag und einer Thrombinschnittstelle am N-Terminus des Proteins.

Cytochrom *c*₅₅₂:

Für die heterologe Expression von Cytochrom *c*₅₅₂ in *E. coli* wurden zwei Plasmide durch Transformation in BL21(DE3)pLysS Zellen eingeführt. Das Plasmid pMA7 (Maneg, 2004) basiert auf dem pET22b(+) Vektor (Novagen, Madison, WI, USA); es enthält neben der genetischen Information des Proteins eine *peIB*-Leader Sequenz und eine Ampicillinresistenz. Das zweite Plasmid pEC86 trägt das Hämreifungsgen *ccm*ABCDEFGH für *E. coli* (Thöny-Meyer et al., 1995) und eine Chloramphenicolresistenz.

Cu_A-Domäne:

Für die heterologe Expression der löslichen Cu_A-Domäne in *E. coli* wurde das Plasmid pMA10 (Maneg, 2004), das die genetische Information des Proteins trägt, durch Transformation in

BL21(DE3)pLysS Zellen eingeführt. Das pMA10 Plasmid basiert auf dem pET-3d Vektor (Novagen, Madison, WI, USA) und enthält eine Ampicillinresistenz.

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien:

Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Ascorbat	Carl Roth, Karlsruhe
BIS-TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
CuCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe
DM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DSS	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
IPTG	Biomol, Ivesheim
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Carl Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Carl Roth, Karlsruhe
MgSO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
NH ₄ Cl	Carl Roth, Karlsruhe
Pefabloc SC	Biomol, Ivesheim
Thiamin	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe

Isotope:

D ₂ O (99,96%D)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
¹⁵ NH ₄ Cl (98%N)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
U- ¹³ C-Glukose (99%C)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
U- ¹³ C-Glycerin (99%C)	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA

Enzyme:

Lysozym	Biomol, Ivesheim
---------	------------------

Säulenmaterialien:

Superdex 75	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
Kationen-CM Sepharose	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
Sephacryl S-100	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
Sephadex G-25	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA

2.1.4 Stammlösungen:

IPTG-Stammlösung	2,38 mg IPTG/100ml H ₂ O
------------------	-------------------------------------

Antibiotika-Stammlösungen:

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Konzentration im Medium</u>
Ampicillin	50mg/ml in 50% Glycerin	50µg/ml
Chloramphenicol	60mg/ml in Ethanol	60µg/ml

Alle Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.1.5 Nährmedien:

Excisionase:

ECPM1-x Medium: 1 g/l NH_4Cl , 40 g/l Glycerin und Spurenelemente. (Für isotonen-angereicherte Medien wurden $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, U- ^{13}C -Glycerin und U- ^{13}C -Glukose verwendet.)

Cytochrom c_{552} bzw. Cu_A -Domäne:

Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf 1 l Volumen:

1) LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
pH 7,5	

2) M9-Medium (Minimal-Medium):

KH_2PO_4	3 g
Na_2HPO_4	6 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1 g

Der pH-Wert der Lösung wurde vor dem Autoklavieren auf 7.4 eingestellt. Anschließend wurden folgende sterile Komponenten hinzugegeben:

1M MgSO_4	1 ml
1M CaCl_2	1 ml
NH_4Cl	1 g
Glukose	4-5 g

(Für isotonenangereicherte Medien wurden $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und ^{12}C -Glukose oder U- ^{13}C -Glukose verwendet.)

2.1.6 Geräte:

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Biofuge 13	Heraeus, Langenselbold
Brutschrank	Heraeus, Langenselbold
FrenchPress	SLM-Aminco, Urbana, Illinois, USA
Heizblock	Eppendorf/HLC, Wesseling-Berzdorf
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Konzentratoren: Vivaspin (MWCO 5kDa)	VivaScience, Lincoln, UK
Luftschüttler	Heraeus, Langenselbold
NMR-Spektrometer: DMX 500, 600, 900	Bruker BioSpin, Rheinstetten
pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Rotoren Ultrazentrifuge: Typ 60Ti, 40Ti	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Spektralphotometer Uvicon 941	Kontron, Hamburg
Ultraschallgerät 250	Branson, Danbury, CT, USA
Ultrathurax	Branson, Danbury, CT, USA
Ultrazentrifuge L-70	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden:

Es wurden für Cytochrom *c*₅₅₂ und die Cu_A-Domäne im Allgemeinen die Vorschriften von Britta Reincke (2000) bzw. Oliver Maneg (2004) verwendet mit einigen in den folgenden Unterkapiteln beschriebenen Optimierungen.

2.2.1 Bakterienstammhaltung

1) Glycerindauerkulturen:

Von einer 2 ml Übernachtskultur wurden 1,5 ml bei Raumtemperatur für 3 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge 13) mit 6000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 800 µl

Gefriermedium (doppeltkonzentriertes LB-Medium mit 15% Glycerin) resuspendiert und bei –80 °C eingefroren.

2) Bakterienstammplattenhaltung:

Die Bakterien einer Glycerindauerkultur wurden mit einer sterilen Impföse auf einer Agar-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden ca. 12-16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und danach bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Transformation

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen für 30 min auf Eis aufgetaut. Danach wurde ein Aliquot Plasmidlösung (100-500 ng Plasmid) den Zellen zugegeben und gut durchmischt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Transformationsansatz 1 min lang bei 42 °C inkubiert („heat shock“) und kurz auf Eis gestellt. Nach 2 min wurde er in 600–900 µl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotika) überführt und dann für 60 min bei 37 °C und 230 rpm (Heizblock) inkubiert. Es wurden 100 µl dieser Erstkultur auf die Hälfte einer Agarplatte gestrichen; der Rest der Kultur wurde 5 min lang bei 6000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13), der Überstand entfernt, und die Zellen anschließend in 100 µl frischem LB-Medium resuspendiert, auf der anderen Hälfte der Platte ausgestrichen und 12-16 h im Brutschrank zum Wachsen gebracht.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Expression und Aufreinigung der Excisionase

Die Proteinpräparation wurde wie folgt von I. Kleinhaus durchgeführt: Die Zellen wurden in 10 l ECPM1-x Medium im Fermenter mit Sauerstoffzufuhr gezüchtet ($OD_{600} = 1,3 - 1,6$). Anschließend wurden die Zellen geerntet, in 4 l ECPM1-x Medium ohne Stickstoff- oder

Kohlenstoffquelle resuspendiert und 20 min lang damit gewaschen. Daraufhin wurden $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/l), U- ^{13}C -Glucose (0,5 g/l) und U- ^{13}C -Glycerin (1,5 g/l) zugegeben und die Zellen im neuen Medium fermentiert. Nach 20 min wurde mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert, die Zellen 165 min nach der Induktion geerntet und in einer French Press aufgeschlossen. (Zu allen Wildtyp-Proben wurde 10 mM 2-Mercaptoethanol hinzugegeben, um die Cys28 Thiolgruppe des Proteins vor Oxidation zu schützen.) Das Lysat wurde auf einer Ni-NTA Säule aufgetragen und mit einem linearen 50-400 mM Imidazol-Gradienten eluiert. Das Protein wurde anschließend mit Thrombin gespalten und danach mittels einer Gelfiltrationsäule (2,6 cm \times 60 cm Superdex 75) gereinigt. Die Homogenität der Proteinprobe wurde durch SDS-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie (MALDI-TOF) verifiziert. Die Fraktionen mit \geq 99% Excisionase-Gehalt wurden für die NMR-Probenvorbereitung gegen 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5; 100 mM NaCl; 0,2 mM EDTA; 0,03% NaN_3) dialysiert.

2.3.2 Expression und Aufreinigung des Cytochrom c_{552}

Die Bakterienkulturen, mit denen die heterologe Expression durchgeführt wurde, enthielten ein Plasmid, auf dem sich neben der genetischen Information des Proteins auch ein Ampicillin-resistenzgen befand, sowie noch ein zweites Plasmid, welches neben dem Cytochrom c Reifungsgen eine Chloramphenicolresistenz besaß.

Zuerst wurden positive Klonkolonien von den im Brutschrank über Nacht gewachsenen Zellen ausgewählt. Zur Kontrolle des Plasmideinbaus und der Überexpressionsfähigkeit wurden mit einigen der Klonkolonien jeweils 2 Reagenzgläser, die beide 2 ml LB-Medium enthielten, angeimpft. Eines der beiden Reagenzgläser jeder Klonkolonie wurde bei einer $\text{OD}_{600} = 0,5-1,0$ induziert; das andere Reagenzglas blieb als Referenz nicht induziert. Jeweils 2, 4, 6 und 8 h nach der Induktion wurden Ganzzellysate von jedem Klon vorbereitet und auf ein 12%iges Ahn-Gel aufgetragen. Anhand dieses Gels wurde der beste positive Klon ausgewählt. Interessanterweise exprimierten die Zellen das Cytochrom c_{552} im LB-Medium auch ohne Induktion durch IPTG-Zugabe.

Der letztendlich ausgewählte positive Klon wurde mehrere Stunden in 2 ml LB-Medium inkubiert; anschließend wurden die 2 ml in 200 ml steriles LB-Medium überführt und mit

200 µl Ampicillinlösung (50 mg/ml) sowie 200 µl Chloramphenicolösung (60 mg/ml) im Luftschüttler (Multitron) bei 37 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Für die Optimierung der Expressionsausbeute wurden mehrere 200 ml Kulturen in LB-Medium angezogen; danach wurden die Zellen in verschiedenen Medien (LB, M9, Fermenter, Hefe) weiter fermentiert.

Die beste Ausbeute wurde in LB-Medium erzielt, aber es kamen hierbei auf der Kationenaustauschsäule 2 Peaks zum Vorschein. Die entsprechenden Fraktionen wurden separat aufgereingt. Anhand von 1D NMR-Spektren schienen die zwei Proben unterschiedliche Häm-Nachbarschaften aufzuweisen, obwohl sie auf dem SDS-Gel und im UV-Spektrum identisch waren. Im M9-Medium war die Ausbeute zwar geringer, jedoch traten bei der Aufreinigung nicht unterschiedliche Peaks auf.

Daraufhin wurden im Großmaßstab 5 l Erlenmeyerkolben benutzt, die jeweils 2,5 l M9-Medium mit der entsprechenden Antibiotikakonzentration enthielten; sie wurden mit 15-25 ml der über Nacht inkubierten Vorkultur angeimpft, 6-7 h fermentiert, danach zentrifugiert, in frischem M9-Medium resuspendiert und weiter inkubiert. Etwa 30 min nach der Resuspension erfolgte bei einer OD_{600} zwischen 2 und 3 die Induktion durch Zugabe einer sterilen IPTG-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,4 mM IPTG. Sieben Stunden nach der Induktion wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 4 °C, 15 min) und das Zellpellet weiter bearbeitet wie im Unterkapitel 2.3.2.1 beschrieben.

Anreicherung mit ^{15}N -Isotopen

Die Anreicherung von Cytochrom c_{552} mit ^{15}N -Isotopen erfolgte durch Zugabe von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ Salz. Nach Inkubation der 2,5 l Bakterienkulturen für 6-7 h in nicht-angereichertem M9-Medium wurden sie zentrifugiert, mit 500 ml M9-Medium ohne Stickstoffquelle gewaschen, und danach in jeweils 2,5 l mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ angereichertem M9-Medium resuspendiert. Nach 30 min wurden sie mit IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) induziert und genauso wie die nicht-angereicherten Ansätze weiterbehandelt.

Aus 10 l Kultur wurde nach der Durchführung aller Reinigungsschritte letztendlich eine 2 mM Proteinprobe (14 mg/ml) erhalten, mit der die NMR-Experimente durchgeführt wurden. Für die Messungen des reduzierten und oxidierten Cytochrom c_{552} wurden separate Präparationen durchgeführt, um jeweils frische Proben zu erhalten, da das Protein bereits nach 3 Tagen im NMR-Gerät erste Abbauprodukte und eine Veränderung des Redoxzustandes zeigte.

Konzentrationsbestimmung

Charakteristischerweise erscheinen beim reduzierten Cytochrom c_{552} im UV/Vis-Spektrum eine α -Bande bei 552 nm, eine β -Bande bei 520 nm und eine γ -(Soret-)Absorptionsbande bei 415 nm. Die Konzentrationen der Cytochrom-Proben wurden daher photometrisch mit einem Photometer (Uvicon 941) mittels UV/Vis-Differenzspektren (d.h. reduziert minus oxidiert) bei einer Wellenlänge von 552 nm bestimmt. Als Extinktionskoeffizient wurde $\epsilon = 21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Die Proteinlösung wurde erst mit 5 μl einer 1 M Kalium-hexacyanoferrat(III)-Lösung oxidiert und gemessen; danach wurde die Probe mit einer $\frac{1}{4}$ Spatelspitze Natriumdithionit reduziert und das Differenzspektrum berechnet.

2.3.2.1 Periplasma-Präparation

Das periplasmatische Protein wurde nach der Methode von Witholt et al. (1976) isoliert. Die folgenden Angaben beziehen sich auf 1 Liter Kulturvolumen:

Das aus der Anzucht erhaltene Zellpellet wurde auf Eis in 20 ml Periplasmapuffer (100 mM Tris-HCl; pH 8; 0,5 M Sucrose; 1 mM EDTA) resuspendiert und bei 4 °C über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Lysozym (60 $\mu\text{g/ml}$) wurde eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt, um so das Peptidoglycangerüst anzudauen bzw. das Periplasma freizusetzen, und anschließend für 45 min bei $35000 \times g$ und 4 °C ultrazentrifugiert. Um die genomische DNA zu zerstören, wurde das Zellpellet anschließend 3 min lang mit dem Ultrathurax behandelt. Vor dem Auftragen auf die Kationenaustauschsäule wurde die Periplasmalösung auf pH 8,0 eingestellt und filtriert.

2.3.2.2 Säulenchromatographie

Für die Reinigung des löslichen Cytochrom c_{552} Fragments wurden nacheinander eine Kationenaustausch- und eine Gelfiltrationssäule eingesetzt. Aufgrund der roten Farbe konnte das Protein visuell detektiert werden. Mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelen wurde die Reinheit des Proteins überprüft. Die Säulenaufreinigung verlief in mehreren Schritten bei 4 °C; hierfür wurden die folgenden Puffer verwendet:

Puffer 1: 50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1mM EDTA

Puffer 2: 50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1mM EDTA; 350 mM NaCl

Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1mM EDTA; 2 M NaCl

1. Säule: CM-Sepharose

An einer Kationenaustauschsäule binden jene Proteine, die bei dem gegebenen pH-Wert positiv geladen sind. Die Affinität der Bindung ist abhängig von den konkurrierenden Ionen.

Das Säulenvolumen betrug 800 ml, der Durchmesser 6 cm. Die CM-Sepharose Säule wurde mit einem Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, dann mit 4-5 Säulenvolumina des Puffer 1 äquilibriert. Die Periplasmalösung wurde anschließend über den Stempel auf die Säule aufgetragen. Um das Cytochrom c_{552} von nicht-bindenden Verunreinigungen zu trennen, wurde die Säule mit einem Säulenvolumen Puffer 1 gespült. Danach wurde mit Puffer 2 ein Salzgradient (bis 350 mM NaCl) an der Säule angelegt und das Protein eluiert. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,2-0,7 ml/min. (Cytochrom c_{552} eluiert unter diesen Bedingungen bei einer Salzkonzentration zwischen 180 und 200 mM NaCl.)

2. Säule: Sephacryl S-100

Die Gelfiltrations-Chromatographie trennt Moleküle nach ihrer Größe und ihrer Form ab. Die feste Phase besteht aus einer Gelmatrix mit konstanter molekularer Porenweite. Die Moleküle mit einem größeren Durchmesser als die Porenweite der Gelmatrix, wandern schneller durch die Säule als kleinere Moleküle, die in den Poren länger aufgehalten werden.

Die Gelfiltrationssäule wurde mit 4 Säulenvolumina des Puffer 1 äquilibriert. Die Sephacryl S-100 Säule hatte ein Volumen von 200 ml und einen Durchmesser von 2,5 cm. Die Proteinprobe wurde aufgetragen und mit Puffer 1 eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 150 μ l/min und die Größe der gesammelten Fraktionen 1,5-2 ml.

2.3.2.3 Kinetische Untersuchungen

Im Rahmen der Resonanzzuordnungen für das Cytochrom c_{552} (siehe 3.2.1) wurde festgestellt, daß die verwendeten Proteinproben eine spontane Ala123 \rightarrow Thr Mutation enthielten. Aus diesem Grund wurde die Aktivität der A123T Mutante gegenüber der ba_3 -Oxidase gemessen und direkt mit den Aktivitäten des Cytochrom c_{552} Wildtyps aus *T. thermophilus* und dem heterolog in *E. coli* exprimierten Cytochrom c_{552} Wildtyps verglichen.

Hierfür wurde jede der 3 Cytochrom c_{552} Formen aufkonzentriert und mit Dithionit reduziert. Das überschüssige Reduktionsmittel wurde anschließend mit einer G-25 Gelfiltrationssäule (20 mM Tris/HCl; 0,2 g/l DM; 1mM EDTA; 20 mM KCl; pH 7,5) entfernt. Für die Aktivitäts-

messungen wurden die Konzentrationen aller 3 Cytochrom c_{552} Proben spektroskopisch bestimmt und die Lösungen soweit verdünnt, daß die Konzentrationen gleich waren. Die verwendete Proteinkonzentration lag somit bei 20 μM für alle Cytochrom c_{552} Proben, während die Konzentration der ba_3 -Oxidase Stammlösung 111 μM betrug. Für jede Aktivitätsmessung wurden jeweils 2 μl der 1:1000 verdünnten ba_3 -Oxidase Lösung zu 98 μl einer der Cytochrom c_{552} Proben (20 μM) hinzupipettiert. Für jede der 3 Cytochrom c_{552} Formen wurden 3 Messungen durchgeführt und die Wechselzahl für jede Messung bestimmt. Aus diesen Daten wurden die jeweiligen Wechselzahlen berechnet und daraus der Mittelwert bestimmt (Tabelle 7).

2.3.3 Expression und Aufreinigung der Cu_A -Domäne

Für die heterologe Expression der löslichen Cu_A -Domäne (Maneg et al., 2003) wurden neben den von Marco Mukrasch (2003) ausgearbeiteten Optimierungen einige zusätzliche kleinere Änderungen eingeführt.

Nach der Transformation wurde ein für die Überexpression optimaler Zellklon entsprechend der im Kapitel 2.3.2 beschriebenen Vorgehensweise ausgewählt. Zellen aus einer 2 ml Übernachtskultur wurden am nächsten Tag in 200 ml LB-Medium bei 37 °C im Schüttler bis zu einer Zelldichte $\text{OD}_{600} = 1-2$ inkubiert und anschließend in 1 l frisches LB-Medium überführt. Nachdem die Zellen die Exponentialphase erreicht hatten, wurden sie zentrifugiert (Biofuge, 6000 rpm, 4 °C, 15 min) und das Pellet in 250 ml M9-Minimalmedium resuspendiert. Die Suspension wurde sofort erneut zentrifugiert (Biofuge, 6000 rpm, 4 °C, 15 min) und das Pellet diesmal in 1 l M9-Minimalmedium mit 1 g NH_4Cl (wahlweise mit ^{14}N - oder ^{15}N -Isotop) als einziger Stickstoffquelle resuspendiert.

Auf diese Art und Weise war es möglich, den größten Teil der Zellmasse in einem Nährmedium ohne ^{15}N -Isotop zu erzeugen, was kostensparend ist. Die wiederholte Übertragung der Zellen auf frisches Medium sollte außerdem Faktoren (Metabolite) entfernen, die hemmend auf das Wachstum und die Proteinexpression wirken könnten, und gleichzeitig die Zellen physiologisch (Ribosomenzahl) in die exponentielle Phase bringen. Wird an diesem Punkt nun mit IPTG (0,4 mM Endkonzentration) induziert, so erfolgt kein starkes Zellwachstum mehr und

es werden weniger zelleigene Proteine hergestellt. Stattdessen sollte eine verstärkte Überexpression des rekombinanten Proteins erzielt werden.

Die Inkubationszeit nach der Induktion betrug 7 Stunden bei 37 °C im Schüttler, woraufhin die Zellen geerntet wurden (15 min bei 6000 rpm in der Biofuge). Das Pellet wurde in 7,5 ml einer 50 mM Tris/HCl-Lösung (pH 8) resuspendiert und mit 5 mg Pefabloc sowie 1 ml einer Lysozymlösung (10 mg Lysozym/1 ml H₂O) versetzt. Diese Zellsuspension wurde anschließend bei -80 °C für 12-16 h eingefroren. Durch das Lysozym und den Gefrierprozess wird die Mureinschicht in der Zellwand der Bakterien stark angegriffen, weshalb die Zellen beim Auftauen bereits teilweise lysiert waren.

Die weitere Aufarbeitung der Zellen orientierte sich stark an der von Slutter et al. (1996) vorgeschlagenen Methodik: die aufgetaute Zellsuspension wurde dreimal für 60 s mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier, 40 %, Stufe 4) behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 30.000 rpm und 4 °C für 45-60 min in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde verworfen, während der Überstand mit der löslichen Cu_A-Domäne (ca. 40 ml) 1:1 mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) verdünnt und anschließend 10 min lang bei 4 °C gerührt wurde. Bei diesem niedrigen pH-Wert fällt ein Teil der Proteine aus; die Cu_A-Domäne hingegen bleibt unter diesen Bedingungen in Lösung.

In diesem Stadium der Präparation liegt die lösliche Cu_A-Domäne noch ohne Cofaktoren vor. Für den Einbau der beiden Kupferionen in das Apoprotein wurden pro ml der Proteinsuspension 15 µl einer 100 mM Cu(His)₂-Komplexlösung hinzugegeben und gut durchgemischt. Nach 10 min Rühren bei 4 °C wurde die Lösung für weitere 10 min in einem Wasserbad auf 65 °C erhitzt. Bei diesem Schritt denaturieren fast alle *E. coli* Proteine, während die Cu_A-Domäne aus *T. thermophilus* unter diesen Bedingungen noch nativ bleibt. Die denaturierten Proteine wurden nun 5 min bei 6000 rpm und 4 °C in der Megafuge sedimentiert. Der pH-Wert des Überstandes wurde mit 50%iger Essigsäure auf pH 4,6 nachgestellt. Da der theoretische isoelektrische Punkt der Cu_A-Domäne bei pI = 5,75 liegt, sollte sie folglich bei pH 4,6 kationisch geladen sein. Der lila gefärbte Überstand (oxidiertes Zustand) wurde anschließend filtriert und auf eine CM-Sepharose Kationenaustauschsäule aufgetragen. Nach zwei Waschschritten mit 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,6) wurde ein weiterer Waschschriff mit 30% einer 50 mM Natriumacetatlösung (pH 4,6) und 70% einer 20 mM Bis/Tris-Lösung (pH 7,0) auf der Säule durchgeführt. Danach folgte die Elution mit 20 mM Bis/Tris-Puffer (pH 7,5)

und 100 mM NaCl. Mit Hilfe dieses Aufreinigungsschrittes wurde überschüssiges Cu(His)₂ und noch andere vorhandene Proteinverunreinigungen entfernt. Das Volumen des Eluats wurde anschließend mit Hilfe von Konzentratoren auf ca. 0,5-1 ml verringert, die aufkonzentrierte Proteinlösung auf eine 40 ml Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-100) aufgetragen und das Protein mit 20 mM Bis/Tris-Puffer (pH 7,5) und 100 mM NaCl eluiert.

Im UV/Vis-Spektrum weist die oxidierte Cu_A-Domäne der ba₃-Oxidase aus *T. thermophilus* mehrere Maxima bei den Wellenlängen 360 nm, 480 nm, 530 nm und 790 nm auf (Slutter et al., 1996). Die Cu_A-Konzentration wurde anhand des Maximums bei 530 nm ausgehend von einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 3,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt.

2.4 NMR-spektroskopische Methoden

2.4.1 Excisionase

2.4.1.1 Probenvorbereitung

Die NMR-Proben enthielten neben 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5), 100 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, und 0,03% NaN₃ noch 1,0 mM DTT als Reduktionsmittel, 5% D₂O als Locksubstanz und 0,1 mM DSS als interne Referenzsubstanz (Rogov et al., 2003). Die eingegangenen Proteinproben 300 μ l wurden mit Argon entgast und in 5 mm Shigemi-Röhrchen eingesetzt (Shigemi, Allison Park, PA, USA).

2.4.1.2 NMR-Experimente

Alle NMR-Spektren für die Resonanzzuordnung wurden mit Bruker DMX 500 und DMX 600 Spektrometern bei 30 °C aufgenommen. Für die Identifizierung der NMR-aktiven Kerne des Proteinrückgrats wurden [¹⁵N, ¹H]-TROSY-HNCO (Salzmann et al., 1998), (HCA)CO(CA)NH (Löhr und Rüterjans, 1995) und [¹⁵N, ¹H]-TROSY-HNCACB (Salzmann et al., 1999) Experimente durchgeführt. Die Zuordnung der Seitenkettenresonanzen erfolgte mittels HBHA(CBCA)(CO)NH (Grzesiek und Bax, 1993) H(CC)(CO)NH-TOCSY (Montelione et al., 1992), (H)C(C)(CO)NH-TOCSY (Grzesiek et al., 1993) und ¹⁵N-editierten 3D TOCSY-HSQC (Marion et al., 1989; Zhang et al., 1994) Spektren. Die ¹H-Resonanzen der aromatischen Ringe

wurden mit Hilfe von [^1H , ^1H]-TOCSY Spektren (Davis und Bax, 1985; Griesinger et al., 1988), aufgenommen mit Spinlockzeiten von 59,3 oder 5,6 ms, sowie [^1H , ^1H]-NOESY Spektren (Jeener et al., 1979), durchgeführt mit einer Mischzeit von 150 ms in H_2O bzw. D_2O , ermittelt. Zur Bestimmung der Protonenabstände wurde zusätzlich ein ^{15}N -editiertes 3D NOESY-HSQC Spektrum (Mischzeit = 100 ms) aufgenommen, sowie zwei verschiedene ^{13}C -editierte 3D NOESY-HSQC Spektren (Mischzeit = 70 ms), zum einen für die $\text{H}^\alpha/\text{H}^\beta$ Korrelationen (NOESY- ^{13}C , ^1H -HSQC) und zum anderen für die Methylgruppen (NOESY-(CT)- ^{13}C , ^1H -HSQC (Bax et al., 1990).

Die Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente wurden bei 15 und 25 °C gemessen. Zuerst wurde als Referenz ein [^1H , ^{15}N]-HSQC Spektrum mit vollständig protonierter Excisionase aufgenommen. Danach wurde die Probe lyophilisiert und im gleichen Volumen eiskaltem D_2O resuspendiert. In den ersten 2 h wurden alle 15 min [^1H , ^{15}N]-HSQC Spektren aufgenommen, und danach alle 30 min bis die Amidprotonen vollständig mit Deuterium ausgetauscht waren (nach 12 h).

Die Prozessierung aller Spektren wurde an einem Silicon Graphics Rechner mit XWINNMR (Bruker Bio-Spin, Rheinstetten) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls an Silicon Graphics Rechnern mit FELIX 97 (Accelrys, San Diego, CA, USA) und mit AURELIA 2.7.5 (Bruker Bio-Spin, Rheinstetten). Zur Sekundärstrukturvorhersage wurde ein Konsensus aus den H^α -, C^α -, C^β - und C' -Verschiebungswerten gemäß dem von Wishart und Sykes (1994) entwickelten CSI Programm erstellt. Die NOE-Daten wurden den dreidimensionalen NOESY-HSQC Spektren und den zweidimensionalen NOESY Spektren entnommen und anschließend mit dem Programm *nmr2st* (Pristovšek et al., 2000) semiautomatisch zugeordnet. Eine interne Distanzkalibrierung, basierend auf den Intensitäten charakteristischer NOE-Konnektivitäten in den regulären Sekundärstrukturelementen, wurde zur Einteilung der NOEs in verschiedene Abstandskategorien (2.7, 3.5, 4.2, 5.0 und 6.0 Å) verwendet.

2.4.1.3 Strukturrechnung

Die Tertiärstruktur der Excisionase wurde mit Hilfe des Programms DYANA (Güntert et al., 1997) berechnet. Die DYANA-Bibliothek wurde dabei unverändert gelassen, mit Ausnahme des Pro32, das als *cis*-Konformer erkannt wurde. Im Falle von IsoAsp66 wurde darauf verzichtet, eine Veränderung der DYANA-Bibliothek vorzunehmen, da dieser Rest im

unstrukturierten C-terminalen Ende der Excisionase liegt und letztendlich auch keine NOE-Verletzungen hervorgerufen hat. Aus den berechneten Strukturen wurde anschließend ein Ensemble der 20 energetisch günstigsten Strukturen ausgewählt und damit die stereospezifische Zuordnung der prochiralen Methylen- und Isopropylgruppen mit Hilfe des Programms GLOMSA (Güntert et al., 1991) ermittelt.

Die Energieminimierung der DYANA-Konformerer wurde unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Abstandsbeschränkungen mit dem DISCOVER-Modul des INSIGHT 97 Programmpakets (Accelrys, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde das CVFF-Kraftfelds (Dauber-Osguthorpe et al., 1988) verwendet. Die minimierten Strukturen wurden desweiteren mit dem Programm PROCHECK-NMR (Laskowski, 2001) analysiert und mit MOLMOL (Koradi et al., 1996) graphisch dargestellt.

2.4.2 Cytochrom c_{552} und Cu_A -Domäne

2.4.2.1 Probenvorbereitung

Cytochrom c_{552} :

Die NMR-Messungen wurden mit 1-2 mM Proteinproben in 20 mM KH_2PO_4 Puffer (pH 6,0) durchgeführt. Die eingeeengten Proben (560 μ l) wurden mit 5 μ l einer 1 M Ascorbatlösung reduziert oder mit 5 μ l einer 1 M Kalium-hexacyanoferrat(III)-Lösung oxidiert. Bei den oxidierten Proben wurde das überschüssige Kalium-hexacyanoferrat(III) mittels einer G-25 Gelfiltrationssäule und durch anschließendes Umpuffern entfernt. Zu jeder Probe wurden noch 5% D_2O als Locksubstanz und 0,05 mM DSS als interne Referenzsubstanz hinzugefügt. (In manchen Fällen war es notwendig, die NMR-Proben nach 2-3 Tagen Meßzeit erneut zu reduzieren oder oxidieren und mit Hilfe einer kleinen G-25 Gelfiltrationssäule zu regenerieren und gleichzeitig von überschüssigem Reduktions- bzw. Oxidationsmittel zu befreien.)

Zur Untersuchung der Interaktion von Cytochrom c_{552} mit der Cu_A -Domäne wurden die Proben (560 μ l in 20 mM KH_2PO_4 Puffer, pH 6,0) wie folgt vorbereitet. (Der gewünschte pH-Wert ließ sich nicht immer durch Umpuffern exakt einstellen, so daß es notwendig war, die eingeeengten Proben mit HCl oder KOH schrittweise zu titrieren.)

a) Reduzierter Zustand

Probe 1 → freies Protein: ^{15}N -angereichertes Cytochrom c_{552} (0,4 mM) + 5 μl Ascorbat + 25 μl D_2O mit DSS

Probe 2 → Proteinkomplex: ^{15}N -angereichertes Cytochrom c_{552} (0,4 mM) + 5 μl Ascorbat + 25 μl D_2O mit DSS + 1,6 mM nicht-markierte Cu_A -Domäne

b) Oxidierter Zustand

Probe 1 → freies Protein: ^{15}N -angereichertes Cytochrom c_{552} (0,5 mM) + 5 μl Kaliumhexacyanoferrat(III) + 25 μl D_2O mit DSS

Probe 2 → Proteinkomplex: ^{15}N -angereichertes Cytochrom c_{552} (0,5 mM) + 5 μl Kaliumhexacyanoferrat(III) + 25 μl D_2O mit DSS + 2,0 mM nicht-markierte Cu_A -Domäne

Cu_A -Domäne:

Die NMR-Messungen wurden mit 1-2 mM Proteinproben in 20 mM KH_2PO_4 Puffer (pH 6,0) durchgeführt. Die eingegangenen Proben (560 μl) lagen nach der Proteinpräparation vollständig oxidiert vor und wurden nur wenn nötig mit 5 μl einer 1 M Ascorbatlösung reduziert. Zu jeder Probe wurden noch 5% D_2O als Locksubstanz und 0,05 mM DSS als interne Referenzsubstanz hinzugefügt. (In manchen Fällen war es notwendig, die NMR-Proben nach einigen Tagen Meßzeit erneut zu regenerieren, wie zuvor für Cytochrom c_{552} beschrieben.)

Zur Untersuchung der Interaktion der Cu_A -Domäne mit Cytochrom c_{552} wurden die Proben (560 μl in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0) wie folgt vorbereitet. (Der gewünschte pH-Wert ließ sich nicht immer durch Umpuffern exakt einstellen, so daß es notwendig war, die eingegangenen Proben mit HCl oder KOH schrittweise zu titrieren.)

a) Reduzierter Zustand

Probe 1 → freies Protein: ^{15}N -angereicherte Cu_A -Domäne (0,5 mM) + 5 μl Ascorbat + 25 μl D_2O mit DSS

Probe 2 → Proteinkomplex: ^{15}N -angereicherte Cu_A -Domäne (0,5 mM) + 5 μl Ascorbat + 25 μl D_2O mit DSS + 2,0 mM nicht-markiertes Cytochrom c_{552}

b) Oxidierter Zustand

Probe 1 → freies Protein: ^{15}N -angereicherte Cu_A -Domäne (0,5 mM) + 1 μl Kaliumhexacyanoferrat(III) + 25 μl D_2O mit DSS

Probe 2 → Proteinkomplex: ^{15}N -angereicherte Cu_A -Domäne (0,5 mM) + 1 μl Kaliumhexacyanoferrat(III) + 25 μl D_2O mit DSS + 2,0 mM nicht-markiertes Cytochrom c_{552}

2.4.2.2 NMR-Experimente

Für die Resonanzzuordnung des Cytochrom c_{552} im reduzierten und oxidierten Zustand sowie der Cu_A -Domäne im oxidierten Zustand wurden jeweils die folgenden NMR-Spektren mit einem Bruker DMX 600 Spektrometer bei 25 °C aufgenommen: [^1H , ^1H]-TOCSY (Spinlockzeiten = 80 oder 6 ms), (Davis und Bax, 1985; Griesinger et al., 1988), [^1H , ^1H]-NOESY (Mischzeit = 150 ms) (Jeener et al., 1979), [^{15}N , ^1H]-TROSY (Pervushin et al., 1997), [^1H , ^{15}N]-TOCSY-HSQC (Kay et al., 1989) und [^1H , ^{15}N]-NOESY-HSQC (Zuiderweg und Fesik, 1989). Die Zuordnung der reduzierten Cu_A -Domäne war bereits zuvor mit Hilfe von Tripelresonanzexperimenten an einer doppelt-markierten Probe erfolgt (Mukrasch et al., 2004); die Resonanzen der aromatischen Ringprotonen wurden für die reduzierte Cu_A -Domäne in der hier vorliegenden Arbeit anhand von homonuklearen TOCSY und NOESY Spektren bestimmt. Die Prozessierung der Spektren wurde auf einem Silicon Graphics Rechner mit XWINNMR (Bruker Bio-Spin, Rheinstetten) durchgeführt. Die Auswertungen erfolgten mit dem Programm AURELIA 2.7.5 (Bruker Bio-Spin, Rheinstetten) ebenfalls an einem Silicon Graphics Rechner.

2.4.2.3 Analyse der Kontaktregionen

Zur Untersuchung der Proteinkomplexe wurde im Vorfeld zu jeder Messung überprüft, daß die Proben exakt den gleichen pH-Wert aufwiesen, um Veränderungen in den chemischen Verschiebungswerten, die auf Titrationseffekten der Histidinringe beruhen, ausschließen zu können. Es wurden [^{15}N , ^1H]-TROSY Experimente jeweils mit und ohne Komplexpartner an einen Bruker DMX 900 Spektrometer bei 25 °C und pH 6 durchgeführt. Die Spektren wurden an einem Silicon Graphics Rechner mit XWINNMR (Bruker Bio-Spin, Rheinstetten) prozessiert und mit FELIX 97 (Accelrys, San Diego, CA, USA) analysiert. Die Veränderungen der ^{15}N - und ^1H -Verschiebungen des freien Proteins gegenüber dem Proteinkomplex wurden in folgende Formel (Mulder et al., 1999) eingesetzt:

$$\delta_{\text{gesamt}} = [(\Delta\delta_{\text{H}})^2 + (\Delta\delta_{\text{N}} / 6.5)^2]^{1/2}$$

Die resultierende Gesamtverschiebungsänderung (δ_{gesamt}) wurde anschließend gegen einen Maximalwert normiert und als Farbänderungen kodiert auf der entsprechenden Molekuloberfläche (PDB ID: 1EHK bzw. 1DT1) eingezeichnet.

2.4.2.4 Berechnung des Proteinkomplexes

Die Strukturen des Komplexes zwischen Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne wurden mit Hilfe des HADDOCK (High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing) Programms (Dominguez et al., 2003) berechnet, das im CNS Programmpaket (Brunger et al., 1998) implementiert ist. Zur Automatisierung benutzt HADDOCK "python" Skripte aus dem ARIA Programm (Linge et al., 2001). Die HADDOCK-Rechnungen beruhen auf dem Prinzip, daß Protein-Protein-Wechselwirkungen zu Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte bei Oberflächenresten führen, die in direkten Kontakt mit dem Komplexpartner kommen. Diese Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte leiten als sogenannte Wechselwirkungsbeschränkungen (AIRs = ambiguous interaction restraints) den Rechnungsprozess.

Als Eingabe für die HADDOCK-Rechnungen wurden die Reste mit den größten Gesamtverschiebungsänderungen (δ_{gesamt}) in allen 4 Differenzmessungen, d.h. ^{15}N -markiertes Cytochrom c_{552} mit und ohne Cu_A -Domäne im reduzierten Zustand, ^{15}N -markiertes Cytochrom c_{552} mit und ohne Cu_A -Domäne im oxidierten Zustand, ^{15}N -markierte Cu_A -Domäne mit und ohne Cytochrom c_{552} im reduzierten Zustand bzw. ^{15}N -markierte Cu_A -Domäne mit und ohne Cytochrom c_{552} im oxidierten Zustand, als „aktive“ Interaktionsbeschränkungen eingesetzt (Dominguez et al., 2003). Oberflächenreste, die einem „aktiven Rest“ direkt benachbart sind, aber keine große Gesamtverschiebungsänderung (δ_{gesamt}) aufwiesen, wurden in der HADDOCK-Rechnung als „passive“ Interaktionsbeschränkungen verwendet. Die Aminosäuren, die weniger als 20% relative Oberflächenzugänglichkeit aufwiesen, wurden bei den Rechnungen hingegen gar nicht in Betracht gezogen. Die Lösungsmittelzugänglichkeit wurde mit dem Programm NACCESS (Hubbard und Thornton, 1993) berechnet.

Als Strukturgrundlage wurden die Röntgenstrukturkoordinaten des Cytochroms c_{552} (PDB ID: 1DT1; Fee et. al., 2000) sowie der Cu_A -Domäne der ba_3 -Oxidase (PDB ID: 1EHK; Soulimane

et al., 2000) in die Rechnungen eingesetzt. Es wurden 50 Strukturen des Cytochrom c_{552}/Cu_A -Komplexes mit dem starren Docking-Protokoll von HADDOCK berechnet; jene 20 Strukturen mit dem kleinsten Fehler wurden anschließend energieminiert, wobei die Seitenketten der aktiven und passiven Reste diesmal flexibel gehalten wurden. Die 10 besten Strukturen hiervon wurden in einer aus TIP3P Wassermolekülen bestehenden 8 Å Schale erneut minimiert (Jorgensen et al., 1983). Die endgültigen Komplexstrukturen wurden miteinander verglichen, indem die AIR-Beschränkungen, die Wechselwirkungsenergien und die im Komplex abgedeckten hydrophoben Oberflächenanteile, letztere mit dem Surface-Racer 3.0 Programm (Tsodikov et al., 2002) berechnet, analysiert wurden.

Der Elektronentransferweg vom Donor zum Akzeptor wurde mit dem Programm GREENPATH Version 0.971 (Regan et al., 1993) als eine Kombination aus kovalenten Bindungen, anderen interatomaren Wechselwirkungen und räumlichen Elektronensprüngen, die es dem Elektron ermöglichen die Distanz zwischen dem Donor und dem Akzeptor zu überbrücken ('electron tunneling'), berechnet. Das Programm GREENPATH basiert auf den Theorien und Methoden von Beratan et al. (1991); hierbei wird ein Elektronentunnel-Kopplungsfaktor (T_{DA}) ermittelt, welcher die elektronische Wechselwirkung zwischen dem Elektronendonator und -akzeptor wiedergibt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Excisionase

3.1.1 Zuordnung der ^1H -, ^{15}N - und ^{13}C -Resonanzen

Die Anreicherung von Proteinen mit den NMR-aktiven Isotopen ^{13}C und/oder ^{15}N ermöglicht die Aufnahme von mehrdimensionalen heteronuklearen NMR-Experimenten, um so leichter die Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen des Makromoleküls zu erlangen (Grzesiek und Bax, 1993). Die Zuordnungsstrategie basiert in diesem Fall hauptsächlich auf skalaren heteronuklearen Kopplungen über die Peptidbindungen sequentiell benachbarter Aminosäurereste hinweg.

Da sich der Excisionase Wildtyp bei der Präparation als ein sehr instabiles Protein erwies, wurde eine Punktmutation (Cys28→Ser) eingeführt, um intermolekulare Disulfidbrückenbildung zu verhindern. Diese Substitution von Cys nach Ser hat weder die Funktion noch die thermodynamischen Eigenschaften des Proteins nennenswert verändert (Rogov et al., 2003). Aufgrund der verbesserten Stabilität der C28S Mutante wurden Meßbedingungen von 30 °C und pH 6,5 für die Aufnahme der NMR-Spektren gewählt.

Es konnte für die C28S Mutante nahezu die komplette Resonanzzuordnung erhalten werden (Tabelle 1), abgesehen von den ^{13}C -Resonanzen der aromatischen Ringe und einiger Carboxylatgruppen sowie den Amidresonanzen von einigen Argininseitenketten. Ein [^1H , ^{15}N]-HSQC Spektrum mit der Zuordnung der Amidresonanzen ist in (Abb. 6) dargestellt.

Das [^1H , ^{15}N]-HSQC Spektrum der C28S Mutante ist nahezu identisch mit dem des Excisionase Wildtyps (Abb. 7). Signifikante Differenzen in den chemischen Verschiebungswerten treten nur in der unmittelbaren Nachbarschaft der Mutationsstelle, d.h. bei den Resten Arg26-Phe31 auf. Die gegenüber dem Wildtyp am stärksten verschobenen Amidresonanzen wurden mit Hilfe der 3D [^1H , ^{15}N]-NOESY-HSQC Spektren eindeutig zugeordnet. Hierbei konnte außerdem gezeigt werden, daß die NOE-Muster der Reste rund um die Mutationsstelle auf eine nahezu gleiche Struktur wie im Wildtyp schließen lassen (Rogov et al., 2003).

Tabelle 1: ¹H-, ¹⁵N-, ¹³C-Resonanzen der C28S Mutante der Excisionase bei 30 °C und pH 6.5. Stereospezifisch eindeutig zugeordnete prochirale Gruppen sind fett gedruckt.

AS	N	HN	CO	C α	H α	andere C	andere H	andere N
M1	n.b.	n.b.	174.6	55.9	4.37	33.3 β , 31.7 γ	1.83 β , 2.32 γ	
Y2	119.1	8.17	175.3	57.2	4.99	41.3 β	2.83 β , 2.78 β , 6.88 δ , 6.69 ϵ	
L3	122.3	9.66	177.4	53.3	4.97	45.7 β , 26.9 γ , 23.0δ1, 26.5δ2	1.83β1, 1.90β2 , 1.68 γ , 0.87δ1, 0.97δ2	
T4	111.7	8.85	174.9	61.9	4.82	71.2 β , 22.2 γ _{CH3}	4.91 β , 1.43 γ _{CH3}	
L5	122.5	8.67	179.0	60.4	3.54	42.9 β , 27.3 γ , 27.2δ1, 25.6δ2	2.03β1, 1.94β2 , 1.61 γ , 1.03δ1, 0.91δ2	
Q6	117.0	9.02	179.2	60.0	3.99	28.3 β , 34.4 γ	2.15 β , 2.10 β , 2.62 γ , 2.49 γ , 7.53 ϵ , 6.99 ϵ	111.7 ϵ
E7	121.4	7.86	178.9	58.9	4.03	31.1 β , 37.2 γ	2.40 β , 1.99 β , 2.40γ1, 2.31γ2	
W8	120.4	9.05	179.4	63.0	3.76	28.1 β	2.80β1, 2.74β2 , 7.09 δ 1, 9.97 ϵ 1, 6.94 ϵ 3, 7.19 ζ 2, 7.14 ζ 3 7.14 η 2	130.2 ϵ 1
N9	117.7	8.66	176.5	56.3	3.98	39.9 β	2.93 β , 2.72 β , 7.68δ1 , 8.10δ2	114.9 δ
A10	116.6	7.60	178.5	54.1	4.01	18.6 β	1.50 β	
R11	114.4	7.09	176.8	55.9	4.25	30.8 β , 27.1 γ , 44.2 δ	1.64β1, 1.88β2 , 1.75 γ , 1.66 γ , 3.11δ1, 3.08δ2	
Q12	118.7	7.13	175.5	54.6	3.85	29.1 β , 33.1 γ	1.62β1, 1.94β2, 1.85γ1 , 1.58γ2 , 6.31 ϵ	115.4 ϵ
R13	121.2	8.45	177.6	59.1	3.97	29.7 β , 27.4 γ , 43.2 δ	1.83 β , 1.66γ1, 1.74γ2 , 3.27 δ	
R14	116.5	7.99	177.6	52.6	4.70	31.1 β	1.67 β , 1.49 β , 1.48 γ , 3.16 δ	
P15	---	---	176.8	63.5	4.17	32.7 β , 27.7 γ , 51.0 δ	1.69β1, 2.16β2 , 1.99 γ , 3.47δ1, 3.57δ2	
R16	123.7	8.90	176.8	51.6	4.98	32.6 β , 27.0 γ , 40.8 δ	2.01β1, 1.35β2 , 1.96 γ , 3.34 δ , 3.25 δ	
S17	116.9	9.14	175.3	58.7	4.40	63.9 β	4.12β1, 4.26β2	
L18	121.8	8.71	179.3	58.5	3.83	40.4 β , 27.1 γ , 22.8δ1, 25.4δ2	1.82 β , 1.46 β , 1.81 γ , 0.86δ1, 1.01δ2	
E19	116.7	8.48	179.4	59.8	3.93	29.1 β , 36.6 γ	2.04 β , 1.90 β , 2.36 γ , 2.28 γ	
T20	120.0	7.62	174.1	66.6	3.53	67.5 β , 21.6 γ _{CH3}	4.04 β , 0.29 γ _{CH3}	
V21	119.5	7.23	178.2	66.5	3.10	31.3 β , 23.2γ1 , 22.2γ2	1.96 β , 1.07γ1, 0.81γ2	
R22	117.0	8.42	179.2	60.6	3.71	30.2 β , 30.0 γ , 43.6 δ	1.90 β , 1.82 β , 1.85 γ , 1.53 γ , 3.27 δ , 3.19 δ	
R23	122.3	7.68	177.8	60.2	3.98	28.7 β , 27.7 γ , 43.6 δ	2.20 β , 1.77 β , 1.59 γ , 3.42 δ , 3.19 δ	
W24	120.2	8.28	179.3	58.5	4.56	28.9 β	2.88β1, 3.93β2 , 7.05 δ 1, 10.71 ϵ 1, 7.59 ϵ 3, 7.52 ζ 2, 7.46 ζ 3, 7.36 η 2	130.2 ϵ 1
V25	118.0	8.09	180.4	66.7	3.52	31.3 β , 20.6γ1 , 23.6γ2	2.08 β , 0.26γ1, 0.79γ2	
R26	122.8	8.06	178.5	59.6	4.14	30.2 β , 28.1 γ , 43.8 δ	2.09 β , 1.87 γ , 1.75 γ , 3.35 δ , 3.29 δ	
E27	117.5	8.35	175.2	56.3	4.31	30.2 β , 36.9 γ	2.33 β , 2.08 β , 2.65 γ , 2.28 γ	

S28	111.9	7.96	175.3	59.1	4.32	60.9β	4.20β, 4.14β	
R29	114.5	8.33	174.2	55.2	4.40	30.8β, 27.4γ, 43.8δ	1.41β1, 2.26β2 , 1.79γ, 1.57γ, 3.27δ, 3.16δ	
I30	117.4	7.47	175.1	58.1	4.85	38.0β, 26.7γ _{CH2} , 17.2γ _{CH3} , 11.4δ	1.57β, 1.10γ _{CH2} , 0.43γ _{CH3} , 0.71δ	
F31	128.0	9.08	173.7	55.4	4.52	43.8β	2.77β1, 2.85β2 , 7.18δ, 7.33ε, 7.33ζ	
P32	---	---	n.b.	61.5	3.66	32.1β, 25.3γ, 49.7δ	1.58β1, 1.96β2 , 1.40γ, 1.29γ, 3.06δ1, 3.40δ2	
P33	---	---	n.b.	61.1	4.34	30.7β, 27.8γ, 50.0δ	1.84β1, 2.25β2 , 2.11γ, 2.08γ, 3.54δ, 3.44δ	
P34	---	---	175.9	62.2	4.52	32.7β, 27.1γ, 50.1δ	1.23β, 1.00β, 1.15γ, 0.69γ, 3.40δ1, 3.23δ2	
V35	119.9	8.60	175.0	60.8	4.22	34.3β, 21.0γ1, 20.6γ2	1.83β, 0.78γ1, 0.75γ2	
K36	126.4	8.52	175.8	56.1	4.33	33.5β, 24.8γ, 29.3δ, 42.0ε	1.69β, 1.40β, 0.86γ1, 1.02γ2 , 1.41δ, 2.71ε1, 2.79ε2	
D37	127.6	8.48	175.9	53.1	4.68	42.1β	2.19β1, 2.55β2	
G38	114.4	8.59	175.9	47.0	3.58, 4.01			
R39	125.8	8.95	175.8	56.3	4.26	30.8β, 27.2γ, 43.3δ	1.99β, 1.76β, 1.64γ, 3.24δ	
E40	119.6	7.82	174.9	54.6	4.63	32.4β, 35.9γ	2.17β, 2.02β, 2.39γ, 2.31γ	
Y41	119.8	8.56	175.0	58.1	5.01	42.1β	2.82β1, 2.61β2 , 6.88δ, 6.74ε	
L42	121.8	9.14	175.9	53.3	5.18	43.8β, 26.8γ, 22.9δ1, 25.6δ2	1.53β1, 1.17β2 , 1.47γ, 0.76δ1, 0.67δ2	
F43	123.5	10.04	175.9	55.8	4.60	41.0β	2.77β, 2.46β, 6.28δ, 6.28ε, 6.46ζ	
H44	124.4	9.07	177.6	58.7	4.02	31.5β	2.87β1, 2.73β2 , 6.74δ2, 7.72ε1	
E45	124.8	8.32	177.2	59.6	4.09	29.1β, 35.4γ	2.10β, 1.95β, 2.21γ, 2.15γ	
S46	115.7	9.62	175.0	58.2	4.67	64.1β	4.09β	
A47	124.8	8.31	178.5	53.1	4.92	18.7β	1.42β	
V48	116.3	8.81	174.2	59.3	5.16	36.7β, 21.7γ1, 18.6γ2	2.33β, 1.15γ1, 1.02γ2	
K49	122.9	8.52	176.7	55.5	4.90	32.6β, 23.5γ, 28.5δ, 41.1ε	1.49β1, 1.32β2 , 0.73γ, 0.28γ, 0.46δ1, 0.37δ2 , 2.25ε, 1.90ε	
V50	125.8	8.80	175.0	60.9	4.27	33.9β, 20.0γ1, 21.7γ2	1.99β, 0.79γ1, 0.85γ2	
D51	123.9	8.37	176.1	53.9	4.63	41.9β	2.49β1, 2.70β2	
L52	122.6	8.33	177.1	55.5	4.26	42.5β, 27.0γ, 24.9δ1, 23.3δ2	1.58β, 1.58γ, 0.92δ1, 0.84δ2	
N53	118.5	8.49	174.7	53.3	4.65	38.8β	2.79β, 7.63δ, 6.89δ	113.3δ
R54	121.6	7.95	173.8	53.9	4.70	30.4β	1.85β, 1.69β, 1.69γ, 3.22δ	
P55	---	---	177.0	63.2	4.47	32.1β, 27.5γ, 50.6δ	2.28β, 1.88β, 2.00γ, 3.75δ, 3.61δ	
V56	120.7	8.32	176.4	62.6	4.14	32.6β, 20.6γ1, 21.4γ2	2.07β, 0.93γ1, 0.91γ2	
T57	117.3	8.05	175.1	61.9	4.38	70.1β, 21.5γ _{CH3}	4.26β, 1.22γ _{CH3}	

G58	111.1	8.47	174.7	45.7	4.04		
S59	116.0	8.27	175.2	59.2	4.40	63.8 β	3.87 β
L60	124.0	8.22	177.6	55.9	4.30	42.0 β , 27.1 γ , 24.6 δ 1, 23.9 δ 2	1.64 β , 1.65 γ , 0.93 δ 1, 0.88 δ 2
L61	121.2	7.96	177.6	55.9	4.26	42.2 β , 27.2 γ , 25.0 δ 1, 23.6 δ 2	1.65 β , 1.65 γ , 0.91 δ 1, 0.86 δ 2
K62	121.1	8.02	176.7	57.0	4.24	33.0 β , 24.9 γ , 29.3 δ , 42.2 ϵ	1.80 β , 1.46 γ , 1.68 δ , 3.02ϵ1, 3.21ϵ2
R63	121.4	8.16	176.6	56.7	4.32	30.7 β , 27.1 γ , 43.4 δ	1.81 β , 1.63 γ , 3.20 δ
I64	121.8	8.16	176.0	61.1	4.18	38.6 β , 27.3 γ _{CH2} , 17.6 γ _{CH3} , 12.8 δ	1.86 β , 1.47 γ _{CH2} , 1.20 γ _{CH2} , 0.88 γ _{CH3} , 0.85 δ
R65	125.6	8.38	174.9	55.9	4.42	31.1 β , 27.2 γ , 43.6 δ	1.90 β , 1.75 β , 1.64 γ , 3.21 δ
N66	126.1	8.10	176.4	54.8	4.51	41.4 β	2.79 β , 2.72 β
G67	113.9	8.39	174.7	45.7	3.95		
K68	120.8	8.32	176.9	56.5	4.34	33.2 β , 24.8 γ , 29.1 δ , 42.0 ϵ	1.83 β , 1.73 β , 1.42 γ , 1.73 δ , 3.00 ϵ
K69	122.8	8.34	176.3	56.3	4.31	33.2 β , 24.8 γ , 29.2 δ , 42.1 ϵ	1.83 β , 1.73 β , 1.46 γ , 1.73 δ , 3.02 ϵ
A70	126.0	8.33	177.6	52.5	4.33	19.6 β	1.41 β
K71	121.2	8.31	175.8	56.5	4.37	33.2 β , 24.8 γ , 29.2 δ , 42.2 ϵ	1.91 β , 1.79 β , 1.48 γ , 1.73 δ , 3.03 ϵ
S72	122.8	7.99	178.7	60.0	4.33	64.9 β	3.91 β

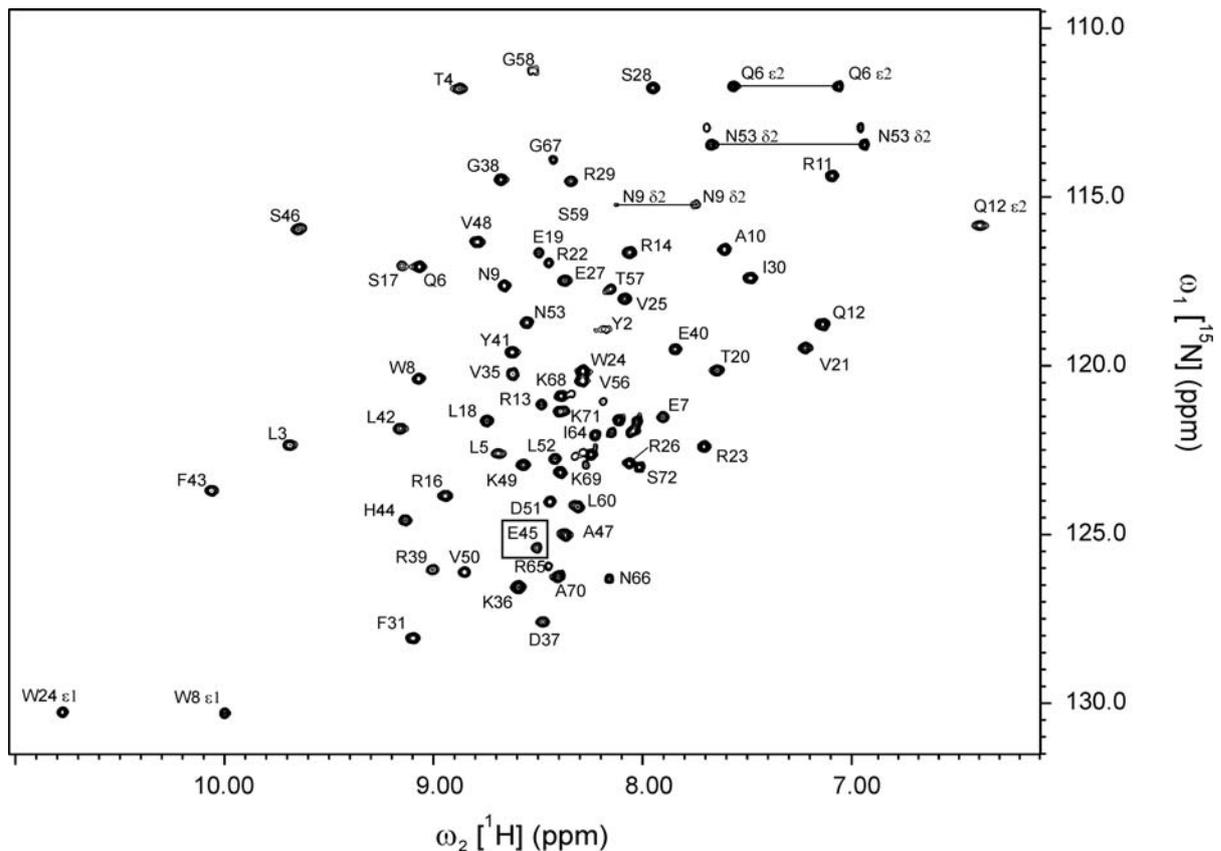


Abb. 6: $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC Spektrum der C28S Mutante der Excisionase bei 30 °C und pH 6.5. Das Signal des Glu45 ist eingerahmt, weil es eine andere Position aufweist als in der Excisionase aus dem Bakteriophagen λ . Alle anderen Resonanzen sind identisch in den Excisionase Proteinen aus den Bakteriophagen HK022 und λ (Rogov et al., 2003).

Die sequenzielle Zuordnung der Resonanzen im Proteinerückgrat wurde mit Hilfe von dreidimensionalen HNCOC, (HCA)CO(CA)NH und HNCACB Tripelresonanzexperimenten durchgeführt. Im HNCOC Experiment wurden Korrelationssignale zwischen der Amidgruppe der Aminosäure i und dem Carbonylkohlenstoff der Aminosäure $i-1$ detektiert. Hierzu komplementär wurden im (HCA)CO(CA)NH Experiment Konnektivitäten zwischen der Amidgruppe der Aminosäure i und den Carbonylkohlenstoffatomen sowohl der Aminosäure $i-1$ als auch der Aminosäure i erhalten. Zur Bestätigung der sequentiellen Verknüpfungen diente das HNCACB Experiment, in dem Korrelationen zwischen der Amidgruppe der Aminosäure i

und den C^α - und C^β -Resonanzen sowohl der Aminosäure i als auch der Aminosäure $i-1$ beobachtet werden.

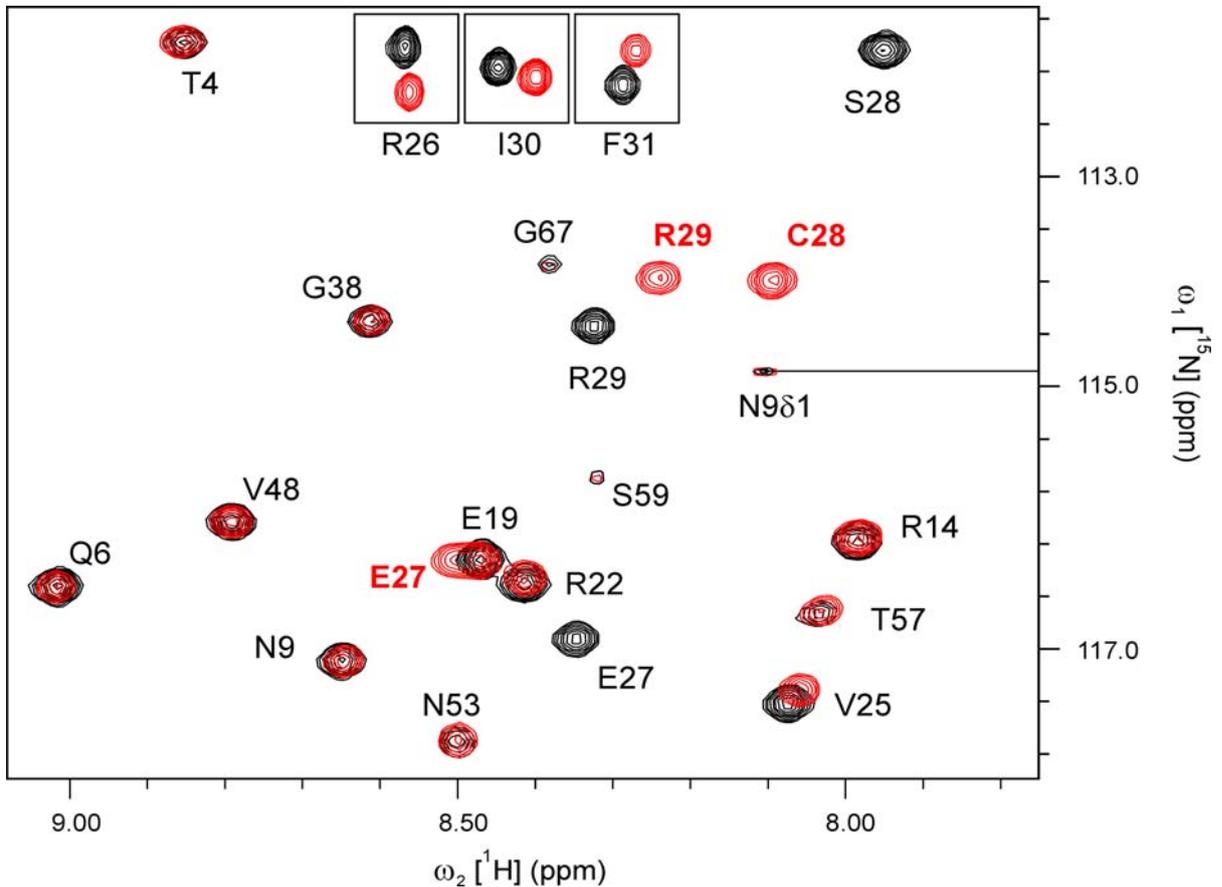


Abb. 7: Überlagerung eines Ausschnitts der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC Spektren des Excisionase Wildtyps (in Rot) und der C28S Mutante (in Schwarz). Die Kästchen am oberen Rand zeigen die Signale von Arg26, Ile30 und Phe31, die in anderen Regionen des Spektrums zu finden sind.

Zusätzlich ließen sich mit diesen Experimenten auch die $^{13}\text{CH}_2$ - und ^{13}CO - Resonanzen der Asparagin- und Glutaminseitenketten bestimmen. Weitere Seitenkettenresonanzen wurden mit Hilfe von HBHA(CBCA)(CO)NH (Korrelationen zwischen der Amidgruppen der Aminosäure i und den H^α - und H^β -Resonanzen der Aminosäure $i-1$), H(CC)(CO)NH-TOCSY (Korrelationen zwischen der Amidgruppe der Aminosäure i und allen ^{13}C -gebundenen Protonenresonanzen des

„Backbone“-Spinsystems der Aminosäure *i-1*) und (H)C(C)(CO)NH-TOCSY (Korrelationen zwischen der Amidgruppe der Aminosäure *i* und allen ^{13}C -Resonanzen des „Backbone“-Spinsystems der Aminosäure *i-1*) Experimenten zugeordnet. Für die Identifizierung von Seitenketten-Spinsystemen (z.B. aromatische Ringe) wurden entsprechend der klassischen Zuordnungsstrategie (Wüthrich, 1986) in erster Linie zweidimensionale [^1H , ^1H]-TOCSY und [^1H , ^1H]-NOESY Experimente verwendet.

Im Verlauf der Zuordnung wurde eine ungewöhnliche Konnektivität zwischen Asn66 und Gly67 bemerkt, durch die allerdings die Faltung und die Funktion des Proteins scheinbar nicht beeinträchtigt wird. Hierbei handelte es sich um eine Isoaspartyl-Verknüpfung (Abb. 8). Diese Art von Asn-X Konnektivität wurde bereits für verschiedene andere Proteine beschrieben (Robinson und Robinson, 2001; Geiger und Clarke, 1987; Simonovic und Volz, 2002).

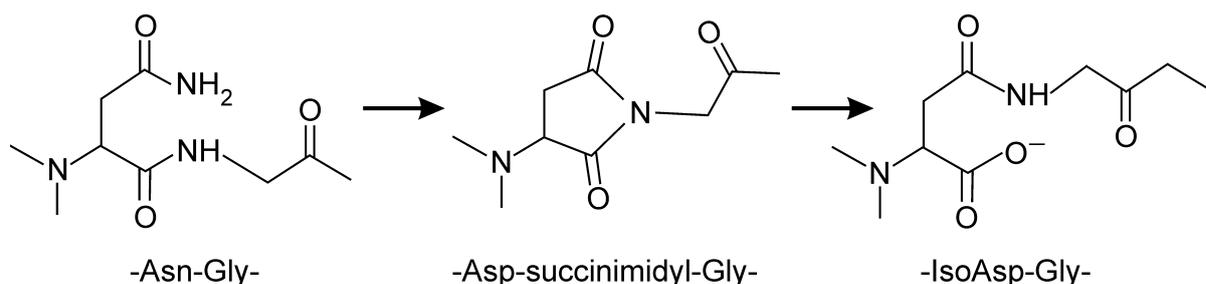


Abb. 8: Bei der Isoaspartyl-Verknüpfung lagert sich der Asparaginrest zuerst in eine Succinimidylgruppe um und bildet anschließend einen Isoaspartatrest.

Im Falle der Excisionase wurde die Isoaspartyl-Verknüpfung aufgrund von Vorzeichenänderungen im [^{15}N , ^1H]-TROSY-HNCACB Spektrum erkannt, nachdem im HNCO-Spektrum (Abb. 9) die sequentielle Verknüpfung zwischen Asn66 und Gly67 über die Carbonylresonanzen im Proteinrückgrat fehlgeschlagen war.

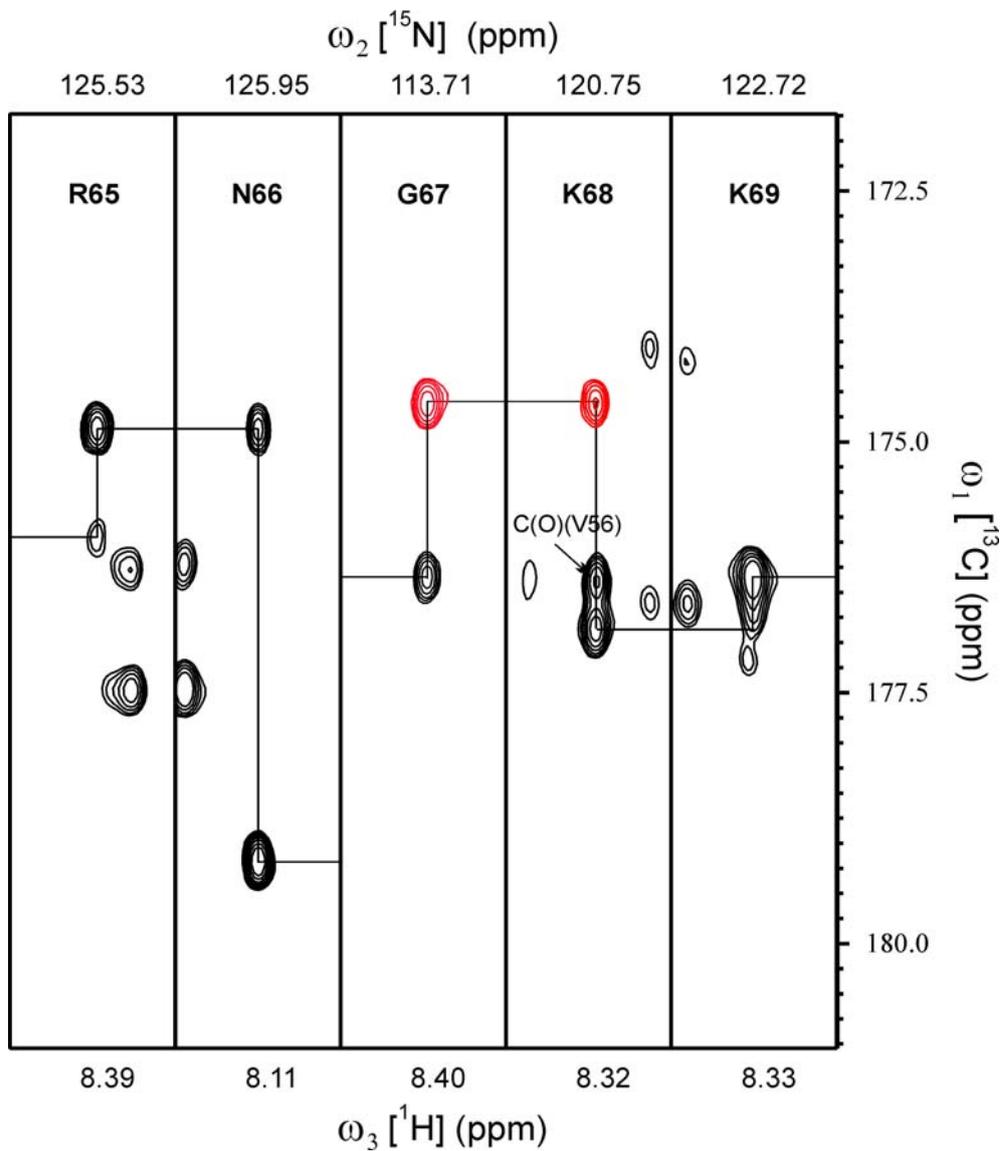


Abb. 9: Streifen aus dem HNCO-Spektrum der C28S-Mutante. Die sequentielle Verknüpfung der Carbonylresonanzen ist zwischen Asn66 und Gly67 unterbrochen. (Das negative Signal des Gly67-Carbonylkohlenstoffs ist rot dargestellt).

Im HNCACB-Spektrum (Abb. 10) sind üblicherweise (mit Ausnahme der Glycine) die C^α -Signale positiv und die C^β -Signale negativ. Im Falle von Gly67 hingegen zeigte die C^α -Resonanz des Restes 66 ein negatives Signal, während die C^β -Resonanz des Restes 66 ein positives Vorzeichen aufwies.

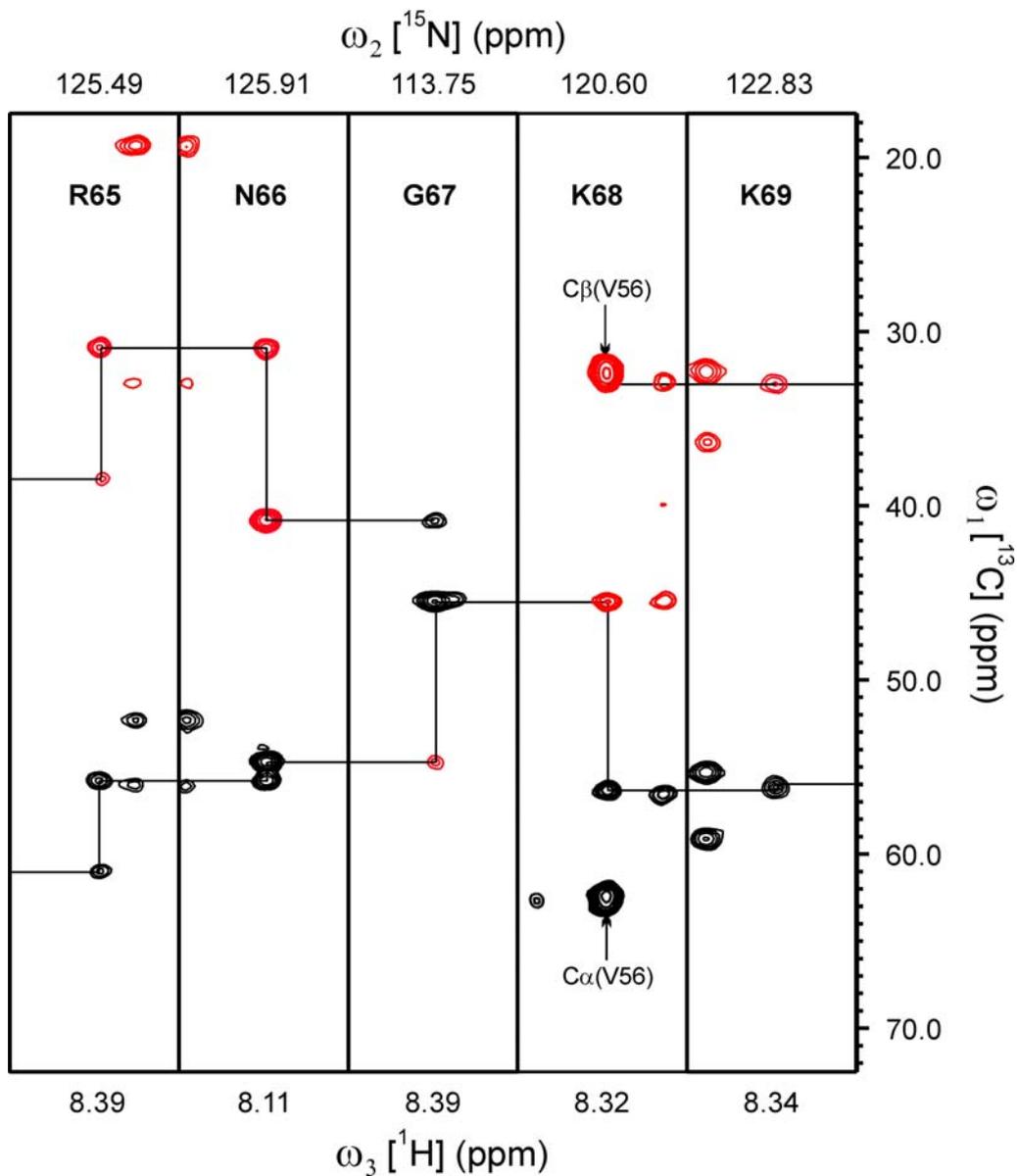


Abb. 10: Streifen aus dem HNCACB Spektrum der C28S Mutante. Aufgrund der Vorzeichenumkehr durch die Isoaspartyl-Verknüpfung erscheint das C^β -Signal des vorangehenden Aminosäurerestes im Gly67 Streifen positiv und das entsprechende C^α -Signal negativ. Die intraresiduellen Konnektivitäten der C^α - und C^β -Resonanzen des Restes 66 zeigen hingegen die gewöhnlichen Vorzeichen.

Diese Vorzeichenumkehr deutet darauf hin, daß das C^β -Atom des Restes 66 näher an Gly67 HN liegt als sein C^α -Atom, wie es nur bei einer Umformung zu Isoaspartat möglich ist. Eine derartige Isomerisierung und Deamidierung von Asparaginresten kann einen nicht-

enzymatischen Abbau des Proteins oder Peptids sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nach sich ziehen (Simonovic und Volz, 2002), was in biologischen Systemen möglicherweise als molekulare Uhr eine wichtige Rolle spielt (Tugarinov et al., 2002). Es ist zwar noch nicht sicher, ob diese Asn/IsoAsp-Isomerisierung, gefolgt von Proteinabbau, in der Excisionase auch *in vivo* stattfindet, aber diese Art von „negativer Regulation“ könnte bei den Bakteriophagen λ und HK022 eine physiologische Bedeutung haben. Schon eine kleine Menge an Excisionase kann in infizierten Zellen den Lebenszyklus des Phagen in den lytischen Zyklus umändern. Es wurde bereits gezeigt (Leffers und Gottesman, 1998), daß die Excisionase Konzentration in *E. coli* Zellen durch zelluläre Proteasen reguliert wird. Also könnte die Asn/IsoAsp-Isomerisierung als ein Signal für den Selbstabbau des Proteins dienen. Bei der Proteinpräparation wurde tatsächlich ein spontaner Abbau der Excisionase festgestellt (I. Kleinhaus, nicht publizierte Ergebnisse).

3.1.2 Strukturuntersuchung

Durch eine statistische Untersuchung der chemischen Verschiebungswerte bestimmter Kerne ist bereits eine grobe Abschätzung der Sekundärstrukturelemente möglich. Gemäß dem chemischen Verschiebungsindex (CSI = „chemical shift index“) kann man die in einem Protein vorhandenen Sekundärstrukturelemente recht gut vorhersagen (Wishart und Sykes, 1994). Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, daß die chemischen Verschiebungswerte der H^α -, C^α -, C^β - und C' -Kerne abhängig von den Φ - und Ψ -Winkelverteilungen, d.h. der Sekundärstruktur, der entsprechenden Aminosäurereste sind. Daher werden die $^1H^\alpha$, $^{13}C^\alpha$, $^{13}C^\beta$ und $^{13}C'$ Verschiebungswerte mit den Standardverschiebungswerten der jeweiligen Aminosäuretypen verglichen. Resonanzfrequenzen, die eine β -Faltblattstruktur andeuten, erhalten hierbei einen Index +1, während für α -helikale Strukturen charakteristisch sind, durch einen Index -1 dargestellt werden. Die entsprechende CSI-Analyse der Excisionase (Abb. 11) ergab 3 Faltblatt- und 2 Helixregionen, die mit den Faltblattsträngen β_1 , β_4 und β_5 sowie den Helices α_1 und α_2 übereinstimmen. Die beiden kurzen Faltblattstränge β_2 und β_3 wurden durch die CSI-Analyse jedoch nicht erkannt.

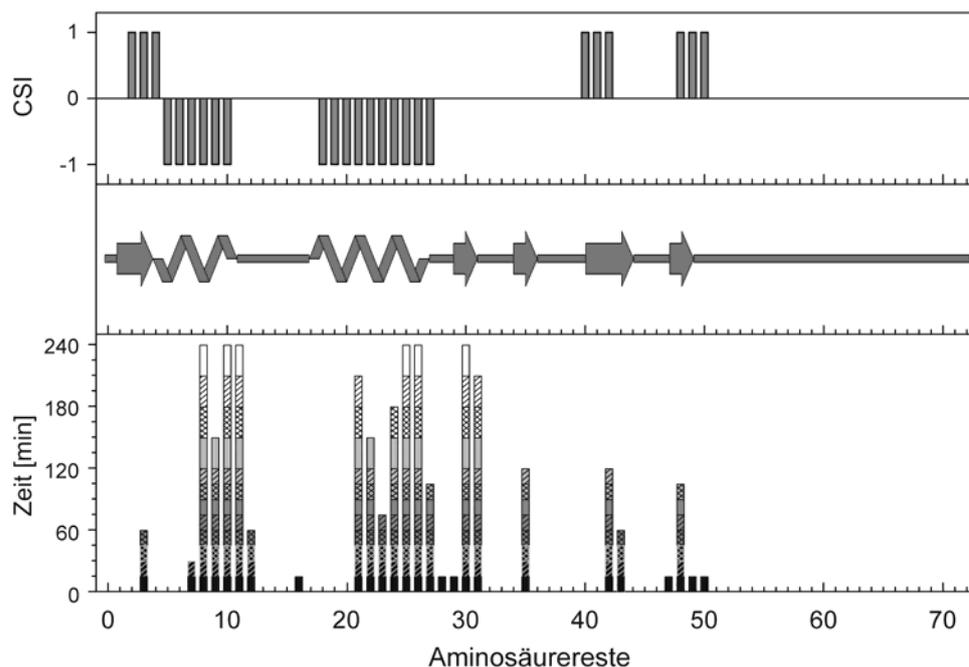


Abb. 11: Sekundärstrukturanalyse der Excisionase. In der obersten Zeile ist der Konsensus der CSI-Analyse dargestellt. Reste mit einem Index +1 repräsentieren β -Faltblattstrukturen, während ein Index -1 helikale Bereiche andeutet. Die Faltblattstränge β_2 und β_3 wurden aufgrund ihrer Kürze von dem Programm nicht erkannt. In der mittleren Zeile ist die Sekundärstruktur der gerechneten Excisionase Struktur in Form von Pfeilen (5 β -Faltblattstränge) und Spiralen (2 α -Helices) schematisch dargestellt. In der unteren Zeile ist der zeitabhängige Wasserstoff/Deuterium-Austausch der Amidprotonenresonanzen abgebildet. Anhand der langsam austauschenden Amidprotonen im Proteinerückgrat wurden die Wasserstoffbrücken in den Sekundärstrukturelementen identifiziert.

Sekundärstrukturelemente in Proteinen, d.h. α -Helices und β -Faltblattstränge werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Einen indirekten experimentellen Hinweis auf derartige Wasserstoffbrücken erhält man durch Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente. Hierbei werden die labilen Protonen der Hydroxyl-, Thiol-, Amid-, und Iminogruppen durch Deuteriumatome substituiert. Die Signale von langsam-austauschenden Protonen bleiben jedoch über längere Zeitspannen in den NMR-Spektren erkennbar. Dementsprechend wurden langsam-austauschende Amidprotonen ausschließlich in den regulären Sekundärstrukturelementen gefunden (Abb. 11), inklusive den Faltblattsträngen β_2 und β_3 , welche durch die CSI-Analyse nicht identifiziert werden waren. Die Wasserstoff/Deuterium-

Austauschexperimente sowie eine detaillierte strukturelle Analyse der Excisionase-Daten deuteten beispielsweise auf eine starke Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amidproton von Phe31 (Strang β 2) und dem Carbonylkohlenstoff von Val 48 (Strang β 5) hin.

Weitere Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins lassen sich aus den NOE-Daten erhalten (Wüthrich, 1986). Jedes Sekundärstrukturelement weist nämlich charakteristische Abstände zwischen den ^1H -Kernen im Proteinrückgrat auf, die sich in den NOE-Intensitäten widerspiegeln (Abb. 12). Die β -Faltblattstränge sind beispielsweise durch sehr starke NOE-Konnektivitäten zwischen H^α der Aminosäure i und HN der Aminosäure $i+1$ charakterisiert [$d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$], während die α -Helices durch starke NOEs zwischen HN der Aminosäure i und HN der Aminosäure $i+1$ [$d_{\text{NN}}(i, i+1)$] sowie bestimmte NOE-Konnektivitäten zwischen Protonen der Aminosäure i und den Aminosäuren $i+2$, $i+3$ und $i+4$ gekennzeichnet sind.

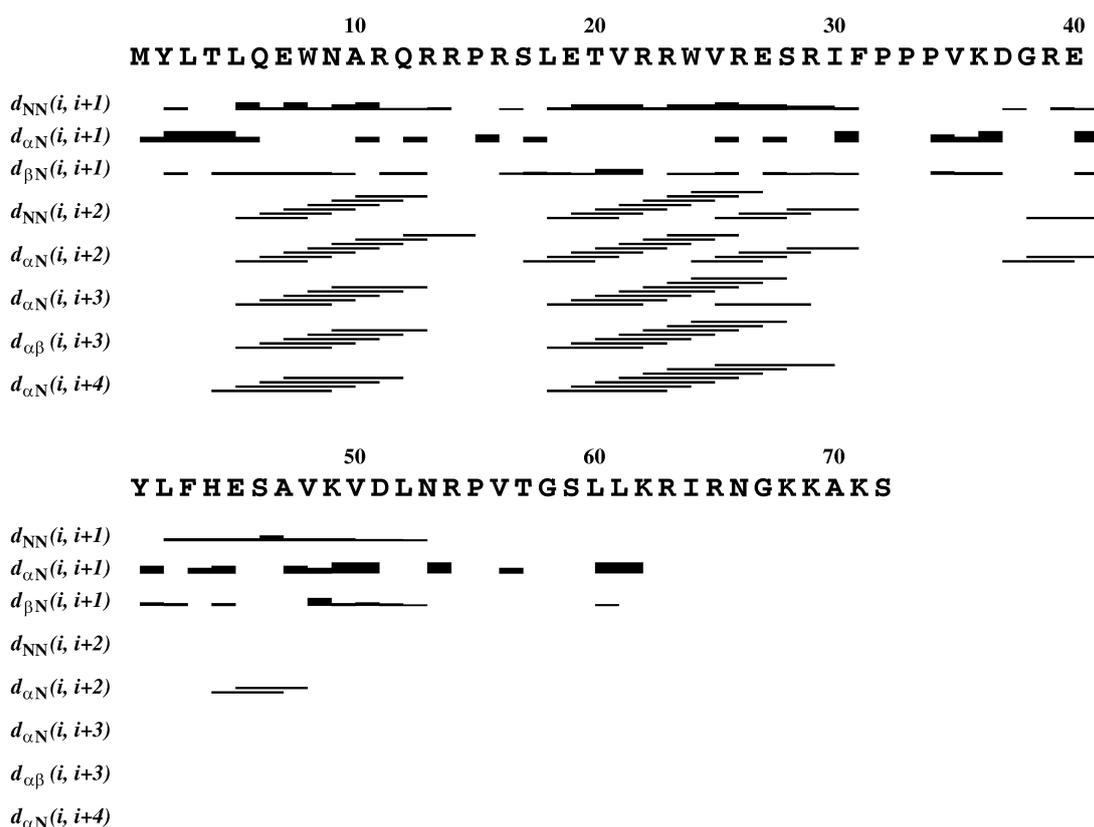


Abb. 12: NOE-Muster der Excisionase. Faltblattstrukturen sind charakterisiert durch starke $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ Konnektivitäten, während nur in helikalen Strukturen NOEs zwischen der Aminosäure i und den Aminosäuren $i+2$, $i+3$ bzw. $i+4$ auftreten.

Anhand der NOE-Verknüpfungen zwischen den Faltblattsträngen ergab sich für die Excisionase ein aus insgesamt fünf Strängen bestehendes β -Faltblattmuster (Abb. 13). Das eine antiparallele β -Faltblatt ist aus den Strängen $\beta 2$ und $\beta 5$ aufgebaut, während sich das andere antiparallele β -Faltblatt aus den Strängen $\beta 3$, $\beta 4$ und $\beta 1$ zusammensetzt. Die β -Faltblattstruktur wird durch eine Triprolin-Sequenz und ein „ β -Bulge“ Element unterbrochen. Die „ β -Bulge“-Struktur (Aminosäuren 45→47), welche die β -Faltblattstränge $\beta 4$ und $\beta 5$ verbindet, befindet sich quasi gegenüber dem Triprolin-Segment (Pro32-Pro33-Pro34).

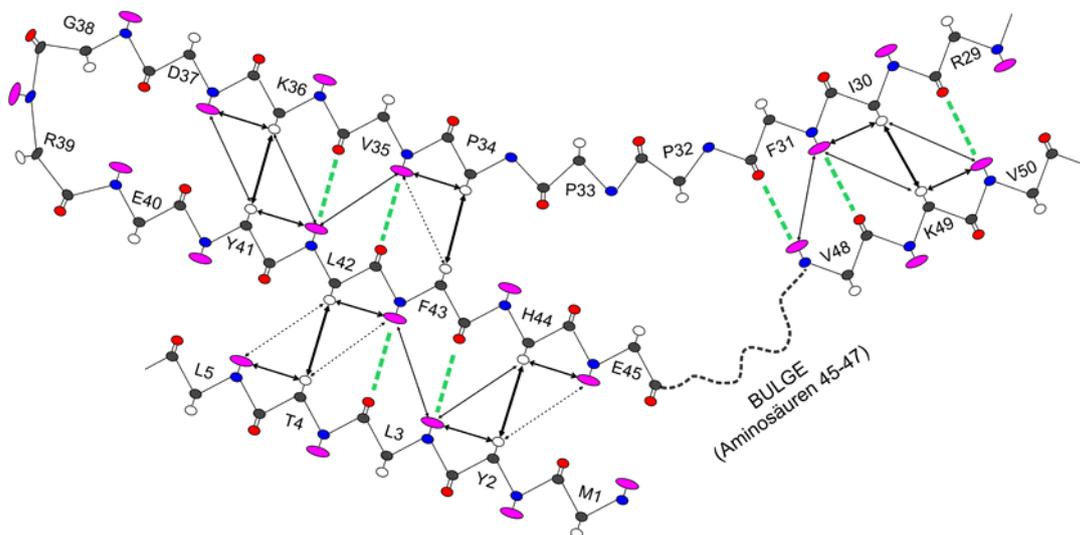


Abb. 13: Schematische Darstellung der antiparallelen β -Faltblattstruktur der Excisionase. Die experimentell beobachteten NOEs sind entsprechend ihrer Intensitäten durch dicke, dünne bzw. gepunktete Doppelpfeile dargestellt. Wasserstoffbrücken, die anhand der Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimente abgeleitet wurden, sind als gestrichelte grüne Linien dargestellt. Die Atome im Proteinrückgrat sind nach der folgenden Farbkodierung gefärbt: C in Grau, N in Blau, HN in Lila, O in Rot und H^α in Weiß.

Um die Tertiärstruktur des Proteins zu berechnen, benötigt man zusätzliche Abstandsinformationen, die aus den 2D und 3D NOESY Spektren zu entnehmen sind. Der Kern-Overhauser-Effekt beruht auf der $1/r^6$ Abhängigkeit der Kreuzrelaxation zwischen benachbarten 1H -Kernen. Daher ist die Detektion einer NOE-Konnektivität zwischen 2 Protonen gleichbedeutend mit einer räumlichen Abstandsbeschränkung; je nach Intensität oder Volumen des

erhaltenen NOE-Signals, läßt sich ein interatomarer Abstandswert im Bereich zwischen 2-6 Å zuordnen. Durch Kombination der experimentell ermittelten Abstandsbeschränkungen und der für Molekülstrukturen intrinsischen sterischen Einschränkungen (d.h. Bindungswinkel, Bindungslängen, etc.) kann man mittels Distanzgeometrierechnungen die Tertiärstruktur bestimmen. Dementsprechend wurde durch Torsionswinkeldynamikrechnungen ein Strukturensemble aus 100 Konformeren erzeugt. Hiervon wurden die 20 Konformeren mit der niedrigsten Zielfunktion energieminimiert und miteinander verglichen.

Die Φ/Ψ -Winkelverteilungen im Proteinrückgrat dieser 20 Strukturen sind im Ramachandran-Diagramm aufgetragen (Abb. 14). Die Analyse der Φ - und Ψ -Winkelverteilungen ergab, daß 82,3% der Aminosäurereste in die bevorzugten, 14,5% in die zusätzlich erlaubten und 1,4% in die weniger erlaubten Bereiche fallen. Nur 1,8% aller Reste aus dem Strukturensemble lagen in den verbotenen Bereichen. Aufgrund des Fehlens von NOEs für die Reste Asp51 bis Ser72 war der C-Terminus allerdings vollständig ungeordnet. Aus diesem Grund werden in der Strukturstatistik (Tabelle 2) die RMSD-Werte und Ramachandran-Verteilungen nur für den strukturierten Teil des Proteins von Tyr2 bis Val50 angegeben.

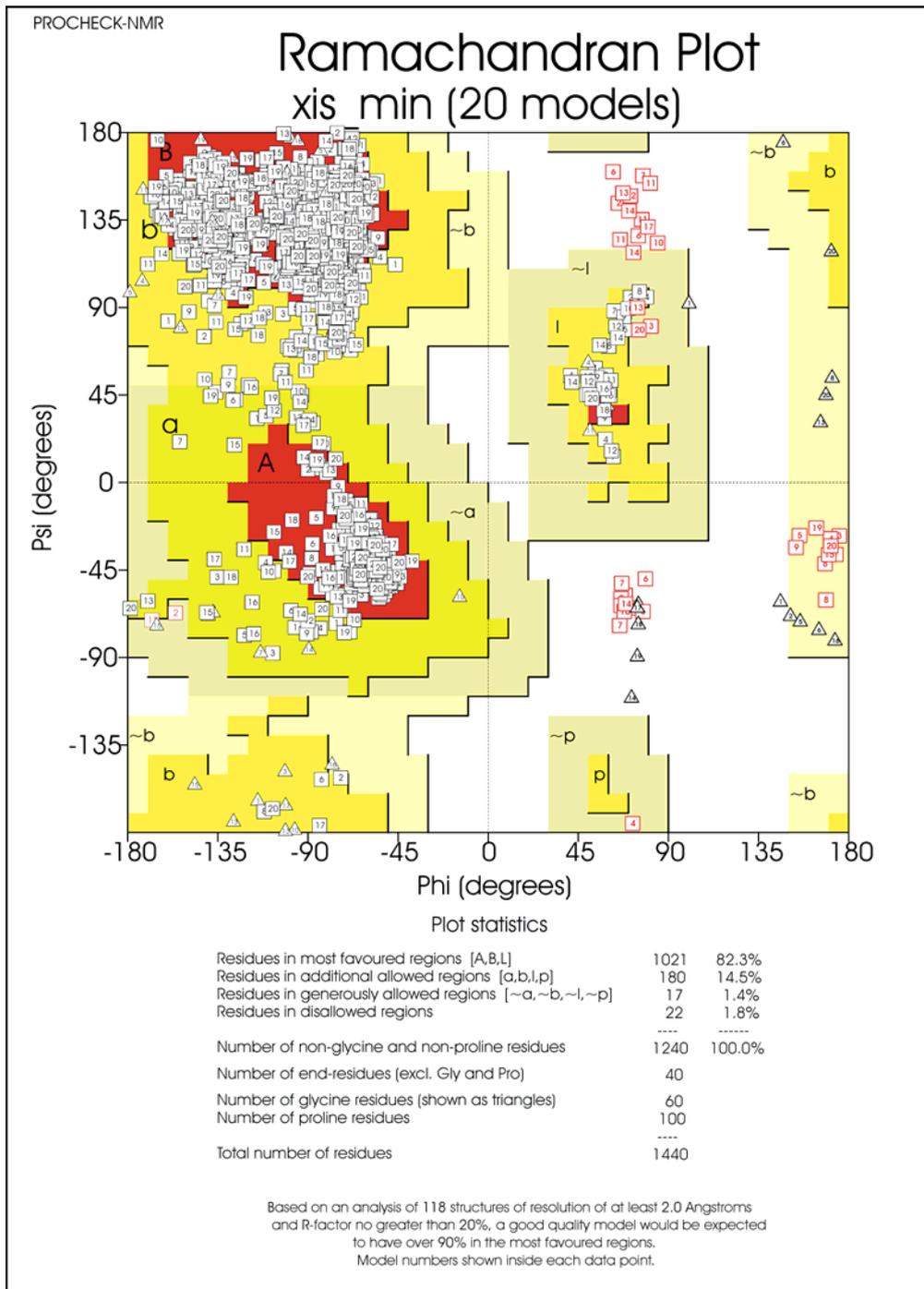


Abb. 14: Ramachandran-Diagramm der 20 energieminierten Excisionase (Xis) Konformer. Es sind die Φ - und Ψ -Winkel aller Aminosäurereste gegeneinander aufgetragen. Die dunklen Regionen sind energetisch günstiger und stellen daher bevorzugte Bereiche dar. Die Zahlen in den Kästchen bzw. Dreiecken geben das jeweilige Konformer wieder.

Tabelle 2: Strukturstatistik für die 20 energieminierten Konformer.

Gesamtzahl der Abstandsbeschränkungen	902 (34)^a
Intraresiduell (i=j)	141
Sequentiell (i-j =1)	256
“Medium-range” (1 < i-j ≤4)	256 (20)^a
“Long-range” (i-j >4)	249 (14)^a
Verletzungen der Abstandsbeschränkungen	
0,20–0,30 Å	21
0,30–0,40 Å	3
maximale Verletzung (Å)	0,36
RMSD-Werte (Å)	
Rückgratotope^b (2–50)	0.83±0.14
Alle Schweratome (Reste 2–50)	1.86±0.18
Rückgratotope^b (Reste 2–11;18–50)	0.71±0.13
Alle Schweratome (Reste 2–11;18–50)	1.68±0.19
Ramachandran-Verteilung (%)^c	
Reste in bevorzugten Regionen	83,9
Reste in zusätzlich erlaubten Regionen	13,1
Reste in weniger erlaubten Regionen	1,6
Reste in nicht erlaubten Regionen	1,5

^a Die Zahl der einbezogenen Wasserstoffbindungsbeschränkungen ist in Klammern eingegeben;

^b N, C^α, C^γ;

^c Werte nur für den strukturierten Teil (Reste 2-50).

Das Strukturensemble der 20 besten Excisionase Konformer (Abb. 15) wies einen RMSD-Wert der Rückgratotope von 0.83±0.14Å auf. Ohne Berücksichtigung des wenig geordneten „L-Loop“ (Glu 12 → Ser 17) lag der RMSD-Wert noch etwas niedriger bei 0.71±0.13Å.

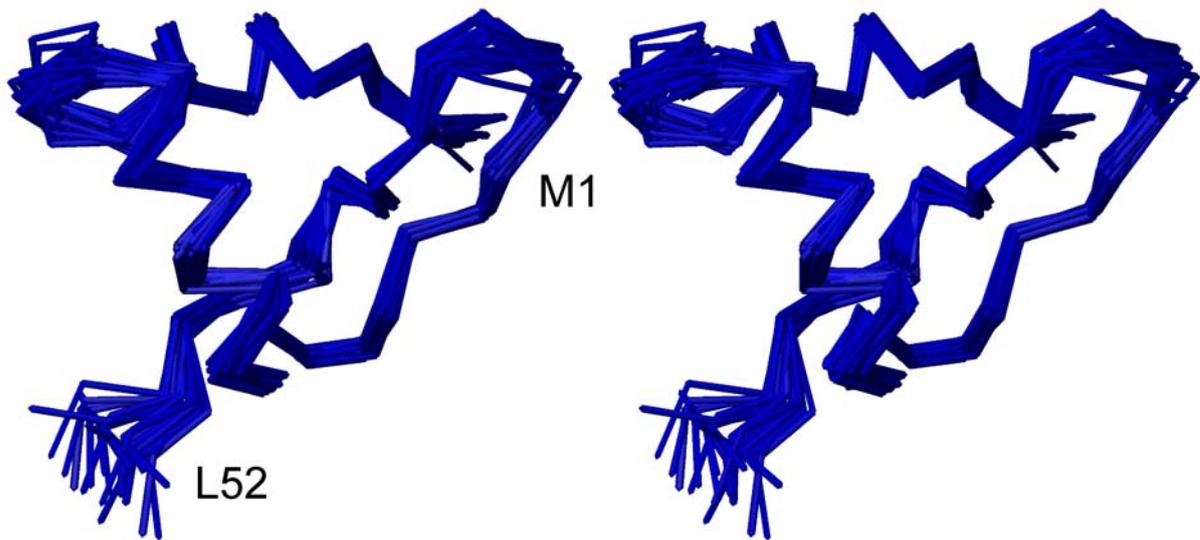


Abb. 15: Strukturensamble der 20 energieminierten Excisionase Konformeren. Der unstrukturierte C-Terminus ist in diesem Stereobild nicht dargestellt.

Die einzelnen Strukturelemente der Excisionase Struktur sind in Abb. 16 anhand des Konformers mit der niedrigsten Gesamtenergie schematisch dargestellt. Die beiden α -Helices sind nahezu im rechten Winkel zueinander angeordnet, wobei Helix $\alpha 1$ (Leu 5 \rightarrow Arg11) über den „L-Loop“ direkt mit Helix $\alpha 2$ (Leu18 \rightarrow Glu27) verbunden ist. Desweiteren bilden die β -Faltblattstränge $\beta 1$ (Tyr2 \rightarrow Thr4), $\beta 4$ (Tyr41 \rightarrow His44) und $\beta 3$ (Val35 \rightarrow Lys36) ein antiparalleles β -Faltblatt, wobei die Reste Asp37 \rightarrow Glu40 zwischen den Strängen $\beta 3$ und $\beta 4$ einen „ β -Turn“ (T) formen.

Das zweite β -Faltblatt besteht aus den Strängen $\beta 2$ (Ile30 \rightarrow Phe31) und $\beta 5$ (Val48 \rightarrow Lys49). Hierbei ist der Strang $\beta 5$ über ein „ β -Bulge“ Element mit Strang $\beta 4$ verbunden und Strang $\beta 2$ über das Triprolinsegment (Pro32 \rightarrow Pro34) mit Strang $\beta 3$. Pro32 weist dabei eine *cis* Konformation auf, während Pro33 und Pro34 beide *trans* Konformationen besitzen. Bis jetzt existieren nur 6 Proteinstrukturen in der Brookhaven Datenbank, die ein derartiges Triprolinmotiv, mit dem ersten Prolin in *cis* Konformation, aufweisen. Diese 6 Strukturen sind die Cytochrom *c* Oxidase (PDB ID: 1AR1, 2OCC und 1OCO), die endo- β -N-Acetylglucosaminidase F1 (2EBN), das basische Myelinprotein (1QCL), die Protocatechuate-4,5-dioxygenase (1BOU und 1B4U), die Thiaminase I (2THI), und das zytotoxische T-

Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (1DQT, 1I85 und 1I8L). Alle diese Proteine weisen eine *cis-trans-trans* Triprolinsequenz auf, außer dem zuletzt genannten Antigen 4, welches eine *cis-trans-cis* Konfiguration besitzt. Interessanterweise befinden sich diese Triprolinsegmente in allen Fällen stets an der Proteinoberfläche, direkt an der Interaktionsstelle mit dem jeweiligen Bindungspartner. In ähnlicher Weise könnte das Pro32-Pro33-Pro34 Motiv in der Excisionase bei der Protein-Protein-Wechselwirkung mit Liganden, wie z.B. FIS oder einem weiteren Excisionase Molekül, eine Rolle spielen.

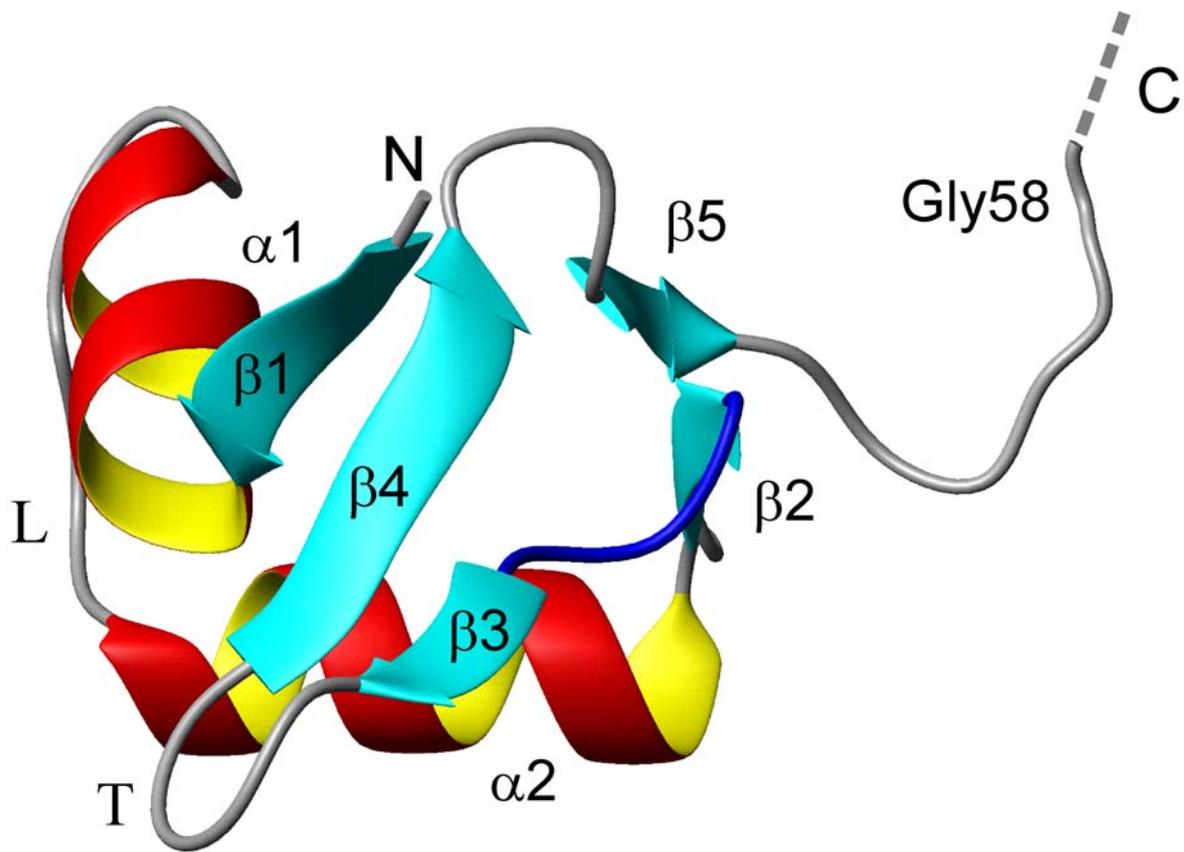


Abb. 16: Schematische Darstellung der Strukturelemente der Excisionase. Die β -Faltblattstränge sind in Zyan und die α -Helices in Gelb und Rot dargestellt.

3.2 Cytochrom c_{552}

3.2.1 Zuordnung der ^1H - und ^{15}N -Resonanzen

Für kleinere Proteine bis 15 kDa gibt es eine klassische Zuordnungsstrategie (Wüthrich, 1986), bei der prinzipiell keine isopenmarkierten Proben benötigt werden. Hierbei werden die Aminosäuren über NOE-Konnektivitäten sequentiell miteinander verknüpft, nachdem die Aminosäuren mittels skalarer Kopplungsexperimente (TOCSY und COSY) in Protonenspinsysteme unterteilt worden sind. Im Falle des Cytochrom c_{552} wurde ^{15}N -angereichertes Protein eingesetzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Das rekombinante Protein enthielt N-terminal zwei zusätzliche Aminosäuren (Met-1 und Ala0) gegenüber der Sequenz des reifen Cytochrom c_{552} (Swiss-Prot Datenbank: P04164).

3.2.1.1 Reduziertes Cytochrom c_{552}

Die Resonanzen des reduzierten Cytochrom c_{552} konnten, insbesondere die für die Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtigen Amidresonanzen, nahezu vollständig zugeordnet werden. Im reduzierten, diamagnetischen Cytochrom c_{552} sind aufgrund der Ringstromeffekte verschiedener aromatischer Systeme einige recht ungewöhnliche chemische Verschiebungen zu beobachten, wie z.B. die Amidprotonenresonanz des Leu116 bei 4,35 ppm. Im [^{15}N , ^1H]-TROSY Spektrum (Abb. 17) ist das Leu116 rechts vom Wassersignal zu finden. Die ^1H - und ^{15}N - Resonanzen des reduzierten Cytochrom c_{552} sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Resonanzzuordnung des reduzierten Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus* bei pH 6,0 und 25 °C. Nicht eindeutig zugeordnete Resonanzen sind kursiv geschrieben; fett gedruckte Resonanzen sind stereospezifisch zugeordnet (n.b. = nicht bestimmt). Die Sekundärspinsysteme sind mit Apostroph gekennzeichnet.

AS	N	HN	H α	andere H	andereN
M-1	n.b.	n.b.	n.b.	2.14 ϵ	
A0	125.4	8.30	4.33	1.41 β	
A0'	125.4	8.36	4.38	1.41 β	
Q1	120.5	8.54	4.38	2.13 β , 2.04 β , 2.45 γ , 7.62 ϵ , 6.89 ϵ	112.5
Q1'	119.8	8.37	4.38	2.13 β , 2.04 β , 2.45 γ , 7.62 ϵ , 6.89 ϵ	112.5
A2	125.2	8.49	4.38	1.28 β	
D3	121.4	8.56	4.78	2.94 β , 2.63 β	
G4	112.5	9.07	3.93, 3.43		
A5	122.8	7.98	2.94	1.37 β	
K6	118.9	7.50	4.15	2.00 β , 1.56 γ , 1.77 δ , 3.04 ϵ	
I7	121.4	8.07	3.97	2.00 β , 1.68 γ_{CH_2} , 1.05 γ_{CH_3} , 0.93 δ	
Y8	118.4	8.22	4.38	2.98 β , 2.67 β , 7.09δ1 , 7.02δ2 , 6.13ϵ1 , 6.83ϵ2	
A9	122.1	7.50	4.11	1.64 β	
Q10	114.6	8.53	4.56	2.58 β , 2.85 γ , 2.74 γ , 7.76 ϵ , 6.76 ϵ	110.2
C11	119.3	8.10	5.68	2.38 β , 1.82 β	
A12	119.8	7.44	2.98	1.19 β	
G13	106.7	8.74	3.79		
C14	114.4	6.57	3.75	0.83 β , 0.71 β	
H15	114.4	5.83	2.45	1.44 β , 1.18 β , 9.02 δ 1, 0.35 δ 2, 0.81 ϵ 1	161.4 δ 1
Q16	105.3	6.50	4.29	2.63 β , 2.09 β , 1.41 γ , 1.20 γ , 6.84 ϵ , 6.31 ϵ	116.5
Q17	125.9	9.44	4.24	2.20 β , 2.46 γ , 2.55 γ , 7.57 ϵ , 6.94 ϵ	111.4
N18	112.5	7.78	4.78	2.98 β , 2.72 β , 7.42 δ , 6.68 δ	109.9
G19	103.4	7.16	2.54, 1.46		
Q20	118.4	7.83	3.88	1.64 β , 2.00 γ , 7.32 ϵ , 6.71 ϵ	111.4
G21	105.7	7.44	3.25, 2.76		
I22	117.9	8.43	4.54	1.82 β , 1.20 γ_{CH_2} , 0.86 γ_{CH_3} , 0.92 δ	
P23	---	---	4.28	2.19 β , 1.86 β , 2.08 γ , 1.92 γ , 3.70 δ , 3.65 δ	
G24	111.8	7.21	4.06, 3.12		
A25	123.3	8.31	4.56	0.65 β	
F26	116.0	8.22	5.05	1.82 β , 0.83 β , 7.50 δ , 7.92 ϵ , 7.67 ζ	
P27	---	---	3.48	0.88 β , 0.62 β , 0.83 γ , 0.71 γ , 3.11 δ , 1.97 δ	
P28	---	---	3.30	1.84 β , 1.48 γ , 2.79 δ	
L29	113.7	7.45	4.11	1.09 β , 1.05 β , -0.25 γ , -0.36 δ , -0.58 δ	
A30	124.7	7.58	4.24	0.70 β	
G31	120.3	10.71	4.15, 3.57		
H32	119.3	7.92	5.14	2.90 β , 2.58 β , 7.11 δ 2, 8.48 ϵ 1	
V33	125.0	8.53	3.48	2.00 β , 1.10 γ , 0.96 γ	
A34	122.4	10.57	3.75	1.46 β	
E35	114.4	6.97	4.06	2.50 β , 2.19 β , 2.62 γ , 2.41 γ	
I36	118.4	7.27	3.66	2.00 β , 1.50 γ_{CH_2} , 1.19 γ_{CH_3} , 0.88 δ	
L37	116.0	8.57	4.11	1.64 β , 1.92 γ , 1.13 δ , 0.77 δ	
A38	118.2	7.40	4.33	1.59 β	
K39	117.2	7.70	4.64	2.13 β , 1.91 β , 1.50 γ , 1.80 δ , 3.03 ϵ	
E40	126.8	9.04	4.29	2.09 β , 2.40 γ	
G41	115.3	9.07	4.42, 4.15		

G42	113.0	8.96	4.60, 3.79		
R43	120.7	8.57	4.20	1.71 β , 1.98 γ , 1.50 γ , 3.21 δ , 3.12 δ , 8.82 ϵ	83.4
E44	116.5	8.11	3.93	2.26 β , 1.95 β , 2.58 γ , 2.38 γ	
Y45	118.9	8.14	4.11	3.30 β , 6.93 δ , 6.79 ϵ	
L46	116.5	7.84	3.70	2.27 β , 1.50 γ , 1.23 δ	
I47	115.3	7.09	3.30	2.13 β , 0.56 γ_{CH_2} , 0.92 γ_{CH_3} , 1.00 δ	
L48	118.6	8.40	3.88	2.36 β , 1.37 γ , 1.10 δ , 1.00 δ	
V49	118.4	7.99	2.90	1.55 β , 0.42 γ , -0.68 γ	
L50	117.7	6.61	3.21	1.64 β , 1.05 β , 1.52 γ , 0.69 δ , 0.57 δ	
L51	115.8	8.17	3.52	0.96 β , -0.33 β , 1.40 γ , 0.50 δ , 0.38 δ	
Y52	117.5	8.46	4.74	2.85 β , 2.67 β , 7.16 δ , 6.76 ϵ	
G53	112.5	7.99	3.48, 2.36		
L54	110.9	7.23	4.42	0.70 β , 1.28 γ , 1.53 δ , 1.12 δ	
Q55	121.0	6.85	4.96	2.13 β , 1.68 β , 2.22 γ , 7.61 ϵ , 6.87 ϵ	111.8
G56	107.8	8.40	3.88		
Q57	120.3	8.54	5.32	2.15 β , 2.04 β , 2.36 γ , 7.66 ϵ , 7.07 ϵ	112.8
I58	120.7	9.16	4.96	1.89 β , 1.50 γ_{CH_2} , 1.34 γ_{CH_2} , 0.99 γ_{CH_3} , 1.11 δ	
E59	122.4	9.32	5.54	1.95 β , 1.80 β , 2.05 γ	
V60	123.3	9.16	4.11	1.83 β , 0.56 γ , 0.04 γ	
K61	131.3	10.26	3.97	1.68 β , 1.41 γ , 2.04 δ , 2.89 ϵ	
G62	103.6	8.78	4.11, 3.70		
M63	119.8	7.82	4.74	2.43 β , 2.04 β , 2.36 γ , 1.86 γ , 2.01 ϵ	
K64	121.4	8.23	5.01	1.68 β , 1.46 γ , 1.37 γ , 1.55 δ , 2.94 ϵ	
Y65	120.7	9.28	4.38	3.21 β , 2.94 β , 6.85 δ , 6.62 ϵ	
N66	119.6	9.08	5.27	3.03 β , 2.72 β , 7.69 δ , 6.80 δ	109.9
G67	110.9	8.17	5.05, 4.38		
V68	120.0	8.85	4.29	2.00 β , 0.88 γ , 0.62 γ	
M69	n.b.	8.04	2.05	0.13 β , 0.05 β , -2.06 γ , -2.35 γ , -2.91 ϵ	
S70	125.0	7.36	3.52	3.16 β , 2.90 β	
S71	108.8	7.04	3.39	3.21 β	
F72	128.0	8.96	4.51	3.30 β , 2.27 β , 6.65 δ , 6.65 ϵ , 7.73 ζ	
A73	118.4	7.50	3.70	1.41 β	
Q74	115.8	8.90	4.20	2.04 β , 2.54 γ , 2.22 γ , 7.69 ϵ , 6.62 ϵ	110.2
L75	123.1	7.90	4.38	2.09 β , 1.64 γ , 1.05 δ , 0.93 δ	
K76	118.9	9.12	4.24	1.50 β , 1.64 γ , 2.31 δ , 3.05 ϵ , 2.97 ϵ	
D77	124.7	9.22	4.29	3.07 β , 2.49 β	
E78	116.0	10.05	4.02	2.09 β , 2.40 γ	
E79	120.5	7.26	3.97	1.95 β , 2.81 γ , 2.31 γ	
I80	120.7	8.18	3.61	1.89 β , 1.71 γ_{CH_2} , 0.69 γ_{CH_3} , 0.57 δ	
A81	119.6	8.24	3.66	1.19 β	
A82	116.5	7.62	4.42	1.50 β	
V83	121.4	8.65	4.38	2.27 β , 1.66 γ , 1.32 γ	
L84	125.2	8.12	4.29	1.37 β , 0.20 β , 1.59 γ , 0.75 δ , 0.08 δ	
N85	117.5	8.48	5.01	3.08 β , 3.02 β , 7.51 δ , 7.46 δ	113.7
H86	122.1	8.47	4.06	3.43 β , 2.76 β , 5.81 δ_2 , 7.45 ϵ_1	
I87	112.3	8.61	3.75	2.20 β , 2.26 γ_{CH_2} , 1.36 γ_{CH_3} , 1.45 δ	
A88	119.6	8.04	4.11	1.41 β	
T89	103.6	7.35	4.51	4.06 β , 1.14 γ_{CH_3}	
A90	128.0	8.80	3.39	-0.78 β	
W91	114.4	8.36	4.87	3.43 β , 3.03 β , 6.98 δ_1 , 9.60 ϵ_1 , 7.39 ϵ_3 , 6.88 ζ_2 , 6.56 ζ_3 , 6.30 η_2	128.5

G92	106.4	7.35	4.20, 3.88		
D93	123.1	8.41	4.11	3.03 β , 2.04 β	
A94	117.9	8.44	3.43	0.70 β	
K95	114.4	7.18	4.06	1.91 β , 1.79 β , 1.51 γ , 1.46 γ , 1.70 δ , 3.03 ϵ	
K96	116.0	7.71	4.33	2.09 β , 1.86 β , 1.46 γ , 1.41 γ , 1.66 δ , 1.60 δ , 2.98 ϵ	
V97	119.8	7.36	4.24	2.22 b , 0.92 γ	
K98	127.5	8.67	4.24	1.82 β , 1.54 γ , 1.41 γ , 1.74 δ , 3.03 ϵ	
G99	113.0	9.01	3.95, 3.86		
F100	120.3	7.88	4.11	3.16 β , 2.81 β , 7.04 δ , 7.30 ϵ , 7.29 ζ	
K101	128.7	6.68	4.47	1.31 β , 1.25 γ , 1.22 γ , 1.55 δ , 2.90 ϵ	
P102	---	---	4.09	2.31 β , 1.99 β , 1.92 γ , 1.75 γ , 3.63 δ , 3.42 δ	
F103	122.8	10.24	4.47	3.12 β , 2.63 β , 7.35 δ , 7.40 ϵ , 7.35 ζ	
T104	110.9	8.26	4.75	4.65 β , 1.23 γ_{CH3}	
A105	123.5	8.95	3.79	1.46 β	
E106	116.3	8.60	3.97	2.09 β , 1.95 β , 2.43 γ , 2.30 γ	
E107	119.3	7.59	4.02	2.34 β , 2.13 β , 2.41 γ , 2.38 γ	
V108	118.6	7.18	3.70	2.27 β , 1.01 γ , 0.97 γ	
K109	119.3	8.21	3.72	2.09 β , 1.82 β , 1.42 γ , 1.33 γ , 1.73 δ , 2.98 ϵ	
K110	115.8	7.57	4.06	1.91 β , 1.50 γ , 1.74 δ , 1.67 δ , 3.00 ϵ	
L111	117.0	7.36	4.51	1.86 β , 1.68 γ , 1.07 δ , 0.97 δ	
R112	122.1	7.87	4.20	2.09 β , 1.91 γ , 1.64 γ , 3.21 δ , 3.12 δ , 9.13 ϵ	86.0
A113	117.7	7.28	4.29	1.50 β	
K114	116.7	7.15	4.15	1.66 β , 1.50 γ , 1.37 γ , 1.65 δ , 2.94 ϵ	
K115	116.3	7.95	3.66	1.71 β , 1.37 γ , 1.69 δ , 3.03 ϵ	
L116	117.7	4.35	4.56	1.39 β , 1.12 γ , 0.77 δ , 0.62 δ	
T117	111.8	8.48	4.69	3.61 β , 1.28 γ_{CH3}	
P118	---	---	4.13	1.97 β , 1.55 β , 2.13 γ , 1.93 γ , 3.83 δ	
Q119	115.1	7.78	4.24	2.13 β , 2.02 β , 2.58 γ , 2.45 γ , 7.48 ϵ , 6.76 ϵ	111.6
Q120	121.0	7.89	4.24	2.08 β , 2.50 γ , 7.53 ϵ , 6.76 ϵ	111.1
V121	124.0	8.12	3.52	2.58 β , 1.05 γ	
L122	122.4	7.71	4.20	2.36 β , 2.00 β , 1.68 γ , 1.24 δ , 1.05 δ	
T123	115.8	7.81	3.88	4.51 β , 1.32 γ_{CH3}	
E124	121.0	7.88	4.11	2.33 β , 2.06 β , 2.55 γ	
R125	124.5	8.49	3.11	2.40 β , 2.02 γ , 1.90 γ , 3.57 δ , 3.30 δ , 10.33 ϵ	89.0
K126	117.9	8.28	4.24	2.06 β , 2.00 β , 1.60 γ , 1.84 δ , 1.78 δ , 3.07 ϵ	
K127	120.7	7.93	4.11	2.04 β , 1.99 β , 1.50 γ , 1.77 δ , 2.87 ϵ	
L128	116.5	7.57	4.29	2.05 β , 1.46 β , 1.97 γ , 0.79 δ , 0.70 δ	
G129	103.9	7.86	4.24, 3.79		
L130	120.0	7.16	4.51	1.75 β , 1.60 γ , 0.92 δ , 0.90 δ	
K131	130.3	8.55	4.24	1.75 β , 1.69 β , 1.49 γ , 1.46 γ , 1.85 δ , 3.03 ϵ	

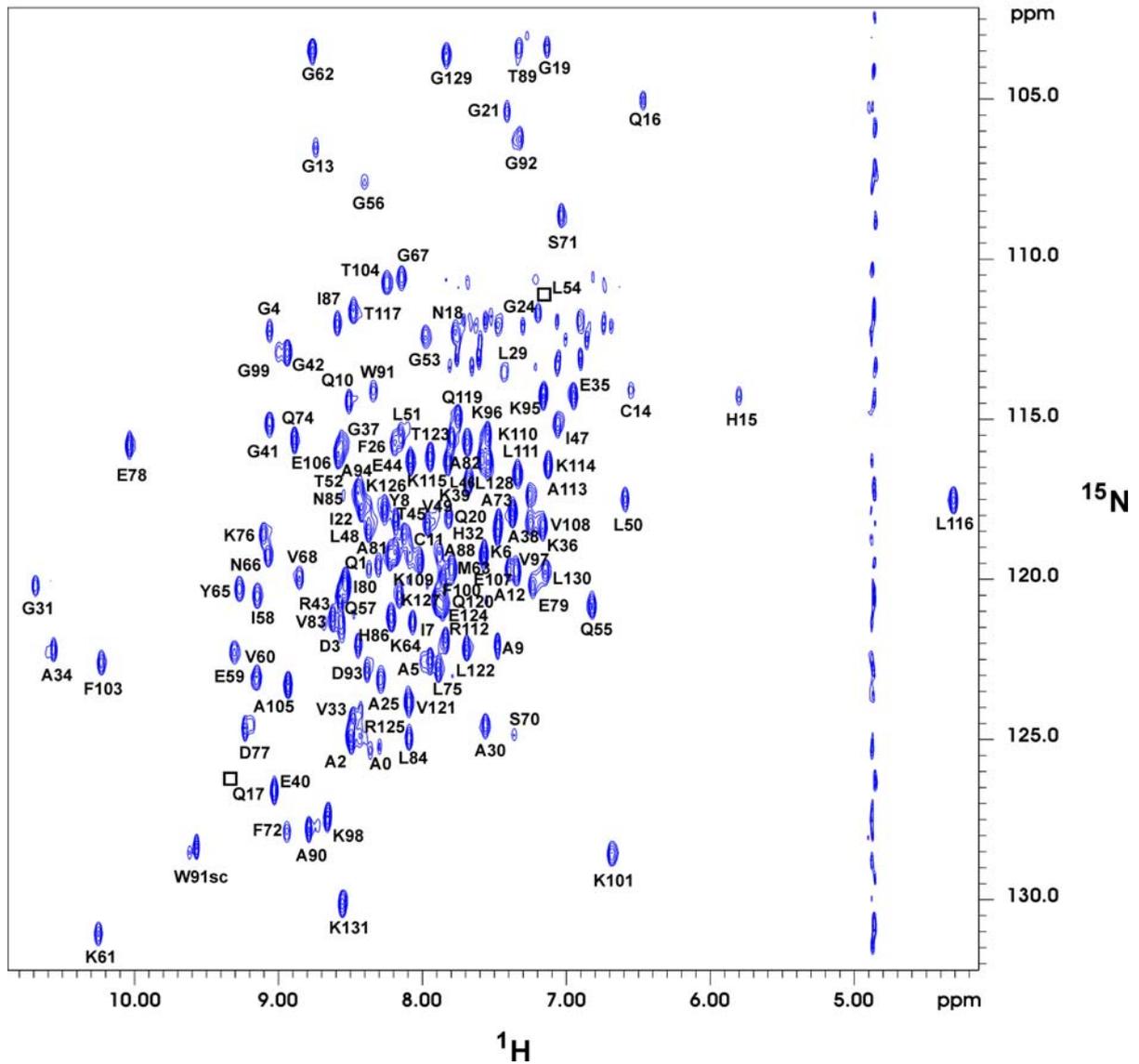


Abb. 17: [^{15}N , ^1H]-TROSY Spektrum des Cytochrom c_{552} im reduzierten Zustand bei pH 6,0 und 25 °C.

Auch im Falle des Hämringes traten ungewöhnliche Verschiebungswerte der Protonen auf. Die Nomenklatur der Hämprotonen ist in Abb. 18 wiedergegeben; die Zuordnung der entsprechenden Protonenresonanzen ist in Tabelle 4 aufgelistet. Die Resonanzzuordnung der Hämresonanzen erfolgte über NOE Daten.

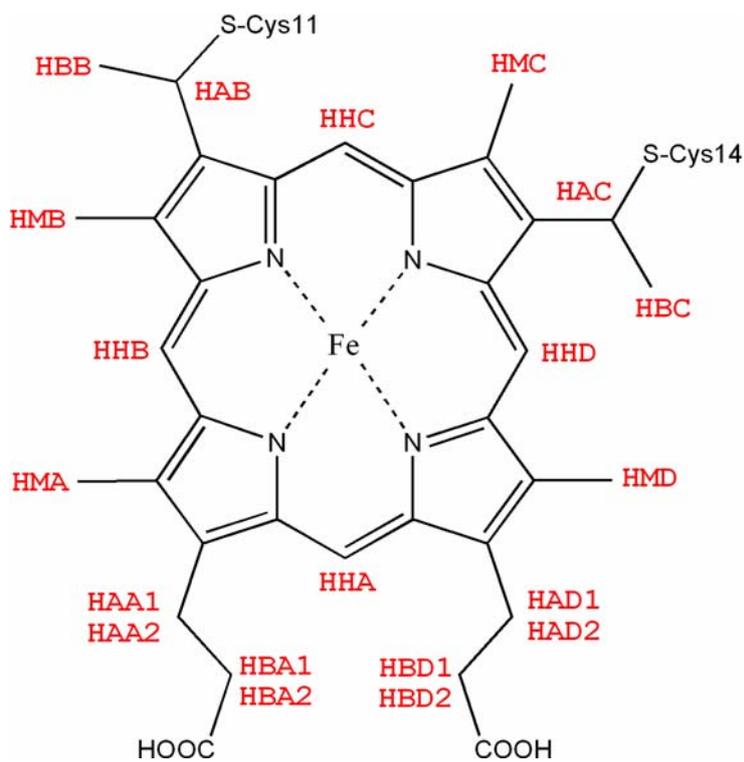


Abb. 18: Chemische Struktur des Häm *c* aus Cytochrom *c*₅₅₂. Die Protonennamen sind in Rot angegeben.

Tabelle 4: Zuordnung der ¹H-Resonanzen des reduzierten Häm *c* bei pH 6,0 und 25 °C. Nicht eindeutig zugeordnete Resonanzen sind kursiv geschrieben.

Protonenname	Chem. Verschiebung (ppm)
HHa	9.30
HHB	9.13
HHc	9.62
HHd	9.86
HAA1/HAA2	4.34, 3.66
HBA1/HBA2	3.22, 2.87
HAB	4.97
HBB	0.88
HAC	6.02
HBC	2.41
HAD1/HAD2	4.36, 4.10
HBD1/HBD2	2.91, 2.58
H2D	12.38
HMA	3.05
HMB	3.54
HMC	3.93
HMD	3.82

Tabelle 5: Resonanzzuordnung des oxidierten Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus* bei pH 6,0 und 25 °C. Nicht eindeutig zugeordnete Resonanzen sind kursiv geschrieben; Fett gedruckte Resonanzen sind stereospezifisch zugeordnet, (n.b. = nicht bestimmt). Die Sekundärspinsysteme sind mit Apostroph gekennzeichnet.

AS	N	HN	H α	andere H	andere N
M-1	n.b.	n.b.	<i>4.44</i>	n.b.	
A0	125.2	8.27	4.30	1.37 β	
A0'	125.2	8.30	4.30	1.37 β	
A0''	125.7	8.41	4.30	1.37 β	
Q1	120.3	8.46	4.27	2.05 β , 1.93 β , 2.35 γ , 7.68 ϵ , 6.96 ϵ	110.9
Q1'	119.6	8.30	4.27	2.05 β , 1.93 β , 2.35 γ , 7.67 ϵ , 6.93 ϵ	110.9
Q1''	119.9	8.33	4.27	2.05 β , 1.93 β , 2.35 γ , 7.64 ϵ , 6.89 ϵ	110.9
A2	125.0	8.38	4.26	1.14 β	
A2'	124.8	8.32	4.22	1.14 β	
A2''	125.5	8.49	4.26	1.14 β	
D3	121.3	8.43	4.62	2.78 β , 2.49 β	
G4	112.1	8.89	3.59, 3.06		
A5	122.4	7.78	2.71	1.29 β	
K6	118.4	7.32	4.02	1.85 β , 1.43 γ , 1.29 γ , 1.65 δ , 2.94 ϵ	
I7	121.0	7.84	3.59	1.46 β , 1.32 γ_{CH_2} , 0.37 γ_{CH_3} , 0.61 δ	
Y8	117.7	7.78	3.41	2.49 β , 6.03δ1 , 7.13δ2 , 5.80ϵ1 , 7.36ϵ2	
A9	122.9	7.32	4.12	1.53 β	
Q10	113.8	8.01	4.20	2.15 β , 1.62 β , 2.30 γ , 7.38 ϵ , 6.44 ϵ	109.8
C11	117.3	7.59	4.31	1.67 β , 1.38 β	
A12	121.7	7.63	4.31	1.67 β	
G13	108.6	9.65	4.37		
C14	114.5	8.55	6.23	n.b.	
H15	116.3	6.30	<i>3.31</i>	n.b.	
Q16	110.2	8.98	5.37	3.69 β , 2.92 β , 3.10 γ , 2.78 γ , 7.69 ϵ , 7.40 ϵ	116.8
Q17	126.9	10.15	<i>4.79</i>	2.48 β , 2.79 γ , 7.77 ϵ , 7.08 ϵ	111.2
N18	113.1	8.37	5.13	3.30 β , 3.06 β , 7.72 δ , 7.05 δ	109.8
G19	103.7	7.96	3.69, 2.10		
Q20	119.4	8.74	4.60	2.44 β , 2.19 β , 2.49 γ , 2.15 γ , 7.63 ϵ , 6.99 ϵ	111.9
G21	106.0	8.86	4.74		
I22	118.2	9.23	5.01	2.23 β , 2.32 γ_{CH_2} , 1.87 γ_{CH_2} , 1.07 γ_{CH_3} , 1.40 δ	
P23	---	---	4.38	<i>1.97β, 2.13γ, 4.06δ, 3.91δ</i>	
G24	111.6	7.16	3.93, 2.91		
A25	122.4	8.11	4.04	0.47 β	
F26	114.9	8.41	4.00	3.51β1 , 3.01β2 , 6.67 δ , 7.33 ϵ , 7.37 ζ	
P27	---	---	2.99	<i>1.36β, -0.96γ, -1.29γ, -0.56δ</i>	
P28	---	---	4.68	2.07 β , 1.98 γ , 3.81 δ , 3.75 δ	
L29	113.5	8.75	4.41	1.86 β , 1.11 β , 2.50 γ , -0.34δ1 , -0.80δ2	
A30	124.8	8.07	4.41	1.04 β	
G31	120.6	10.78	4.28, 3.59		
H32	119.9	7.90	5.03	2.83 β , 2.66 β , 6.85 δ 2, 8.10 ϵ 1	
V33	123.6	8.41	3.21	1.82 β , 0.64γ1 , 0.70γ2	
A34	122.2	10.38	3.67	1.43 β	
E35	114.5	6.91	4.02	2.37 β , 2.57 γ , 2.15 γ	
I36	118.2	7.23	3.59	1.83 β , 1.36 γ_{CH_2} , 0.77 γ_{CH_2} , 1.08 γ_{CH_3} , 0.65 δ	
L37	115.6	8.47	4.02	1.84 β , 1.53 β , 1.78 γ , 1.01 δ , 0.63 δ	

A38	118.0	7.34	4.28	1.55 β	
K39	117.0	7.66	4.60	2.10 β , 1.91 β , 1.48 γ , 1.78 δ , 3.01 ϵ	
E40	126.7	9.05	4.26	2.10 β , 2.39 γ	
G41	115.2	9.09	4.46, 4.22		
G42	113.1	8.98	4.60, 3.78		
R43	120.8	8.61	4.07	1.93 β , 1.85 β , 1.63 γ , 1.40 γ , 3.17 δ , 3.04 δ , 8.80 ϵ	83.4
E44	116.8	8.23	3.98	2.36 β , 2.06 β , 2.68 γ , 2.43 γ	
Y45	118.9	8.29	4.38	3.49β1, 3.39β2, 7.24δ1, 7.02δ2, 6.91ϵ1, 7.38ϵ2	
L46	116.6	7.94	3.78	2.13 β , 1.10 β , 2.14 γ , 0.89δ1, 0.78δ2	
I47	115.6	7.21	3.30	2.25 β , 2.01 γ _{CH2} , 1.00 γ _{CH3} , 0.47 δ	
L48	119.4	8.82	4.36	2.82 β , 1.92 β , 2.59 γ , 1.41 δ , 1.28 δ	
V49	118.7	8.83	5.18	3.21 β , 2.06 γ	
L50	118.9	7.51	4.70	1.77 β , 1.00 β , 0.85 γ , -0.78δ1, -0.44δ2	
L51	117.0	8.86	3.98	1.43 β , 0.09 β , 1.63 γ , 0.70 δ , 0.55 δ	
Y52	116.6	9.43	5.51	3.53 β , 3.42 β , 7.64 δ , 7.06 ϵ	
G53	112.6	9.69	6.23, 5.61		
L54	112.3	9.64	5.57	3.60 β , 2.96 β , 2.80 γ , 2.11δ1, 1.68δ2	
Q55	121.7	7.32	4.89	1.91 β , 2.32 γ , 2.22 γ , 7.63 ϵ , 6.94 ϵ	111.4
G56	107.0	7.69	4.70, 3.69		
Q57	120.3	8.41	4.94	1.94 β , 1.82 β , 2.10 γ , 7.47 ϵ , 6.90 ϵ	112.3
I58	119.9	8.67	4.70	1.49 β , 0.81 γ _{CH2} , 0.66 γ _{CH3} , -0.07 δ	
E59	122.0	9.09	5.27	1.78 β , 1.63 β , 1.87 γ	
V60	122.9	8.93	3.93	1.62 β , -0.05γ1, 0.14γ2	
K61	131.1	10.18	3.93	2.06 β , 1.67 β , 1.40 γ , 1.75 δ , 2.97 ϵ	
G62	103.4	8.73	4.07, 3.59		
M63	119.6	7.72	4.62	1.96 β , 1.72 β , 2.36 γ , 2.28 γ , 2.29 ϵ	
K64	121.5	8.11	4.65	1.48 β , 1.39 β , 1.28 γ , 1.17 γ , 1.48 δ , 2.82 ϵ	
Y65	119.9	8.83	3.83	2.01 β , 6.20 δ , 6.38 ϵ	
N66	118.9	8.36	4.60	2.63 β , 2.34 β , 7.41 δ , 6.57 δ	109.5
G67	109.1	6.78	4.02, 2.73		
V68	117.5	7.37	3.93	1.57 β , 0.59 γ	
M69	124.8	8.74	2.39	n.b.	
S70	111.6	8.42	5.06	4.05 β , 3.92 β	
S71	111.9	8.41	5.08	4.38 β , 4.02 β	
F72	126.4	9.64	4.65	3.02 β , 2.25 β , 6.86 δ , 6.24 ϵ , 6.18 ζ	
A73	118.4	7.84	3.88	1.67 β	
Q74	115.6	9.01	4.22	2.03 β , 2.51 γ , 2.18 γ , 7.60 ϵ , 6.52 ϵ	110.0
L75	122.4	7.74	4.22	1.86 β , 1.32 β , 1.73 γ , 0.70 δ , 0.37 δ	
K76	118.7	9.01	4.22	2.18 β , 1.34 γ , 1.58 δ , 2.98 ϵ	
D77	124.8	9.21	4.17	2.96 β , 2.44 β	
E78	115.9	9.99	3.88	1.96 β , 2.30 γ	
E79	120.1	7.06	3.69	2.54 β , 2.15 β , 2.04 γ , 1.64 γ	
I80	120.3	7.98	3.06	1.75 β , 1.51 γ _{CH2} , 0.42 γ _{CH3} , 0.52 δ	
A81	119.1	8.03	3.40	1.00 β	
A82	116.1	7.35	4.17	1.24 β	
V83	120.1	8.10	3.74	1.47 β , 0.14γ1, 0.44γ2	
L84	124.3	7.46	3.37	0.90 β , 0.86 γ , -0.22 δ , -0.26 δ	
N85	117.3	8.08	4.70	2.81 β , 2.77 β , 7.34 δ , 7.29 δ	113.1
H86	121.5	8.06	3.78	2.87 β , 2.44 β , 5.41 δ 2, 7.37 ϵ 1	
I87	110.9	7.90	3.45	1.58 β , 1.26 γ _{CH2} , 0.99 γ _{CH2} , 0.28 γ _{CH3} , -0.32 δ	
A88	119.4	7.63	3.88	1.14 β	

T89	103.2	7.14	4.41	3.93 β , 1.00 γ_{CH3}	
A90	127.6	8.62	3.35	-0.81 β	
W91	114.0	8.33	4.94	3.54 β , 3.11 β , 7.15 δ 1, 9.84 ϵ 1, 7.46 ϵ 3, 7.17 ζ 2, 6.51 ζ 3, 6.45 η 2	128.8
G92	106.3	7.33	4.22, 3.88		
D93	122.7	8.35	4.07	2.92 β , 1.96 β	
A94	117.7	8.35	3.35	0.57 β	
K95	114.2	7.14	4.02	1.87 β , 1.74 β , 1.46 γ , 1.42 γ , 1.66 δ , 3.02 ϵ	
K96	115.6	7.67	4.31	2.06 β , 1.83 β , 1.44 γ , 1.40 γ , 1.65 δ , 1.59 δ , 2.97 ϵ	
V97	119.9	7.32	4.22	2.15 β , 0.87 γ	
K98	127.6	8.66	4.17	1.78 β , 1.49 γ , 1.39 γ , 1.69 δ , 3.02 ϵ	
G99	113.1	8.98	4.60, 3.79		
F100	119.9	7.81	4.02	3.11 β , 2.73 β , 6.94 δ , 6.89 ϵ , 7.11 ζ	
K101	128.5	6.62	4.41	1.23 β , 1.16 γ , 1.48 δ , 2.82 ϵ	
P102	---	---	3.95	2.18 β , 1.61 β , 1.90 γ , 1.80 γ , 3.54 δ , 3.34 δ	
F103	122.4	10.09	4.36	2.87 β , 2.44 β , 7.14 δ , 7.17 ϵ , 7.11 ζ	
T104	110.7	8.15	4.64	4.60 β , 1.15 γ_{CH3}	
A105	123.1	8.87	3.69	1.38 β	
E106	116.1	8.55	3.97	2.07 β , 1.96 β , 2.39 γ , 2.28 γ	
E107	119.1	7.55	4.00	2.37 β , 2.10 β , 2.29 γ	
V108	118.2	7.15	3.69	2.25 β , 0.96 γ , 0.92 γ	
K109	119.4	8.22	3.76	2.09 β , 1.82 β , 1.48 γ , 1.35 γ , 1.71 δ , 3.00 ϵ	
K110	115.6	7.58	4.10	1.96 β , 1.54 γ , 1.74 δ , 1.67 δ , 3.02 ϵ	
L111	116.8	7.44	4.65	1.96 β , 1.84 β , 1.90 γ , 1.17 δ , 1.08 δ	
R112	122.0	7.96	4.36	2.19 β , 1.98 β , 1.98 γ , 1.75 γ , 3.31 δ , 3.18 δ , 9.14 ϵ	86.1
A113	117.5	7.38	4.36	1.58 β	
K114	116.8	7.30	4.29	1.83 β , 1.62 γ , 1.53 γ , 1.79 δ , 3.08 ϵ	
K115	116.8	8.15	3.93	1.86 β , 1.53 γ , 1.81 δ , 3.16 ϵ	
L116	118.0	4.69	4.81	1.76 β , 1.18 β , 1.37 γ , 1.02 δ , 0.85 δ	
T117	111.9	8.79	5.08	5.08 β , 1.50 γ_{CH3}	
P118	---	---	4.84	2.13 β , 2.85 γ , 2.78 γ , 4.40 δ , 4.23 δ	
Q119	115.4	8.19	4.44	2.30 β , 2.16 β , 2.70 γ , 2.55 γ , 7.58 ϵ , 6.88 ϵ	111.4
Q120	121.0	8.20	4.43	2.77 β , 2.30 β , 2.65 γ , 7.66 ϵ , 6.88 ϵ	111.2
V121	123.8	8.55	3.95	3.31 β , 1.93 γ , 1.78 γ	
L122	122.4	7.99	4.41	2.52 β , 2.14 β , 1.73 γ , 1.23 δ , 1.01 δ	
T123	115.9	8.02	3.98	4.65 β , 1.38 γ_{CH3}	
E124	120.8	8.08	4.22	2.77 β , 2.84 γ , 2.53 γ	
R125	124.3	8.62	3.21	2.49 β , 2.20 β , 1.71 γ , 1.00 γ , 3.54 δ , 3.23 δ , 9.94 ϵ , 9.56 η 2	88.7 ϵ
K126	118.0	8.32	4.26	2.10 β , 1.60 γ , 1.82 δ , 3.05 ϵ	
K127	120.6	7.96	4.12	2.10 β , 1.80 β , 1.56 γ , 1.78 δ , 3.04 ϵ	
L128	116.3	7.60	4.31	2.06 β , 1.46 β , 2.03 γ , 0.81 δ , 0.70 δ	
G129	103.7	7.86	4.22, 3.78		
L130	119.6	7.11	4.46	1.67 β , 1.55 γ , 0.86 δ	
K131	130.2	8.51	4.17	1.77 β , 1.65 β , 1.43 γ , 1.39 γ , 1.64 δ , 2.97 ϵ	

Die Resonanzzuordnung des Häms erfolgte wiederum über NOE-Daten. Im Falle des oxidierten Häms traten jedoch aufgrund des paramagnetischen Zustandes sehr ungewöhnliche Verschiebungswerte der Protonen auf, wie z.B. das HMC bei 34,1 ppm und das HBB bei -1,42 ppm. Es konnten daher auch nicht alle Hämresonanzen identifiziert werden. In Tabelle 6 sind die zugeordneten Hämresonanzen für den oxidierten Zustand aufgelistet.

Tabelle 6: Zuordnung der ^1H -Resonanzen des oxidierten Häm *c*. Nicht eindeutig zugeordnete Resonanzen sind kursiv geschrieben.

Protonenname	Chem. Verschiebung (ppm)
HMA	32.79
HMB	13.00
HMC	34.10
HMD	17.52
HBB	-1.42
HBC	<i>3.31</i>

3.2.2 Funktionelle Untersuchungen

Im Verlauf der Resonanzzuordnungen wurde festgestellt, daß die Aminosäure Ala123 des Cytochrom c_{552} durch eine spontane Mutation in ein Threonin umgewandelt worden war. Diese Punktmutation konnte auch durch eine DNA-Sequenzanalyse nachträglich bestätigt werden. Aus diesem Grund wurden enzymkinetische Aktivitätsmessungen durchgeführt, um festzustellen, ob diese A123T Mutation das Protein funktionell beeinträchtigt.

Zur Bestimmung der Elektronentransferaktivität wurde die Oxidation des reduzierten Cytochrom c_{552} durch Wildtyp ba_3 -Oxidase bei 552 nm kinetisch untersucht. Es wurden hierbei drei verschiedene Cytochrom c_{552} Proben parallel behandelt: (1) die heterolog in *E. coli* exprimierte A123T Mutante, (2) das heterolog in *E. coli* exprimierte „Wildtyp“ Protein und (3) das homolog in *T. thermophilus* exprimierte „Wildtyp“ Protein.

Für jede dieser Cytochrom c_{552} Proben wurden 3 Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die erhaltenen Wechselzahlen geben die Anzahl der Reaktionszyklen an, die das Enzym pro Zeiteinheit katalysiert, wodurch die katalytische Wirksamkeit des Enzyms wiedergegeben wird.

Die Aktivitätsmessungen haben gezeigt (Tabelle 7), daß die Wechselzahlen der A123T Mutante nicht signifikant vom Wildtyp abweichen, sondern in der gleichen Größenordnung liegen. Die hier gemessenen Werte stimmen außerdem mit den Literaturwerten (Giuffre et al., 1999) überein, bei denen ähnliche Messungen mit den gleichen Reaktionspartnern durchgeführt worden waren. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, daß die A123T Mutante ein vollständig funktionsfähiges Cytochrom c_{552} darstellt.

Tabelle 7: Katalytische Wirksamkeit verschiedener Formen des Cytochrom c_{552} . Die Wechselzahlen (WZ) ergeben Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelmessungen.

Cytochrom c_{552} Form	WZ (s^{-1})	\overline{WZ} (s^{-1})
Homolog exprimierter Wildtyp	64,78 71,05 104,02	$79,95 \pm 21,08$
Heterolog exprimierte A123T Mutante	66,29 68,96 85,22	$73,49 \pm 10,25$
Heterolog exprimierter Wildtyp	66,63 70,35 86,83	$74,60 \pm 10,75$

3.2.3 Histidintitrationsen

Histidin kann bei pH-Verschiebung seinen Ladungszustand ändern, wenn der Imidazolring in der Seitenkette protoniert bzw. deprotoniert wird. In der Literatur findet man für das freie Histidin einen pK_s -Wert für die Seitenkette zwischen 6,0 - 6,8 (Koolman und Röhm, 1998; Campbell und Dwek, 1988). Histidine können daher, wenn sie in der Bindungstasche oder im aktiven Zentrum eines Proteins auftreten, als pH-sensitive Sonden für Liganden- oder Substratbindung fungieren, da der Protonierungsgrad des Imidazolringes wiederum dessen Ringstromeffekt beeinflusst.

Es wurden deshalb Histidintitrationsmessungen im reduzierten und oxidierten Zustand durchgeführt, um zu ermitteln, welche pK_s -Werte die Histidinreste des Cytochrom c_{552} jeweils aufweisen. Die chemischen Verschiebungswerte der $H^{\delta 2}$ - und $H^{\epsilon 1}$ -Resonanzen sind für die

Histidine 15, 32 und 86 in der Tabelle 8 pH-abhängig aufgetragen. Die größten Veränderungen wurden im pH-Bereich 6-8 für His32 beobachtet, welches über eine Wasserstoffbrücke mit dem Propionat A des Hämrings verbunden ist. His15, einer der beiden axialen Eisenliganden, zeigt im reduzierten Zustand nur geringe Resonanzveränderungen in diesem pH-Bereich, während im oxidierten Cytochrom c_{552} die Imidazolresonanzen aufgrund der Nähe zum paramagnetischen Eisenkern nicht detektiert werden konnten.

Tabelle 8: Histidintitrationen des reduzierten und oxidierten Cytochrom c_{552} . Die Protonenresonanzen (in ppm) des reduzierten Proteins sind rot dargestellt; blau gefärbte Verschiebungswerte representieren das oxidierte Cytochrom c_{552} (n.b. = nicht bestimmt).

Oxidationszustand	pH	H15 (H δ 2)	H15 (H ϵ 1)	H32 (H δ 2)	H32 (H ϵ 1)	H86 (H δ 2)	H86 (H ϵ 1)
reduziert	5.86	0.358	0.818	7.142	8.576	5.819	7.485
	6.31	0.350	0.811	7.113	8.477	5.810	7.451
	6.92	0.337	0.798	7.032	8.188	5.792	7.432
	7.30	0.329	0.787	6.979	7.992	5.779	7.429
	7.92	0.316	0.770	6.900	7.702	5.762	7.422
oxidiert	5.91	n.b.	n.b.	6.884	8.349	5.441	7.405
	6.36	n.b.	n.b.	6.860	8.136	5.424	7.376
	6.98	n.b.	n.b.	6.820	7.785	5.401	7.358
	7.38	n.b.	n.b.	6.800	7.641	5.387	7.352
	7.84	n.b.	n.b.	6.789	7.549	5.379	7.347

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei der im folgenden Abschnitt beschriebenen Mapping-Analyse sichergestellt, daß die NMR-Messungen des freien und komplexierten Cytochrom c_{552} immer bei exakt dem gleichen pH-Wert durchgeführt wurden, um eine falsche Interpretation der Verschiebungsänderungen aufgrund von pH-Unterschieden zu vermeiden.

3.2.4 Analyse der Kontaktfläche

Um strukturelle Informationen über die Wechselwirkungen des Cytochrom c_{552} mit seinem Elektronentransferpartner, der Cytochrom c Oxidase, zu erhalten, wurde eine Mapping-Analyse

(„chemical shift perturbation mapping“) mittels NMR durchgeführt. Hierzu wurde die wasserlösliche Cu_A-Domäne der Oxidase als Reaktionspartner des Cytochrom *c*₅₅₂ eingesetzt. Es wurden die chemische Verschiebungswerte der Amidgruppen des ¹⁵N-angereicherten Cytochrom *c*₅₅₂ in [¹⁵N, ¹H]-TROSY Spektren, die einmal in Abwesenheit und einmal in Gegenwart der Cu_A-Domäne aufgenommen worden waren, miteinander verglichen (Abb. 20). Wegen der sehr kurzlebigen Interaktion zwischen den beiden Proteinen waren die Veränderungen der Signalpositionen in Gegenwart der Cu_A-Domäne allerdings nur sehr gering.

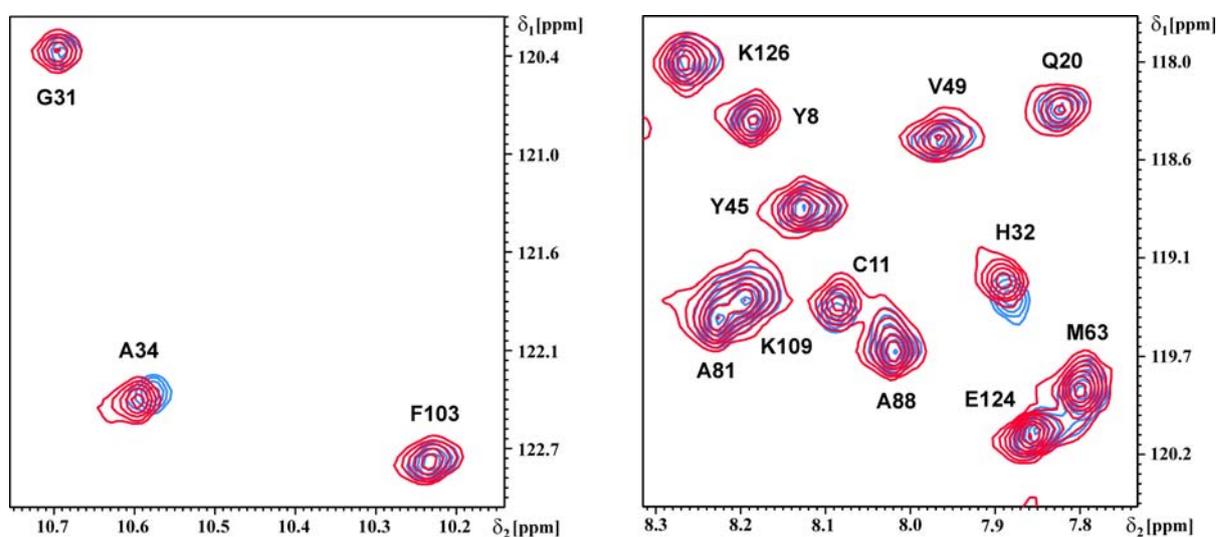


Abb. 20: Mapping-Analyse des reduzierten Cytochrom *c*₅₅₂ in Abwesenheit (rot) und in Gegenwart (blau) der Cu_A-Domäne. Die hier gezeigten Ausschnitte aus den überlagerten [¹⁵N, ¹H]-TROSY Spektren lassen erkennen, daß die meisten Signale keine signifikanten Verschiebungen aufweisen. Die größten Veränderungen treten in diesen Regionen für Ala34 (linkes Bild) und His32 (rechtes Bild) auf.

Die berechneten Gesamtverschiebungsänderungen ($\Delta\delta$) der einzelner Aminosäurereste sind in Abb. 21 für den reduzierten und den oxidierten Zustand gegeneinander aufgetragen. In der Regel sind in beiden Redoxzuständen die gleichen Sequenzabschnitte betroffen, wobei die Gesamtverschiebungsänderungen im oxidierten Zustand meist etwas größer sind.

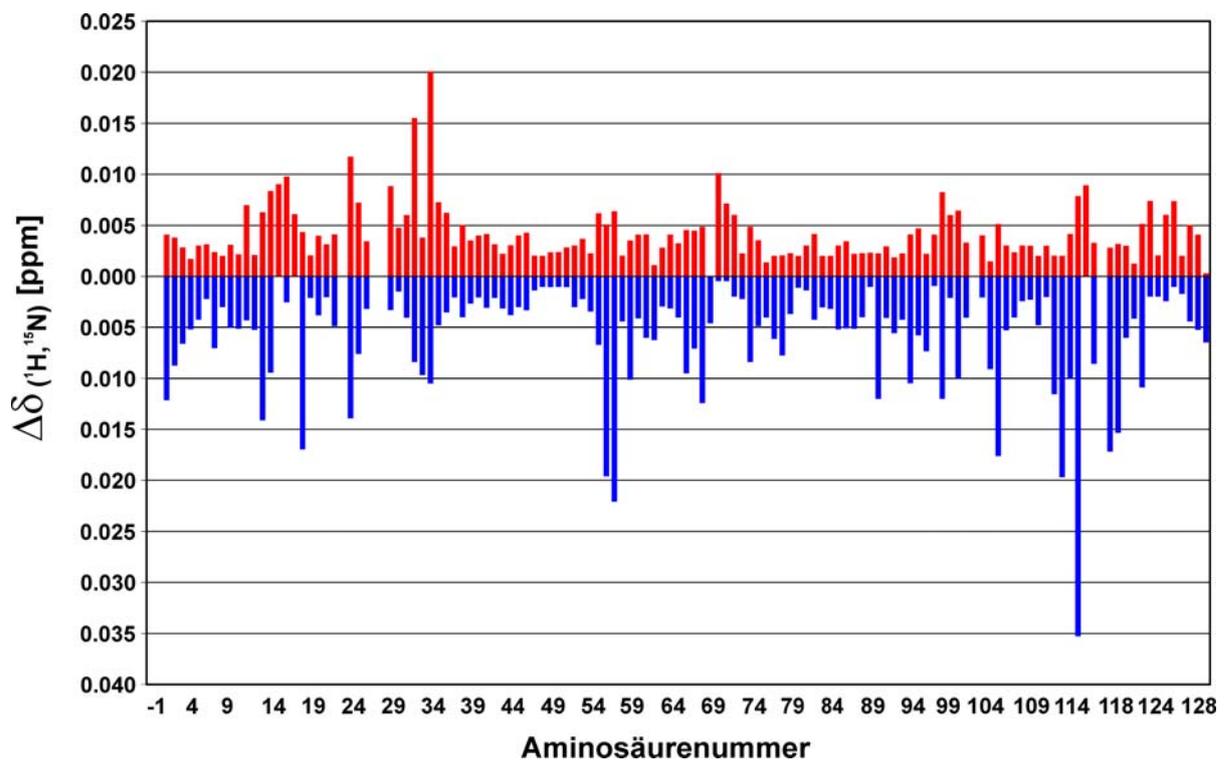


Abb. 21: Balkendiagramm der Amidresonanzänderungen im Proteinerückgrat des Cytochrom c_{552} aufgrund der transienten Komplexbildung mit der Cu_A -Domäne. Die Gesamtverschiebungsänderungen ($\Delta\delta$) der Amidgruppenresonanzen sind für den reduzierten Zustand nach oben (in Rot) und für den oxidierten Zustand nach unten (in Blau) dargestellt.

Um die Oberflächenregionen, welche bei der Protein-Protein-Wechselwirkung mit der Cu_A -Domäne beeinflusst werden, genauer charakterisieren zu können, wurden die Gesamtverschiebungsänderungen anhand der dreidimensionalen Struktur des Cytochrom c_{552} dargestellt (Abb. 22). Es ist erkennbar, daß die meisten der stark verschobenen Reste auf der „Vorderseite“ des Cytochrom c_{552} um die Hämspalte herum angeordnet sind. Dennoch treten auch auf der Rückseite Verschiebungseffekte auf, insbesondere im reduzierten Zustand, in dem gerade die hinter dem Hämring gelegenen Reste Ala34 und His32 am stärksten beeinflusst sind. Dieses Ergebnis ist analog zum Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* (Wienk et al., 2003), bei dem ebenfalls die größten Verschiebungsänderungen im reduzierten Zustand für die Reste G54, G55 und D56 hinter dem Hämring beobachtet wurden.

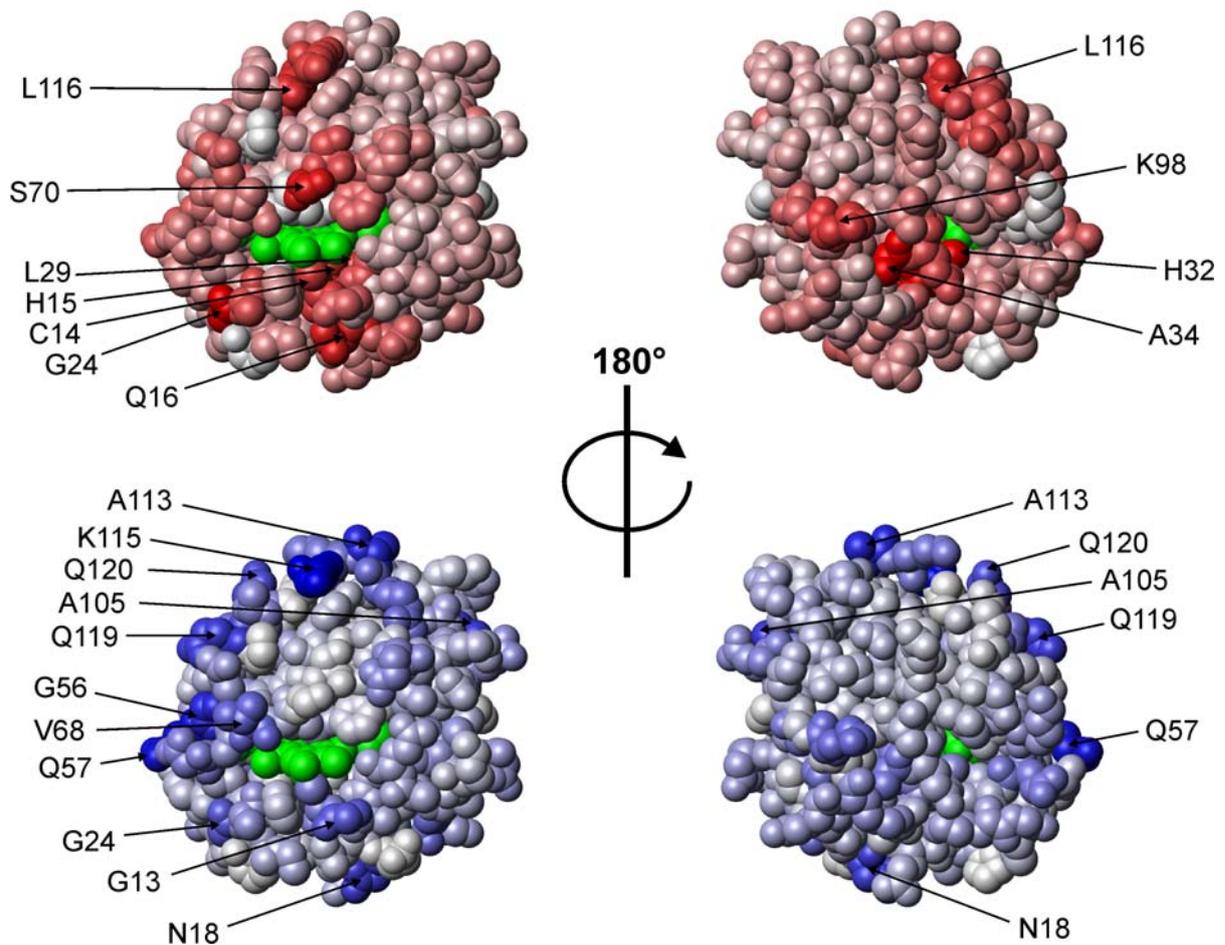


Abb. 22: Vorder- und Rückseite (rechts) des Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus*. Die Gesamtverschiebungsänderungen aufgrund der Komplexbildung mit der Cu_A -Domäne sind nach Farbintensität abgestuft dargestellt (oben: reduzierter Zustand in Rot; unten: oxidiertes Zustand in Blau). Zur besseren Übersicht sind nicht nur die Amidgruppen sondern die gesamten Aminosäurereste eingefärbt. Die am stärksten betroffenen Reste sind jeweils beschriftet; das Häm ist grün koloriert.

Das Häm ist Cofaktor der Cytochrome und wichtiger Katalysator des Elektronentransfers; es besteht aus einer planaren Porphyrinstruktur mit einem Eisenatom in der Mitte. Es ist bekannt, daß das „low-spin“ Häm im oxidierten Zustand ein ungepaartes Elektron besitzt, welches im reduzierten Zustand gepaart vorliegt. Tatsächlich beträgt aber die Ladungsänderung am Eisenatom in einem formalen Redoxvorgang nur 0,1-0,2 Elektronen, also 10-20% gegenüber der eigentlichen Differenz von einem ganzen Elektron (Johansson et al., 2002a). Der restliche

Teil der Ladung verteilt sich über das gesamte Porphyrinsystem. Diese extensive Verteilung der Ladung ist notwendig, damit sich das Häm an die Dielektrizitätseigenschaften des Proteins anpaßt. Eine ganzzahlige Veränderung der Ladung des Eisenatoms würde die elektrostatischen Verhältnisse im Proteininneren zu extrem verschieben. Durch quantenmechanische Berechnungen für ein Häm *a* Modell (Johansson et al., 2002a und b) konnte auch gezeigt werden, daß aufgrund der Elektronenpaarung bei der Reduktion des Eisenatoms die effektive Delokalisierung der Elektronen bis außerhalb des Porphirinrings und seiner Liganden erfolgt. Dies ist zu erklären durch die gegenseitige Abstoßung der 3d- Elektronen (Coulombenergie), wodurch das zusätzliche Elektron bis an die Peripherie des Hämsystems delokalisiert wird.

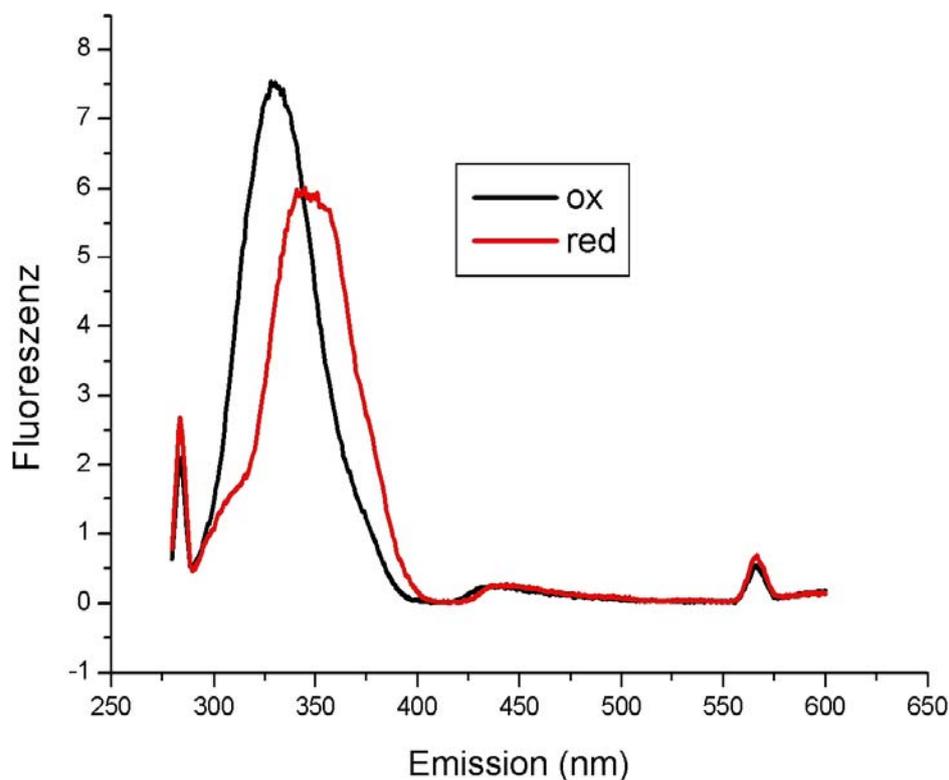


Abb. 23: Fluoreszenzspektren des reduzierten und oxidierten Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* (Reincke, 2000). Das Maximum der Fluoreszenzemission ist im oxidierten Zustand um 20 nm zu niedrigeren Wellenlängen hin verschoben. Diese Bande wird durch den einzigen Tryptophanrest (Trp57) hervorgerufen, wohingegen im Falle des Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus* an Stelle dieses Tryptophans ein Histidinrest (His32) zu finden ist.

Einen experimentellen Hinweis auf eine solche Delokalisierung der Elektronenladung über die Grenzen des Porphyrinrings hinaus lieferten bereits die Fluoreszenzspektren des Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* (Abb. 23). Hierbei wurde festgestellt, daß sich die elektronischen Eigenschaften des Trp57 durch den Redoxprozess signifikant verändern (20 nm Verschiebung des Emissionsmaximums), obwohl die Strukturen des reduzierten und oxidierten Cytochrom c_{552} in diesem Bereich identisch sind (Harrenga et al., 2000). Auch die deutliche Intensitätsabnahme des Emissionssignals im reduzierten Zustand könnte auf eine verstärkte elektronische Wechselwirkung zwischen Trp57 und dem Hämring hindeuten, wodurch die Tryptophanfluoreszenz teilweise gelöscht wird. Tatsächlich liegt dieser Tryptophanrest in der Hämspalte direkt hinter dem Porphyrinring und ist mit diesem durch eine Wasserstoffbrücke zum Propionat A verbunden (Abb. 24A). Anscheinend reicht also der elektronische Einfluß einer Ladungsänderung im Hämring über das Propionat A und die Wasserstoffbrücke bis zum Trp57 Indolring.

Desweiteren traten die stärksten Verschiebungseffekte bei der Untersuchung des reduzierten Cytochrom c_{552}/Cu_A Komplexes aus *P. denitrificans* an den zum Trp57 direkt benachbarten Resten G54, G55 und D56 auf. Im oxidierten Komplex wurden in dieser Region keine nennenswerten Veränderungen der Amidresonanzen beobachtet (Wienk et al., 2003). Der gleiche Effekt wurde nun aber auch beim Cytochrom c_{552}/Cu_A System aus *T. thermophilus* beobachtet: die hinter dem Hämring gelegenen Reste H32 und A34 wiesen die stärksten Verschiebungseffekte in Gegenwart des Redoxpartners auf, aber wiederum nur im reduzierten Zustand. In der oxidierten Form hingegen zeigten diese beiden Reste keine nennenswerten Änderungen bei der Komplexbildung. Hierbei ist der His32 Imidazolring, analog dem Trp57 in *P. denitrificans*, über eine Wasserstoffbrücke direkt an das Propionat A gebunden (Abb. 24B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der transiente Kontakt der beiden Redoxpartner am Eingang der Hämspalte entweder zu mechanisch oder elektronisch induzierten Veränderungen auf der Rückseite des Häms führen. Da dieser Effekt jedoch nur im reduzierten Zustand auftritt, obwohl die Verschiebungseffekte im oxidierten Zustand ansonsten generell größer ausfallen, ist davon auszugehen, daß er elektronischer Natur ist. Anscheinend führt, wenn die beiden Redoxpartner im reduzierten Zustand aufeinander treffen, der Elektronenüberschuß auf beiden Seiten des Cytochrom c_{552}/Cu_A Systems zu einer Reorganisation der Elektronenverteilung im Porphyrinsystem bis über die Propionate hinaus.

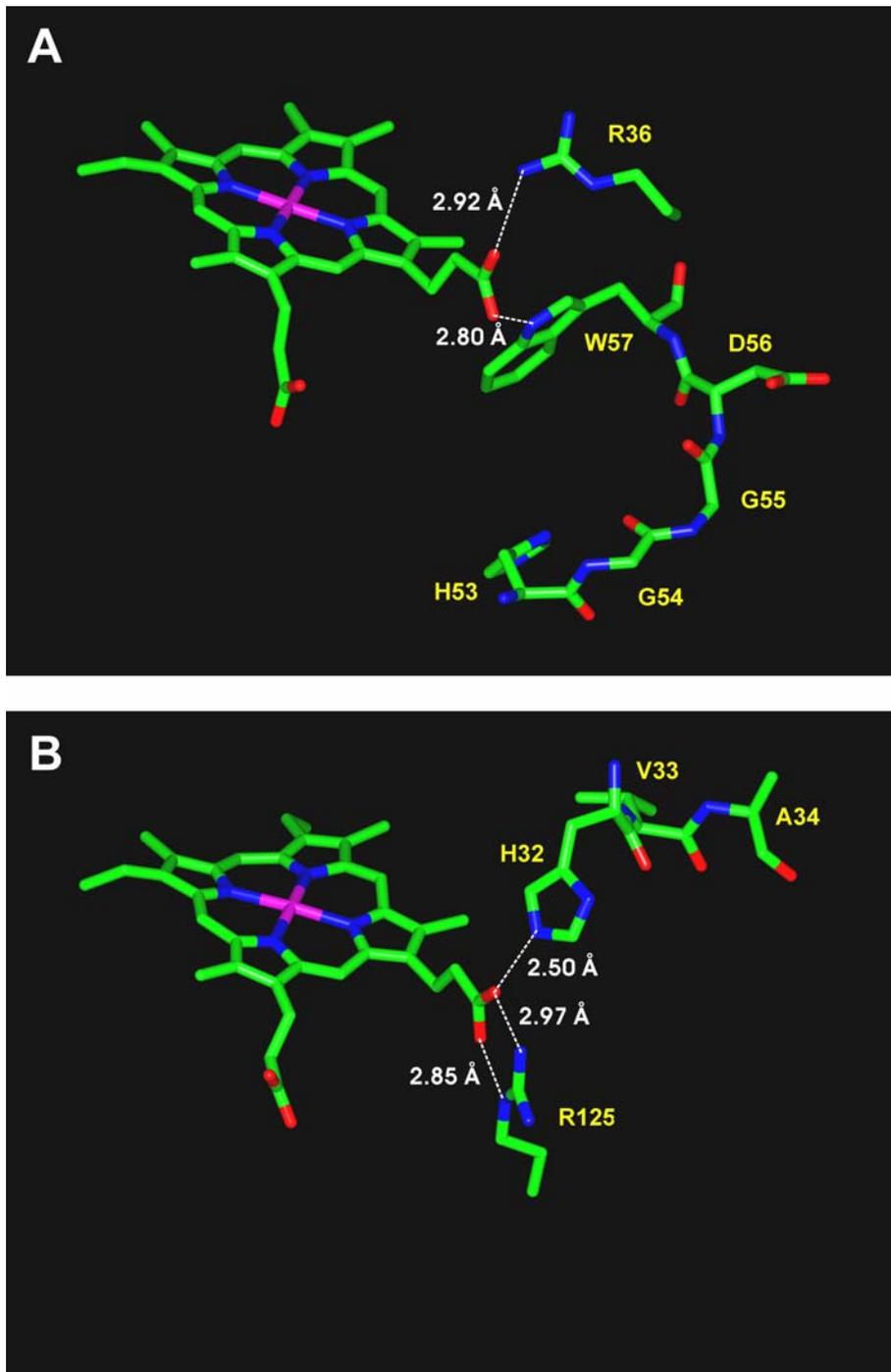


Abb. 24: Räumliche Anordnung am Propionat A in Cytochrom c_{552} aus *P. denitrificans* (A) und *T. thermophilus* (B). In beiden Proteinen bildet die Carboxylatgruppe des Propionat A Wasserstoffbrücken zu einer Argininseitenkette und einem aromatischen Ring. Die Reste mit den stärksten Sekundäreffekten bei der Komplexbildung im reduzierten Zustand (G54, G55 und D56 in *P. denitrificans* bzw. H32 und A34 in *T. thermophilus*) liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den aromatischen Seitenketten.

3.3 Cu_A-Domäne

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurde von der Untereinheit II der *ba*₃-Oxidase der Transmembrananker entfernt. Dies bedeutet, daß die ursprüngliche Proteinsequenz um 32 Aminosäuren verkürzt wurde. Da hierzu der Einbau einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym in die Sequenz notwendig war, wurde anstelle von Ile33 in der löslichen Cu_A-Domäne ein Methionin (Met33) am N-Terminus eingefügt. Die Aminosäurenumerierung, die in dieser Arbeit verwendet wird, entspricht der vollständigen Untereinheit II.

3.3.1 Zuordnung der ¹H- und ¹⁵N-Resonanzen

3.3.1.1 Reduzierte Cu_A-Domäne

Die Resonanzzuordnung der reduzierten Cu_A-Domäne wurde bereits früher mit Hilfe von Tripelresonanzexperimenten bestimmt (Mukrasch et al., 2004) und in der BioMagResBank (BMRB-5819) deponiert. Ein [¹⁵N, ¹H]-TROSY Spektrum mit den Amidresonanzen ist in Abb. 25 gezeigt. Die aromatischen Protonenresonanzen wurden jetzt für den reduzierten Zustand nachträglich mittels 2D [¹H, ¹H]-TOCSY und [¹H, ¹H]-NOESY Spektren bestimmt (Tabelle 9). Interessanterweise konnten lediglich die Resonanzen der Phe88 Ringprotonen nicht detektiert werden. Der Phe88 Ring liegt an der Moleküloberfläche in unmittelbarer Nachbarschaft zum Cu_A-Zentrum und wurde zuvor (Soulimane et al., 2000) als wahrscheinlicher Faktor beim Elektronentransfer vom Cytochrom *c*₅₅₂ zur Cu_A-Domäne postuliert.

Tabelle 9: ^1H -Resonanzen der aromatischen Ringprotonen der reduzierten Cu_A -Domäne bei pH 6,0 und 25 °C. Die neu zugeordneten Verschiebungswerte sind fett gedruckt; nicht eindeutig zugeordnete Resonanzen sind kursiv dargestellt (n.b. = nicht bestimmt).

AS	Ringprotonen
Y35	7.11δ, 6.81ϵ
H40	7.13 δ 2, 8.13 ϵ 1
W64	6.80 δ 1, 9.60 ϵ 1, 7.93ϵ3 , 7.01 ζ 2, 7.05ζ3 , 7.15η2
Y79	6.66δ, 6.46ϵ
Y82	6.23δ, 6.22ϵ
F86	6.62δ, 6.95ϵ, 7.13ζ
F88	n.b.
Y90	6.64δ, 6.26ϵ
F105	7.19δ, 7.19ϵ, 7.23ζ
H114	6.66 δ 2, 6.97 ϵ 1, 11.78 ϵ 2
F116	6.82δ, 6.35ϵ, 5.98ζ
H117	6.83 δ 2, 8.28 ϵ 1
Y137	6.00δ, 6.48ϵ
F139	7.18δ, 7.18ϵ, 7.20ζ
Y145	7.14δ, 6.67ϵ
Y152	6.86δ, 6.81ϵ
H157	7.31 δ 2, 7.38 ϵ 1
F161	7.15δ, 7.34ϵ, 7.33ζ

Tabelle 10: Resonanzzuordnung der oxidierten Cu_A-Domäne aus *T. thermophilus* bei pH 6,0 und 25 °C. Nicht eindeutig zugeordnete Resonanzen sind kursiv geschrieben; Fett gedruckte Resonanzen sind stereospezifisch zugeordnet, (n.b. = nicht bestimmt). Die Sekundärspinsysteme sind mit Apostroph gekennzeichnet.

AS	N	HN	H α	andere H	andere N
M33	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
A34	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
Y35	n.b.	n.b.	4.67	3.02 β , 2.98 β , 7.11 δ , 6.80 ϵ	
T36	n.b.	8.14	4.30	4.10 β , 1.15 γ_{CH_3}	
L37	n.b.	8.19	4.31	1.60 β , 1.61 γ , 0.94 δ , 0.89 δ	
A38	n.b.	8.34	4.36	1.38 β	
T39	n.b.	8.04	4.29	4.19 β , 1.17 γ_{CH_3}	
H40	n.b.	8.41	4.76	3.23 β , 3.16 β	
T41	n.b.	8.18	4.30	4.18 β , 1.17 γ_{CH_3}	
A42	126.7	8.41	4.38	1.41 β	
G43	108.8	8.37	3.93		
V44	119.9	8.22	4.12	2.03 β , 0.91 γ , 0.89 γ	
I45	127.3	8.37	4.48	1.87 β , 0.95 γ_{CH_3} , 1.52 γ_{CH_2} , 1.20 γ_{CH_2} , 0.85 δ	
P46	---	---	4.40	2.30 β , 1.94 β , 2.06 γ , 1.98 γ , 3.95 δ , 3.68 δ	
A47	124.6	8.39	4.32	1.41 β	
G48	108.1	8.40	3.98		
K49	120.8	8.19	4.38	1.87 β , 1.77 β , 1.45 γ , 1.41 γ , 1.69 δ , 3.01 ϵ	
L50	123.6	8.23	4.43	1.68 β , 1.64 β , 1.65 γ , 0.97 δ , 0.93 δ	
E51	124.2	8.69	4.43	2.13 β , 2.00 β , 2.34 γ , 2.20 γ	
R52	123.0	8.23	4.96	1.88 β , 1.72 β , 1.68 γ , 1.60 γ , 3.23 δ , 7.34 ϵ	85.0
V53	117.6	8.09	4.38	1.81 β , 0.59γ1 , 0.40γ2	
D54	123.2	8.32	4.97	3.14 β , 2.49 β	
P55	---	---	4.30	2.24 β , 2.06 γ , 1.94 γ , 4.16 δ , 3.99 δ	
T56	108.5	8.43	4.26	4.27 β , 1.30 γ_{CH_3}	
T57	108.3	7.43	4.74	4.55 β , 1.07 γ_{CH_3}	
V58	121.8	7.12	4.21	2.05 β , 0.77γ1 , 0.68γ2	
R59	115.4	8.24	4.26	1.87 β , 1.53 β , 1.39 γ , 2.93 δ , 7.02 ϵ	84.5
Q60	116.4	7.78	4.43	2.08 β , 2.39 γ , 2.26 γ	
E61	118.2	8.09	4.57	2.02 β , 1.92 β , 2.21 γ , 2.15 γ	
G62	113.1	8.95	4.71, 3.81		
P63	---	---	3.68	0.64 β , -0.29 β , 1.28 γ , 1.01 γ , 3.63 δ , 3.45 δ	
W64	117.3	8.76	4.32	3.25 β , 2.94 β , 6.79 δ 1, 9.59 ϵ 1, 7.91 ϵ 3, 7.00 ζ 2, 7.04 ζ 3, 7.13 η 2	128.5
A65	120.1	7.23	3.93	1.06 β	
D66	114.6	7.73	5.22	2.80 β , 2.41 β	
P67	---	---	4.30	2.23 β , 2.13 β , 2.02 γ , 4.11 δ , 3.82 δ	
A68	119.6	8.18	4.32	1.51 β	
Q69	117.0	7.75	4.71	2.47 β , 1.68 β , 2.24 γ , 2.13 γ , 7.84 ϵ , 6.76 ϵ	112.7
A70	121.5	7.02	4.38	1.79 β	
V71	114.0	7.88	4.71	2.19 β , 0.90γ1 , 1.04γ2	
V72	129.1	9.56	4.43	2.07 β , 0.92γ1 , 1.04γ2	
Q73	128.8	9.17	4.15	1.85 β , 1.81 β , 2.18 γ , 1.99 γ , 6.90 ϵ , 6.61 ϵ	108.6
T74	119.3	8.29	4.39	4.44 β , 1.12 γ_{CH_3}	
G75	111.2	8.02	4.26, 3.81		
P76	---	---	4.17	1.88 β , 2.12 γ , 1.97 γ , 3.55 δ	

N77	117.1	8.67	4.88	2.97 β , 2.45 β , 7.65 δ , 6.85 δ	111.5
Q78	118.7	6.98	5.61	1.74 β , 1.46 β , 2.24 γ , 7.88 ϵ , 6.80 ϵ	113.5
Y79	124.7	8.92	5.10	2.52 β , 6.65 δ , 6.45 ϵ	
T80	121.2	9.62	5.11	3.76 β , 0.56 γ_{CH_3}	
V81	125.6	8.75	5.10	1.63 β , 0.80γ1, 0.56γ2	
Y82	129.6	9.12	4.66	2.41 β , 1.31 β , 6.21 δ , 6.21 ϵ	
V83	124.1	8.74	5.33	1.93 β , 1.09 γ	
V83'	124.1	8.70	5.33	1.93 β , 1.09 γ	
L84	128.3	9.64	5.22	1.91 β , 1.70 β , 1.67 γ , 0.56 δ	
A85	130.5	8.69	4.54	1.06 β	
F86	116.9	7.68	5.22	2.98 β , 2.15 β , 6.57 δ , 7.00 ϵ , 7.21 ζ	
A87	125.5	10.49	3.65	0.13 β	
F88	128.4	7.94	5.39	3.02 β , 2.75 β	
G89	113.0	8.07	3.44		
Y90	113.1	8.19	5.33	2.75 β , 2.52 β , 6.66 δ , 6.29 ϵ	
Q91	121.2	9.23	4.83	2.24 β , 2.48 γ	
Q91'	121.3	9.12	4.83	2.24 β , 2.48 γ	
P92	---	---	4.76	2.47 β , 2.12 β , 1.99 γ , 1.83 γ , 4.07 δ , 3.49 δ	
N93	113.2	8.27	5.12	3.23 β , 3.10 β	
P94	---	---	5.26	2.23 β , 1.79 β , 1.97 γ , 1.82 γ , 3.70 δ , 3.53 δ	
I95	119.9	8.36	4.10	1.79 β , 0.90 γ_{CH_3}	
E96	128.7	8.44	5.50	1.90 β , 1.74 β , 2.07 γ , 1.93 γ	
V97	115.2	8.48	4.66	1.82 β , 0.61γ1, 0.45γ2	
P98	---	---	4.68	2.20 β , 1.76 β , 1.59 γ , 1.49 γ , 3.11 δ , 2.72 δ	
Q99	121.4	8.50	3.91	1.87 β , 2.38 γ , 2.07 γ , 7.76 ϵ , 6.70 ϵ	109.6
G100	112.2	8.74	4.15, 3.37		
A101	122.3	7.01	4.54	1.34 β	
E102	123.0	8.27	4.32	1.86 β , 2.07 γ , 1.99 γ	
I103	130.4	9.13	4.83	2.28 β , -0.05 γ_{CH_3} , 2.38 γ_{CH_2} , 1.24 γ_{CH_2} , 0.68 δ	
V104	127.3	9.01	4.38	2.19 β , 0.66 γ , 0.63 γ	
F105	124.8	9.54	4.99	2.99 β , 2.40 β , 7.16 δ , 7.16 ϵ , 7.25 ζ	
K106	122.9	8.98	5.11	1.60 β , 1.51 β , 1.10 γ , 1.05 γ , 1.46 δ , 2.88 ϵ , 2.73 ϵ	
I107	125.2	9.41	5.78	1.40 β , 0.76 γ_{CH_3} , 1.23 γ_{CH_2} , -0.06 γ_{CH_2} , -0.23 δ	
I107'	125.2	9.41	5.78	1.40 β , 0.66 γ_{CH_3} , 1.23 γ_{CH_2} , -0.06 γ_{CH_2} , -0.23 δ	
T108	118.9	8.22	4.59	3.50 β , 5.53 γ_{OH} , -0.46 γ_{CH_3}	
T108'	118.8	8.10	4.58	3.45 β , 5.61 γ_{OH} , -0.50 γ_{CH_3}	
T108''	118.8	8.16	4.59	3.50 β , 5.53 γ_{OH} , -0.46 γ_{CH_3}	
S109	115.1	7.14	6.23	3.85 β , 3.08 β	
S109'	114.8	7.28	6.32	3.95 β , 3.14 β	
P110	---	---	n.b.	n.b.	
D111	120.5	8.75	4.77	2.88 β , 2.63 β	
D111'	120.5	8.68	4.77	2.88 β , 2.63 β	
V112	122.0	11.81	4.66	2.42 β , 0.86γ1, 0.48γ2	
I113	120.5	7.67	4.49	1.57 β , 1.09 γ_{CH_3}	
H114	120.8	8.64	5.16	2.36 β , 31.99 δ 2, 24.47 ϵ 2	
G115	n.b.	n.b.	n.b.		
F116	124.3	9.21	4.43	3.09 β , 2.44 β , 6.67 δ , 6.29 ϵ , 5.93 ζ	
H117	126.2	8.07	5.46	3.23 β , 3.08 β , 6.74 δ 2	
H117'	126.4	8.04	5.50	3.23 β , 3.08 β , 6.74 δ 2	
V118	123.6	6.33	4.27	1.77 β , 0.72γ1, 0.16γ2	
V118'	124.0	6.10	4.23	1.77 β , 0.72γ1, 0.16γ2	

E119	131.1	8.90	3.87	2.16 β , 1.98 β , 2.26 γ	
G120	111.0	9.02	4.39, 3.84		
T121	109.4	7.85	4.99	3.65 β , 0.76 γ_{CH_3}	
N122	115.7	7.84	4.96	3.18 β , 2.88 β , 7.63 δ , 6.86 δ	110.4
I123	121.2	8.53	3.81	1.49 β , 0.83 γ_{CH_3} , 1.01 γ_{CH_2} , 0.61 γ_{CH_2} , 0.19 δ	
N124	131.4	9.13	5.09	2.93 β , 2.54 β	
N124'	131.5	9.31	5.27	2.93 β , 2.54 β	
V125	120.5	8.30	4.76	2.24 β , 1.00 γ , 0.97 γ	
V125'	120.5	8.36	4.71	2.24 β , 1.00 γ , 0.97 γ	
E126	126.8	8.79	4.70	2.08 β , 2.35 γ	
V127	124.9	9.02	4.07	1.81 β , 0.78 γ 1, 0.68 γ 2	
V127'	125.0	9.13	4.07	1.81 β , 0.78 γ 1, 0.68 γ 2	
L128	128.1	9.19	4.86	1.50 β , 1.62 γ , 0.93 δ	
P129	---	---	4.70	1.76 β	
G130	112.4	9.15	4.24, 4.02		
E131	117.8	7.84	5.05	1.80 β , 1.73 β , 2.07 γ , 1.95 γ	
E131'	117.8	7.80	5.05	1.80 β , 1.73 β , 2.07 γ , 1.95 γ	
E131''	117.8	7.73	5.05	1.80 β , 1.73 β , 2.07 γ , 1.95 γ	
V132	126.5	8.85	4.52	2.10 β , 1.06 γ , 0.88 γ	
S133	127.3	9.71	4.94	3.90 β , 3.74 β	
T134	121.8	8.89	5.72	3.98 β , 1.12 γ_{CH_3}	
V135	126.1	8.85	4.54	2.11 β , 1.01 γ	
R136	125.6	8.62	5.95	1.74 β , 1.68 β , 1.59 γ , 1.49 γ , 3.13 δ , 7.20 ϵ	84.7
Y137	125.7	9.63	4.38	2.86 β , 2.30 β , 5.99 δ , 6.47 ϵ	
T138	120.7	6.76	4.71	3.53 β , 0.78 γ_{CH_3}	
F139	125.9	8.95	4.43	3.14 β , 2.80 β , 7.15 δ , 7.15 ϵ , 7.20 ζ	
K140	122.8	8.62	4.43	1.99 β , 1.74 β , 1.43 γ , 1.32 γ , 1.64 δ , 2.93 ϵ	
R141	117.9	7.84	5.05	1.96 β , 1.79 β , 1.73 γ , 3.30 δ , 3.26 δ , 7.24 ϵ	84.3
R141'	117.9	7.81	5.05	1.96 β , 1.79 β , 1.73 γ , 3.30 δ , 3.26 δ , 7.24 ϵ	84.3
P142	---	---	4.39	2.06 β , 1.85 γ , 3.94 δ , 3.68 δ	
G143	108.1	8.68	4.38, 3.76		
G143'	108.1	8.73	4.38, 3.76		
E144	118.8	8.13	5.22	1.85 β , 2.24 γ , 2.02 γ	
Y145	125.2	9.69	4.71	2.64 β , 2.60 β , 7.11 δ , 6.64 ϵ	
R146	123.4	8.95	4.66	1.64 β , 1.79 γ , 1.47 γ , 2.97 δ , 2.91 δ , 7.00 ϵ	83.7
I147	123.7	8.30	4.33	0.58 β , -0.58 γ_{CH_3} , 1.14 γ_{CH_2} , -0.03 γ_{CH_2} , 0.32 δ	
I148	119.8	8.78	5.09	1.00 β	
C149	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
N150	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
Q151	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
Y152	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
C153	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
G154	104.4	7.14	5.20, 4.38		
L155	109.4	7.85	4.95	3.59 β , 1.48 γ , 0.79 δ , 0.75 δ	
G156	105.3	5.70	3.72, 0.91		
H157	117.6	8.51	4.55	3.96 β , 1.65 β	
Q158	122.3	8.51	4.17	1.72 β , 2.17 γ , 1.96 γ	
Q158'	122.3	8.42	4.17	1.72 β , 2.17 γ , 1.96 γ	
N159	117.7	8.44	4.66	2.80 β	
M160	120.7	7.49	4.38	2.15 β , 1.74 β , 2.48 γ , 1.38 γ , 1.42 ϵ	
F161	121.3	8.19	5.72	3.31 β , 3.14 β , 7.34 δ , 7.44 ϵ , 7.41 ζ	
F161'	118.5	8.21	6.04	3.40 β , 3.22 β , 7.34 δ , 7.44 ϵ , 7.41 ζ	

G162	110.2	9.19	4.72, 3.66	
G162'	110.5	9.22	4.72, 3.66	
G162''	109.5	9.20	4.72, 3.66	
T163	115.3	8.05	5.11	3.81 β , 1.18 γ_{CH_3}
I164	126.7	9.19	4.88	1.57 β , 0.38 γ_{CH_3}
I164'	126.6	9.25	4.88	1.57 β , 0.38 γ_{CH_3}
V165	129.4	9.62	4.42	1.91 β , 0.90 γ , 0.82 γ
V166	128.2	9.07	4.71	2.24 β , 0.17γ_1, 0.73γ_2
K167	129.4	8.88	4.38	1.85 β , 1.62 β , 1.34 γ , 1.55 δ , 2.83 ϵ , 2.79 ϵ
E168	126.9	8.39	4.03	1.91 β , 2.24 γ

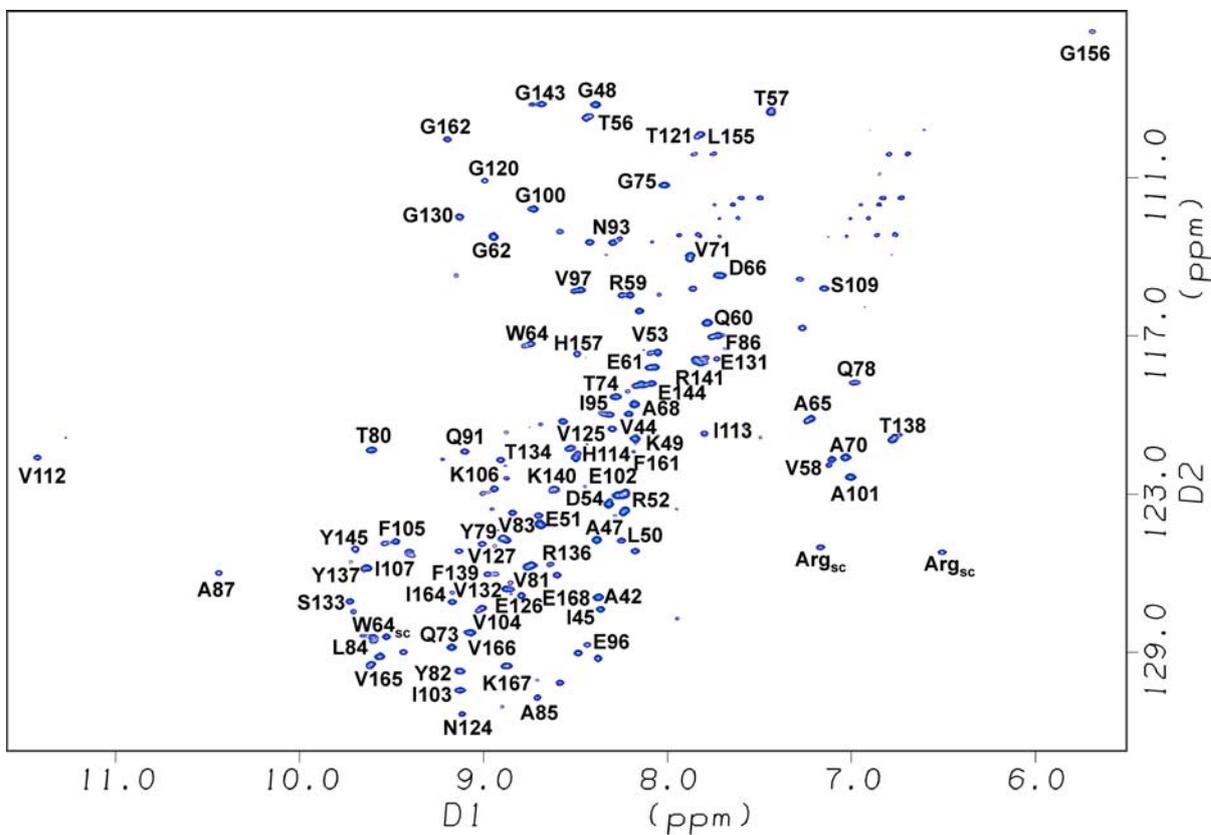


Abb. 26: [^{15}N , ^1H]-TROSY Spektrum der Cu_A -Domäne im oxidierten Zustand bei pH 6,0 und 25 °C.

3.3.2 Histidintitrationen

Die Cu_A-Domäne hat 4 Histidinreste (His40, His114, His117 und His157). Hiervon zeigten zwei (His40 und His117) in der reduzierten Form ein deutliches Titrationsverhalten im pH-Bereich 5,5-8,0 (Tabelle 11). Die Imidazolresonanzen der beiden Zentralliganden des Cu_A-Zentrums, His114 und His157, konnten hingegen in den homonuklearen 2D NMR-Spektren aufgrund von Überlagerungen mit anderen aromatischen Resonanzen nicht identifiziert werden. Im oxidierten, paramagnetischen Zustand wiederum waren die Ringprotonenresonanzen dieser beiden Zentralliganden des Cu_A-Zentrums nicht detektierbar. Auch die aromatischen ¹H-Resonanzen der beiden anderen Histidine konnten in der oxidierten Cu_A-Domäne nicht eindeutig identifiziert werden. Daher wurden die Histidinresonanzen im oxidierten Zustand nicht weiter pH-abhängig verfolgt.

Tabelle 11: Histidinresonanzen der Cu_A-Domäne im reduzierten Zustand in Abhängigkeit des pH-Werts (n.b. = nicht bestimmt).

<i>pH</i>	H40 (Hδ2)	H40 (Hε1)	H114 (Hδ2)	H114 (Hε1)	H117 (Hδ2)	H117 (Hε1)	H157 (Hδ2)	H157 (Hε1)
5.72	7.230	8.408	n.b.	n.b.	6.936	8.531	n.b.	n.b.
6.26	7.144	8.183	n.b.	n.b.	6.844	8.313	n.b.	n.b.
6.65	7.074	7.995	n.b.	n.b.	6.764	8.107	n.b.	n.b.
7.22	7.004	7.810	n.b.	n.b.	6.680	7.893	n.b.	n.b.
7.75	6.973	7.729	n.b.	n.b.	6.642	7.797	n.b.	n.b.

Das beobachtete Titrationsverhalten hat gezeigt, daß auch im Falle der Cu_A-Domäne sichergestellt sein sollte, daß die Spektren der Komplexmessungen bei identischen pH-Werten durchgeführt werden, um Verschiebungseffekte aufgrund von veränderten Ringstromeffekten der Imidazolringe ausschließen zu können.

3.3.3 Analyse der Kontaktfläche

Zur Untersuchung der Kontaktfläche der *ba*₃-Oxidase im Komplex mit seinem Redoxpartner wurde die ¹⁵N-angereicherte Cu_A-Domäne mit einem vierfachen Überschuß an Cytochrom *c*₅₅₂ versetzt. Analog zu der Studie am Cytochrom *c*₅₅₂ (siehe Kapitel 3.2.4), wurden die Gesamtverschiebungsänderungen $\Delta\delta$ nun für die Aminosäurereste der Cu_A-Domäne ermittelt (Abb. 27). Auch in diesem Fall waren die Effekte im oxidierten Zustand größer.

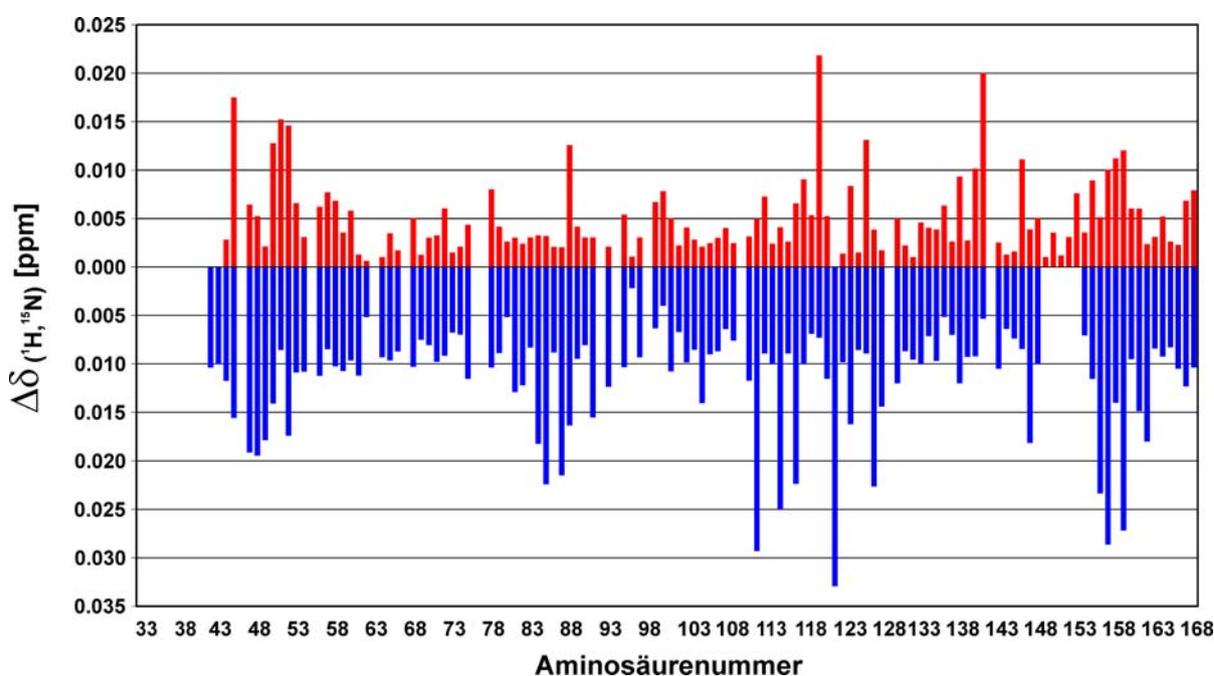


Abb. 27: Balkendiagramm der Gesamtverschiebungsänderungen ($\Delta\delta$) aller Aminosäurereste in der Cu_A-Domäne aufgrund von Komplexbildung mit Cytochrom *c*₅₅₂. Die Verschiebungswerte ergeben sich aus einer Kombination der ¹H- und ¹⁵N-Resonanzverschiebungen der Amidgruppen im Proteinerückgrat. Die Ergebnisse für den reduzierten (in Rot) und den oxidierten Zustand (in Blau) sind hier gegeneinander aufgetragen.

Die Verteilung der betroffenen Reste in der dreidimensionalen Struktur (Abb. 28) zeigt, daß viele Aminosäuren auf der „Unterseite“ des Moleküls, die in der vollständigen Oxidase entweder mit der Untereinheit I oder der Lipidmembran in direkten Kontakt stehen, starke

Verschiebungen aufwiesen. Es ist daher anzunehmen, daß diese Region in der löslichen Cu_A-Domäne eine zusätzliche Interaktionsfläche darstellt, welche im biologischen System ausgeschlossen werden kann. Desweiteren traten jedoch auch in einer Region nahe dem Cu_A-Zentrum deutliche Verschiebungseffekte auf; hier waren insbesondere die Reste A87, F88, G156, H157, Q158 und N159 betroffen.

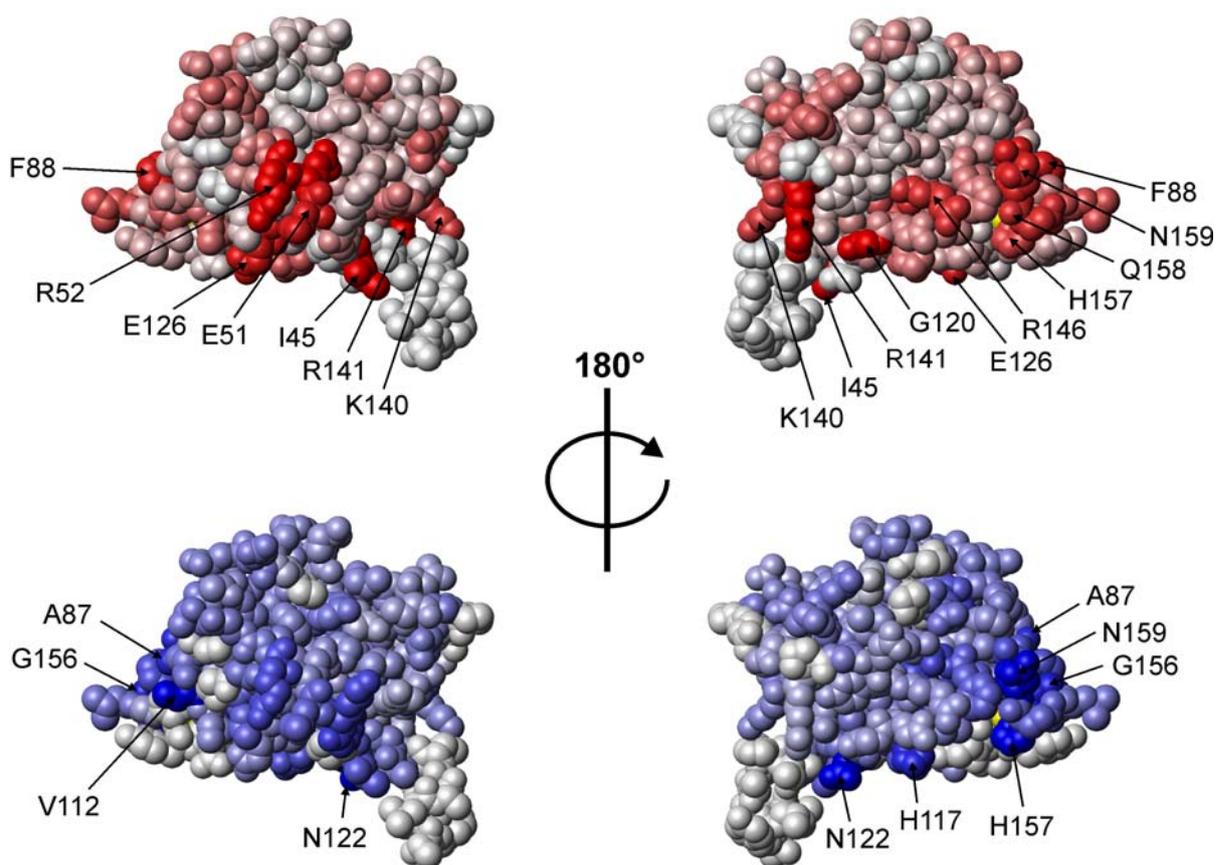


Abb. 28: Struktur der Cu_A-Domäne aus *T. thermophilus*. Die Gesamtverschiebungsänderungen aufgrund der Komplexbildung mit Cytochrom *c*₅₅₂ wurden nach Farbintensität abgestuft dargestellt (oben: reduzierter Zustand in Rot; unten: oxidiertes Zustand in Blau). Zur besseren Übersicht wurden nicht nur die Amidgruppen sondern die gesamten Aminosäurereste eingefärbt. Die am stärksten betroffenen Aminosäuren sind beschriftet. Die zusätzlich betroffenen Aminosäurereste A85, G115 und V127 liegen im Proteininneren und sind daher nicht markiert. Die beiden Kupferatome des Cu_A-Zentrums (gelb) liegen ebenfalls im Proteininneren. Die Untereinheit I grenzt von unten an die Cu_A-Domäne; der nicht eingefärbte, nach unten verlaufende Fortsatz stellt den Rest des abgeschnittenen Transmembranankers dar.

3.3.4 Kontakte zwischen der Cu_A-Domäne und Cytochrom *c*₅₅₂

Die Bestimmung der räumlichen Anordnung von Cytochrom *c*₅₅₂ und der *ba*₃-Oxidase im Elektronentransferkomplex basiert auf den chemischen Verschiebungseffekten der Oberflächenreste. Diejenigen Reste mit den stärksten Gesamtverschiebungswerten ($\Delta\delta$) sowohl im Cytochrom *c*₅₅₂ als auch in der Cu_A-Domäne wurden als „Interaktionsbeschränkungen“ (AIRs = ambiguous interaction restraints) in die „Docking“-Rechnung eingesetzt. Als „aktive Reste“ wurden ausschließlich Aminosäurereste mit einer relativen Lösungsmittelzugänglichkeit von 20% oder mehr eingesetzt. Zusätzlich wurden sogenannte „passive Reste“ in der Rechnung verwendet, welche direkte Nachbarn der aktiven Reste sein müssen und ebenfalls mindestens 20% relative Lösungsmittelzugänglichkeit aufweisen. Desweiteren wurden Oberflächenreste, die zu weit von der anzunehmenden Kontaktzone entfernt angeordnet sind, von der Rechnung ausgeschlossen. Auf diese Weise wurden die im Folgenden beschriebenen Selektionen vorgenommen.

Beim Cytochrom *c*₅₅₂ im reduzierten Zustand wiesen die Reste Ala34, His32, Gly24, Ser70, Gln16, His15, Leu116, Leu29, Cys14 und Lys98 die größten Gesamtverschiebungsänderungen $\Delta\delta$ (bis 0,008 ppm) auf. Von diesen Resten wurden Ala34, His32, His15, Leu116, Leu29 und Cys14 wegen einer zu geringer Oberflächenzugänglichkeit (< 20%) eliminiert sowie auch Lys98 wegen seiner Lage auf der Rückseite des Moleküls. Gln16 wurde lediglich als passiver Rest eingestuft, da er nur 28,7% relative Oberflächenzugänglichkeit aufweist. Die Reste Gly24 und Ser70 mit jeweils über 40% relativer Oberflächenzugänglichkeit wurden als aktive Reste ausgewählt.

Beim Cytochrom *c*₅₅₂ im oxidierten Zustand wiesen die Reste Lys115, Gln57, Ala113, Gly56, Ala105, Gln119, Asn18, Gln120, Gly13, Gly24 und Val68 die größten Gesamtverschiebungsänderungen $\Delta\delta$ (bis 0,0124 ppm) auf. Von diesen Resten wurde Ala105 wegen seiner Lage auf der Rückseite des Moleküls eliminiert und Gly56 (23,4% relative Oberflächenzugänglichkeit) als passiver Rest eingestuft. Alle anderen Reste haben über 40% relative Oberflächenzugänglichkeit und wurden daher als aktive Reste ausgewählt.

Bei der Cu_A-Domäne im reduzierten Zustand wiesen die Reste Gly120, Arg141, Ile45, Glu51, Arg52, Glu126, Leu50, Phe88, Asn159, Gln158, Arg146, Lys140 und His157 die größten Gesamtverschiebungsänderungen $\Delta\delta$ (bis 0,01 ppm) auf. Von diesen Resten wurden Gly120,

Ile45 und Glu126 wegen ihrer Lage an der Grenzfläche zur Untereinheit I der Oxidase eliminiert. Die Reste Arg141, Glu51, Arg52, Leu50 und Lys140 wurden ebenfalls herausgefiltert, da ihre Seitenketten in der *ba*₃-Oxidase vermutlich in die Lipidmembran eintauchen und nur in der löslichen Cu_A-Domäne frei zugänglich sind. His157 und Gln158 wurden ebenfalls vernachlässigt, da sie keine signifikanten Oberflächenzugänglichkeiten (< 20%) besitzen. Nur Phe88, Arg146 und Asn159 (mit relativen Oberflächenzugänglichkeiten über 20%) wurden als aktive Reste ausgewählt.

Bei der Cu_A-Domäne im oxidierten Zustand wiesen die Reste Asn122, Val112, His157, Asn159, Gly115, Gly156, Val127, Ala85, His117 und Ala87 die größten Gesamtverschiebungsänderungen $\Delta\delta$ (bis 0,02 ppm) auf. Von diesen Resten wurden Val112, His157, Gly115, Val127 und Ala85 aufgrund ihrer zu geringen Oberflächenzugänglichkeiten (< 20%) eliminiert. Desweiteren wurden auch Asn122 und His117, welche an der Grenzfläche zur Untereinheit I der Oxidase liegen, vernachlässigt. Ala87, Gly156 und Asn159 (mit relativen Oberflächenzugänglichkeiten über 20%) wurden hingegen als aktive Reste eingestuft.

Aufgrund dieser Selektionskriterien wurden letztendlich die in Tabelle 12 aufgelisteten aktiven und passiven Reste in die Docking-Rechnung eingebracht.

Tabelle 12: Aktive und passive Reste in der Docking-Rechnung mit Cytochrom *c*₅₅₂ und der Cu_A-Domäne aus *T. thermophilus*.

Molekül	aktive Reste	passive Reste
Cytochrom <i>c</i>₅₅₂	G13, N18, G24, Q57, V68, S70, A113, K115, Q119, Q120	C11, Q16, Q17, Q20, I22, P23, A25, F26, Q55, G56, M63, K64, N66, G67, S71, W91, K109, K110, R112, K114, T117, P118, T123, E124
Cu_A-Domäne	A87, F88, R146, G156, N159	F86, E119, E144, L155, F161

In einem ersten Rechenzyklus mit den Röntgenkoordinaten der beiden Redoxpartnermoleküle (1DT1 für Cytochrom c_{552} und 1EHK für die Cu_A -Domäne) wurden in starrer Form 50 Komplexstrukturen ermittelt. Hiervon wurden die 20 Strukturen mit den niedrigsten AIR-Verletzungen weiter verfeinert, wobei nun die Seitenketten der aktiven und passiven Reste als flexibel behandelt wurden. Aus diesem Ensemble wurden anschließend wiederum die 10 energetisch günstigsten Strukturen ausgewählt und in einer Schale von Wassermolekülen erneut energieminimiert. Die Statistik der 10 endgültigen Komplexstrukturen ist in Tabelle 13 aufgelistet. Die relative Orientierung des Cytochrom c_{552} Moleküls zur Cu_A -Domäne in den unterschiedlichen Komplexstrukturen ist in Abb. 29 wiedergegeben.

Tabelle 13: Statistik der 10 berechneten Strukturen des Elektronentransferkomplexes zwischen Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne aus *T. thermophilus*.

Nr.	Distanz Fe-Cu (Å)	Intermolekulare Energie (kcal/mol)				Bedeckte Oberfläche (Å ²)	Elektronentransfer		RMSD ^d (Å)
		Total	vdW ^a	elektr. ^b	AIR		Weglänge (Å)	$\log T_{DA}^2 ^c$	
1	15,59	-102,3	-52,4	-64,4	14,5	1377	19,60	-11,2	-
2	15,78	-110,0	-59,5	-67,5	17,0	1535	19,55	-11,2	2,31
3	15,87	-123,6	-63,1	-80,3	19,7	1563	19,96	-11,8	4,54
4	16,03	-91,9	-53,9	-56,4	18,3	1602	20,07	-11,9	3,21
5	16,05	-86,1	-44,7	-59,3	17,9	1426	20,34	-12,3	2,34
6	16,18	-98,9	-52,4	-64,8	18,4	1488	22,13	-11,8	1,57
7	16,31	-93,2	-54,3	-53,5	14,6	1314	20,83	-11,7	2,72
8	16,32	-78,3	-55,0	-42,1	18,8	1495	19,96	-11,8	3,33
9	16,61	-92,2	-59,2	-49,6	16,7	1360	20,54	-11,4	3,82
10	16,77	-79,0	-45,2	-52,2	18,3	1354	24,87	-12,8	2,35

^a van der Waals

^b elektrostatisch

^c Elektronentunnel-Kopplungsfaktor

^d RMSD-Werte des Cytochrom c_{552} Rückgrats relativ zur Struktur Nr. 1 nach Überlagerung der Cu_A -Domänen aller Konformerer

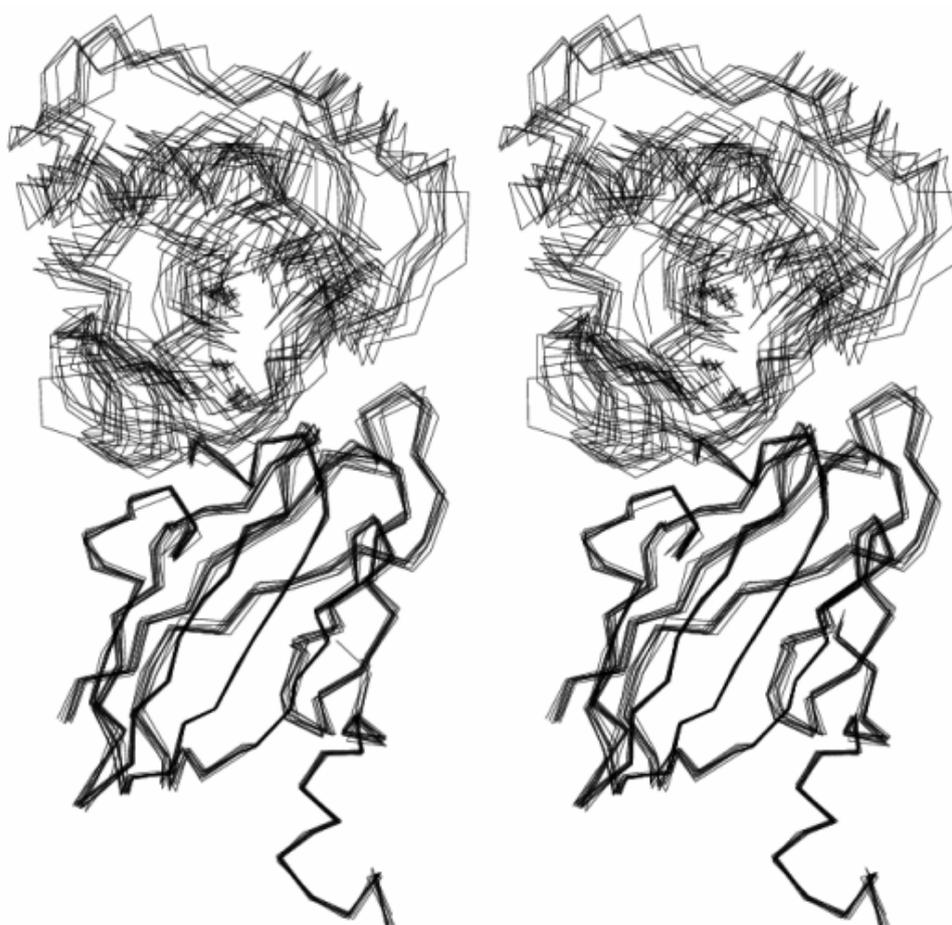


Abb. 29: Stereobild der Komplexstrukturen Nr. 1-10 aus Tabelle 13. Die Cu_A-Domäne (unten) wurde für alle 10 Konformeren übereinandergelegt; das Cytochrom *c*₅₅₂ (oben) nimmt leicht unterschiedliche Orientierungen bei der Komplexbildung an.

Die Struktur Nr. 1 zeigt den kürzesten Abstand zwischen den Metallzentren und die geringsten AIR Verletzungen. Die Strukturen Nr. 2 und 3 weisen ebenfalls Fe-Cu Abstände unter 16 Å und Gesamtenergien unter -100 kcal/mol auf. Aufgrund dieser Befunde wurden die Strukturen Nr. 1-3 als am wahrscheinlichsten für den Cytochrom *c*₅₅₂/Cu_A Komplex ausgewählt. Betrachtet man die Position des Cytochrom *c*₅₅₂ in den Strukturen 1-3, so sind die Strukturen 1 und 2 am ähnlichsten, während die Strukturen 1 und 3 größere Unterschiede aufweisen (Tab. 14). In Tabelle 15 sind die Aminosäurekontakte zwischen Cytochrom *c*₅₅₂ und der Cu_A-Domäne in Struktur Nr. 1 dargestellt. Dabei besteht in den Strukturen Nr. 1-3 ca. 50% der durch die Komplexbildung bedeckten Oberflächen aus unpolaren Anteilen. Die Struktur 1 mit der

rekonstituierten Untereinheit I ist in Abb. 30 dargestellt. Die beiden Metallzentren des Donors und Akzeptors liegen 15,6 Å auseinander. In der Kontaktzone zwischen den beiden Redoxpartnern berührt der Hämring des Cytochrom *c*₅₅₂ die Oberfläche der Cu_A-Domäne nahe dem Cu_A-Zentrum. Hierbei werden relativ große unpolare Oberflächen abgedeckt, insbesondere in der Region mit den Phenylalaninresten 86 und 88. Die letzteren beiden Reste liegen in der Cu_A-Domäne aus *T. thermophilus* in vergleichbaren Positionen wie die Reste Trp121 und Tyr122 (Soulimane et al., 2000), die in der Cu_A-Domäne aus *P. denitrificans* eine Rolle bei der Elektronenübertragung spielen sollen (Witt et al., 1998a und b).

Tabelle 14: RMSD-Werte des Cytochrom *c*₅₅₂ Rückgrats in den Komplexstrukturen Nr. 1-3.

Struktur	2	3
1	2,31	4,54
2	---	2,55

Tabelle 15: Intermolekulare Interaktionsmatrix zwischen Cytochrom *c*₅₅₂ und der Cu_A-Domäne in Struktur Nr. 1 aus Tabelle 13. Die Anzahl der atomaren Kontakte, die näher als 2,8 Å liegen, sind für die jeweiligen Reste auf den Interaktionsoberflächen angezeigt.

		Cu _A													
		PHE 86	ALA 87	PHE 88	GLY 89	TYR 90	GLN 91	ASN 93	ARG 146	LEU 155	GLY 156	GLN 158	ASN 159	PHE 161	
Cyt <i>c</i> ₅₅₂		-----													
GLY 13	13	1					1								
ILE 22	22							9							
GLY 24	24								1						
ALA 25	25							1							
PHE 26	26	1			3	1									
GLN 55	55									2	2	3			
GLY 56	56													4	
GLN 57	57													1	
ASN 66	66								3					3	3
GLY 67	67													3	
VAL 68	68			7							5		5		
SER 70	70		1	3											
SER 71	71			1											
LYS 115	115									1					
THR 117	117									8					
PRO 118	118									5					
Häm			3												



Abb. 30: Elektronentransferkomplex der *ba*₃-Oxidase mit dem Cytochrom *c*₅₅₂ aus *T. thermophilus*. Das Cytochrom *c*₅₅₂ ist in Rot dargestellt, das dazugehörige Häm in Grün (Fe in Orange), die Untereinheit II mit der Cu_A-Domäne in Gelb, das dazugehörige Cu_A-Zentrum in Magenta und die Untereinheit I in Blau. Die räumliche Orientierung der Proteine entspricht der berechneten Struktur Nr. 1 aus Tabelle 13.

Das Programm GREENPATH, welches auf dem „Pathway“-Modell basiert, wurde für einen Vergleich der Elektronentransfereffizienzen der verschiedenen Komplexstrukturen eingesetzt. Dieses Programm durchsucht das Netzwerk der gebundenen und nicht-gebundenen Kontakte innerhalb der Proteinmatrix nach dem Elektronenpfad, der die maximale Elektronentunnel-Kopplung zwischen den Donor und den Akzeptor (d.h., dem Eisenatom des Häms von Cytochrom c_{552} und dem binuklearen Kupfer-Zentrum der Cu_A -Domäne) aufweist. Die abgeschätzten „Elektronentunnel-Kopplungsfaktoren“ der 10 berechneten Strukturen unterscheiden sich nur sehr geringfügig ($\log |T_{DA}|^2$ Werte von -11,2 bis -12,8). Jedoch sind die Weglängen des Elektronentransfers in den Strukturen Nr. 1 und 2 am geringsten (19,6 Å). Der Elektronentransferweg (Abb. 31) ist in den Strukturen Nr. 1-3 gleich. Ausgehend vom Eisenatom des Häms in Cytochrom c_{552} führt der Weg im Häm entlang den Atomen NC, C4C, C3C, CAC und CBC zum HBC2. Von dort wird das Elektron zum Sauerstoffatom des Ala87 in der Cu_A -Domäne übertragen und läuft weiter entlang des Proteinrückgrats bis zum HN-Atom des Phe88. An dieser Stelle tunnelt das Elektron zum HE1-Atom des His114, einem Zentralliganden des Cu_A -Zentrums. Über CE1 und ND1 gelangt das Elektron schließlich zu einem der beiden Kupferatome.

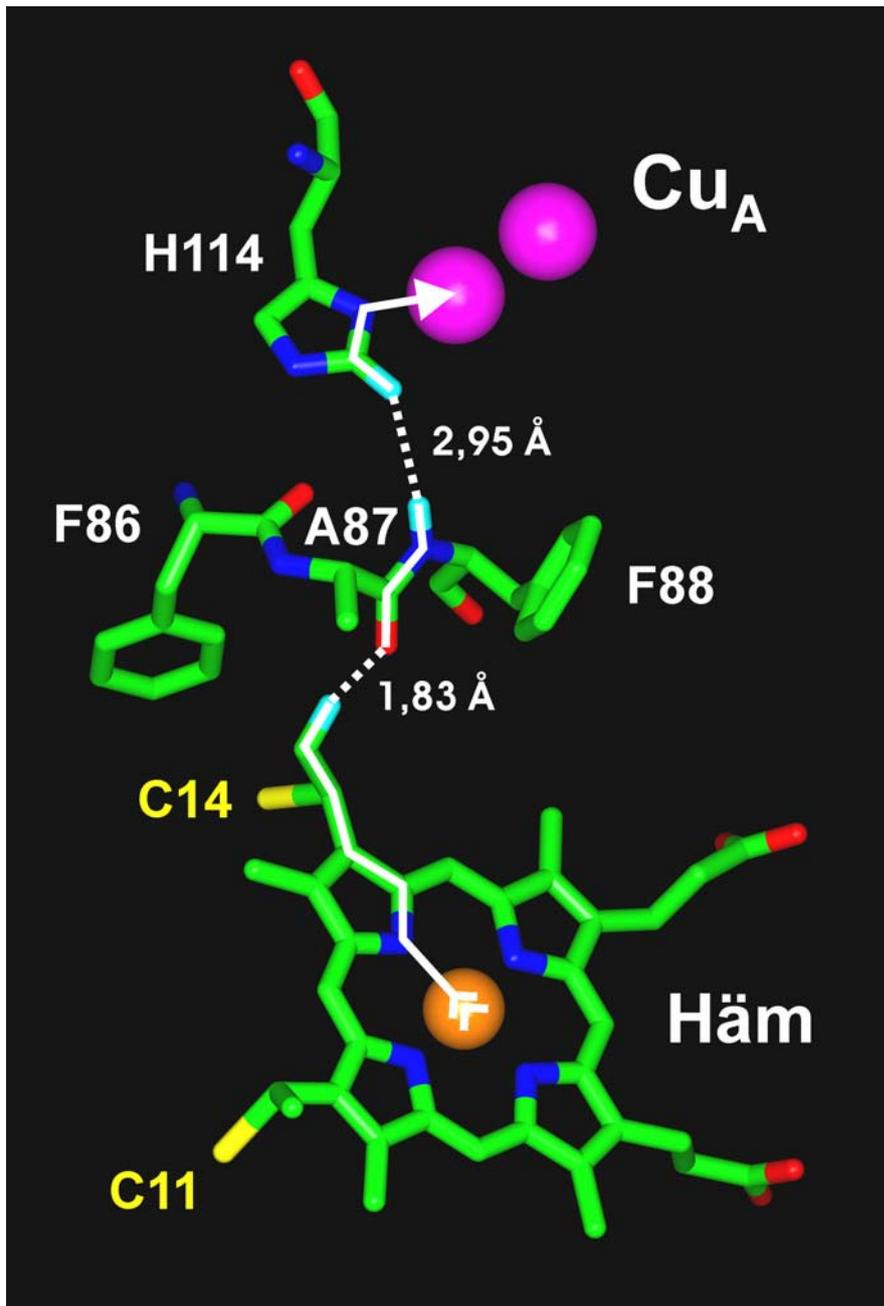


Abb. 31: Elektronentransferweg vom Eisenatom (orange) des Cytochrom c_{552} Porphyrinrings bis zum Cu_A -Zentrum (magenta) in der Untereinheit II der ba_3 -Oxidase aus *T. thermophilus*. Der Elektronenpfad ist mit einer weißen Linie entlang der Bindungen gezeichnet und mit gepunkteter Linie an jenen Stellen, an denen das Elektron durch den Raum (Distanz in Å) übertragen wird. Die räumliche Orientierung der Reste entspricht der berechneten Struktur Nr. 1 aus Tabelle 13. Der Porphyrinring ist kovalent an die Schwefelatome (gelb) von Cys11 und Cys14 gebunden. Wasserstoffatome (zyan) sind nur abgebildet, wenn sie einen Teil des Elektronentransferweges darstellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Kontaktoberflächen der beiden Elektronentransferproteine relativ flach sind, und daß die AIRs verschiedene Kontakt-Kombinationen zwischen den aktiven und passiven Resten der Redoxpartner zulassen. Das bedeutet, daß letztendlich keine einzelne Lösung durch die Berechnungen erzeugt wurde. Keine der Komplexstrukturen ermöglicht das vollständige Entfernen der mit den AIRs assoziierten potentiellen Energie. Der Energiewert bleibt daher deutlich kleiner als die van der Waals oder elektrostatischen Terme (Tabelle 13). Insofern sind die energetisch günstigsten Strukturen Nr. 1-3 alle gleich wahrscheinlich. Eine exakt definierte räumliche Orientierung der beiden Redoxpartner ist auch eher unwahrscheinlich, da die Komplexbildung nur transient ist. Der Elektronentransfer von Cytochrom c_{552} zu Cu_A -Domäne soll laut EPR Messungen sehr schnell ablaufen; es wurde festgestellt, daß Elektronen bis zu einer Distanz von 14 Å zwischen zwei Redoxpartnern mit einer Rate von 1013 bis 107 pro Sekunde tunneln (Page et al., 1999).

Der Elektronentransferweg der Struktur Nr. 1 involviert unter anderem die Reste Ala87 und Phe88 der Cu_A -Domäne, welche beide im Komplex mit Cytochrom c_{552} deutliche Änderungen der chemischen Verschiebungswerte aufweisen. Hierbei durchläuft das Elektron jedoch nicht den Phenylring des Phe88, sondern lediglich dessen Proteinrückgrat. Dies erklärt auch das Ergebnis einer Mutagenesestudie, bei der Phe88 durch ein Leucin ersetzt wurde. Diese Mutation führte nur zu einer Abnahme der Elektronentransferaktivität um ca. 50% (Maneg et al., 2003). Mit anderen Worten, die Seitenkette dieses Restes ist nicht essentiell für die Elektronenübertragung im *T. thermophilus* System ist, wohingegen im *P. denitrificans* System der analoge Trp121 Rest in der Cu_A -Domäne offensichtlich unersetzlich für die Elektronentransferreaktion ist.

Die Tatsache, daß die F88L Mutation in der Cu_A -Domäne von *T. thermophilus* den Elektronentransfer zwar verringert aber nicht vollständig unterbindet, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die Veränderung der Oberflächenverhältnisse dazu führen, daß die Protein-Protein-Wechselwirkungen eine reduzierte Bindungsaffinität zur Folge haben. Andererseits wäre es auch denkbar, daß der aromatische Ring des Phe88 einen alternativen Weg für den Elektronentransfer darstellt. Die Mindestabstände vom Hämring zum Phenylalaninring und weiter zum Cu_A -Zentrum betragen 6,5 bzw. 6,0 Å; diese Distanzen müßte das Elektron durch den Raum zurücklegen, da keine weiteren Reste dazwischen liegen. Die gesamte Weglänge des Elektronentransfers zwischen den Metallzentren wäre in diesem Fall jedoch um ca. 2,5 Å kürzer als in dem hier dargestellten Elektronentransferweg (Abb. 31). Mit diesem alternativen

Übertragungsweg könnte das Ergebnis der oben beschriebenen Mutationsstudie wie folgt erklärt werden: parallele Elektronentransferwege sowohl über die aromatischen Ringsysteme als auch durch nicht-konjugierte Bindungen würden durch das Entfernen des Phe88 Rings nur partiell unterbunden werden. Die 50%ige Abnahme der Elektronentransferaktivität in der F88L Mutante deutet daher möglicherweise auf eine etwa gleiche Wahrscheinlichkeit für beide Wege hin. Einen zusätzlichen Einfluß des Phe86 Rings auf den Elektronentransfer konnte aufgrund von kinetischen Untersuchungen entsprechender F86L und F86L/F88L Mutanten bereits zuvor ausgeschlossen werden (Maneg, 2004).

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Strukturen der Excisionase (Xis) aus dem Bakteriophagen HK022 sowie des Proteinkomplexes zwischen Cytochrom c_{552} und der Cu_A -Domäne aus *T. thermophilus* mittels NMR in wässriger Lösung bestimmt.

Im Falle der Excisionase wurde mit Hilfe isotope-markierter Proteinproben die vollständige Zuordnung der 1H -, ^{15}N - und ^{13}C -Resonanzen durchgeführt. Hierauf basierend wurden anhand verschiedener zwei- und dreidimensionaler NOESY Spektren insgesamt 902 Abstandsbeschränkungen identifiziert, mit deren Hilfe die räumliche Struktur des Proteins bestimmt werden konnte. Die Strukturrechnungen ergaben letztendlich ein Strukturensamble von 20 Konformeren, die aus 2 α -Helices und 5 β -Faltblattsträngen aufgebaut sind. Die β -Faltblattstränge bilden 2 antiparallele β -Faltblätter, während die beiden α -Helices eine L-Formation darstellen. Die letzten 12 Aminosäurereste am C-Terminus zeigten keine NOEs und besaßen folglich auch keine geordnete Struktur. Dennoch ist dieser C-terminale Teil der Sequenz möglicherweise von physiologischem Interesse, da für den Rest 66 eine Asn/IsoAsp-Isomerisierung beobachtet wurde, welche eine Rolle bei der Autoregulation dieses Proteins *in vivo* spielen könnte. Ein weiteres markantes Strukturelement der Excisionase ist das Triprolinsegment Pro32-Pro33-Pro34, das die beiden β -Faltblätter miteinander verbindet. Diese drei Prolinreste liegen in einer *cis-trans-trans* Konformation vor; aufgrund von Ligandenwechselwirkungen verschiedener anderer Proteine, die ein solches Motiv besitzen, liegt die Vermutung nahe, daß diese Region in der spezifischen Protein-Protein-Interaktion, die während der exzisivon Rekombination stattfindet, eine Schlüsselrolle spielen könnte.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von Cytochrom c_{552} mit der Cu_A -Domäne wurden beide löslichen Fragmente mit dem ^{15}N -Isotop angereichert. Daraufhin konnten für jedes Protein heteronukleare NMR-Experimente durchgeführt werden, die eine vollständige Zuordnung der Amidresonanzen sowohl im reduzierten als auch im paramagnetischen oxidierten Zustand ermöglichte. Basierend auf diesen Resonanzzuordnungen konnten Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte aufgrund von Oberflächenkontakten mit dem jeweiligen Redoxpartner mittels 2D [^{15}N , 1H]-TROSY Experimenten in beiden Redoxzuständen ermittelt werden. Die betroffenen Aminosäurereste, welche an der Moleküloberfläche die Kontaktzone definieren, wurden für eine Docking-Rechnung herausgezogen, um letztendlich die räumliche

Struktur des Elektronentransferkomplexes zwischen Cytochrom c_{552} und der ba_3 -Oxidase zu bestimmen.

Interessanterweise traten beim Cytochrom c_{552} zusätzlich zu den Verschiebungseffekten auf der Moleküloberfläche im reduzierten Zustand auch noch sehr dominante Sekundäreffekte im hinteren Teil der Hämspalte an der Stelle auf, wo das Propionat A über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein verbunden ist. Analog zu dem System aus *P. denitrificans* befindet sich auch im Cytochrom c_{552} aus *T. thermophilus* in dieser Position ein aromatischer Ring, der vermutlich von elektronischen Veränderungen im Hämring beeinflusst wird und diese Effekte durch seinen somit veränderten Ringstrom an die unmittelbare Umgebung weitergibt. Diese experimentellen Daten unterstützen die Elektronendelokalisierungstheorie von Wikström und Mitarbeitern (Johansson et al., 2002a und b), wonach im reduzierten Häm ein Teil der Elektronenladung bis in die Peripherie des Hämring delokalisiert ist, einschließlich der nicht-konjugierten Propionatreste.

Aus vorangegangenen Studien ergab sich bereits, daß der Elektronentransferkomplex in *T. thermophilus* auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, im Gegensatz zum *P. denitrificans* System, in dem die Interaktion elektrostatischer Natur ist (Maneg et al., 2003). Tatsächlich weist die in dieser Arbeit bestimmte Struktur des Elektronentransferkomplexes einen hohen Anteil (ca. 40%) an unpolaren Kontaktflächen auf. Das Cytochrom c_{552} bindet dabei an die Cu_A -Domäne nahe dem Cu_A -Zentrum, so daß der Abstand zwischen den Metallzentren von Donor und Akzeptor 15,6 Å beträgt. Der Hämring des Cytochrom c_{552} berührt die Cu_A -Domäne im Bereich von Phe86 und Phe88, wie bereits von Soulimane et al. (2000) aufgrund der Sequenzhomologie mit dem *P. denitrificans* System postuliert worden war. Wie jedoch aus dem berechneten Elektronentransferweg hervorgeht, ist die aromatische Seitenkette des Phe88 nicht unbedingt in die Elektronenübertragung einbezogen. Der ca. 19-20 Å lange Weg des Elektrons führt wahrscheinlich vom Häm über das Proteinrückgrat der Cu_A -Reste Ala87 und Phe88 zum Cu_A -Zentralliganden His114 und schließlich zum binuklearen Kupferzentrum. Dies erklärt auch, wieso eine F88L Mutation der Cu_A -Domäne (Maneg et al., 2003) nur zu einer 50%igen Abnahme der Aktivität geführt hat. Hiermit ist nun für das *T. thermophilus* System der gesamte Weg der Elektronenübertragung vom Cytochrom c_{552} über die Cu_A -Domäne zur Untereinheit I der ba_3 -Oxidase in den Grundzügen aufgeklärt, da der Elektronentransfer vom Cu_A - zum Cu_B -Zentrum bereits zuvor beschrieben worden war (Soulimane et al., 2000).

5. Literaturverzeichnis

Antholine, W., Kastrau, D., Steffens, G., Buse, G., Zumft, W. und Kroneck, P. (1992) A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous-oxide reductase and cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 209, 875-881.

Bax, A., Ikura, M., Kay, L.E., Torchia, D.A. und Tschudin, R. (1990) Comparison of different modes of two-dimensional reverse correlation NMR for the study of proteins. *J. Magn. Reson.* 86, 304–318.

Bendall, D. (1996) Protein Electron Transfer, S. 43-68. Bios Scientific, Oxford, UK.

Beratan, D. N., Betts, J. N. und Onuchic, J. N. (1991) Protein electron transfer rates set by the bridging secondary and tertiary structure. *Science* 252, 1285-1288.

Bertini, I., Bren, K., Clemente, A., Fee, J. A., Gray, H. B., Luchinat, C., Malmström, B.G., Richards, J. H., Sanders, D. und Slutter, C. E. (1996) The Cu_A center of a soluble domain from *Thermus* cytochrome *ba*₃. An NMR investigation of the paramagnetic protein, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 11658-11659.

Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, J., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. und Warren, G. L. (1998) Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*54, 905-921.

Bushman, W., Yin, S., Thio, L. L. und Landy, A. (1984) Determinants of directionality in λ site-specific recombination. *Cell* 39, 699-706.

Campbell, I. D. und Dwek, R. A. (1988) Biological Spectroscopy, S. 320-323, Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA, USA.

- Dauber-Osguthorpe, P.**, Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, D. J., Genest, M. und Hagler, A. T. (1988) Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* 4, 31–47.
- Davis, D. G.** und Bax, A. (1985) Assignment of complex NMR spectra via two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 2820–2821.
- Dhillon, T. S.**, Dhillon, E. K. S. und Lai, A. N. (1981) Genetic recombination between phage HK022, λ , and ϕ 80. *Virology* 109, 198-200.
- Dominguez, C.**, Boelens, R. und Bonvin, A. M. (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1731-1737.
- Drosou, V.**, Malatesta, F. und Ludwig, B. (2002a) Mutations in the docking site for cytochrome *c* on the *Paracoccus* heme *aa*₃ oxidase. Electron entry and kinetic phases of the reaction. *Eur. J. Biochem.* 269, 2980-2988.
- Drosou, V.**, Reincke, B., Schneider, M. und Ludwig, B. (2002b) Specificity of the interaction between the *Paracoccus denitrificans* oxidase and its substrate cytochrome *c*: comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome *c*₅₅₂, and its truncated and site-directed mutants. *Biochemistry* 41, 10629-10634.
- Fee, J. A.**, Choc, M. G, Findling, K. L, Lorence, R. und Yoshida, T. (1980) Properties of a copper-containing cytochrome *c*_{1aa}₃ complex: A terminal oxidase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 147-151.
- Fee, J. A.**, Chen, Y., Todaro, T. R., Bren, K. L., Patel, K. M., Hill, M. G., Gomez-Moran, E., Löhr, T. M., Ai, J., Thöny-Meyer, L., Williams, P. A., Stura, E., Sridhar, V. und McRee, D. E. (2000) Integrity of *Thermus thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂ synthesized by *Escherichia coli* cells

expressing the host-specific cytochrome *c* maturation genes, *ccmABCDEFGH*: Biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein. *Protein Sci.* 9, 2074-2084.

Geiger, T. und Clarke, S. (1987) Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J. Biol. Chem.* 262, 785-794.

Giuffre, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T. und Buse, G. (1999) Kinetic properties of *ba₃* oxidase from *Thermus thermophilus*: effect of temperature. *Biochemistry* 38, 1057-1065.

Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K. und Ernst, R. R. (1988) Clean TOCSY for ¹H spin system identification in macro-molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7870-7872.

Grzesiek, S. und Bax, A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *J. Biomol. NMR* 3, 185-204.

Grzesiek, S., Anglister, J. und Bax, A. (1993) Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in ¹³C/¹⁵N-enriched proteins by isotropic mixing of ¹³C magnetization. *J. Magn. Reson. Ser.B* 101, 114-119.

Güntert, P., Braun, W. und Wüthrich, K. (1991) Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* 217, 517-530.

Güntert, P., Mumenthaler, C. und Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 273, 283-298.

Harrenga, A., Reincke, B., Rüterjans, H., Ludwig, B. und Michel, H. (2000) Structure of the soluble domain of cytochrome *c*₅₅₂ from *Paracoccus denitrificans* in the oxidized and reduced states. *J. Mol. Biol.* 295, 667-678.

Hubbard, S. J. und Thornton, J. M. (1993) *NACCESS* Computer Program. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, UK.

Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. und Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR-spectroscopy, *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4563.

Johansson, M. P., Sundholm, D., Gerfen, G. und Wikström, M. (2002a) The spin distribution in low-spin iron porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11771-11780.

Johansson, M. P., Blomberg, M. R., Sundholm, D. und Wikström, M. (2002b) Change in electron and spin density upon electron transfer to haem, *Biochim. Biophys. Acta.* 1553, 183-187.

Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. und Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79, 926-935.

Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E. und Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.*, 434, 17-22.

Kay, L. E., Marion, D. und Bax, A. (1989) Practical aspects of 3D heteronuclear NMR of proteins. *J. Magn. Reson.* 84, 72-84.

Kelly, M., Lappalainen, P., Talbo, G., Haltis, T., van der Oost, J. und Saraste, M. (1993) Two cysteines, two histidines, and one methionine are ligands of a binuclear purple copper center. *J. Biol. Chem.* 268, 16781-16787.

Kim, S. und Landy, A. (1992) Lambda Int protein bridges between higher order complexes at two distant chromosomal loci *attL* and *attR*. *Science* 256, 198-203.

Koolman J. und Röhm K. H. (1998) Taschenatlas der Biochemie, S.56-57, Thieme Verlag, Stuttgart.

Koradi, R., Billeter, M. und Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graphics* 41, 51-55.

Landy, A. (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913-949.

Laskowski, R. A. (2001), PDB sum: summaries and analysis of PDB structures. *Nucleic Acids. Res.* 29, 221-222.

Leffers, G. G. und Gottesman, S. (1998) Lambda Xis degradation in vivo by Lon and FtsH. *J. Bacteriol.* 180, 1573-1577.

Linge, J. P., O'Donoghue, S. I. und Nilges, M. (2001) Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol.* 339, 71-90.

Löhr, F. und Rüterjans, H. (1995) A new triple-resonance experiment for the sequential assignment of backbone resonances in proteins. *J. Biomol. NMR* 6, 189-197.

Maneg, O., Ludwig, B. und Malatesta, F. (2003) Different interaction modes of two cytochrome-c oxidase soluble Cu_A fragments with their substrates. *J. Biol. Chem.* 278, 46734-46740.

Maneg, O. (2004) Elektronentransfer zwischen Redoxkomplexen aus *Thermus thermophilus* und *Paracoccus denitrificans*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Marion, D., Driscoll, P. C., Kay, L. E., Wingfield, P. T., Bax, A., Gronenborn, A. M. und Clore, G. M. (1989) Overcoming the overlap problem in the assignment of ¹H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ¹H-¹⁵N Hartmann-Hahn-multiple

quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1β . *Biochemistry* 28, 6150-6156.

Montelione, G. T., Lyons, B. A., Emerson, S. D. und Tashiro, M. (1992) An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10974-10975.

Mukrasch, M. D., Lücke, C., Löhr, F., Maneg, O., Ludwig, B. und Rüterjans, H. (2004) Complete ^1H , ^{15}N and ^{13}C assignment of the soluble domain of the ba_3 oxidase subunit II of *Thermus thermophilus* in the reduced state. *J. Biomol. NMR* 28, 297-298.

Mukrasch, M., (2003) Untersuchung der löslichen Cu_A -Domäne aus Untereinheit II der ba_3 Cytochrom c Oxidase von *Thermus thermophilus* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Mulder, F. A. A., Schipper, D., Bott, R. und Boelens, R. (1999) Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 292, 111-123.

Nash, H. A. (1996) Site-specific recombination: integration, excision, resolution and inversion of defined DNA segments. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., Curtiss, R. III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. und Umberger, H. E., eds.), S. 2363-2376. *ASM Press, Washington DC, USA*.

Nunes-Düby, S. E., Matsumoto, L. und Landy, A. (1989) Half-*att* site substrates reveal the homology independence and minimal protein requirements for productive synapsis in λ excisive recombination. *Cell* 59, 197-206.

Page, C., Moser, C. X. und Dutton, L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402, 47-52.

Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. und Wüthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12366-12371.

Pristovšek, P., Lücke, C., Reincke, B., Ludwig, B. und Rüterjans, H. (2000) Solution structure of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₂ in the reduced state. *Eur. J. Biochem.* 267, 4205-4210.

Reedijk, J. (1992) Nomenclature of electron-transfer proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 665-677.

Regan, J. J., Risser, S. M., Beratan, D. N. und Onuchic, J. N. (1993) Protein electron transport: single versus multiple pathways. *J. Phys. Chem.* 97, 13083-13088.

Reincke, B., (2000) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen löslicher Fragmente des Cytochrom *c*₅₅₂ aus *Paracoccus denitrificans*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Reincke, B., Perez, C., Pristovšek, P., Lücke, C., Ludwig, C., Löhr, F., Rogov, V. V., Ludwig, B. und Rüterjans, H. (2001) Solution structure and dynamics of the functional domain of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c*₅₅₂ in both redox states. *Biochemistry* 40, 12312-12320.

Robinson, N. E. und Robinson, A. B. (2001) Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 4367-4372.

Rogov, V. V., Lücke, C., Muresanu, L., Wienk, H., Kleinhaus, I., Werner, K., Löhr, F., Pristovšek, P. und Rüterjans, H. (2003) Solution structure and stability of the full-length excisionase from bacteriophage HK022. *Eur. J. Biochem.* 270, 4846-4858.

Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H. und Wüthrich, K. (1998) TROSY in triple-resonance experiments: new perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13585-13590.

Salzmann, M., Wider, G., Pervushin, K., Senn, H. & Wüthrich, K. (1999) TROSY-type triple-resonance experiments for sequential NMR assignments of large proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 844-848.

Saraste, M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* 23, 331-366.

Simonovic, M. und Volz, K. (2002) Atomic resolution structure of a succinimide intermediate in *E. coli* CheY. *J. Mol. Biol.* 322, 663-667.

Slutter, C. E., Sanders, D., Wittung, P., Malström, B. G., Aasa, R., Richards, J. H., Gray, H. B. und Fee, J. A. (1996) Water-soluble, recombinant Cu_A-domain of the cytochrome *ba*₃ subunit II from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* 35, 3387-3395.

Soulimane, T., Gohlke, U., Huber, R. und Buse, G. (1995) Three-dimensional crystals of cytochrome-*c* oxidase from *Thermus thermophilus* diffracting to 3.8 Å resolution. *FEBS Lett.* 368, 132-134.

Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M., Huber, R. und Buse, G. (1997) Cytochrome-*c*₅₅₂ from *Thermus thermophilus*: a functional and crystallographic investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 572-576.

Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant *ba*₃-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* 19, 1766-1776.

Studier, W. und Moffatt, B. (1986) Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

- Thöny-Meyer, L.,** Fischer, F., Künzler, P., Ritz, D. und Hennecke, H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J. Bacteriol.* 177, 4321-4326.
- Tsodikov, O. V.,** Record, M. T. Jr. und Sergeev, Y. V. (2002) A novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature. *J. Comput. Chem.* 23, 600-609.
- Tugarinov, V.,** Muhandiram, R., Ayed, A. und Kay, L. E. (2002) Four-dimensional NMR spectroscopy of a 723-residue protein: chemical shift assignments and secondary structure of malate synthase G. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10025-10035.
- Wienk, H.,** Maneg, O., Lücke, C., Pristovšek, P., Löhr, F., Ludwig, B. und Rüterjans, H. (2003) Interaction of cytochrome *c* with cytochrome *c* oxidase: an NMR study on two soluble fragments derived from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 42, 6005-6012.
- Williams, P. A.,** Blackburn, N. J., Sanders, D., Bellamy, H., Stura, E. A., Fee, J. A., McRee D. E. (1999) The Cu_A domain of *Thermus thermophilus* ba₃-type cytochrome *c* oxidase at 1.6 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 6, 509-516.
- Wishart, D. S. und** Sykes, B. D. (1994) The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR* 4, 171-180.
- Witholt, B.,** Boekhout, M., Kingma, J., van Heerikhuizen, H. und de Leij, L. (1976) An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 74, 160-170.
- Witt, H.,** Malatesta, F., Brunori, M. und 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. und Ludwig, B. (1998b) Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-*c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* 273, 5132-5136.

Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids. Wiley, N Y, USA.

Yagil, E. und Dolev, S. (1989) Determinants of site-specific recombination in the lambdoid coliphage HK022. *J. Mol. Biol.* 207, 695-717.

Zhang, O., Kay, L. E., Olivier, J. P. und Forman-Kay, J. D. (1994) Backbone ¹H and ¹⁵N resonance assignments of the N-terminal SH₃ domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *J. Biomol. NMR* 4, 845-858.

Zuiderweg, E. R. P. und Fesik, S. W. (1989) Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry* 28, 2387-2391.

6. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
BIS-TRIS	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
COSY	Correlated Spectroscopy
DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Natrium 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIS	Factor for Inversion Stimulation
HK022	HongKong022
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IHF	Integration Host Factor
Int	Integrase
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
OD	optische Dichte
ppm	parts per million
<i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
RMSD	Root-Mean-Square-Deviation
rpm	Umdrehungen pro Minute
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
WZ	Wechselzahl
Xis	Excisionase

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2002 bis Oktober 2005 am Institut für Biophysikalische Chemie und molekulare Genetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Rüterjans und Herrn Prof. Dr. B. Ludwig angefertigt.

Herrn Prof. Rüterjans danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seine Unterstützung.

Herrn Prof. Ludwig danke ich für die Betreuung des molekularbiologischen Teils dieser Arbeit sowie für hilfreiche Tipps und Diskussionen

Herrn Dr. Christian Lücke möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung des NMR-Teils dieser Arbeit, sowie Herrn Dr. Primož Pristovšek für die Einführung in NMR-Spektroskopie und Herrn Dr. Frank Löhr für die Spektrenaufnahme.

Frau Sigrid Fachinger danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und unermüdlichen Einsatz im bürokratischen Bereich.

Frau Ioana Kleinhaus danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Ich danke Herrn Dr. Felicean Dancea für ein angenehmes Arbeitsklima in unserem gemeinsamen Büro sowie auch für das Lösen einiger Computerprobleme.

Bei Herrn Dipl.-Biochem. Marco Mukrasch bedanke ich mich für die Vorarbeiten an der reduzierten Cu_A-Domäne und für zahlreiche Informationen über die Proteinpräparation.

Herrn Hans Werner Müller danke ich für die Einarbeitung in die praktische Laborarbeit.

Herrn Dr. Vladimir Rogov für die Leitung des Excisionase-Projekts.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christian Wolf, Dr. Veronika Bade, Herrn Dr. Helmut Hanssum, Prof. Dr. Lorella Franzoni, Dr. Vicky Katsemi, Birgit Schäfer, Juliana Winkler, Gary Yalloway, Andrea Hermann, Stephe Koerber, Horng der Ou, Dr. Christoph Kyritsis, Natasha Rogova, Dr. Oliver Anderka, Christian Groß, Bettina Pobisch, Mitch Maestre-Martinez, Jessie Lorenzo-Chao, Dr. Ulli Schieborr sowie auch Dr. Marco Betz für ein nettes Arbeitsklima.

Mein letzter und herzlicher Dank geht an meine Eltern für ihre Unterstützung und ihr Interesse an meiner Ausbildung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Lucia Mureşanu
Geboren am: 18.12.1978 in Cluj-Napoca (Klausenburg), Rumänien
Staatsangehörigkeit: rumänisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984-1989 Grundschule: Theoretisches Lyceum George Coşbuc (deutsche Abteilung)
1989-1997 Gymnasium: Theoretisches Lyceum George Coşbuc (Schwerpunkt: Mathematik und Physik in deutscher Sprache)
Mai 1997 Deutsches Sprachdiplom Stufe II
Juni 1997 Abitur

Studium:

Sept. 1997 Aufnahmeprüfung an der Babes-Bolyai Universität, Fakultät für Chemie und Chemische Ingenieurwissenschaften, Abteilung: Chemie und Physik (in deutscher Sprache)
Sept. 2000 Praktikum für Biophysikalische Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Feb.-Juni 2001 Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ioan Oprean; Thema: Ätherische Öle aus *Salvia officinalis*.
Juni 2001 Lizenzprüfung in Chemie und Physik
1. 4.-1.12. 2002 KAAD Stipendium an der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main
1.1.03-Okt. 2005 Durchführung der Doktorarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Publikationen

Einige Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Rogov, V. V., Lücke, C., Muresanu, L., Wienk, H., Kleinhaus, I., Werner, K., Löhr, F., Pristovšek, P. und Rüterjans, H. (2003) Solution structure and stability of the full-length excisionase from bacteriophage HK022. *Eur. J. Biochem.* 270, 4846-4858.

Muresanu, L., Pristovšek, P., Löhr, F., Maneg, O., Mukrasch, M., Rüterjans, H., Ludwig, B. und Lücke, C. (2006) The electron transfer complex between cytochrome *c*₅₅₂ and the Cu_A domain of the *Thermus thermophilus* *ba*₃ oxidase – a combined NMR and computational approach. *Manuskript eingereicht.*