



**Untersuchungen zur Funktion des
Oxidase-Biogenesefaktors Surf1
aus *Paracoccus denitrificans***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von Freya Alena Bundschuh

aus Darmstadt

Frankfurt am Main 2009

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Prof. Dr. Klaas Martinus Pos

Datum der Disputation: _____

Für meine Familie

„Cuius rei demonstrationem mirabilem sane detexi.

Hanc marginis exiguitas non caperet.“

Ich habe hierfür einen wahrhaft wunderbaren Beweis gefunden,

doch ist der Rand hier zu schmal, um ihn zu fassen.

Pierre de Fermat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die mitochondriale Atmungskette.....	2
1.2	<i>Paracoccus denitrificans</i> als Modellorganismus.....	5
1.2.1	Das Bodenbakterium <i>Paracoccus denitrificans</i>	5
1.2.2	Die Atmungskette von <i>Paracoccus denitrificans</i>	6
1.2.2.1	Die <i>aa</i> ₃ -Cytochrom <i>c</i> Oxidase	8
1.2.2.2	Die <i>ba</i> ₃ -Ubichinoloxidase	10
1.3	Biogenese der mitochondrialen Cytochrom <i>c</i> Oxidase	11
1.3.1	Assemblierung der <i>Core</i> -Untereinheiten	14
1.3.1.1	Biogenese von Untereinheit I.....	15
1.3.1.2	Biogenese der Untereinheit II	17
1.3.2	Assemblierung zur reifen Cytochrom <i>c</i> Oxidase	18
1.3.3	COX-Defizienz	19
1.3.3.1	Leigh-Syndrom	21
1.3.3.2	Der Assemblierungsfaktor Surf1.....	21
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	24
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Materialien.....	27
2.1.1	Geräteliste	27
2.1.2	EDV	28
2.1.2.1	Programme	28
2.1.2.2	Datenbanken.....	28
2.1.3	Chemikalien	29
2.1.4	Chromatographiematerialien.....	30
2.1.5	Größenstandards.....	31
2.1.6	Proteine	31
2.1.6.1	Antikörper	31
2.1.6.2	Enzyme für die Molekularbiologie	31

Inhaltsverzeichnis

2.1.6.3	Allgemeine Proteine	32
2.1.7	Nukleinsäuren.....	32
2.1.7.1	Vorhandene Plasmide.....	32
2.1.7.2	Erstellte Plasmide	33
2.1.7.3	Oligonukleotide.....	34
2.1.8	Mikroorganismen	36
2.1.8.1	<i>Escherichia coli</i> K12-Stämme	36
2.1.8.2	<i>Paracoccus denitrificans</i> -Stämme	37
2.1.9	Antibiotika.....	38
2.1.10	Kulturmedien.....	38
2.1.11	Puffer und Lösungen	39
2.1.11.1	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie.....	39
2.1.11.2	Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie	42
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	48
2.2.1	Bakterienanzucht und Lagerung.....	48
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“.....)	49
2.2.3	Isolierung genomischer DNA.....	49
2.2.4	Restriktion von DNA	51
2.2.5	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	51
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	52
2.2.7	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	53
2.2.8	Ligation	53
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	54
2.2.10	Gerichtete Mutagenese.....	55
2.2.11	DNA-Sequenzierung	56
2.2.12	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	56
2.2.13	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen.....	57
2.2.14	Konjugation: <i>Triparental Mating</i>	58
2.2.15	Blau-Weiß-Screening	58
2.2.16	Southern-Hybridisierung.....	59
2.2.17	Koloniehybridisierung (Dot-Blot).....	61
2.3	Proteinbiochemische Methoden	62
2.3.1	Analytische Membranpräparation	62
2.3.1.1	<i>E. coli</i> Testexpression	62

Inhaltsverzeichnis

2.3.1.2	<i>Paracoccus</i> Kulturen.....	63
2.3.2	Membranpräparation im großen Maßstab.....	63
2.3.2.1	<i>E. coli</i> Kulturen.....	63
2.3.2.2	<i>Paracoccus</i> Kulturen.....	64
2.3.3	Solubilisierung von Membranen.....	65
2.3.3.1	Isolierung von Surf1.....	65
2.3.3.2	Klassische Isolierung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	65
2.3.4	Säulenchromatographie.....	66
2.3.4.1	Isolierung von Surf1 mittels IMAC.....	66
2.3.4.2	Nachreinigung von Surf1 mittels Anionentauscher.....	66
2.3.4.3	Klassische Isolierung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	67
2.3.5	Gelfiltration.....	68
2.3.5.1	Analytische Gelfiltration.....	68
2.3.5.2	Präparative Gelfiltration.....	68
2.3.6	Proteinbestimmung nach Lowry.....	69
2.3.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	69
2.3.7.1	Tris-Glycin-System nach Laemmli.....	69
2.3.7.2	Blau-Nativ-PAGE.....	70
2.3.8	Färbungen für Gele.....	71
2.3.8.1	Coomassie-Färbung.....	71
2.3.8.2	Silberfärbung.....	71
2.3.8.3	Hämefärbung.....	71
2.3.9	Westernblot.....	72
2.3.10	Hämextraktion.....	73
2.3.11	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	74
2.4	Biophysikalische Methoden.....	74
2.4.1	Enzymaktivitätstests.....	74
2.4.1.1	Reduktion von Cytochrom <i>c</i>	75
2.4.1.2	Reduktion von Decylubichinon.....	75
2.4.1.3	Aktivitätsmessung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	76
2.4.1.4	Aktivitätsmessung der Ubichinioxidase.....	76
2.4.2	Spektroskopische Methoden.....	77
2.4.2.1	Native Redoxspektren.....	77
2.4.2.2	Pyridin-Hämochromspektren.....	78
2.4.2.3	Kohlenmonoxid-Bindungsspektren.....	78

2.4.2.4	Cyanid-Bindungsspektren	79
2.4.3	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	79
2.4.4	Proteinkristallisation.....	80
3	Ergebnisse	81
3.1	Bioinformatische Untersuchungen.....	81
3.1.1	Organisation der <i>surf1</i> -Gene	81
3.1.2	Sequenzalignment	82
3.1.3	Transmembranvorhersage	84
3.2	Charakterisierung von <i>surf1</i> Deletionsstämmen.....	85
3.2.1	Konstruktion des Doppeldeletionsstamms	85
3.2.1.1	<i>surf1</i> -Doppeldeletionsstamm	87
3.2.1.2	<i>surf1</i> -Komplementationsstämme	88
3.2.2	Charakterisierung der Deletionsstämme in Membranen.....	89
3.2.2.1	Westernblot-Analyse.....	90
3.2.2.2	Aktivität der <i>cbb₃</i> -Cytochrom <i>c</i> Oxidase	91
3.2.2.3	Aktivität der <i>aa₃</i> -Cytochrom <i>c</i> Oxidase.....	93
3.2.2.4	Aktivität der <i>ba₃</i> -Ubichinoloxidase.....	94
3.2.3	Aufreinigung der Cytochrom <i>c</i> Oxidase	95
3.2.3.1	Aktivitätsmessungen	96
3.2.3.2	Spektrale Untersuchungen.....	97
3.2.4	Surf1-Histidinmutanten.....	100
3.3	Heterologe Aufreinigung von Surf1 aus <i>E. coli</i>	101
3.3.1	Surf1-Expressionsplasmide.....	101
3.3.1.1	Häm <i>a</i> -Biosynthese-Plasmid	102
3.3.1.2	Surf1-Histidinmutanten.....	104
3.3.2	Aufreinigung von Surf1 über Affinitäts- <i>tags</i>	106
3.3.2.1	Testexpressionen	106
3.3.2.2	Optimierung der Aufreinigung.....	107
3.3.3	Hämbindung von Surf1	109
3.3.3.1	HPLC-Experimente.....	111
3.3.3.2	Verbesserung der Expressionsbedingungen.....	112
3.4	Biochemische Untersuchung von Surf1	113

Inhaltsverzeichnis

3.4.1	Analytische Gelfiltration.....	114
3.4.2	Hämbindungseigenschaften von Surf1	118
3.4.2.1	Kohlenmonoxid-Bindungsspektren.....	118
3.4.2.2	<i>In vitro</i> -Titration	119
3.4.2.3	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	122
3.4.3	Interaktion von Surf1 und Häm <i>a</i> Synthase	126
3.4.4	Proteinkristallisation	128
3.5	Homologe Aufreinigung von Surf1 aus <i>P. denitrificans</i>.....	131
3.5.1	Hämgehalt	132
3.5.2	Koelution von COX Untereinheit I.....	133
3.5.3	Nachreinigung von Surf1 mittels Anionentauscher	135
3.5.4	Analytische Gelfiltration.....	138
3.5.5	Native Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	140
4	Diskussion	143
4.1	<i>surf1</i>-Deletionen	147
4.2	Hämbindung von Surf1	151
4.3	Interaktion von Surf1 mit anderen Proteinen	156
4.4	Surf1 als Hämtransportmolekül	159
5	Zusammenfassung	165
6	Literaturverzeichnis.....	167
	Abkürzungsverzeichnis.....	I
	Aminosäuresequenzen.....	V
	Publikationen	VII
	Lebenslauf.....	IX
	Eidesstattliche Erklärung	XI
	Danksagung	XIII

1 Einleitung

Das Leben ist auf die regelmäßige Zufuhr von Energie angewiesen. Sie wird benötigt, um ein ständiges Ungleichgewicht zu bewahren, das Leben erst ermöglicht. So müssen beispielsweise Ionengradienten aufrechterhalten werden, Makromoleküle synthetisiert und mechanische Arbeit für zelluläre Bewegungen ausgeführt werden. Alle diese Prozesse stehen außerhalb des thermodynamischen Gleichgewichts und nur konstante Energieumwandlung kann dieses Ungleichgewicht gewährleisten. Die Energiegewinnung lebender Organismen kann auf zwei Arten erfolgen, *chemotroph* über die Oxidation von Nährstoffen oder *phototroph* durch die Nutzung von Lichtenergie, wobei die Energie in eine für die Zelle leicht nutzbare Form umgewandelt wird. Über die Synthese von Nucleosid-Triphosphaten kann kurzfristig Energie gespeichert und auch transportiert werden, und das bei Lebewesen wichtigste energiespeichernde Nucleosid-Triphosphat ist das Adenosintriphosphat (ATP).

Das Auftreten von Sauerstoff in der Atmosphäre vor ca. 2,4 Milliarden Jahren beruht auf der Energieumwandlung früher Cyanobakterien über oxygene Photosynthese, bei der Sauerstoff als Abfallprodukt entsteht [1]. Ursprünglich toxisch für lebende Zellen, haben diese im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, den anfallenden Sauerstoff als Elektronenakzeptor für die ATP-Synthese zu nutzen. Bei der chemoorganotrophen Energieumwandlung werden die von Organismen aufgenommenen Nährstoffe im Verlauf kataboler Prozesse wie der Fettsäureoxidation, der Glykolyse und des Citratzyklus zu Kohlendioxid oxidiert. Diese Oxidationen liefern die reduzierten energiereichen Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenosindinukleotid (NADH) und Flavinadenindinukleotid (FADH₂). Im Rahmen der Regenerierung der Reduktionsäquivalente werden die Elektronen über die Atmungskette letztendlich auf molekularen Sauerstoff übertragen, und die freiwerdende Energie kann für die Synthese von ATP genutzt werden.

Die Komplexe der Atmungskette sind ein beeindruckendes Beispiel für die Vielfalt großer Enzymkomplexe, die im Zusammenspiel das Leben erst möglich machen. Die Untersuchung der Biogenese-Wege solcher komplizierter Enzyme ist deswegen unabdingbar, um die Grundprinzipien des Lebens zu verstehen.

1.1 Die mitochondriale Atmungskette

Für aerobe Organismen stellt die oxidative Phosphorylierung die Hauptquelle für Energie in Form von ATP dar. Formal läuft dabei die exotherme Knallgasreaktion ab, also die Oxidation von Wasserstoff zu H_2O , und die dabei freigesetzte Energie kann in die für den Organismus verwertbare chemische Form des ATP umgewandelt werden. Ausgehend von NADH und zu geringerem Umfang FADH_2 werden die Elektronen über eine Folge von membrangebundenen Redoxzentren, auch als Atmungskette bezeichnet, auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die dabei nutzbare freie Enthalpie wird zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über eine Membran genutzt. Ein gerichteter Rückstrom der Protonen in Richtung des Gradienten erlaubt unter Nutzung der freien Energie die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP und dessen Freisetzung. Die Kopplung von Elektronentransfer und Protonentransport zur Energieerzeugung wurde erstmals von Mitchell in seiner chemiosmotische Theorie beschrieben [2].

Die Komplexe der Atmungskette sind bei Eukaryonten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, während sie bei Prokaryonten in der Cytoplasmamembran zu finden sind.

Das Elektronentransportsystem besteht aus vier hintereinander geschalteten membranständigen Enzymkomplexen (Abb. 1.1): der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), der Ubichinol:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (Komplex III oder bc_1 -Komplex) und der Cytochrom *c* Oxidase (COX, Komplex IV). Sie vermitteln den Elektronentransfer von NADH bzw. FADH_2 auf molekularen Sauerstoff, während die Komplexe I, III und IV einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran aufbauen. Neben den vier membranständigen Komplexen sind zusätzlich zwei bewegliche Elektronenüberträger notwendig: das lipophile Ubichinon und das meist hydrophile Protein Cytochrom *c*. Die ATP-Synthase wird oft als Komplex V bezeichnet, obwohl sie nicht am Elektronentransfer beteiligt und formal nicht zur Atmungskette gezählt wird. Die Protonen fließen durch den Komplex V zurück auf die Matrixseite der Membran.

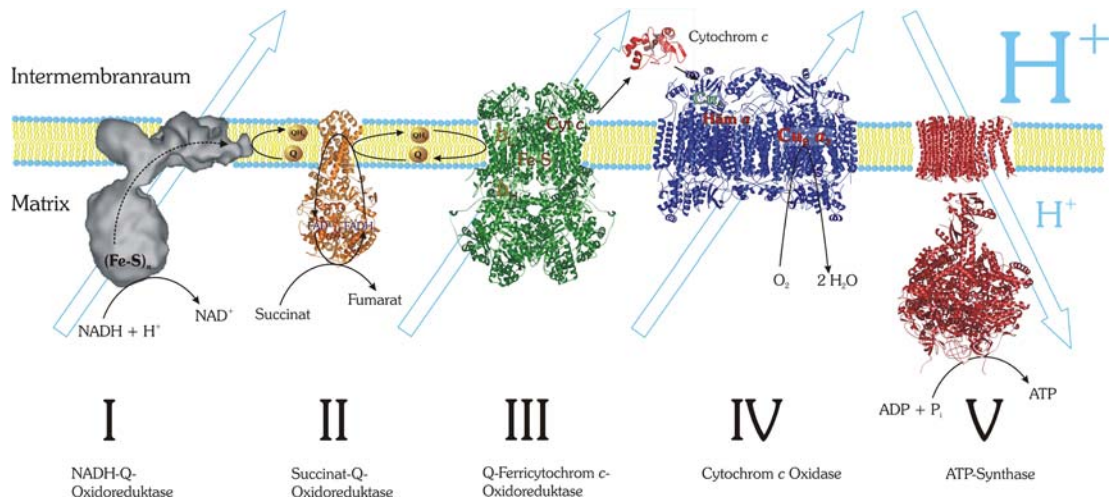


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien. Abbildung entnommen aus [3]

Die Elektronen des NADH treten über Komplex I in die Atmungskette ein, wo die Oxidation von NADH zu NAD^+ erfolgt. Nach der Bindung des NADH an der Matrixseite werden die beiden Elektronen zunächst auf ein Flavinmononukleotid (FMN) übertragen, das als prosthetische Gruppe dem Enzym angehört. Von dort gelangen die Elektronen stufenweise über acht Eisen-Schwefel-Zentren vom Typ $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ und $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ auf das Ubichinonmolekül (Q), das zu Ubihydrochinol (QH_2) reduziert wird. Dabei werden durch einen bisher noch ungeklärten Mechanismus zwei Protonen pro Elektron über die Membran transferiert [4]. Der bovine Komplex I beinhaltet 45 verschiedene Untereinheiten und ist damit einer der größten bekannten membrangebundenen Proteinkomplexe [5]. Er besteht aus einem in die Membran eingebetteten hydrophoben Teil und einem hydrophilen Arm, der aus der Membran in die Matrix ragt, so dass der gesamte Komplex die Form des Buchstaben L annimmt.

Auch über Komplex II werden Elektronen auf Ubichinon übertragen, dies stellt einen alternativen Eintrittspunkt von Elektronen in die Atmungskette dar, wodurch Komplex I umgangen werden kann. Als Elektronendonator fungiert hier Succinat, das zu Fumarat oxidiert wird. Die Elektronen werden zunächst an FAD abgegeben, das zu FADH_2 reduziert wird. Über Eisen-Schwefel-Zentren gelangen die Elektronen schließlich zu Ubichinon. Im Gegensatz zu den anderen Komplexen werden von Komplex II keine Protonen transportiert, da das Elektronenübertragungspotential von FADH_2 auf Ubichinon zu gering ist [6].

Das kleine hydrophobe Ubichinolmolekül überträgt die Elektronen auf Komplex III. Aufgrund seiner beiden *b*-Typ Häme und des *c*-Typ Häms nennt man den Komplex III auch Cytochrom *bc*₁-Komplex. Die Elektronenübertragung innerhalb dieses Komplexes erfolgt über einen verzweigten Redoxmechanismus, der Q-Zyklus genannt wird [7]. Die Elektronen müssen von einem Zwei-Elektronen-Überträger (Ubichinol) auf einen Ein-Elektronen-Überträger (Cytochrom *c*) weitergeleitet werden. Sie passieren dabei die beiden *b*-Typ Häme und das Eisen-Schwefel-Zentrum, bis sie auf das Häm *c*₁ übertragen werden. Von dort gelangen die Elektronen auf das lösliche Cytochrom *c* [8]. Auch dieser Komplex fungiert als Protonentranslokase, wobei pro übertragenem Elektronenpaar zwei Protonen in den Intermembranraum überführt werden. Außerdem erscheinen zwei weitere Protonen aus der chemischen Reaktion auf der Intermembranseite.

Cytochrom *c* gibt die Elektronen nun an die Cytochrom *c* Oxidase (COX) weiter. Dieser Komplex gehört mit seinen beiden *a*-Typ Hämen und den zwei Kupferzentren zur Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen [9]. Er katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor. Die Elektronen werden zunächst vom Cu_A-Zentrum auf Häm *a* und dann zum Häm *a*₃-Cu_B-Zentrum transferiert, an dem dann die Reduktion des Sauerstoffs erfolgt. In mehreren Schritten werden hier nacheinander vier Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei zwei Moleküle Wasser gebildet werden. Zusätzlich werden vier Protonen von der Matrixseite in den Intermembranraum transferiert. Eine detailliertere Beschreibung dieses Komplexes erfolgt in den folgenden Abschnitten.

Durch den Transfer von Protonen von der Matrixseite der Mitochondrien in den Intermembranraum durch die Komplexe I, III und IV ändern sich das Membranpotential und der pH-Wert in den jeweiligen Kompartimenten. Dies resultiert in einer protonenmotorischen Kraft, und die Energie dieses elektrochemischen Protonengradienten wird von der F₀F₁-ATP-Synthase (Komplex V) zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt. Die innere Mitochondrienmembran ist für Protonen impermeabel, so dass der Ausgleich des Konzentrationsgradienten durch die Passage von Protonen durch den membranständigen F₀-Teil des Enzyms erfolgt, und der Protonenfluss führt zur Rotation der zentralen γ -Untereinheit im F₁-Teil der ATP-Synthase. Diese Rotation begünstigt Konformationsänderungen in den drei katalytischen Untereinheiten, wodurch die Energie zur Freisetzung von ATP zur Verfügung steht [10].

Die oxidative Phosphorylierung generiert den Großteil der Energie für die eukaryotische Zelle und nimmt damit eine zentrale Rolle in ihrem Energiehaushalt ein. Defekte der mitochondrialen Atmungskette sind häufig Ursache schwerer Krankheiten [11]. Insbesondere die Assemblierung dieser Multikomponenten-Komplexe stellt die Zelle vor eine große Herausforderung, und die einzelnen Mechanismen sind bisher nicht annähernd aufgeklärt [12].

1.2 *Paracoccus denitrificans* als Modellorganismus

1.2.1 Das Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans*

Das Gram-negative, kokkenförmige Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* wurde erstmals 1908 von Martinus Beijerinck als *Micrococcus denitrificans* isoliert, und über seine Fähigkeit, Nitrat in molekularen Stickstoff umzuwandeln, selektioniert [13].

Über 16S-rRNA-Sequenzvergleiche konnte es der α_3 -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet werden [14]. Zu dieser Gruppe gehören auch die photosynthetischen Bakterien *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodobacter capsulatus*, mit denen *P. denitrificans* eng verwandt ist [15].

P. denitrificans galt lange als einziger Vertreter der Gattung *Paracoccus*, allerdings konnten inzwischen weitere Bakterien dieser Gattung zugeordnet werden [16]. Alle *Paracoccus*-Spezies weisen mit bis zu 70% einen hohen Guanosin/Cytosin-Gehalt der genomischen DNA auf [16]. Die Sequenzierung des Genoms des *P. denitrificans*-Stammes Pd1222 wurde 2006 fertig gestellt und veröffentlicht [17]. Das Genom besteht aus drei separaten DNA-Molekülen, den Chromosomen 1 und 2, sowie einem Megaplasmid mit Größen von ca. 2,9, 1,7 bzw. 0,65 Mbp [18].

P. denitrificans ist in der Lage, sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen. Das Bakterium nutzt dabei eine Vielzahl an Substraten als Energiequelle, die der Boden als Lebensraum enthält. Neben heterotrophen Wachstum auf Succinat können Methanol und Methylamin als C_1 -Quellen dienen [19], sowie eine Reihe von anorganischen Verbindungen wie Wasserstoff, Sulfit und Thiosulfat als Elektronendonatoren verwendet werden [20].

Die Anpassung an verschiedene Wachstumsbedingungen zeigt sich auch im Aufbau eines komplexen und verzweigten Elektronentransportsystems. Neben der aeroben Atmung mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor bietet die anaerobe Atmung mit verschiedenen Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen als terminale Elektronenakzeptoren eine weitere Möglichkeit der Energiegewinnung [21, 22].

Die Endosymbionten-Hypothese besagt, dass die in Eukaryoten vorkommenden Chloroplasten und Mitochondrien bakteriellen Ursprungs sind [23]. Der Hypothese nach werden Bakterien aus der α_3 -Untergruppe der Proteobakterien wie *P. denitrificans* als Nachkommen eines gemeinsamen Vorfahren heutiger Mitochondrien gesehen [24, 25].

1.2.2 Die Atmungskette von *Paracoccus denitrificans*

Die Elektronentransportkette von *P. denitrificans* dient als Modell für die mitochondriale Atmungskette. Obwohl sie deutlich einfacher aufgebaut sind und weniger Untereinheiten als ihre mitochondrialen Pendanten besitzen, weisen die aeroben Atmungskettenkomplexe von *P. denitrificans* eine deutliche Homologie zu denen der Mitochondrien auf [24]. Die aerobe Elektronentransportkette besitzt dabei im Gegensatz zu anderen bakteriellen Modellorganismen (z. B. *E. coli*) alle vier Transmembrankomplexe [15].

Im Unterschied zu den Mitochondrien ist die Elektronentransportkette von *P. denitrificans* komplexer und weit verzweigt (Abb. 1.2). Dies ermöglicht dem Bakterium die optimale Anpassung an verschiedenste Umweltbedingungen. In Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration werden so verschiedene terminale Oxidasen genutzt. Bei hoher Sauerstoffkonzentration wird die aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase exprimiert, die der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase funktional entspricht (siehe Abschnitt 1.2.2.1). Zwischen bc_1 -Komplex und der aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase dient das Cytochrom c_{552} als Elektronenüberträger, das über eine N-terminale Membrandomäne in der Cytoplasmamembran verankert ist [26]. Daneben verfügt *P. denitrificans* über eine Reihe von weiteren *c*-Typ Cytochromen, wobei vor allem Cytochrom c_{550} als Elektronendonator an aerober und anaerober Atmung beteiligt ist [15, 27].

Einleitung

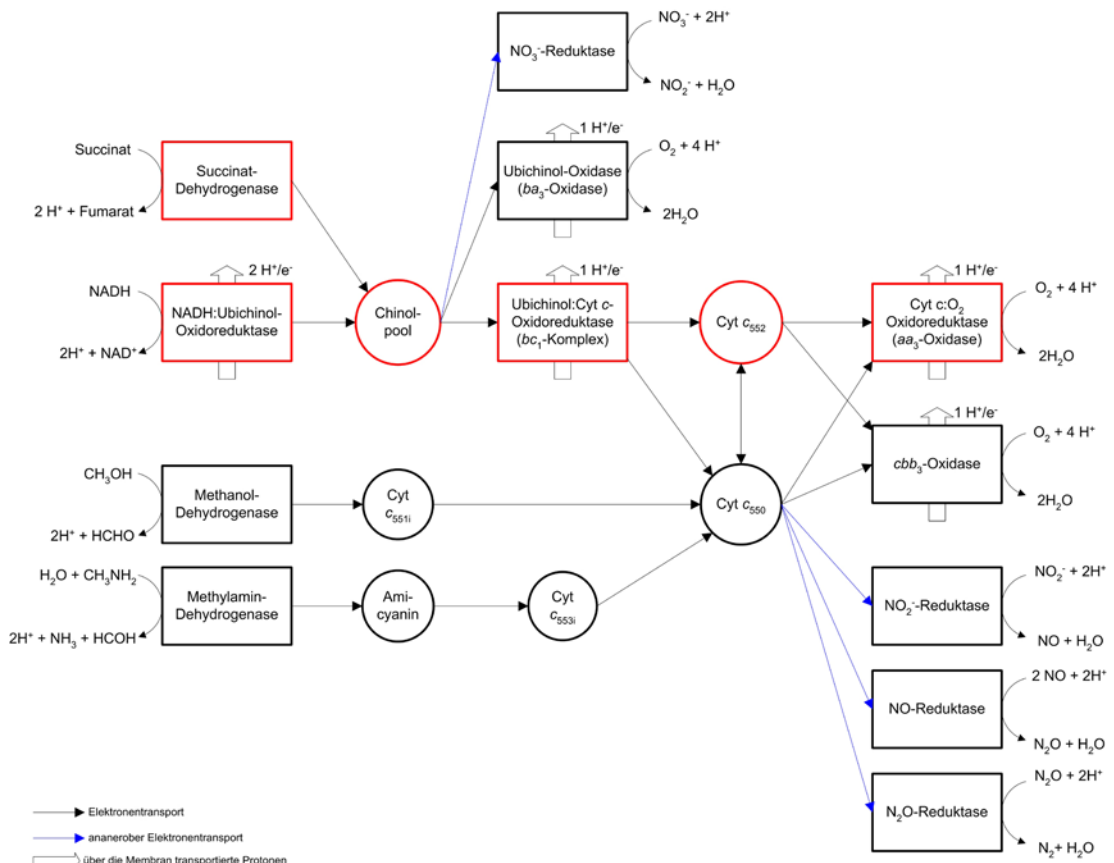


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette bei *P. denitrificans*. Die der mitochondrialen Atmungskette homologen Komponenten sind in rot dargestellt.

Außer der *aa₃*-Oxidase steht *P. denitrificans* eine weitere terminale Cytochrom *c* Oxidase zur Verfügung. Die *cbb₃*-Cytochrom *c* Oxidase besitzt eine höhere Sauerstoffaffinität und wird bei niedrigen O₂-Partialdrücken exprimiert. Der Elektronentransfer von Cytochrom *c* zum Sauerstoff ist auch hier an einen Protonentransfer über die Membran gekoppelt [28]. Zusätzlich zu den beiden Cytochrom *c* Oxidasen besitzt das Bakterium eine dritte terminale Oxidase, die Ubichinol als Elektronendonator verwendet (siehe Abschnitt 1.2.2.2).

Neben den drei terminalen Oxidasen verfügt *P. denitrificans* über eine Reihe von terminalen Reduktasen. Diese ermöglichen dem Bakterium anaerobes Wachstum in Abwesenheit von Sauerstoff, wobei Nitrat, Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffoxid als terminale Elektronenakzeptoren fungieren [29].

1.2.2.1 Die aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase

Die aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase ist eine der drei terminalen Oxidasen von *P. denitrificans*. Sie entspricht dem mitochondrialen Komplex IV und gehört ebenfalls der Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen an [30]. Das Enzym katalysiert den Elektronentransfer von Cytochrom *c* auf Sauerstoff, und im Laufe eines kompletten Zyklus der Sauerstoffreduktion werden insgesamt acht Elektronen von der Cytoplasmaseite aufgenommen. Vier Protonen werden für die Wasserbildung benötigt, während weitere vier Protonen über die Membran transloziert werden.

Im Gegensatz zur Cytochrom *c* Oxidase der mitochondrialen Membran, die als Dimer aus je bis zu 13 Untereinheiten (UE) besteht, enthält das *Paracoccus* Enzym nur vier Untereinheiten mit einem Gesamtmolekulargewicht von 126 kD. Mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse konnte die Struktur des Komplexes bereits aufgeklärt werden [31, 32], und die Untereinheiten I, II und III weisen in Sequenz und Aufbau große Ähnlichkeit mit dem *Core*-Enzym der mitochondrialen Oxidase auf (Abb. 1.3).

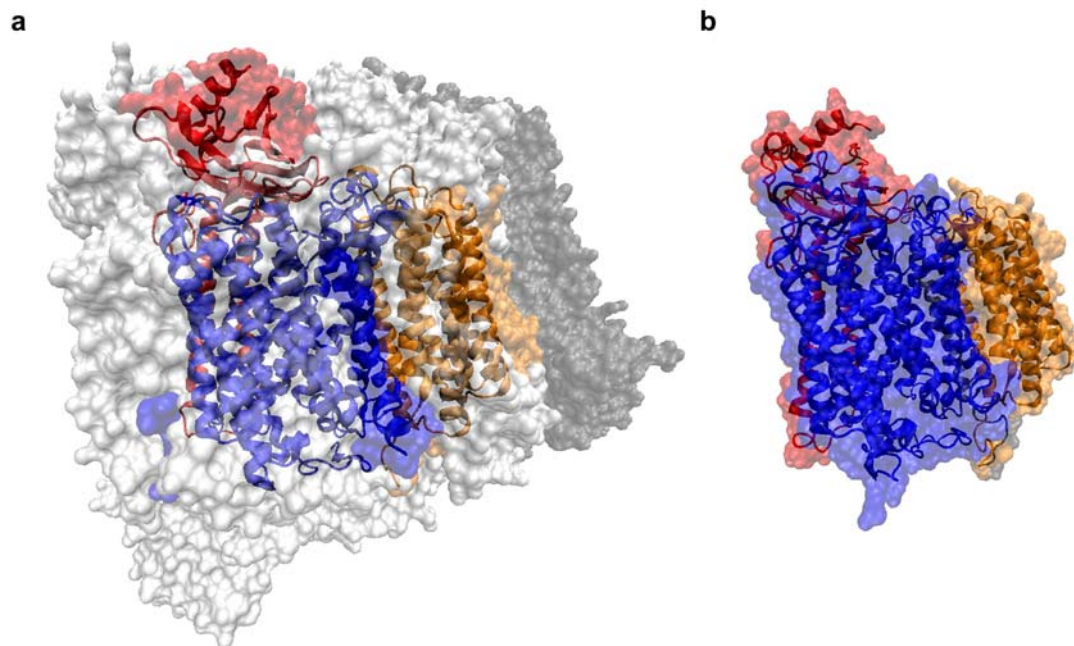


Abbildung 1.3: Struktureller Vergleich der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase und der aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans*. (a) Dimer der Oxidase aus *Bos taurus* (pdb-Code: 1V54). Im Vordergrund sind die der mitochondrial kodierten *Core*-Untereinheiten UEI (blau), UEII (rot) und UEIII (orange) hervorgehoben, während die nukleären Untereinheiten in hellgrau angedeutet sind. Das zweite Monomer ist im Hintergrund in dunkelgrau gezeigt. (b) Raumstruktur der *P. denitrificans* Oxidase (pdb-Code: 1QLE). Untereinheit I ist in blau dargestellt, UEII in rot und UEIII in orange. Die vierte Untereinheit ist in dieser Darstellung nicht sichtbar. Das Bild wurde mit dem Programm VMD erstellt.

Untereinheit I mit ihren zwölf Transmembranhelices ist die größte Untereinheit des Komplexes und ist fast komplett in die Membran eingebettet. Sie enthält drei Redoxzentren, das *low-spin* Häm *a* und das *high-spin* Häm *a*₃ sowie das Cu_B-Ion. Zwei Histidinseitengruppen bilden die beiden axialen Liganden des Häm *a*-Moleküls, während das Häm *a*₃ nur von einem Histidin ligandiert wird. In der unmittelbaren Umgebung von Häm *a*₃ liegt das Cu_B-Ion, das zusammen mit Häm *a*₃ das aktive Zentrum des Enzyms bildet, an dem die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser stattfindet. Die Ligandierung des Cu_B wird ebenfalls von drei Histidinseitengruppen übernommen. Außerdem befinden sich die Protonenkanäle für die Aufnahme der Protonen von der Cytoplasmaseite in Untereinheit I, wobei man zwischen dem so genannten D-Kanal und dem K-Kanal unterscheidet.

In Untereinheit II liegt mit dem Cu_A-Zentrum die Elektroneneintrittsstelle der Oxidase [33]. Sie besitzt zwei N-terminale Transmembranhelices und eine hydrophile periplasmatische Domäne, in der das Cu_A-Zentrum liegt. Dieses Redoxzentrum enthält zwei Kupferionen mit unterschiedlicher Ladung (Cu^I • Cu^{II}). Im Laufe der Biogenese von Untereinheit II wird die Polypeptidkette prozessiert, wobei N-terminal eine hydrophobe Signalhelix mit etwa 28 Aminosäuren und C-terminal weitere 17 Aminosäuren abgeschnitten werden [34].

Die ebenfalls sehr hydrophobe Untereinheit III besteht aus sieben Transmembranhelices und enthält keine Redoxfaktoren. Sie ist nicht essentiell für die Funktion des Enzyms, spielt aber möglicherweise eine Rolle bei der Assemblierung [35]. Allerdings scheint ihr Verlust zur so genannten Suizid-Inaktivierung zu führen, einem durch Sauerstoffumsatz ausgelöster Aktivitätsverlust der Oxidase [36], und man nimmt daher an, dass Untereinheit III die Integrität des Häm *a*₃-Cu_B-Zentrums während des Substratumsatzes sichert [37].

Untereinheit IV ist die kleinste der vier Untereinheiten und besteht aus einer Transmembranhelix. Sie besitzt keinerlei Homologien zu denen im Nukleus kodierten Untereinheiten mitochondrialer Oxidasen und scheint keinen Einfluss auf die Struktur oder Funktion des Enzyms zu haben [38].

Die Gene für die Cytochrom *c* Oxidase sind auf vier verschiedene Loci im Genom von *Paracoccus denitrificans* verteilt. Für Untereinheit I sind zwei Genorte bekannt, das *ctaDII*-Gen und sein Isogen *ctaDI*, wobei beide Gene getrennt voneinander und dem *cta*-Operon im Genom vorliegen. Dies gilt auch für das Gen für Untereinheit IV

ctaH. Die Gene für Untereinheit II *ctaC* und Untereinheit III *ctaE* sind im so genannten *cta*-Operon organisiert. Das Gen *ctaC* stellt das erste in diesem Operon dar, gefolgt von *ctaB*, das für die Farnesytransferase oder Häm *o* Synthase kodiert. Danach schließt sich ein noch unbekannter offener Leserahmen (*orf*) an, dem das *ctaG*-Gen folgt. Dieses Gen wird im Zusammenhang mit dem Cu_B-Einbau in Untereinheit I diskutiert [39]. Das ursprünglich letzte Gen im *cta*-Operon stellte das Gen für Untereinheit III, *ctaE*, dar. Allerdings befindet sich etwa 60 bp stromabwärts ein weiteres Gen, *surflc*, das für einen möglichen Assemblierungsfaktor der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase kodiert und im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurde (siehe folgende Abschnitte).

1.2.2.2 Die *ba*₃-Ubichinoloxidase

Die *ba*₃-Ubichinoloxidase (QOX) ist neben der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase und der *cbb*₃-Cytochrom *c* Oxidase die dritte terminale Oxidase von *P. denitrificans* (Abb. 1.2). Sie gehört ebenfalls zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen [30] und weist hohe Homologien zur *bo*₃-Chinoloxidase von *E. coli* und zur *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase auf [40]. Das Enzym vermittelt den Elektronentransfer von Ubihydrochinol auf molekularen Sauerstoff, wobei sie ebenfalls als Protonenpumpe fungiert und ein Proton pro Elektron über die Membran transportiert. Durch die Übertragung der Elektronen von Ubihydrochinol auf molekularen Sauerstoff durch die *ba*₃-Ubichinoloxidase kann der *bc*₁-Komplex umgangen werden, was jedoch in einer geringeren Energieausbeute resultiert.

Die *ba*₃-Ubichinoloxidase besteht aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 154 kD. Die größten Homologien zu anderen terminalen Oxidasen finden sich in Untereinheit I. Sie besteht aus 15 Transmembranhelices, und in ihr sind neben dem *low-spin* Häm *b* auch das binukleäre Zentrum aus Häm *a*₃ und Cu_B lokalisiert [41]. Die Ligandierung der Redoxzentren findet auch hier über die sechs für Häm-Kupfer-Oxidasen typischen konservierten Histidinreste statt. Die Raumstruktur der *ba*₃-Ubichinoloxidase von *Paracoccus* ist noch nicht aufgeklärt, allerdings zeigen Strukturdaten der sehr verwandten *bo*₃-Chinoloxidase aus *E. coli* eine Ubichinol-Bindungstelle in Untereinheit I, die durch konservierte Bereiche in

den Helices I und II gebildet wird [42]. Auch die Protonenkanäle für die Wasserbildung und die Translokation liegen in Untereinheit I.

Untereinheit II besteht analog zu Untereinheit II der *aa₃*-COX aus zwei Transmembranhelices und einer hydrophilen Domäne, die ins Periplasma ragt. Allerdings fehlt dieser Untereinheit das binukleäre Cu_A-Zentrum. Bei der Biogenese wird Untereinheit II mit einer Signalsequenz translatiert, die im Anschluss abgeschnitten wird [43].

Untereinheit III besteht aus fünf Transmembranhelices, und über ihre Funktion ist bisher wenig bekannt. Untereinheit IV wird aus drei Transmembranhelices gebildet und weist keinerlei Homologie zu Untereinheit IV der *aa₃*-Oxidase auf. Obwohl sie nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt ist, führt eine Mutation der Untereinheit IV bei der *bo₃*-Ubichinioxidase aus *E. coli* zu einem Verlust des Cu_B-Einbaus [44].

Im Gegensatz zu den Genen der *aa₃*-Cytochrom *c* Oxidase sind die Gene der *ba₃*-Ubichinioxidase nicht über das *Paracoccus* Genom verteilt, sondern sind in einem einzigen Operon organisiert. Das *qox*-Operon beginnt mit dem *qoxA*, das für Untereinheit II kodiert. Danach folgt das Gen *qoxB* für Untereinheit I und die Gene *qoxC* und *qoxD*, die für Gen für die Untereinheiten II und III kodieren. Im Anschluss an *qoxD* konnte ein weiteres Gen in diesem Operon als *surfl*-Homolog identifiziert werden, das im Zusammenhang mit der Assemblierung der Oxidase diskutiert wird [45]. Auf dieses Gen wird in den weiteren Abschnitten dieser Arbeit ausführlicher eingegangen.

1.3 Biogenese der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase

Der Aktivitätsverlust von Komponenten der Atmungskette hängt mit einer Vielzahl von neurologischen Störungen und anderen schweren Symptomen zusammen [11]. In den letzten Jahren wurde das Augenmerk verstärkt auf die Biogenese der Atmungskettenkomplexe gelenkt, da besonders Defekte der Assemblierung häufig mit schweren Krankheiten assoziiert sind [12]. Als terminales Enzym der Atmungskette nimmt die Cytochrom *c* Oxidase eine besonders wichtige Rolle für den Energiehaushalt der aeroben Zelle ein, und Defekte der Oxidase sind eine der

häufigsten Ursache für unterschiedlichste klinische Symptome [46, 47] (siehe Abschnitt 1.3.3).

Die mitochondriale Cytochrom *c* Oxidase besteht in Säugern aus 13 Untereinheiten, von denen nur die drei *Core*-Untereinheiten von mitochondrialer DNA kodiert werden, während die Gene der weiteren zehn Untereinheiten im Zellkern lokalisiert sind. Die Funktion der zehn akzessorischen Untereinheiten ist bisher nicht vollständig bekannt, und man nimmt eine Rolle bei der Regulation der COX-Aktivität an [48].

Die Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase ist ein komplizierter gerichteter Prozess. So müssen Transkription und Translation zweier verschiedener genetischer Systeme aufeinander abgestimmt und reguliert werden, Membraninsertion, Kofaktor-Biosynthese und –Einbau koordiniert und der Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten kombiniert werden. In Hefe konnten bisher mehr als 30 Proteinfaktoren identifiziert werden, die an der Assemblierung der COX beteiligt sind [49], und oft ist deren Funktion noch nicht aufgeklärt. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über einige Assemblierungsfaktoren und deren mögliche Funktion.

Der Mechanismus der Assemblierung der einzelnen Untereinheiten in der inneren Mitochondrienmembran zu einem funktionsfähigen Enzym ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Studien an humanen Leukämie-Zellen deuten auf drei Intermediate beim Zusammenbau des Holoenzymkomplexes hin, die unter verschiedenen Bedingungen in der Zelle akkumulieren können [50].

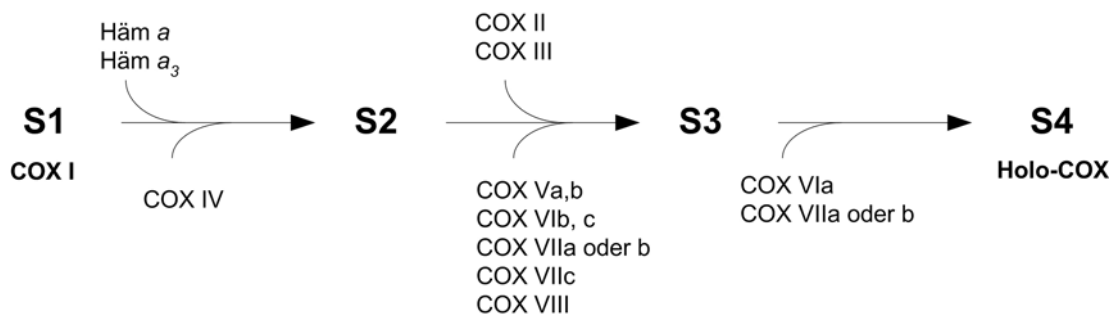


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der vier Assemblierungsintermediate bei der humanen COX-Biogenese nach Nijtmans [50]

Die Assemblierung beginnt demnach mit dem Einbau von UEI in die innere Mitochondrienmembran (Abb. 1.4; S1), und nach dem Kofaktoreinbau bildet sich zusammen mit UEIV das nächste Intermediat (S2). Danach binden die beiden

anderen *Core*-Untereinheiten UEII und UEIII, sowie weitere nukleäre Untereinheiten (S3) und durch die Assoziation der beiden letzten UE wird das fertige Holoenzym zusammengestellt.

Tabelle 1.1: Auswahl an Oxidase-Assemblierungsfaktoren in Hefe (Details, siehe Text)

Protein	Funktion	Humanes Homolog
Translationsaktivatoren		
Pet309	aktiviert Translation der UEI mRNA	LRPPRC
Mss51	reguliert UEI Translation	
Cox14	reguliert UEI Translation	
Pet111	aktiviert Translation der UEII mRNA	
Pet54	aktiviert Translation der UEIII mRNA	RBM9
Membraneinbau		
Oxa1	Membraneinbau mitochondrialer UE	Oxa1
Mba1	Oxa1-unabhängiger Membraneinbau	
Cox18	UEII Einbau	Cox18
Mss2	Translokation des C-Terminus von UEII	
Häm-Biosynthese		
Cox10	Häm α Synthase (Farnesyltransferase)	Cox10
Cox15	Häm β Synthase	Cox15
Kupfereinbau		
Sco1/Sco2	beteiligt am Kupfereinbau in UEII	Sco1/Sco2
Cox11	beteiligt am Kupfereinbau in UEI	Cox11
Cox17	Kupferchaperon	Cox17
Untereinheiten spezifische Proteine		
Cox20	Chaperon für UEII	Cox20
Pet100	erleichtert Einbau nukleärer UE	
Funktion unbekannt		
Shy1	Häm β -Einbau, Subkomplex-Assemblierung	Surf1
Coa1	beteiligt an Bildung früher Intermediate	
Coa2	Unbekannt	

Die Darstellung der Assemblierung in vier Intermediaten gibt nur einen sehr groben Überblick über die tatsächliche Abfolge der COX-Biogenese, und im Folgenden soll auf die einzelnen Schritte genauer eingegangen werden. Da die Assemblierung der

Cytochrom *c* Oxidase bisher am besten in *S. cerevisiae* untersucht wurde, beziehen sich die folgenden Abschnitte hauptsächlich auf die Ereignisse in Hefe.

1.3.1 Assemblierung der Core-Untereinheiten

Die Assemblierung der *Core*-Untereinheiten ist von besonderer Bedeutung, da die Untereinheiten I und II den katalytischen Kern des Enzyms bilden und alle für die Aktivität benötigten Kofaktoren beinhalten.

Abbildung 1.5 zeigt vereinfacht die separate Biogenese der drei *Core*-Untereinheiten in Hefe und einige daran beteiligte Assemblierungsfaktoren. Auf die einzelnen Schritte wird im Folgenden eingegangen.

COXI, COXII und COXIII sind auf der mitochondrialen DNA kodiert und werden an mitochondrialen Ribosomen translatiert. In Hefe-Mitochondrien binden Translationsaktivatoren an den nicht-kodierenden 5'-Bereich der mRNA und regulieren die Translation [51]. Diese Aktivatoren interagieren über Nam1 mit der RNA-Polymerase und koppeln so Transkriptions- und Translationsprozesse [52], wobei jede Untereinheit ihre eigenen Regulationsfaktoren besitzt. Die Synthese von UEI steht unter der Kontrolle von Pet309 und Mss51, die Translation von UEII wird über Pet111 reguliert und UEIII über Pet54, Pet122 und Pet494 [49]. Die Aktivatoren sind mit der Matrixseite der inneren mitochondrialen Membran assoziiert und interagieren miteinander, um die Syntheserate der drei Untereinheiten zu koordinieren. Zusätzlich scheinen sie Transkription und Proteinsynthese an spezifische Regionen der Membran zu leiten und so Assemblierungsstellen an der inneren Membran zu definieren [53].

Der Membraneinbau der drei *Core*-UE wird von Oxa1 katalysiert, einem homooligomeren Komplex in der inneren Membran. Oxa1 gehört einer großen Membranproteinfamilie, die die Insertion von Membranproteinen in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien vermittelt [54]. Der Einbau in die Membran findet kotranslational statt, wobei Oxa1 über seine C-terminale Domäne mit dem mitochondrialen Ribosom wechselwirkt. In Hefe scheint neben Oxa1 auch Mba1 an der Membraninsertion mitochondrialer Proteine, insbesondere von Domänen mit wenigen oder keinen Ladungen, beteiligt zu sein. Das Protein ist zwar mit der

inneren Membran assoziiert, allerdings kein integrales Membranprotein und seine genaue Funktion ist bisher unklar [55].

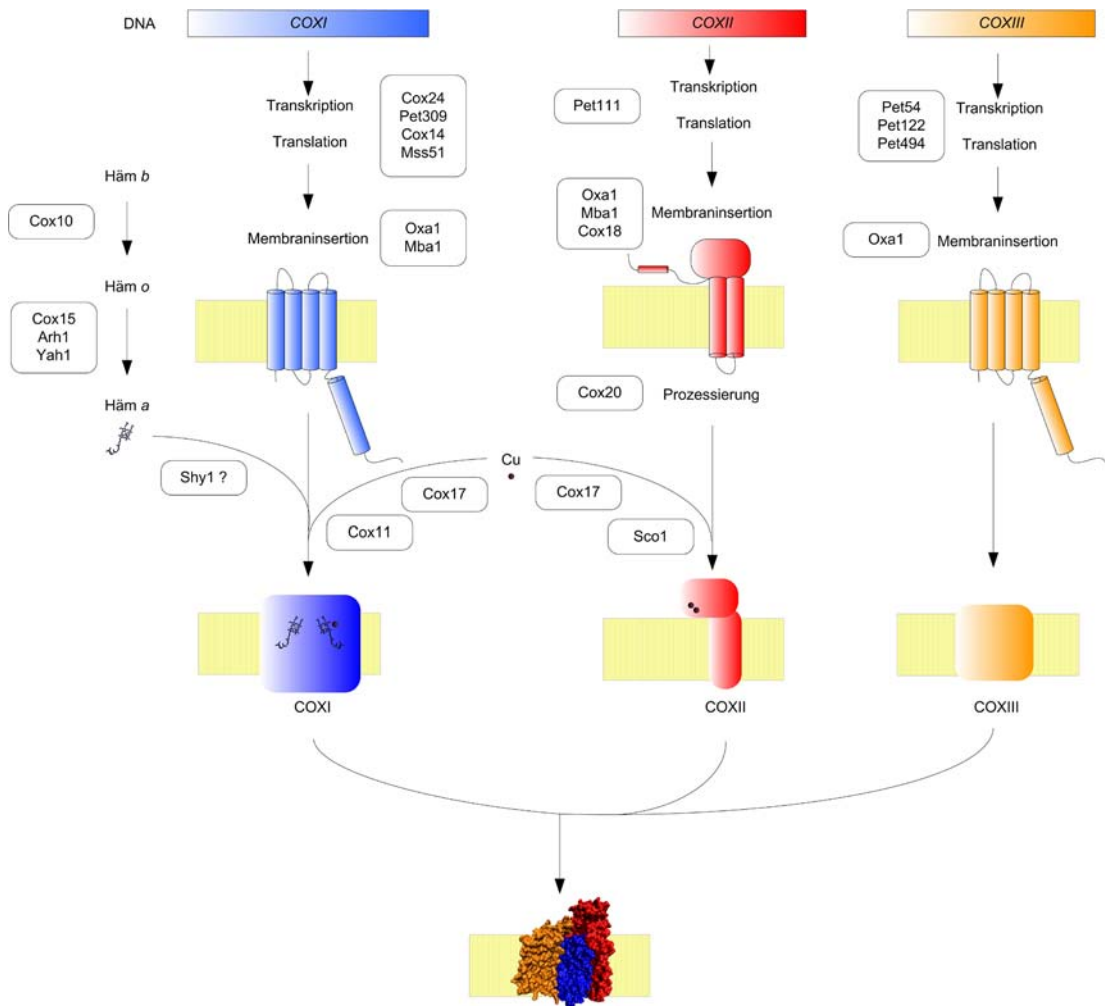


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der separaten Assemblierung der drei mitochondrial-kodierten Core-Untereinheiten in Hefe. An den einzelnen Schritten beteiligte Assemblierungsfaktoren sind in Kästen hervorgehoben. Die Abbildung wurde modifiziert nach [49]. Für Details siehe Text.

1.3.1.1 Biogenese von Untereinheit I

Untereinheit I der COX ist mit seinen 12 Transmembranhelices ein stark hydrophobes Protein, und die zwei Häm *a* Kofaktoren sowie das Cu_B Ion sind tief in die Membrandomänen eingebettet. Bisher ist nur sehr wenig über die Mechanismen zum Kofaktoreinbau in apo-UEI bekannt, aber aufgrund der Lokalisation der Kofaktoren im Inneren des Proteins wird ein kotranslationaler Einbau während der Membraninsertion angenommen [56].

Häm *a* wird in der Zelle ausschließlich für die Cytochrom *c* Oxidase benötigt, und das weit verbreitete Häm *b* wird in zwei Schritten in Häm *a* umgewandelt. Im ersten Schritt wird über die Farnesylierung das Häm *o* Intermediat synthetisiert. Diese Reaktion wird von der Farnesyltransferase Cox10 (auch Häm *o* Synthase) katalysiert. Im Anschluss wird eine Methylgruppe zu einer Formylgruppe oxidiert. Diese Reaktion wird von Cox15 (auch Häm *a* Synthase) katalysiert. Das Membranprotein Cox15 arbeitet möglicherweise zusammen mit mitochondrialem Ferredoxin Yah1 und der Ferredoxinreduktase Arh1 als Monooxygenase [57, 58]. Der Mechanismus des Häm *a*-Einbaus in Untereinheit I ist bisher noch nicht aufgeklärt (siehe Diskussionsteil dieser Arbeit).

Der Cu_B-Einbau wird höchstwahrscheinlich von Cox11 übernommen [59], einem Kupferbindeprotein, das über seine N-terminale Transmembranhelix in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Auch hier scheint ein kotranslationaler Einbau wahrscheinlich, da das Protein mit dem mitochondrialen Ribosom assoziiert ist [60, 61]. Der intrazelluläre Transport von Kupfer wird von einer Reihe kleiner löslicher Proteine gewährleistet, die man als Kupferchaperone bezeichnet. Eines dieser Chaperone ist Cox17, das sowohl im Cytosol als auch im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Man nimmt an, dass es als Kupfershuttle zwischen diesen Kompartimenten fungiert und das Mitochondrium mit Kupfer beliefert [62]. In einem *in vitro* Ansatz konnte ein Kupfertransfer von Cox17 auf Cox11 und Sco1 nachgewiesen werden [63], die genauen Mechanismen des Kupfertransfers von Cox17 auf Cox11 und von Cox11 auf UEI sind allerdings weiterhin unklar.

Neusynthetisierte UEI wird von einem Proteinkomplex aus Mss51 und Cox14 gebunden [64, 65]. Mss51 ist ein Matrixprotein, während Cox14 eine Transmembranhelix besitzt und nur wenig über seine Funktion bekannt ist. Mss51 hat eine zweifache Funktion bei der Oxidase-Biogenese. Es aktiviert einerseits die Translation von UEI, andererseits bindet es das neusynthetisierte Protein als Chaperon und kann in dieser Form die Translation nicht mehr beeinflussen. Erst durch die Assoziation mit anderen Untereinheiten und Assemblierungsfaktoren kann Mss51 den Komplex wieder verlassen, und die Proteinbiosynthese von UEI geht weiter [64, 65].

Nachdem Untereinheit I vollständig assembliert ist, bleibt sie auch nach der Assoziation mit anderen Untereinheiten an Chaperone gebunden. Bevor UEI mit

vollständig assemblierter UEII assoziiert, binden die beiden kleinen nukleären Untereinheiten V und VI (in Säugern COXIV und Va) [66]. Dieser Komplex entspricht dem bei humanen Zelllinien gefundenen Assemblierungsintermediat S2.

Das Hefe-Homolog von humanem Surf1, Shy1, bindet ebenfalls in einem frühen Stadium der Assemblierung. Obwohl wenig über die genaue Funktion des Proteins bekannt ist, nimmt man an, dass es UEI von Mss51 übernimmt und weitere Assemblierungsschritte ermöglicht [64], wobei es auch in späteren Schritten der Assemblierung mit UEI assoziiert bleibt [67]. Allerdings sind Mss51 und Cox14 nur in Pilzen zu finden, und Untersuchungen am bakteriellen Homolog von Shy1 in *R. sphaeroides* zeigen, dass das Protein am Häm α -Einbau beteiligt zu sein scheint [68]. Auf die möglichen Funktionen von Shy1 bzw. Surf1 wird in späteren Kapiteln dieser Arbeit noch genauer eingegangen.

1.3.1.2 Biogenese der Untereinheit II

Untereinheit II der COX ist die hydrophilste der drei *Core*-Untereinheiten. Sie besitzt zwei hydrophile Domänen im Intermembranraum, eine kleine N-terminale und eine große C-terminale, die von Oxa1 über die Membran exportiert werden [69]. Diese Reaktion ist abhängig vom Membranpotential, das die Translokation der negativ-geladenen Domänen auf die positive Seite der Membran erleichtert. Eukaryoten besitzen mit Cox18 noch ein weiteres Oxa1-Homolog, dem die Ribosomen-Bindedomäne fehlt und das im Gegensatz zu Oxa1 spezifisch für COX-Biogenese ist [70]. Dieser Assemblierungsfaktor scheint bei der Translokation des hydrophilen C-Terminus eine Rolle zu spielen.

Nach der Insertion in die Membran wird das Protein von Cox20 gebunden, einem integralen Membranprotein, das als spezifisches Chaperon für UEII fungiert [71]. In Pflanzen und Pilzen wird UEII als Vorläuferprotein mit einer N-terminalen Verlängerung synthetisiert, die nach der Translokation über die innere Membran von einem Proteasekomplex abgespalten wird, und in Hefe scheint die Prozessierung von UEII von Cox20 abhängig zu sein [71].

In der C-terminalen Domäne liegt das Cu_A -Zentrum mit seinen beiden Kupferionen. Der Einbau der beiden Kupferionen wird höchstwahrscheinlich von Sco1 und Sco2 übernommen, die ihrerseits das Kupfer von Cox17 erhalten. Im Gegensatz zu

Säugetern scheint Sco2 in Hefe nicht für die Biogenese des Cu_A-Zentrums nötig zu sein. Der Mechanismus des Cu_A-Einbaus ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass Sco2 in Säugern als Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase für Sco1 auftritt, das den eigentlichen Kupfertransfer auf UEII übernimmt [72]. Allerdings konnte für das Bakterium *T. thermophilus* ein periplasmatisches Kupferchaperon PCu_AC als Donor für das Cu_A-Zentrum identifiziert werden, und dieses Protein wird in Bakterien häufig in einem Operon mit Sco-Homologen kodiert [73]. Nachdem UEII vollständig assembliert ist, assoziiert sie mit UEI und UEIII.

Die hohe Homologie der *Core*-Untereinheiten zu bakteriellen Oxidasen legt gemeinsame Elemente bei der Assemblierung dieser Untereinheiten nahe. Obwohl prokaryotische Oxidasen weit weniger kompliziert aufgebaut sind, sollten sich die Mechanismen insbesondere beim Kofaktoreinbau gleichen, und in der Tat werden alle bisher in Bakterien identifizierten COX-Assemblierungsfaktoren mit dem Kofaktoreinbau in Zusammenhang gebracht [74]. Die leichtere Handhabbarkeit von Bakterien und der einfachere Aufbau prokaryotischer Oxidasen machen sie deshalb zum idealen Modellorganismus für Untersuchungen zur Biogenese der mitochondrialen *Core*-Untereinheiten.

1.3.2 Assemblierung zur reifen Cytochrom c Oxidase

Die nukleär-kodierten Untereinheiten der COX müssen, wie auch die Reifungsfaktoren, in das Mitochondrium transportiert werden. Dies geschieht über die TOM-(*Translocase of Outer Membrane*) und TIM-(*Translocase of Inner Membrane*) Komplexe, die als Eintrittspunkte für cytosolisch exprimierte Proteine in das Mitochondrium dienen [75]. Für den Einbau in die innere Mitochondrienmembran existieren zwei verschiedene Wege, der *stop-transfer* Mechanismus, bei dem die Proteine über Tim23 lateral in die innere Membran eingebaut werden, und der *conservative sorting* Mechanismus, bei dem die Proteine über die mitochondriale Matrix in die innere Membran transloziert werden [75].

Wie die *Core*-Untereinheiten mit den akzessorischen Untereinheiten zur aktiven COX assemblieren, ist bisher nicht bekannt. Wie bereits beschreiben, assoziieren die

Untereinheiten V und VI (Hefenomenklatur) sehr früh mit Untereinheit I. Die meisten anderen akzessorischen Untereinheiten binden wahrscheinlich gleichzeitig mit UEII und UEIII an den bereits bestehenden UEI-V-VI-Komplex [50]. Subkomplexe von akzessorischen Untereinheiten interagieren mit dem membranständigen Assemblierungsfaktor Pet100, der wahrscheinlich deren Einbau in das Enzym ermöglicht [76].

Das aktive Holoenzym enthält neben seinen redoxaktiven Zentren noch weitere kleine Moleküle, wie ein Mg^{2+} -Ion zwischen Untereinheit I und II, ein Na^+ -Ion in Untereinheit I und ein Zink-Ion auf der Matrixseite in Untereinheit Vb. Mechanismen oder Chaperone, die diese Ionen in die COX einbauen, sind bisher unbekannt. Auch ist unklar, wie die postrationale kovalente Verknüpfung eines Cu_B -koordinierenden Histidins mit dem benachbarten Tyrosin in Untereinheit I zustande kommt. Ein Cardiolipin-Molekül scheint an der Bildung und Aufrechterhaltung des dimeren Zustands der COX beteiligt [77], und die Cytochrom *c* Oxidase assoziiert in vielen Organismen in so genannten Superkomplexen mit den Komplexen I und III der Atmungskette [78]. Auch hier sind die Mechanismen, die zur Bildung von Superkomplexen führen, noch nicht aufgeklärt.

1.3.3 COX-Defizienz

Defizienzen von Enzymen der Atmungskette können zu einer ganzen Bandbreite an enzephalopathischen und myopathischen Störungen führen.

Mutationen in den mitochondrial-kodierten Untereinheiten I, II und III der Cytochrom *c* Oxidase werden selten gefunden und führen oft erst spät in der Kindheit oder im frühen Erwachsenenalter zu klinischen Symptomen [12]. Die Beeinträchtigung der Enzymstabilität und -aktivität tritt aufgrund der hohen Anzahl an mtDNA-Kopien erst ab einem bestimmten Schwellenwert an Mutationen ein, und eine Reihe von klinischen Phänotypen wie Myopathie, MELAS (Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktat-Azidose und schlaganfallähnliche Symptome) und Enzephalomyopathien sind zu beobachten [79].

Tabelle 1.2: Auswahl an Genen, die mit COX-Defizienz assoziiert sind (nach [12, 47])

Gen	Funktion	Phänotyp
Mitochondriale Gene		
<i>COXI</i>	Strukturgen, UEI	MND (Motor Neuron Disease) Myopathie, Myoglobinurie
<i>COXII</i>	Strukturgen, UEII	Enzephalopathie, Myopathie
<i>COXIII</i>	Strukturgen, UEIII	Myopathie, Enzephalopathie, Myoglobinurie, MELAS
Nukleäre Gene		
<i>surf1</i>	früher Assemblierungsfaktor	Leigh-Syndrom
<i>sco1</i>	Kupfer-Chaperon	Ketoazidose, Leberversagen
<i>sco2</i>	Kupfer-Chaperon	hypertrophe Kardiomyopathie, Enzephalopathie
<i>cox10</i>	Häm o Synthese	Tubulopathie, Leukodystrophie
<i>cox15</i>	Häm a Synthese	hypertrophe Kardiomyopathie, Leigh Syndrom
<i>LRPPRC</i>	Translationsaktivator	LSFC (French-Canadian Leigh Syndrome)

Die meisten Krankheiten im Zusammenhang mit Cytochrom *c* Oxidase-Mangel sind daher autosomal-rezessiv vererbte Defekte, also Mutationen in chromosomalen Genen. Allerdings sind bisher noch keine Mutationen in den zehn nukleär-kodierten Strukturgenen der COX im Zusammenhang mit Enzephalomyopathien beschrieben worden [12].

Defekte im Ablauf der Assemblierung führen zu einem Aktivitätsverlust der Cytochrom *c* Oxidase und gehen oft mit schweren Krankheitsbildern einher. Nicht selten sind dafür Defekte von Assemblierungsfaktoren verantwortlich (Tabelle 1.2). Autosomal-rezessive vererbte Krankheiten brechen schon früh in der Kindheit aus und enden in ihrem Verlauf tödlich. Zu ihnen zählen unter anderen das Leigh Syndrom (siehe 1.3.3.1), hypertrophe Kardiomyopathie, Myopathie und fatale

infantile Lactatazidose. Die unterschiedliche klinische Darstellung insbesondere die Gewebe- und Organspezifität der einzelnen Krankheiten gibt außerdem Rätsel auf [46, 47].

1.3.3.1 Leigh-Syndrom

Die häufigste Form der mitochondrialen Enzephalomyopathien ist das Leigh-Syndrom, das erstmals 1951 beschrieben wurde [46]. Es handelt sich dabei um eine fatale neurodegenerative Störung mit bilateralen Läsionen des Hirnstamms und der Basalganglien [80] und morphologischen und histochemischen Defekten in Mitochondrien [81].

Die Ursachen für Leigh-Syndrom sind vielfältig, wobei jedoch immer eine Störung des mitochondrialen Energiestoffwechsels vorliegt. Defekte der Atmungskette sind häufig [82], und es wurden neben Mutationen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes vor allem Mutationen in verschiedenen Genen für Komponenten der Oxidativen Phosphorylierung entdeckt [83]. So findet man Mutationen in nukleär-kodierten Untereinheiten von Komplex I [84, 85] und dem Flavoprotein von Komplex II [86] und der mitochondrial kodierten Atp6-Untereinheit von Komplex V [87].

Auch Defekte der Cytochrom *c* Oxidase können das Leigh-Syndrom hervorrufen, und die Krankheit geht mit einem 80-90 %igem Verlust an Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität in allen Geweben einher [80, 88]. Die genetischen Ursachen liegen hier in Mutationen von Assemblierungsfaktoren. Als erstes konnte das *surfl*-Gen in Zusammenhang mit dem Leigh-Syndrom gebracht werden [89, 90], aber mittlerweile konnten auch Defekte in den Genen für die Häm *a* Synthase (Cox15) und eines Translationsaktivator für UEI-mRNA (TACO1) in Patienten mit Leigh-Syndrom identifiziert werden [91-93].

1.3.3.2 Der Assemblierungsfaktor Surf1

Surfl ist das erste Gen des hoch-konservierten *surfeit*-Genlocus auf Chromosom 9 (Chromosomenband 9p34), der eine Größe von etwa 60 kb hat. Dieser Genlocus

enthält sechs Haushaltsgene, die keinerlei Homologie untereinander in DNA-Sequenz oder Aminosäureabfolge aufweisen [94]. Das *surfl*-Gen umfasst 9 Exons und kodiert für ein 30 kD-Protein, das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Surf1 verfügt über eine N-terminale und eine C-terminale Transmembranhelix, die über einen im Intermembranraum liegenden Loop verknüpft sind [95].

Mehr als 40 verschiedene krankheitsauslösende Mutationen sind für das *surfl*-Gen bekannt, die alle mit Leigh-Syndrom und COX-Defizienz einhergehen [96].

Alle diese Mutationen führen zu verkürzten Formen des Proteins. Nur intaktes Protein kann in die Membran eingebaut werden, und das verkürzte Protein scheint instabil, so dass in Patienten mit Leigh-Syndrom kein Surf1 nachgewiesen werden kann. Die Abwesenheit von Surf1 führt zu einer starken Reduktion an vollständig assemblierter und funktionaler COX um bis zu 90 %. Obwohl Surf1 demnach nicht essentiell für die COX-Biogenese ist und seine genaue Funktion noch nicht aufgeklärt ist, scheint das Protein eine Rolle in frühen Stadien der Assemblierung zu spielen, da sich in Abwesenheit von Surf1 die Assemblierungsintermediate S1 und S2 (Abb. 1.4) in der Zelle ansammeln [66, 97, 98].

In mehreren eukaryotischen und prokaryotischen Spezies konnten Surf1-Homologe gefunden werden. Dabei ist die hohe Konservierung von Surf1 auffällig, und allen Proteinen können zwei Transmembranen zugeordnet werden [45].

Eines der am besten untersuchten ist das Hefe-Homolog Shy1 (*surfl* homolog of yeast). Es ist mit 45 kD um einiges größer als das humane Surf1 und wurde im Zusammenhang mit *pet*-Mutanten nachgewiesen [99]. Vor allem die zentrale Loop-Region des Proteins ist um einiges verlängert und weist keinerlei Homologien zu anderen Surf1-Proteinen auf. Interessanterweise kann humanes Surf1 Effekte einer Δ *shy1*-Deletion nicht aufzuheben, und auch Shy1 kann Δ *surfl* in humanen Zellen nicht komplementieren [95, 98], was auf unterschiedliche oder zusätzliche Aufgaben von Shy1 bei der COX-Biogenese in Hefe hindeutet. Shy1 wurde in mehreren Proteinkomplexen mit hohem Molekulargewicht nachgewiesen, die ebenfalls Untereinheiten der COX enthalten [50, 67]. Es scheint also neben der Beteiligung an frühen Assemblierungsschritten mehrere Funktionen zu besitzen, beispielsweise die Stabilisierung der Oxidase oder die Bildung von Superkomplexen mit Komplex III der Atmungskette [67].

Bei Bakterien sind die Gene der Surf1-Homologe oft in einem Operon mit den Genen terminaler Oxidasen assoziiert [45]. Dies deutet auf eine Rolle bei der Ausbildung der katalytischen Zentren hin, und in der Tat lassen Ergebnisse aus *R. sphaeroides* darauf schließen, dass Surf1 am Häm *a* Einbau beteiligt sein könnte [68].

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das bakterielle Modellsystem bietet vielfältige Vorteile für die Untersuchung der Biogenese terminaler Oxidasen. Nicht nur die leichtere Handhabbarkeit der Zellen in Bezug auf Anzucht und genetische Manipulation, sondern auch die einfachere Zugänglichkeit der Proteine für die Aufreinigung und Charakterisierung machen dieses System für die Forschung attraktiv. Die hohe Homologie der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* zu den *Core*-Untereinheiten der eukaryotischen COX ermöglicht es zudem, direkte Rückschlüsse auf die mitochondriale Biogenese dieser Untereinheiten zu ziehen.

Über Surf1-Homologe in Bakterien war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig bekannt. Sequenzvergleiche sagten homologe Proteine für mehrere Bakterien vorher, darunter auch eines für *Paracoccus denitrificans* [45]. In diesem Fall wurde ein bis dahin unbekannter *orf* stromabwärts des *qox*-Operons für die *ba*₃-Ubichinioxidase als *surf1*-Homolog identifiziert. Im Gegensatz zu anderen Surf1-Homologen weist die Sequenz für das vorhergesagte translatierte Protein nur eine C-terminale Transmembranhelix auf, und der N-terminale hydrophobe Bereich ist so stark verkürzt, dass keine Transmembranhelix ausgebildet werden kann [45].

In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde allerdings etwa 60 bp stromaufwärts des ATG ein alternatives Start-Codon GTG im Leserahmen und eine entsprechende Shine-Dalgarno-Sequenz gefunden [100]. Zusätzlich zu diesem *surf1*-Gen konnte ein offener Leserahmen stromabwärts des *cta*-Operons für Untereinheiten der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase als weiteres mögliches *surf1*-Gen identifiziert werden. Beide Gene wurden bereits teilweise auf ihre Funktionalität hin untersucht [100].

Die hier vorliegende Arbeit sollte zunächst an die zuvor erzielten Ergebnisse anknüpfen und die Charakterisierung der *surf1*-Deletionsstämme fortsetzen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob die beiden Surf1-Homologe überlappende Funktionen haben oder spezifisch für die jeweilige terminale Oxidase von *P. denitrificans* verantwortlich sind.

Alle bis zu Beginn dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse über die Funktion von Surf1 leiteten sich von Untersuchungen des Proteins *in vivo* oder *in situ* ab, und Studien zu aufgereinigtem Surf1 lagen nicht vor. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit,

beide Surf1-Homologe auch auf Proteinebene zu charakterisieren. Hierfür sollte sowohl die heterologe Expression in *E. coli* als auch die homologe Expression in *P. denitrificans* genutzt werden. Von besonderem Interesse war zusätzlich die Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern der beiden Surf1-Homologe, die weitere Aufschlüsse auf die Funktion des Proteins bei der Biogenese terminaler Oxidasen liefern könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräteliste

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

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

2.1.2 EDV

2.1.2.1 Programme

Clone Manager Suite	Scientific & Educational Software
ClustalX	http://www.clustal.org/ [101]
EndNote X1	Thomson Reuters
Origin 6.1	OriginLabCorporation
Primer Generator	http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi [102]
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
UNICORN	GE Healthcare
Visio 10	Microsoft
Visual Molecular Dynamics (VMD) Version 1.8.4.	http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/ [103]

2.1.2.2 Datenbanken

Codon Usage Database	http://www.kazusa.or.jp/codon/
Elektronische Zeitschriften Bibliothek	http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=UBFM
Expasy Proteomics Server	http://www.expasy.org/
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
Promise Database	http://metallo.scripps.edu/promise/MAIN.html
RCSB Protein Data Bank (PDB)	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

2.1.3 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamidlösung Rotiphorese	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Peqlab
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roth
Antibiotika	AppliChem, Roth
<i>bc</i> ₁ -Komplex-Inhibitoren	BASF
Bernsteinsäure	Fluka
5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Fermentas
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Fermentas
Coomassie Brilliantblau R250	Roth
Decylubichinon	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Fermentas
Digoxigenin-11-dUTP	Roche Diagnostics
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Calbiochem, Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	AppliChem
Fetales Kälberserum (NCS)	Biochrom
Gel-Extraktionskits	Qiagen, Zymo Research
Hefeextrakt	Becton-Dickinson
HPLC-Lösungen	Roth
Imidazol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Fermentas
β -Mercaptoethanol	Fluka
Mineralöl für die Molekularbiologie	Roth
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich
Nicotinamidadenindinucleiotid (NAD ⁺ /NADH)	Appllichem
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
Nitrocellulose-, Nylonmembran	Whatman
Pefabloc SC	Biomol
Ponceau S	AppliChem

Substanz	Bezugsquelle
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem, Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ)	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton/Pepton	Roth

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

2.1.4 Chromatographiematerialien

Chromatographiematerialien werden zur langfristigen Lagerung mit 20 % Ethanol gewaschen, zur kurzfristigen Lagerung mit 1 mM Natriumazid. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Diethylaminoethyl-(DEAE)-Sephacel CL 6B	GE Healthcare
MonoQ	GE Healthcare
Ni ²⁺ -NTA-Agarose Superflow	Qiagen
Sephadex G25	GE Healthcare
Superdex 200	GE Healthcare
Superose 6	GE Healthcare
Ultrogel AcA 34	Sigma-Aldrich

2.1.5 Größenstandards

λ -Phagen DNA, EcoRI/HindIII geschnitten	Hergestellt im Arbeitskrei
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Invitrogen

2.1.6 Proteine

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

2.1.6.1 Antikörper

Antikörper gegen Cytochrome <i>c</i> Oxidase UEI und II, Ubichinoloxidase UEII, Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂ und CtaG aus <i>Paracoccus denitrificans</i>	Prof Ludwig, Universität Frankfurt
Anti-Digoxigenin-F _{ab} / alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics
Ziege-anti-Maus-IgG / alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich
Maus-anti-Penta-His-Antikörper	Novagen

2.1.6.2 Enzyme für die Molekularbiologie

Ampligase	Epicentre
Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)	Fermentas
<i>phusion</i> DNA-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Fermentas
Ribonuclease A (RNase A)	AppliChem
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-Polynucleotid-Kinase (PNK)	Fermentas

2.1.6.3 Allgemeine Proteine

Cytochrom <i>c</i> aus Pferdeherz	Sigma
Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂ aus <i>P. denitrificans</i>	Prof. Ludwig, Universität Frankfurt
Lysozym	Biomol
Protein A / alkalische Phosphatase-Konjugat (AAP)	Sigma
Proteinstandard <i>Kit</i> für die Gelfiltration	GE Healthcare

2.1.7 Nukleinsäuren

2.1.7.1 Vorhandene Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pBluescript	Klonierungsvektor, <i>fl ori</i> , <i>lacZα</i>	Amp	Stragene
pBSL15	Kanamycinkassette flankiert von Polylinkern	Amp, Km	[104]
pEC86	<i>ccm</i> -Operon zur Cytochrom <i>c</i> Reifung hinter <i>tet</i> -Promotor	Cm	[105]
pET22b/21d	Expressionsvektoren für <i>E. coli</i> , <i>T7</i> -promotor, <i>lacO</i> , <i>lacI</i>	Amp	Novagen
pFA17	<i>surflc</i> -Suizidvektor, pRvS1-Derivat, <i>lacZ</i> , <i>surflc::Km^r</i>	Amp, Km, Sm	[100]
pFA20	<i>surflq</i> -Suizidvektor, pRvS1-Derivat, <i>lacZ</i> , <i>surflq::Gm^r</i>	Amp, Gm, Sm	[100]
pGR50	pEC86-Derivat, <i>tet</i> -Promotor, BsrGI/Acc65I-XhoI klonierbar	Cm	Hannappel, Universität Frankfurt
pGR52	pGR50-Derivat, <i>ctaB</i> und <i>ctaA</i> hinter <i>tet</i> -Promotor	Cm	Hannappel, Universität Frankfurt

Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pKH121	<i>cco</i> -Operon-Suizidvektor, pRvS1-Derivat, <i>lacZ</i> , <i>cco</i> ::Gm ^f	Amp, Gm, Sm	Hoffmeier, Universität Frankfurt
pKH144	<i>cta</i> -Operon in pUC18, (BamHI-Sall)	Amp	Hoffmeier, Universität Frankfurt
pOR1	<i>gox</i> -Operon in pUC18 (SphI)	Amp	[40]
pRI2	<i>broad host range</i> -Vektor, pBBR1MCS-Derivat	Cm, Sm	[106]
pRvS1	Suizidvektor für <i>P.denitrificans</i> , <i>lacZ</i>	Amp, Sm	[107]
pSH1a	<i>ccoNOQP</i> in pRI2 (SmaI)	Sm ^f	Heinke, Universität Frankfurt
pUC18/19	Klonierungsvektoren, <i>lacZα</i>	Amp	[108]
pUCGm	Gentamycinkassette flankiert von Polylinkern	Amp, Gm	[109]
pUP39	<i>cta2</i> -Promotor in pRI2	Cm, Sm	[106]

2.1.7.2 Erstellte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pFA32	pSH1a-Derivat, exprimiert his ₁₀ -CcoO	Sm
pFA35	<i>surf</i> c mit N-terminalem Dekka-His-Tag in pUC18 (NdeI-SacI)	Amp
pFA36	<i>surf</i> q mit N-terminalem Dekka-His-Tag in pUC18 (NdeI-SacI)	Amp
pFA39	<i>cta</i> -Promotor aus pUP39 in pET22b (SphI-XbaI) vor RBS	Amp

Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pFA48	<i>surf</i> c mit N-terminalem Deka-His-Tag in pET22b (NdeI-SacI)	Amp
pFA48-H193A	H193A-Mutante von <i>surf</i> c mit N-terminalem Deka-His-Tag in pET22b (NdeI-SacI)	Amp
pFA49	<i>surf</i> q mit N-terminalem Deka-His-Tag in pET22b (NdeI-SacI)	Amp
pFA49-H202A	H202A-Mutante von <i>surf</i> q mit N-terminalem Deka-His-Tag in pET22b (NdeI-SacI)	Amp
pFA59	<i>surf</i> c mit N-terminalem Deka-His-Tag in pFA39 hinter <i>cta</i> 2-Promotor (NdeI-SacI)	Amp
pFA60	<i>surf</i> q mit N-terminalem Deka-His-Tag in pFA39 hinter <i>cta</i> 2-Promotor (NdeI-SacI)	Amp
pFA61	<i>cta</i> 2- <i>surf</i> 1c-Fragment aus pFA39 in pRI2 (Sall)	Sm
pFA61-H193A	<i>surf</i> 1c aus pFA49-H193A in pFA61 (NdeI-SacI)	Sm
pFA62	<i>cta</i> 2- <i>surf</i> 1q-Fragment in pRI2 (Sall) aus pFA39	Sm
pFA62-H202A	<i>surf</i> 1q aus pFA49-H193A in pFA61 (NdeI-SacI)	Sm

2.1.7.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biospring bezogen.

Name	Sequenz (5'→3')
uni_fw	GTAAAACGACGGCCAGT
uni_fw2	AGGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
uni_rv	CAGGAAACAGCTATGAC

Material und Methoden

Name	Sequenz (5'→3')
uni_rv2	AGCGGATAACAATTTACACACAGG
gm_fw	GGCGGCACGCGTATGTTACGCAGCAGC
gm_rv	GCCGCCACGCGTTTAGGTGGCGGTACT
pET_rev	CACGCTGCGCGTAACCAC
csurf1_fw	ATAAGCTTCATATGCGCCGTTACCTGTTCC
his10_csurf1	TATAAGCTTCATATGGCCCGG(CATCAC) ₅ ATGCGCCG TTACCTGTTCCC
Surf1c-588-rv	CGGGATCGGCCGCACCCCCT
Surf1c-H193A	GTCGCGGTTCGAGGGAATTCCGAACAACGCCCTGAGC TATGCC
csurf1_rv	ATGAGCTCTCTAGACTAGAATTGCCGCTGCCTG
csurf1_rv_xho	TAATCTCGAGCTAGAATTGCCGCTGCCTGA
qsurf1_fw	ATAAGCTTCATATGACCCTGCGCCGGCTG
his10_qsurf1	TATAAGCTTCATATGGCCCGG(CATCAC) ₅ GTGACCCT GCGCCGGCTGG
H202A- Surf1q-2	GCGCTGGGCTATGCGGCGACCTGG
Surf1q-641-rv	GCTGTTGCGAAAACGGACCACGGTCA
qsurf1_rv	ATGAGCTCTCTAGACCTTTGCGCCCGTCAGTCC
qsurf1_rv_XhoI	ATTACTCGAGTCAGTCCCGCGCGCCCCGGCGCCTG
his10_ccoO	TATAAGCTTCATATGGCCCGG(CATCAC) ₅ ATGGCCAT TCTTGAAAAGCA
cco5451_rv	TGGCGATTCAGCAGGAAG
ccoO-pEP2_rv	CAATCGTCCCCAGGAAAAAG
cco8844_rv	AAGCTTTGCGAGGCGACATA

2.1.8 Mikroorganismen

2.1.8.1 *Escherichia coli* K12-Stämme

Name	Charakterisierung	Herkunft
DH5 α	supE44, Δ (lacZYA-argF)U169, ϕ 80dlacZ Δ M15, hsdR17(r _K ⁻ ,m _K ⁺), recA1, endA1, gyrA96, thi ⁻ 1, relA1, deoR,	[110, 111], DSMZ
RP4-4	J53-Derivat, Helferplasmid für triparentales Mating, Amp ^r , Tet ^r	[112]
C41	BL21(DE3)-Derivat, Expressionsstamm für pET-Plasmide	[113]
KH121	DH5 α -Derivat, enthält pKH121	Hoffmeier, Universität Frankfurt
FA17	DH5 α -Derivat, enthält pFA17	[100]
FA20	DH5 α -Derivat, enthält pFA20	[100]
FA48	C41-Derivat, enthält pFA48	diese Arbeit
FA48/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48 und pGR52	diese Arbeit
FA48-H193A/GR52	C41-Derivat, enthält pFA48-H193A und pGR52	diese Arbeit
FA49	C41-Derivat, enthält pFA49	diese Arbeit
FA49/GR52	C41-Derivat, enthält pFA49 und pGR52	diese Arbeit
FA49-H202A/GR52	C41-Derivat, enthält pFA49-H202A und pGR52	diese Arbeit
FA61	DH5 α -Derivat, enthält pFA61	diese Arbeit
FA61-H193A	DH5 α -Derivat, enthält pFA61-H193A	diese Arbeit

Name	Charakterisierung	Herkunft
FA62	DH5 α -Derivat, enthält pFA62	diese Arbeit
FA62-H202A	DH5 α -Derivat, enthält pFA62-H193A	diese Arbeit

2.1.8.2 *Paracoccus denitrificans*-Stämme

Name	Charakterisierung	Herkunft
Pd1222	Spc ^r , Rif ^r , “enhanced mating frequency”	[114]
MR31	<i>ctaDI</i> ::Km ^r , <i>ctaDII</i> ::Tet ^r	Wikström, Universität Helsinki
TSP24	MR31-Derivat, Δqox ::Gm ^r	Schröter, Universität Frankfurt
FA1	Pd1222-Derivat, $\Delta surf1q$::Gm ^r	[100]
FA1.62	FA1-Derivat, enthält pFA62	diese Arbeit
FA2	Pd1222-Derivat, $\Delta surf1c$::Km ^r	[100]
FA2.61	FA2-Derivat, enthält pFA61	diese Arbeit
FA3	Pd1222-Derivat, $\Delta surf1c$::Km ^r , $\Delta surf1q$::Gm ^r	diese Arbeit
FA3.61	FA3-Derivat, enthält pFA61	diese Arbeit
FA3.61-H193A	FA3-Derivat, enthält pFA61-H193A	diese Arbeit
FA3.62	FA3-Derivat, enthält pFA62	diese Arbeit
FA3.61-H202A	FA3-Derivat, enthält pFA62-H202A	diese Arbeit
FA7	MR31-Derivat, Δcco ::Gm ^r	diese Arbeit
FA7.32	FA7-Derivat, enthält pFA32	diese Arbeit
FA61TSP24	TSP24-Derivat, enthält pFA61	diese Arbeit
FA62TSP24	TSP24-Derivat, enthält pFA62	diese Arbeit

2.1.9 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL in 50% Glycerin (v/v)	100 µg/mL
Chloramphenicol	60 mg/mL in Ethanol	60 µg/mL
Kanamycin	25 mg/mL in 50% Glycerin (v/v)	25 µg/mL
Streptomycin	25 mg/mL in 50% Glycerin (v/v)	25 µg/mL
Gentamycin	20 mg/mL in 50% Glycerin (v/v)	10 µg/mL (<i>E.c.</i>), 20 µg/mL (<i>P.d.</i>)
Rifampicin	15 mg/mL in Methanol	60 µg/mL

2.1.10 Kulturmedien

Luria-Bertani-Medium (LB) [115]	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl
für Platten	1,6 % (w/v) Agar-Agar
TY-Medium [115]	0,8 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl
für Platten	1,6 % (w/v) Agar-Agar
Gefrierkultur-Medium	15% (v/v) Glycerin in 2x TY
Autoinduktionsmedium (AI) [116]	25 mM KH ₂ PO ₄ , 25 mM Na ₂ HPO ₄ , 50 mM NH ₄ Cl, 5 mM NaSO ₄ , 2 mM MgSO ₄ , 0,01 mM FeCl ₃ , 0,05 % (w/v) Glucose, 0,2 % (w/v) α-Lactose, 0,5 % (v/v) Glycerin in TY

Succinat-Medium [117]	50 mM K ₂ HPO ₄ , 40 mM Bernsteinsäure, 10 mM NH ₄ Cl, 1 mM MgSO ₄ , 1 mM Citrat, 0,2 ‰ (v/v) Spurenelementelösung, ad pH 6,2 mit KOH
Spurenelementelösung (1000x)	100 mM CaCl ₂ , 100 mM CaCl ₂ , 5 mM CuSO ₄ , 90 mM FeCl ₃ , 5 mM H ₃ BO ₃ , 50 mM MnCl ₂ , 10 mM Na ₂ MoO ₄ , 25 mM ZnCl ₂ in 50 % (v/v) HCl

2.1.11 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen werden mit entsalztem Wasser (PRO 90 CN Anlage der Firma Seral) angesetzt. Für molekularbiologischen Anwendungen werden die Lösungen zusätzlich sterilfiltriert und autoklaviert. Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung insbesondere für Gelfiltrationen werden sterilfiltriert und unter Vakuum entgast. Sofern nicht anders gekennzeichnet, beziehen sich alle angegebenen pH-Werte auf Raumtemperatur.

2.1.11.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Plasmid-Präparation

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

Isolierung genomischer DNA

Lyse-Puffer	10 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, pH 8
SDS-Lösung	10 % (w/v)
Natriumperchlorat	5 M NaClO ₄
Rnase A-Lösung	2 mg/mL
TE-Puffer	25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8

Agarose-Gelelektrophorese

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

Herstellung kompetenter Zellen

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

Blau-Weiß-Screening

IPTG-Lösung	50 mg/mL in H ₂ O
X-Gal-Lösung	20 mg/mL in DMSO

Southernblot

SSC (5x)	750 mM NaCl, 75 mM Na-Citrat, pH 7
Vorhybridisierungslösung	1 % (w/v) Magermilchpulver, 0,1 % (w/v) Sarkosyl, 0,02 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Formamid in 5x SSC
Waschlösung 1	0,1 % (w/v) SDS in 2x SSC
Waschlösung 2	0,1 % (w/v) SDS in 0,2x SSC
Maleinsäurepuffer (Lösung1)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
Blocking-Reagenz (Lösung 2)	1 % (w/v) Magermilchpulver in Lösung 1

Immunologische Detektion

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

Dot-Blot

Lyse-Puffer	10 % (w/v) SDS
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisationspuffer	0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4
Waschpuffer 1	2x SSC
Waschpuffer 2	0,5% (w/v) SDS, 1 mM EDTA in 5x SSC

2.1.11.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

Analytische Membranpräparation

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

Membranpräparation im großen Maßstab

Surf1

Puffer 1	50 mM NaP_i , 1 mM EDTA, pH 8 (4 °C)
Puffer 2	50 mM NaP_i , 300 mM NaCl, pH 8 (4 °C)

*aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase

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

Isolierung von Surf1 (Ni^{2+} NTA-Agarose)

Solubilisierungspuffer (2x)	100 mM NaP_i , 600 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)
Verdünnungspuffer	50 mM NaP_i , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 (4 °C)
Säulenpuffer (Triton)	50 mM NaP_i , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,5 % (v/v) Triton X-100, pH 8 (4 °C)
Säulenpuffer (DDM)	50 mM NaP_i , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,2 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Waschpuffer 1	50 mM NaP_i , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Material und Methoden

50 mM Imidazol-Puffer	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
80 mM Imidazol-Puffer	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 80 mM Imidazol, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Elutionspuffer	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Säulenwaschpuffer	50 mM NaP _i , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Waschpuffer 2	20 mM NaP _i , 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Nachreinigung von Surf1 (MonoQ-Anionentauscher)

Niedersalzpuffer	20 mM NaP _i , 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Hochsalzpuffer	20 mM NaP _i , 1 M NaCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Aufreinigung der Cytochrom *c* Oxidase

Solubilisierungspuffer (2x)	40 mM KP _i , 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8 (4 °C)
1. DEAE-Sepharose CL6B	
Säulenpuffer	20 mM KP _i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Niedersalzpuffer	20 mM KP _i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Hochsalzpuffer	20 mM KP _i , 600 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)
Gelfiltrationspuffer	20 mM KP _i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

2. DEAE-Sepharose

Säulenpuffer 20 mM KP_i , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA,
0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Hochsalzpuffer 20 mM KP_i , 400 mM NaCl, 1 mM EDTA,
0,02 % (w/v) DDM, pH 8 (4 °C)

Analytische Gelfiltration

Säulenpuffer 50 mM NaP_i , 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM,
pH 8 (4 °C)

Präparative Gelfiltration

Säulenpuffer 20 mM NaP_i , 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM,
pH 8 (4 °C)

Proteinbestimmung nach Lowry

Lowry A 2 % (w/v) Na_2CO_3 , 0,1 N NaOH

Lowry B1 1 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Lowry B2 2 % (w/v) Kalium-Natrium-Tartrat

Lowry C 20 % (w/v) SDS

Folin-Lösung 50 % (v/v) Folin-Ciocalteu in H_2O

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer (4x) 0,5 M Tris/HCl, 8 mM EDTA, 0,4 % (w/v) SDS,
pH 6,8

Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris/HCl, 8 mM EDTA, 0,4 % (w/v) SDS,
pH 8,8

Acrylamidlösung 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid

Material und Methoden

Probenpuffer (2x)	20 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in 2x Sammelgelpuffer
Laufpuffer (5x)	125 mM Tris, 0,96 M Glycin, 1 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS

LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE)

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

Blau-Nativ-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Gelpuffer (6x)	3 M 6-Aminocapronsäure, 150 mM Imidazol/HCl, pH 7
Kathodenpuffer	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02 % bzw. 0,002 % (w/v) Coomassie G250
Anodenpuffer	25 mM Imidazol/HCl, pH 7
Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid

Coomassie-Färbung

Färbelösung	0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Silberfärbung

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

Hämfärbung

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

Westernblot

Transferpuffer	25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,01 % SDS
Transferpuffer nativ	25 mM Tris, 190 mM Glycin
Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3% TCA
TBS	10 mM Tris/HCl, 7,5 mM NaCl, pH 7,5
BSA	3 % (w/v) BSA in TBS
TBS-TT	20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, 0,2% (v/v) Triton X-100, pH 7,5

Material und Methoden

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

Hämextraktion

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

HPLC

Lösung 1	0,1 % (v/v) TFA in H ₂ O
Lösung 2	0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril

Aktivitätsmessung *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase

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

Aktivitätsmessung *cbb*₃-Cytochrom *c* Oxidase

Puffer für Cytochrom <i>c</i>	20 mM Tris/HCl, pH 7
Aktivitätspuffer	20 mM Tris/HCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 7

Aktivitätsmessung Ubichinoloxidase

Aktivitätspuffer	50 mM KP_i , 1 mM EDTA, 0,02 % (w/v) DDM
Substratlösung	50 mM Decylcholinol, 100 μ M HCl in Ethanol
<i>bc1</i> -Inhibitor-Lösung	50 mM Strobilurin-Derivat PS278991 in DMSO

Redoxspektren

Membranspektrenpuffer	50 mM KP_i , 0,5 % (v/v) Triton X-100, pH 8
Pyridinlösung	20 % (v/v) Pyridin, 0,1 M NaOH

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht und Lagerung

Flüssigkulturen von *Escherichia coli* werden in 2 mL LB-Medium im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm über Nacht angezogen. Antibiotika werden je nach Bedarf zugesetzt. Kulturen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten werden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Lagerung der Platten erfolgt bei 4 °C im Kühlraum.

Flüssigkulturen von *Paracoccus denitrificans* werden in 2 mL LB-Medium im Schüttler bei 32 °C und 200 rpm über Nacht angezogen. Antibiotika werden je nach Bedarf zugesetzt. Kulturen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten werden bei 32 °C im Brutschrank inkubiert. Die Lagerung der Platten erfolgt bei Raumtemperatur.

Für eine dauerhafte Lagerung werden Gefrierkulturen angelegt. Dazu werden 2 mL einer Übernachtflüssigkultur 2 Minuten bei 6000 rpm (Biofuge) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden dann in 500 μ L Gefrierkultur-Medium resuspendiert und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA („Minipräp“)

Für die Präparation von Plasmid-DNA existieren viele Methoden. Hier wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet, da sie schnell und einfach durchzuführen ist.

1,5 mL einer Bakterien-Übernachtskultur werden für 2 Minuten bei 13000 rpm (Biofuge) und Raumtemperatur abzentrifugiert, und das Zellpellet wird in 100µL eiskaltem H₂O resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 200µL frisch angesetzter NaOH/SDS-Lösung, wobei die Reaktionsgefäße mehrmals invertiert werden sollten, um eine vollständige Durchmischung zu garantieren. Nach einer Inkubation von 1 bis 5 Minuten auf Eis, wird zur Neutralisation 150µL eiskalte Kaliumacetatlösung zugegeben. Dabei werden chromosomale DNA, Proteine und andere Zellbestandteile gefällt, die dann 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert werden.

Der klare Überstand wird mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1) versetzt und gut durchmischt, um weitere Proteine zu fällen. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur wird die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Bei dieser Extraktion sammeln sich die Proteine in einer weißen Zwischenschicht, und man sollte beim Abpipettieren sehr vorsichtig sein. Im Anschluss erfolgt die Fällung der Nukleinsäuren. Dazu wird der wässrige Überstand mit zwei Volumen Ethanol (-20 °C) gemischt und für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend mit 200 µL 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 50 µL Wasser oder TE-Puffer gelöst.

Durch Zugabe von 1µL RNase A (2 mg/mL) und Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgt der Verdau der RNA.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA

Eine 50 mL Übernachtskultur von *P. denitrificans* wird 1 %ig angeimpft und bei 32 °C angezogen.

Die Kultur wird auf Eis abgekühlt und bei 6000 rpm (Megafuge) und 4 °C 15 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen werden dann in 20 mL Lyse-Puffer

vollständig resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch Zugabe von 2 mL 20 %iger SDS-Lösung und einstündiger Inkubation im Rollerschränk bei 65 °C. Die Freisetzung der genomischen DNA führt zu einer Viskositätserhöhung der Lösung, allerdings sollte diese nicht zu hoch werden, da sonst die anschließende Proteinfällung beeinträchtigt wird und DNA mitgerissen werden könnte.

Für die Präzipitation der Proteine werden zuerst 6 mL Natriumperchloratlösung unter Schütteln zu dem Bakterienlysat gegeben und für eine Stunde bei 65 °C im Rollerschränk inkubiert. Anschließend werden zur weiteren Fällung 7 mL Chloroform hinzu pipettiert, das Gemisch wird bei Raumtemperatur im Rollerschränk sanft geschüttelt bis sich eine homogene Phase bildet. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 4 °C und 6000 rpm (Megafuge).

Die obere wässrige Phase wird abgenommen und vorsichtig mit 0,7 Volumen Isopropanol überschichtet. Wahlweise können auch 2 Volumen Ethanol eingesetzt werden. Durch langsames Drehen des Reaktionsgefäßes mischen sich die Phasen allmählich, und an der Grenzschicht bilden sich DNA-Fäden, die aufgewickelt werden können. Sollten sich nach vollständiger Phasenmischung immer noch keine Fäden gebildet haben, erfolgt die Fällung über Nacht bei -20 °C mit anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 6000 rpm (Megafuge).

Die präzipitierte DNA wird dann in 4,9 mL TE-Puffer mit 0,1 ml 20 %igem SDS gelöst. Gegebenenfalls wird der Ansatz dazu bei 68 °C bis zur vollständigen Lösung inkubiert. Nach diesem Schritt enthält die Lösung immer noch RNA und einige mitgefällte Proteine. Zur weiteren Aufreinigung wird zunächst die RNA verdaut. Dazu wird etwa ein 20stel Volumen einer RNase A-Lösung zu der DNA-Probe gegeben und für etwa 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daran schließt sich der Proteinverdau durch Proteinase K an, wobei die Endkonzentration des Enzyms bei 0,2 mg/mL liegen sollte. Die Inkubation erfolgt bei 65 °C. Durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol wird die DNA ein weiteres Mal in Gegenwart von 300 mM Natriumacetat für 2 Stunden bei -20 °C präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 6000 rpm (Megafuge) wird das DNA-Pellet in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml TE-Puffer über Nacht bei 65 °C im Rollerschränk gelöst.

Die Mengenbestimmung erfolgt spektroskopisch bei 260 nm, wobei eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 0,05 mg/ml entspricht. Über den Quotient E_{260nm}/E_{280nm} lässt sich die Reinheit der Probe bestimmen. Optimalerweise sollte der

Quotient bei 1,8 liegen. Alternativ kann man den DNA-Gehalt auch über eine Mengenabschätzung in einem Agarose-Gel bestimmen. Diese Methode liefert meist die genaueren Ergebnisse, und Verunreinigungen mit RNA lassen sich dabei ebenfalls schnell feststellen.

2.2.4 Restriktion von DNA

Um DNA-Moleküle klonieren und charakterisieren zu können, ist es nötig sie in bestimmter Weise zu schneiden. Restriktionsendonucleasen schneiden DNA sehr präzise, da sie bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und an dieser Stelle spalten. Dabei entstehen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder kurze überstehende Einzelstrangstücke, die man als klebrige Enden (*sticky ends*) bezeichnet.

Jedes Restriktionsenzym hat ganz spezielle Anforderungen an Ionenstärke, pH-Wert und Reaktionstemperatur. Die entsprechenden optimalen Puffersysteme werden in 10facher Konzentration von den Herstellerfirmen mitgeliefert. Für einen Doppelverdau mit zwei Enzymen sollte ein Puffer ausgewählt werden, in dem beide Enzyme optimal schneiden.

Die *Einheit* (Unit, U) des Enzyms ist definiert als die Menge, die 1 µg DNA in einer Stunde spaltet. Normalerweise werden die Enzyme in einer Konzentration von 10 U/µL von der jeweiligen Herstellerfirma geliefert.

Ein Restriktionsansatz hat üblicherweise ein Volumen von 20 µL, in dem bis zu 1 µg DNA enthalten sein können. Die einzusetzende Menge an Enzym richtet sich nach der Menge der DNA, die man schneiden möchte. Die Inkubation erfolgt eine Stunde bei der optimalen Temperatur, typischerweise bei 37 °C. Die Reaktion wird durch Zugabe von DNA-Probenpuffer oder Inaktivierung bei der für das Enzym vom Hersteller angegebenen Temperatur für 20 Minuten gestoppt.

2.2.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Das Enzym Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP) katalysiert die Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen. Bei einer Klonierung nutzt man diese Eigenschaft, um die Religation eines Plasmids zu

verhindern, insbesondere wenn nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wird. Nach Beendigung der Restriktion, werden die Enzyme zunächst hitzeinaktiviert, üblicherweise 20 Minuten bei 65 °C. Da CIAP in fast allen Reaktionspuffern aktiv ist, wird dann 1 µL CIAP hinzu pipettiert und für 30 Minuten bis 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgrößen, die man auftrennen möchte, wählt man die Agarosegelkonzentration zwischen 0,5 % und 2 % (w/v). Bei einem 0,5 %igen Agarosegel lassen sich Fragmente zwischen 1000 bp und 60000 bp auftrennen, ein 2 %iges Gel trennt kleinere Fragmente zwischen 100 bp und 3000 bp besser auf. Zum Gießen der Agarosegele wird die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer eingewogen und zum Auflösen der Agarose ca. 3 Minuten aufgekocht. Anschließend werden 5µL Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL) pro 100 mL Gel hinzupipettiert, um später die Detektion der DNA zu ermöglichen. Dann wird das noch flüssige Gel in die Form gegossen, und die Kämme werden eingesetzt. Nach dem Erkalten werden die Kämme vorsichtig entfernt. Bei 4 °C und ausreichender Feuchtigkeit ist ein Agarosegel etwa 7 Tage haltbar.

Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wird das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Puffer überschichtet, und die DNA-Proben werden in die Taschen pipettiert. Durch Anlegen einer konstanten Spannung wandern die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung zum Pluspol. Die angelegte Spannung hängt dabei von der Länge der Gelkammer ab (max. 5 V/cm).

Nach Abschluss der Elektrophorese wird die DNA auf dem Durchlichttisch sichtbar gemacht. Dabei nutzt man aus, dass sich Ethidiumbromid in die DNA-Stränge einlagert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm fluoresziert der interkalierte Farbstoff, so dass die DNA-Fragmente sichtbar werden. Das energiereiche UV-Licht führt allerdings zu Mutationen in den DNA-Molekülen. Für Klonierungen sollte daher die UV-Handlampe verwendet werden, deren Wellenlänge bei 365 nm liegt. Diese Strahlung ist energieärmer und daher weniger schädlich, die Intensität der Ethidiumbromid-Fluoreszenz ist dadurch allerdings herabgesetzt.

Die Fragmentgrößen lassen sich anhand ihrer Laufstrecke im Gel bestimmen. Große Fragmente werden durch die Agarosegelmatrix eher zurückgehalten als kleine Fragmente und wandern entsprechend langsamer. Die Größe der gesuchten Fragmente kann man relativ einfach abschätzen, wenn man einen Standard mit bekannten Fragmentgrößen mitlaufen lässt. Eine Mengenabschätzung ist mit Hilfe des Standards ebenfalls einfach durchzuführen, wenn die Menge an DNA der einzelnen Marker-Banden bekannt ist. Als Standard wird üblicherweise EcoRI/HindIII-geschnittene λ -Phagen-DNA verwendet.

2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren, wird das Gel-Extraktionskit der Firma Qiagen (QIAquick® Gel Extraktion Kit) verwendet. Die einzelnen Schritte sind dem Manual des Herstellers zu entnehmen. Nach dem Ausschneiden des gewünschten DNA-Fragments aus dem Agarosegel wird das Gelstückchen mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt und bei 50 °C 10 Minuten im Schüttler inkubiert, bis sich die Agarose gelöst hat. Die Suspension wird auf ein Silikatsäulchen gegeben, woran die DNA bindet. Durch Zentrifugation werden Agarosereste und andere Verunreinigungen entfernt. Es folgen mehrere Waschschriffe mit QG- und PE-Puffer.

Die gereinigte DNA wird mit Wasser oder Tris-Puffer (pH 8) eluiert. Die 30 μ L Eluat können bei Bedarf im Vakuumkonzentrator (*SpeedVac*) auf 5 μ L eingengt werden.

2.2.8 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer DNA-Ligase. Ligasen katalysieren die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe. Für diese Reaktion benötigen Ligasen einen Kofaktor, der je nach Enzym NADH oder ATP sein kann. Die in dieser Arbeit benutzte T4 DNA-Ligase verwendet ATP als Kofaktor.

Bei einer Ligation unterscheidet man zwischen einer *sticky-end*-Ligation und einer *blunt-end*-Ligation. Bei einer *sticky-end*-Ligation können sich die DNA-Fragmente durch die überhängenden Einzelstrangstücke leichter finden. Ein Ligationsansatz enthält hier üblicherweise 2 U an T4 DNA-Ligase und fasst 10 µL, wobei die ATP-Endkonzentration bei 0,5 mM liegen sollte. Eine Inkubation von einer Stunde bei 22 °C ist völlig ausreichend.

Bei der *blunt-end*-Ligation finden sich die DNA-Fragmente dagegen nicht so leicht, weshalb mehrere Stunden inkubiert werden sollte, idealerweise über Nacht bei 22 °C. Für die Ligation mehrerer Fragmente wird ebenfalls über Nacht bei 22°C inkubiert.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* und nutzt das Prinzip der erweiterten Primerextension. In mehreren Zyklen wird so die eingesetzte Template-DNA exponentiell vervielfältigt, so dass nur sehr wenig Template-DNA eingesetzt werden kann.

Ein Zyklus beginnt mit dem Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs bei 98 °C. Die eingesetzte DNA-Menge richtet sich nach der Art der DNA. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA werden 1-2 ng als Template eingesetzt, von genomischer DNA sollten mindestens 50 ng eingesetzt werden. Im anschließenden *annealing* binden kurze Oligonukleotide (Primer) an die Einzelstränge. Die Annealingtemperatur berechnet sich in Annäherung aus folgender Formel:

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

Hier stehen A, T, C und G für die Anzahl der jeweiligen Basen im Primermolekül. Die Länge der Primer liegt zwischen 15 bp und 30 bp, und die Annealingtemperatur der beiden Primer sollte sich nicht um mehr als 20°C unterscheiden. Die Endkonzentration an Primern beträgt im Reaktionsansatz 0,5 µM. Es folgt dann der Elongationsschritt bei 72 °C. Man verwendet hierfür thermostabile Polymerasen, da es so möglich ist mehrere Replikationszyklen durchzuführen, ohne nach jedem Denaturierungsschritt neues Enzym hinzufügen zu müssen. Die gebräuchlichsten und in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen sind die *Taq*-Polymerase aus *Thermus*

aquaticus und die *phusion*-Polymerase. Diese Polymerasen katalysieren die Primerelongation in 3' Richtung. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase verfügt die *phusion*-Polymerase über eine Korrekturlesefunktion (3'→5' Exonuklease), wodurch die Fehlerrate bei der Elongation stark erniedrigt ist. Außerdem unterscheiden sich die beiden Polymerasen in ihrer Elongationsgeschwindigkeit, die *Taq*-Polymerase arbeitet mit ca. 1000 bp/min und die *phusion*-Polymerase mit bis zu 3800 bp/min. Die Dauer der Elongationsphase richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und nach der Schnelligkeit der Polymerase. Üblicherweise werden 2,5 U an Polymerase und 100 µM dNTPs eingesetzt.

Der Zyklus wird nun bis zu 30 mal wiederholt. Das Aufheizen und Abkühlen der Probe übernimmt ein *Thermocycler*. Ein typisches Temperaturprotokoll enthält folgende Schritte:

	primäres Denaturierung der DNA	1 min bei 98 °C
30 Zyklen	Denaturierung der DNA	15 s bei 98 °C
	Annealing der Primer	30 s
	Elongation	0,3 – 2 min pro kb bei 72 °C
1 Zyklus	Elongation vervollständigen	2 min bei 72 °C

Um die Ausbeute an amplifizierter DNA zu erhöhen, können dem PCR-Ansatz verschiedene Substanzen zu gesetzt werden. Zur Verringerung der Primerspezifität können bis 10% DMSO oder 10-15% Glycerin hinzugefügt werden. Außerdem hat die Konzentration von Mg²⁺-Ionen einen Einfluss auf die Polymerasegenauigkeit. Die Genauigkeit fällt dabei mit zunehmender Magnesiumkonzentration.

2.2.10 Gerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der *quik*[®]*change* Mutagenesemethode (Stratagene) können gezielt eine oder mehrere Punktmutation in ein Plasmid eingeführt werden. Die Methode basiert, wie die PCR auf *thermocycling*, da allerdings nur ein Primer verwendet wird, erfolgt die Amplifikation linear und nicht exponentiell.

Als Primer dient ein mutagenes Oligonukleotid, welches zur DNA des zu mutierenden Gens bis auf die auszutauschende(n) Base(n) komplementär ist. Bevor die eigentliche Reaktion beginnen kann, muss das mutagene Oligonukleotid mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidkinase phosphoryliert werden, da die 5'-Phosphatgruppe für den späteren Ringschluss nötig ist.

Der Mutageneseansatz enthält dann neben 5 μM phosphoryliertem Primer ca. 50 ng/ μL Template-DNA, 200 μM dNTPs, 0,5 mM NAD^+ und je 2,5 U der benötigten Enzyme *phusion* Polymerase und Ampligase. Analog zur PCR wird dann zunächst das doppelsträngige Plasmid thermisch denaturiert und so in Einzelstränge überführt. Während des Abkühlens beim *annealing* bei 55 °C lagert sich das mutagene Oligonukleotid, an den Einzelstrang an. Die zugegebene thermostabile Polymerase vervollständigt nun bei 72 °C den Einzelstrang zum heterogenen Doppelstrang, wobei der neusynthetisierte Strang noch nicht zur Ringform geschlossen ist. Dies wird durch eine zugegebene thermostabile Ligase vermittelt. Der Zyklus wird 30 mal wiederholt.

Im Anschluss wird der so gewonnenen Mischung aus parentalem und mutagenen Strang 1 μL des Restriktionsenzym DpnI zugesetzt, das den methylierten, parentalen Strang enzymatisch abbaut. Nach Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 Stunden wird der Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Scientific Research and Development GmbH (SRD GmbH), Köhlerweg 20, 61440 Oberursel durchgeführt.

2.2.12 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen zeigen keine natürliche Fähigkeit DNA-Moleküle effizient aufzunehmen. Für eine erfolgreiche Transformation müssen die Zellen zunächst „kompetent“ gemacht werden. Zuerst werden 2 mL LB-Medium mit *E. coli*-Zellen angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag werden 50 mL LB-Medium 0,5-1% ig mit Bakterien angeimpft. Die Zellen werden bei 37 °C inkubiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,5 (ca. 3 Stunden) wachsen gelassen. Vor der Weiterverarbeitung werden die Zellen dann 10 Minuten auf Eis abgekühlt.

Die Zentrifugation erfolgt bei 2000 g bzw. 3400 rpm (Megafuge) und 0 °C. Das Pellet wird dann in 7,5 mL eiskaltem TFB I-Puffer vorsichtig resuspendiert. Danach werden die Zellen 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 3000 g (4300 rpm) und 0 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird dann in 2 mL eiskaltem TFBII-Puffer vorsichtig resuspendiert. Davon werden 100 µL-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Transformationseffizienz liegt bei durchschnittlich 10⁷ Klonen pro µg DNA.

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

Transformation nennt man eine Methode, nackte DNA in Zellen einzubringen. Dazu werden 100 µL kompetenter Zellen (bsp. DH5α) 15 Minuten auf Eis aufgetaut. Die 10 µL eines Ligationsansatzes werden vollständig zu den Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Für die Transformation von Vektoren aus einer Plasmidpräparation genügt bereits 1 µL DNA.

Nach dem Mischen bleiben die Zellen 20 Minuten auf Eis stehen. Dann folgt der „Hitzeschock“ für eine Minute bei 42 °C, wonach die Zellen sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt werden. Anschließend wird der Transformationsansatz in 900 µL LB-Medium überführt, und die Zellen werden zum Erholen bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Die Länge der Erholungsphase hängt von der verwendeten Antibiotikaresistenz ab. Für Ampicillin sind 45 Minuten völlig ausreichend, während für alle anderen Antibiotika mindestens eine Stunde eingerechnet werden sollte. Nach der Erholungsphase werden die Zellen dann auf antibiotikahaltigen Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.14 Konjugation: *Triparental Mating*

P. denitrificans besitzt weder eine natürliche Kompetenz, um Plasmid-DNA aufzunehmen, noch lässt sich durch eine entsprechende chemische Behandlung eine Kompetenz erreichen. Plasmid-DNA kann nur über Elektroporation oder Konjugation in einen *P. denitrificans*-Stamm gebracht werden.

Eine besondere Form der Konjugation ist das sogenannte *Triple Mating*. Das Plasmid wird dabei von einem Donorbakterium in ein Empfängerbakterium transferiert. Für diesen Transfer sind bestimmte Transferegene (*tra*) nötig, die aber weder im Donor- noch im Empfänger-Stamm vorhanden sind. Deshalb muss zuerst ein Transfer dieser Gene von einem Helfer-Stamm in den Donorstamm (üblicherweise ein *E. coli*-Stamm) stattfinden. Die *tra*-Gene werden von dem *E.coli*-Stamm RP4-4 zur Verfügung gestellt.

Für das *Triple Mating* werden je 2 mL Übernachtskulturen der drei beteiligten Stämme angeimpft. Am nächsten Tag werden zu 300 µL der *P. denitrificans*-Kultur je 100 µL der beiden *E. coli*-Stämme pipettiert. Das Zellgemisch wird 2 Minuten bei 6000 rpm (Biofuge) zentrifugiert, und das Zellpellet wird anschließend in 100 µL LB-Medium resuspendiert und als Tropfen in die Mitte einer Antibiotika-freien LB-Agarplatte gesetzt. Die Inkubationszeit sollte mindestens 8 Stunden bei 32 °C betragen. Der Zellhaufen wird dann mit 1 mL LB-Medium von der Platte gespült und in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert. Die Wahl der Antibiotika richtet sich nach dem einzubringenden Plasmid und dem *P. denitrificans*-Stamm, der die DNA aufnehmen soll. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 32 °C ein bis zwei Tage im Brutschrank.

2.2.15 Blau-Weiß-Screening

Die Blau-Weiß-Screening (*lacZ*-Farbscreening) ist eine häufige Methode, um rekombinante Plasmide in Bakterienkolonien zu identifizieren, wobei sich mehrere hundert Kolonien gleichzeitig untersuchen lassen.

Man nutzt die α - Ω -Komplementation der β -Galactosidase von bestimmten *E. coli*-Stämmen, um zu überprüfen, ob die rekombinanten Plasmide ein Insert tragen. Viele Klonierungsvektoren tragen die regulatorischen Sequenzen des *lac*-Operons und mit

dem *lacZ'*-Gen einen kleinen Teil (α -Fragment) der β -Galactosidase. Zusätzlich enthalten sie eine Multiple Klonierungsstelle (MCS) im *lacZ'*-Gen. Diese Plasmide werden in Wirtszellen gebracht, die den restlichen Teil (Ω -Fragment) der β -Galactosidase exprimieren. Nur wenn beide Fragmente exprimiert werden entsteht ein aktives Enzym. Die Anwesenheit des Enzyms lässt sich mit einer Farbreaktion nachweisen. Das künstliche Substrat X-Gal wird dabei in Galaktose und ein Spaltprodukt zerlegt, das mit Luftsauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff reagiert. Ist das Insert erfolgreich in die MCS kloniert, wird kein α -Fragment exprimiert, und die Klone bleiben weiß. Zum Induzieren des Farbscreenings verwendet man den synthetischen Induktor IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid), er kann von dem Enzym nicht gespalten werden, sodass die Induktion dauerhaft ist.

Für das Screening wird eine Mischung aus 10 μ L IPTG-Lösung, 40 μ L X-Gal-Lösung und 50 μ L LB-Medium auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die zu untersuchenden Bakterien werden nach der Transformation auf dieser Platte ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank lassen sich blaue und weiße Klone unterscheiden.

2.2.16 Southern-Hybridisierung

Mit Hilfe der Hybridisierung nach Southern (Southern-Blot) lassen sich bestimmte DNA-Bereiche spezifisch nachweisen. Die DNA wird dabei auf einer Membran fixiert und denaturiert, eine spezifische markierte DNA-Sonde bindet dann an die fixierten Einzelstränge [118]. Die Sonden werden per PCR hergestellt. Zusätzlich zum normalen PCR-Ansatz wird 1 μ L Digoxigenin-11-dUTP hinzu gegeben, das in das Amplifikat statistisch an Stelle von dTTP eingebaut wird. Die Dig-markierte Sonde lässt sich dann in einem speziellen Färbeverfahren nachweisen. So lassen sich beispielsweise Deletionen auf genomischer Ebene nachweisen.

Zunächst wird genomische *Paracoccus*-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut. Dabei wird ca. 1 μ g genomische DNA eingesetzt. Als Positivkontrolle dient meist Plasmid-DNA, von dieser sollten nur etwa 5 ng eingesetzt werden. Nach dem Restriktionsverdau erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente im 0,7 %igen Agarose-Gel.

Die DNA wird dann anschließend mit Hilfe von Vakuum auf eine positiv geladene Nylon-Membran transferiert. Da DNA negativ geladen ist braucht sie auf dieser Membran nicht mit Hitze oder UV-Licht fixiert zu werden. Beim Zuschneiden der Maske ist darauf zu achten, dass sie kleiner als das Agarosegel ist, da sie sonst nicht dicht abschließt. Die Membran sollte etwas größer als das Gel sein. Die Maske liegt auf der Membran und das Gel auf der Maske, so dass nur der von der Maske freigelassene Bereich auf die Membran geblottet wird. Als Blotlösung wird 0,4 N NaOH-Lösung verwendet, da sie die DNA schon während des Blotvorgangs denaturiert, und auf der Membran Einzelstrang-DNA gebunden wird. Durch das Anlegen eines Vakuums von ca. 80 mbar wird die DNA aus dem Gel auf die Nylon-Membran geblottet. Der Transfer dauert zwischen ein bis zwei Stunden.

Die Membran wird anschließend in 5 x SSC äquilibriert. Unter der UV-Lampe werden die Banden des Längenstandards markiert. Dann folgt die Vorhybridisierung für ein bis zwei Stunden bei 42 °C, wobei die Membran mit Magermilchpulver abgesättigt wird, um eine unspezifische Bindung der Sonde zu verhindern. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde muss vor Gebrauch 10 Minuten im Wasserbad aufgeköcht werden, damit die doppelsträngige DNA denaturiert. Dann wird die Vorhybridisierungs-Lösung durch etwa 5 mL Hybridisierungslösung ersetzt und unter langsamem Rotieren bei 42 °C über Nacht im Rollerschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Membran zunächst gewaschen. Zuerst wird die ungebundene Sonde abgossen, dann wird erst mit Waschlösung 1 zweimal für 5 Minuten gewaschen, anschließend wird zweimal mit Waschlösung 2 jeweils für 20 Minuten bei 68 °C gewaschen. Die Temperaturerhöhung dient zum Ablösen unspezifisch gebundener Sonde. Es schließt sich die Färbung an.

Hierfür wird die Membran für ca. 2 Minuten in Lösung 1 äquilibriert. Anschließend folgt das Blocken der Membran für 30 Minuten in Lösung 2 bei Raumtemperatur. Dann folgt die Inkubation für 30 Minuten mit einem Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (1:5000 in 10 mL Lösung 2). Der Antikörper wird abgossen und ungebundenes AP-Konjugat wird durch zweimaliges Waschen für 15 Minuten mit 20 mL Lösung 1 entfernt. Die Membran wird dann in TMN für 5 Minuten äquilibriert, dann in 10 mL Färbelösung getaucht und solange im Dunkeln inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen sind. Die Färbereaktion wird durch

50 mM EDTA-Lösung gestoppt. Die Membran wird dann zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.2.17 Koloniehybridisierung (Dot-Blot)

Der Dot-Blot ist eine Möglichkeit, Bakterienkolonien *in situ* ohne vorherige DNA-Isolierung zu untersuchen.

Zunächst wird eine Nitrocellulose-Rundmembran auf eine LB-Platte mit entsprechenden Antibiotika gelegt. Die Membran sollte luftblasenfrei aufliegen, so dass die Nährstoffversorgung der Zellen gewährleistet ist. Die zu untersuchenden *Paracoccus*-Klone werden auf die Membran überimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Die hochgewachsenen Kolonien werden dann *in situ* lysiert. Dazu werden vier Filterpapiere vorbereitet, die mit verschiedenen Flüssigkeiten getränkt werden. Die Membran wird dann jeweils für 5 Minuten auf das Filterpapier gelegt. Zunächst werden die Bakterien mit 10 %iger SDS-Lösung lysiert. Danach folgt ein Denaturierungsschritt mit Natronlauge, die im nächsten Schritt neutralisiert wird. Die Bakterienlyse schließt mit einem Waschschriff. Anschließend wird die DNA mit Hitze auf der Membran fixiert. Die luftgetrocknete Membran wird dazu zwischen zwei Filterpapieren für 2 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank gebacken.

Nach dem Backen wird die Membran mit den lysierten Kolonien gewaschen, um die Zelltrümmer zu entfernen. Dazu wird die Membran in 20 mL Waschlösung für 30 Minuten bei 42 °C im Rollerschrank inkubiert und dann vorsichtig mit einem feuchten Kleenex-Tuch abgewischt und noch einmal mit 5 x SSC gespült. Eine unvollständige Entfernung der Zellreste führt zu einem hohen Hintergrundsignal bei der späteren Anfärbung.

Es schließt sich jetzt die Vorhybridisierung an. Alle folgenden Schritte entsprechen denen der Southern-Hybridisierung (siehe 2.2.16).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Analytische Membranpräparation

2.3.1.1 *E. coli* Testexpression

Zunächst werden 300 mL LB-Medium 1 %ig mit einer entsprechenden *E. coli* C41 Kultur angeimpft. Zum Überwachen des Wachstums wird stündlich die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 wird die Expression des gewünschten Proteins mit 1 mM IPTG induziert, wobei vorher 1 mL Kultur abgenommen wird. Im Anschluss wird weiterhin jede Stunde die OD gemessen und 1 mL der Kultur abgenommen. Die entnommenen Proben werden zentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und für die spätere Analyse in 1x PAGE-Probenpuffer resuspendiert, wobei 100 µL in etwa der Zellmenge bei einer OD von 1 entsprechen sollen.

Drei bis vier Stunden nach der Induktion wird die Kultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall GSA, 6000 rpm, 20 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 10 mL Puffer 1 resuspendiert und mit 100 µM frischangesetzten Protease-Inhibitor Pefabloc SC versetzt. Die Lyse der Zellen wird durch Zugabe von 1/100 Volumen Lysozym und Inkubation auf Eis für 1 bis 2 Stunden und anschließendes Einfrieren bei – 80 °C erreicht. Nach dem Auftauen der lysierten Zellen wird das hochviskose Lysat zweimal für 5 Minuten auf Eis beschallt, um die genomische DNA zu zerkleinern. Zum Abtrennen von Zelltrümmern und nicht lysierten Zellen wird dann zentrifugiert (Sorvall SS34, 10000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wird in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert (Beckman Ti60, 35000 rpm, 1 h, 4 °C). Die pelletierten Membranen werden mit einem Spatel in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe eines Teflonstabs in Puffer 2 resuspendiert. Für die spätere Analyse wird außerdem eine kleine Menge des Cytoplasmas aufgehoben. Die Membranen werden bei – 80 °C gelagert.

2.3.1.2 *Paracoccus* Kulturen

Für die Membranpräparation aus *Paracoccus* im kleinen Maßstab werden 500 mL Succinat-Medium mit 2 mL einer *Paracoccus*-Übernachtskultur angeimpft und für mindestens 24 Stunden bei 32°C im Schüttler inkubiert.

Die Kultur wird am nächsten Tag auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall GSA, 6000 rpm, 20 min, 4 °C). Die Zellen werden dann in 10 mL Puffer 1 resuspendiert und die Membranpräparation erfolgt wie in 2.3.1.1. beschrieben.

2.3.2 Membranpräparation im großen Maßstab

2.3.2.1 *E. coli* Kulturen

Für die konventionelle Expression von Surf1 mit Hilfe des pET-Systems werden 15 L LB-Medium 1,5 %ig mit einer entsprechenden *E. coli* C41 Kultur angeimpft. Die Inkubation erfolgt bei 32 °C und 150 rpm. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 wird die Expression des gewünschten Proteins mit 1 mM IPTG induziert.

Für die konstitutive Koexpression der Häm *a* Synthase werden sowohl die Vorkulturen als auch die Hauptkultur in Schikanekolben angezogen, um eine maximale Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. Bei der Verwendung von LB-Medium erfolgt die Induktion bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,0. Wird autoinduzierendes Medium verwendet, erfolgt die Inkubation der Hauptkultur bei 32 °C für ca. 24 Stunden.

Drei bis vier Stunden nach der Induktion wird die Kultur auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 100 mL kaltem Puffer 1 resuspendiert und mit 100 µM frisch angesetzten Protease-Inhibitor Pefabloc SC versetzt. Zum Zellaufschluss wird eine Manton-Gaulin-Pressen verwendet, die zunächst mit 1 L H₂O gespült wird, dann mit 1 L Puffer 1. Nach dem Einfüllen der Zellen wird der überschüssige Puffer abgepumpt und im Anschluss der Pumpenkreislauf geschlossen. Die Zellen werden nun 10 Minuten bei 400 bar Druck aufgeschlossen, wobei die entstehende Wärme über eine Kühlspirale an ein Eisbad abgegeben wird. Die aufgebrochenen Zellen werden abzentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C), um unaufgeschlossene

Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wird in Zentrifugenbecher gefüllt und für mindestens 6 Stunden zentrifugiert (GS3, 8000 rpm, 4 °C). Die pelletierten Membranen werden mit einem Spatel aus den Bechern entnommen und in Puffer 2 mit Hilfe eines Ultra-Turax-Homogenisators resuspendiert. Die Membranen werden ein weiteres Mal zentrifugiert (Beckman Ti45, 35000 rpm, 1 h, 4 °C) und in möglichst wenig Puffer 2 resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung werden die Membranen bei – 80 °C gelagert.

2.3.2.2 *Paracoccus* Kulturen

Für die Membranpräparation im großen Maßstab werden zunächst 2,5 L Succinat-Medium mit bis zu 100 mL einer *Paracoccus* LB-Kultur angeimpft und über Nacht bei 32 °C und 150 rpm inkubiert. Am folgenden Tag werden 50 L Succinat-Medium 4 %ig angeimpft und für 24 Stunden bei 32 °C und 150 rpm inkubiert.

Die Kultur wird am nächsten Tag auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Die pelletierten Zellen werden in ca. 100 mL kaltem Puffer 1 resuspendiert und mit 100 µM frisch angesetzten Protease-Inhibitor Pefabloc SC versetzt. Zum Zellaufschluss mit einer Manton-Gaulin-Pressen erfolgt wie in 2.3.2.1. beschrieben. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (Sorvall RC36, 5000 rpm, 15 min, 4 °C), werden unaufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und Speicherstoffe abgetrennt. Der Überstand wird in Zentrifugenbecher gefüllt und über Nacht zentrifugiert (GS3, 8000 rpm, 4 °C). Das entstandene Pellet besteht aus einem härteren weißlichen Kern aus Speicherstoffen und dem weichen rötlichen Membranen, welche mit einem Spatel abgenommen und in Puffer 2 mit Hilfe eines Ultra-Turax-Homogenisators resuspendiert werden. Die Membranen werden ein weiteres Mal zentrifugiert (Beckman Ti45, 35000 rpm, 1 h, 4 °C) und in möglichst wenig Puffer 2 resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung werden die Membranen bei – 80 °C gelagert.

2.3.3 Solubilisierung von Membranen

2.3.3.1 Isolierung von Surf1

Um Membranproteine über Säulenchromatographie aufreinigen zu können, müssen die isolierten Membranen zuerst solubilisiert werden. Zur Solubilisierung werden die Detergenzien Triton X-100 bzw. DDM (*n*-Dodecyl- β -D-maltosid) verwendet.

Für die Aufreinigung aus *E. coli* werden die Membranen nach dem Auftauen mit Solubilisierungspuffer versetzt, welcher zusätzlich 100 μ M Pefabloc SC und Triton X-100 in 3 facher Menge (w/w) relativ zur Gesamtproteinkonzentration enthält. Die Proteinkonzentration im Solubilisierungsansatz sollte zwischen 10-15 mg/mL liegen. Der Solubilisierungsansatz wird bei 4 °C 1 Stunde gerührt und anschließend zentrifugiert (Beckman Ti45, 35000 rpm, 1 h, 4 °C). Der Überstand wird mit Verdünnungspuffer auf eine Tritonkonzentration von 2,5 % verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert.

Für die Aufreinigung von Surf1 aus *Paracoccus*, werden die Membranen statt mit Triton mit DDM solubilisiert. Der Solubilisierungspuffer enthält entsprechend DDM in 2 facher Menge (w/w) relativ zur Gesamtproteinkonzentration. Nach der Zentrifugation muss das Solubilisat nicht mehr verdünnt werden und kann gleich filtriert werden.

2.3.3.2 Klassische Isolierung der Cytochrom c Oxidase

Die Membranen werden nach dem Auftauen mit Solubilisierungspuffer versetzt, welcher zusätzlich 100 μ M Pefabloc SC und DDM in 1,5 facher Menge (w/w) relativ zur Gesamtproteinkonzentration enthält. Die Proteinkonzentration im Solubilisierungsansatz sollte 10 mg/mL betragen. Der Solubilisierungsansatz wird bei 4 °C 1 Stunde gerührt und anschließend zentrifugiert (Beckman Ti45, 35000 rpm, 1 h, 4 °C). Der Überstand durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.4 Säulenchromatographie

Alle proteinchromatographischen Methoden wurden bei 4 °C durchgeführt und die Puffer wurden vor der Verwendung sterilfiltriert.

2.3.4.1 Isolierung von Surf1 mittels IMAC

Die Aufreinigung von Surf1 erfolgt über Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), wobei Ni²⁺NTA-Agarose als Säulenmaterial verwendet wird. Hierbei nutzt man die Bindung von deprotonierten Histidinen an Ni²⁺-Ionen, so dass Proteine, die einen Histidin-Tag tragen, können so aus einem Proteingemisch isoliert werden.

Die Säule (Ni²⁺NTA-Superflow, ca. 25 mL, Biopilot FPLC-Anlage, Pharmacia) wird zunächst mit mindestens 5 Säulenvolumen (SV) Säulenpuffer äquilibriert, der für die Aufreinigung des Proteins aus *E. coli* Triton X-100 und für die Aufreinigung aus *Paracoccus* DDM enthält. Das Solubilisat wird mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Im Anschluss wird die Säule mit 5 SV mit Waschpuffer 1 gewaschen. Wenn mit Triton solubilisiert wurde, wird für den Detergenztausch das Waschvolumen auf mindestens 10 SV erhöht bis eine stabile UV-Basislinie erreicht wird. Es schließen sich zwei Waschschrte mit je 4 SV 50 mM Imidazol-Waschpuffer und 80 mM Imidazol-Waschpuffer, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, bevor Surf1 mit 5 SV Elutionspuffer eluiert wird.

Das Eluat wird mit Ultrafiltrationskammern (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kD) auf unter 1 mL Volumen ankonzentriert und mehrfach mit Waschpuffer 2 gewaschen, bis die Imidazolkonzentration unter 1 mM liegt. Alle Fraktionen werden durch SDS-PAGE untersucht. Die Lagerung von ankonzentriertem Protein erfolgt in Aliquots à 50 µL bei – 80 °C.

2.3.4.2 Nachreinigung von Surf1 mittels Anionentauscher

Aufgrund eines stark basischen pI kann Surf1 über einen Anionentauscher nachgereinigt werden, da es im Gegensatz zu etwaigen Verunreinigungen nicht an das starke Anionentauschermaterial MonoQ bindet.

Die Säule (MonoQ HR 5/5, 1 mL, Äkta Purifier, Flussrate 1 mL/min) wird zunächst mit mindestens 5 SV Niedersalzpuffer gewaschen. Die steril filtrierte Probe wird über einen 1 mL *sample loop* aufgetragen und die Säule wird mit 5 SV Niedersalzpuffer gewaschen. Es schließt sich ein Gradient von 20 mM – 500 mM NaCl mit einem Volumen von 20 SV an.

Von Beginn an werden Fraktionen von 1 mL Volumen gesammelt, die im Anschluss durch SDS-PAGE untersucht werden, und Fraktionen, die Surf1 enthalten, werden ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kD).

2.3.4.3 Klassische Isolierung der Cytochrom *c* Oxidase

Die Aufreinigung nativer *aa₃*-Cytochrom *c* Oxidase erfolgt über drei Säulenchromatographieschritte und nutzt im Wesentlichen die Oberflächenladungen des Proteins zur Trennung von anderen Proteinen.

Es wird mit einem Anionentauschermaterial begonnen, und die Säule (DEAE-Sepharose CL-6B, ca. 200 mL) wird zunächst in Säulenpuffer äquilibriert. Beim Beladen der Säule mit Solubilisat ist darauf zu achten, dass pro 100 mL Säulenmaterial maximal 1000 mg Membranprotein geladen werden. Anschließend wird die Säule mit 0,5 SV Säulenpuffer gewaschen, bevor ein linearer Salzgradient von 100 bis 600 mM NaCl mit insgesamt 4 SV über Nacht angeschlossen wird, wobei die Cytochrom *c* Oxidase ab einer Salzkonzentration von etwa 280 mM eluiert. Grünliche Fraktionen werden mittels Redoxspektrum auf die Anwesenheit von Oxidase untersucht und ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 50 kDa).

Das Konzentrat wird auf eine entsprechend äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Ultrogel AcA 34, 50 mL) aufgetragen, wobei das Probenvolumen für eine optimale Trennung zwischen 1-2 % des Säulenvolumens liegen sollte. Bei einer Flussrate von 0,1 mL/min wird mit 1 bis 1,5 SV Säulenpuffer gewaschen und das Eluat fraktioniert aufgefangen. Grüne Fraktionen werden gepoolt und in einem Redoxspektrum überprüft.

Das Eluat der Gelfiltration wird im Anschluss mit 0,5 % (w/v) DDM für eine Stunde bei 4 °C nachsolubilisiert, bevor es ein weiteres Mal auf eine zuvor äquilibrierte

Anionenauschersäule (DEAE-Sepharose CL-6B, ca. 200 mL) geladen wird. Nach dem Beladen wird mit 0,5 SV Säulenpuffer gewaschen, und die Oxidase wird mit 4 SV eines Salzgradienten von 100 bis 400 mM NaCl eluiert. Grünliche Fraktionen werden in einem Redoxspektrum und durch SDS-PAGE überprüft, gepoolt und ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 50 kD). Die Lagerung von ankonzentriertem Protein erfolgt in Aliquots à 50 µL bei – 80 °C.

2.3.5 Gelfiltration

Alle proteinchromatographischen Methoden wurden bei 4 °C durchgeführt. Alle Puffer wurden vor der Verwendung sterilfiltriert und entgast.

2.3.5.1 Analytische Gelfiltration

Für die Analyse von Surf1 wird eine Gelfiltrationssäule in Puffer voräquilibriert, wobei entweder eine Superose 6 10/30 (24 mL, Äkta Purifier, Flussrate 0,5 mL/min) oder eine Superdex 200 10/30 Säule (24 mL, Äkta Purifier Flussrate 0,5 mL/min) zur Anwendung kam. Im Anschluss werden 100-500 µg ankonzentriertes, sterilfiltriertes Protein über einen 100 µL *sample loop* geladen und mit 1,5 SV Puffer eluiert. Fraktionen von 1 mL Volumen werden gesammelt und nach SDS-PAGE-Analyse gepoolt und ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kD).

2.3.5.2 Präparative Gelfiltration

Für präparative Zwecke werden 5-20 mg ankonzentriertes, steril filtriertes Surf1 über einen 1 mL *sample loop* auf eine in Puffer voräquilibrierte Superose 6 (ca. 220 mL, Äkta Purifier, Flussrate 0,5 mL/min) geladen. Die Elution des Proteins erfolgt mit 1,5 SV über Nacht und Fraktionen von 3 mL Volumen werden gesammelt. Anhand des Elutionsprofils werden einzelne Fraktionen gepoolt und ankonzentriert (Sartorius Vivaspin, Ausschlussvolumen 30 kD). Die Lagerung von ankonzentriertem Protein erfolgt in Aliquots à 50 µL bei – 80 °C.

2.3.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration wird nach Lowry [119, 120] in leicht modifizierter Form mit 0,5 % (w/v) SDS bestimmt [120]. Die Lowry-Arbeitslösung muss frisch angesetzt werden. Hierzu werden 20 mL Lowry A, je 0,2 mL Lowry B1 und Lowry B2 sowie 0,5 mL Lowry C gemischt. Eine Eichreihe wird aus einer 2 mg/mL BSA-Lösung in den Verdünnungen 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1, 5 und 2 mg/mL hergestellt.

Zu 50 µL Probe werden 850 µL Arbeitslösung pipettiert und für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann werden 100 µL Folin-Lösung hinzugegeben, und nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln wird die Absorption bei 750 nm bestimmt.

Auf Basis der Eichreihe lässt sich dann die Proteinkonzentration der Probe bestimmen.

2.3.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.3.7.1 Tris-Glycin-System nach Laemmli

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wird das Tris-Glycin-System nach Laemmli verwendet [121]. Dabei werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts getrennt. Durch die Zugabe von SDS spielt die Eigenladung des Proteins keine Rolle mehr, da sich die negativ geladenen Moleküle an die denaturierte Proteinkette anlagern. Die Proben werden in SDS-Probenpuffer 20 Minuten bei 37° inkubiert.

Es werden 12 %ige Trenngele gegossen, wobei das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid 37,5 : 1 beträgt. Als Radikalstarter dienen TEMED und Ammoniumperoxosulfat. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels, werden 5 %ige Sammelgele gegossen, in die Probenkämme vor dem Polymerisieren eingebettet werden.

Nach dem Auftragen der Proben werden die Proteine durch Anlegen einer konstanten Spannung von 180 V für 45 bis 60 Minuten aufgetrennt. Große Proteine werden durch die Gelmatrix stärker zurückgehalten, als kleine Proteine, so dass sie langsamer zur Anode wandern. Zur Molekulargewichtsabschätzung lässt man einen Marker mitlaufen, der Proteine bekannter Größe enthält.

Zur semi-denaturierenden Auftrennung von Proteinen kann die LDS-PAGE [122] verwendet werden, da LDS im Gegensatz zu SDS bei 0 °C nicht ausfällt, und so schonendere Laufbedingungen erreicht werden können. Hierzu wird den Gelen vor dem Polymerisieren sowie dem Laufpuffer 0,1 % (w/v) LDS zugesetzt. Die Auftrennung erfolgt durch Anlegen von einer konstanten Stromstärke von 8 mA bei 4 °C über Nacht.

Nach Beendigung der Auftrennung wird das Gel gefärbt oder für die Westernblot-Analyse weiterverwendet.

2.3.7.2 Blau-Nativ-PAGE

Bei diesem Gelsystem nutzt man die Bindung des negativ geladenen Farbstoffs Coomassie-Blau an Proteine. Dieser Triphenylmethanfarbstoff bindet unspezifisch kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten des Proteins, ohne es zu denaturieren. Alle Proteine, die diesen Farbstoff gebunden haben, wandern bei pH 7,5 anodenwärts und können entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden [123].

Es werden 1 mm dicke Gele mit einem 3,5 %igen Sammelgel und einem 3,5 % - 18 %igen Gradiententrenngel verwendet. Die Gele werden mit einem Gradientenmischer bei RT unter Verwendung gekühlter Lösungen gegossen und zur Polymerisierung bei 4 °C über Nacht gelagert.

Nach dem Beladen laufen die Gele bei 4 °C zunächst für 30 Minuten bei 100 V und 15 mA, danach wird die Spannung für 1-2 Stunden auf 300 – 500 V erhöht.

Für die zweite Dimension wird das Gel entlang der Laufrichtung in Streifen geschnitten und die Bahn von Interesse auf ein denaturierendes Gel übertragen. Der Lauf erfolgt bei 8 mA über Nacht.

2.3.8 Färbungen für Gele

2.3.8.1 Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung, werden die Proteine im Gel angefärbt. Man verwendet für diese Art der Anfärbung den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei ca. 100 ng.

Zuerst wird das Gel kurz in Wasser gewaschen, anschließend wird es in die Färbelösung gelegt und für etwa 20 Minuten unter Schütteln bei 65 °C inkubiert. Die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fixiert die Proteine zusätzlich. Die Entfernung von überschüssigem Farbstoff erfolgt durch Inkubation bei 65 °C in Entfärbelösung, wobei der Entfärber mehrmals gewechselt werden sollte.

2.3.8.2 Silberfärbung

Das Gel wird nach dem Lauf für mindestens 2 Stunden in Fixierlösung gelegt und bei RT geschüttelt. Es schließen sich drei Waschschrte für jeweils 20 Minuten mit 50 %igem (v/v) Ethanol an. Hierauf wird das Gel für 1 Minute in Vorbehandlungslösung inkubiert und im Folgenden dreimal mit H₂O kurz gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit Silberfärbelösung für 20 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O für etwa 30 Sekunden, kann das Gel durch Zugabe von Entwicklerlösung gefärbt werden. Ist der gewünschte Färbegrad erreicht, wird die Reaktion mit 50 mM EDTA gestoppt.

2.3.8.3 Hämfärbung

Mit Hilfe von TMBZ lässt sich die Peroxidaseaktivität von Hämgruppen bzw. Hämproteinen sichtbar machen. Dies nutzt man, um spezifisch Proteine in Polyacrylamidgelen anzufärben, die eine Hämgruppe tragen [124]. Die Färbung kann sowohl direkt in Polyacrylamidgelen, als nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgen, wobei sich die einzelnen Schritte nicht unterscheiden.

Zunächst wird in Lösung 1 äquilibriert. Danach erfolgt die Inkubation mit der Färbelösung, idealerweise für 2 Stunden auf Eis. Im Anschluss wird die

Färbereaktion durch Zugabe von Entwicklerlösung, die H_2O_2 enthält, gestartet. Bei Bedarf kann durch einen Waschschritt mit Lösung 4 der Hintergrund reduziert werden.

Gefärbte Membranen können nach der Dokumentation der Färbung mit Methanol entfärbt und für den Westernblot weiterverwendet werden.

2.3.9 Westernblot

Mit Hilfe des Westernblots lassen sich Proteine gezielt nachweisen, wobei man elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert und die spezifische Bindung von Antikörpern an das zu untersuchende Protein ausnutzt [125, 126]. Über einen zweiten Antikörper kann man die Proteine sichtbar machen, da an diesen das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, das verschiedenste Reagenzien farbig umsetzen kann.

Für die Westernblot-Analyse wird die Proteinprobe über ein Polyacrylamidgel (PAG) aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran bzw. PVDF-Membran erfolgt über das Nass-Blotting-Verfahren. Dafür werden in einer Schale zunächst zwei Lagen Filz und zwei Lagen Filterpapier auf eine Lochplatte gelegt und mit Transferpuffer großzügig getränkt. Darauf wird vorsichtig das Gel gelegt, auf dem dann die Membran aufliegt. Wird eine PVDF-Membran verwendet, sollte diese vorher kurz in Methanol äquilibriert werden. Dann folgen wieder Filterpapier, Filz und die zweite Lochplatte. Es ist darauf zu achten, dass alle Lagen ausreichend in Transferpuffer getränkt sind. Das „Paket“ wird mit Gummibändern zusammengehalten und senkrecht in den Blotting-Tank gestellt. Man sollte hierbei beachten, dass die Membranseite immer zur Anode gewandt ist, während die Gelseite zur Kathode zeigt. Durch das Anlegen eines konstanten Stroms von 400 mA werden die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran gezogen und dort fixiert. Der Transfer dauert zwischen 60 und 90 Minuten.

Nach dem Transfer werden die Proteine in Ponceau-Lösung angefärbt. Dadurch wird kontrolliert, ob der Transfer erfolgreich war, außerdem werden die Banden des Proteinstandards markiert. Durch Spülen mit TBS-Puffer wird die Membran wieder entfärbt und anschließend mit BSA-Lösung abgesättigt, um unspezifische Antikörper-Bindung zu vermeiden. Idealerweise wird über Nacht inkubiert, mindestens aber 3 Stunden, um eine optimale Absättigung zu erreichen.

Die Membran wird dann zweimal mit TBS-TT-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:1000 in BSA) erfolgt. Nach mindestens einer Stunde folgen zwei weitere Waschschrte mit TBS-TT. Dann wird mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (1:1000 in BSA) für eine Stunde inkubiert. Nach mehreren Waschschrten mit TBSTT, die der Verbesserung des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses dienen, folgt die Färbereaktion.

Die Membran wird nach dem Waschen in TMN-Puffer äquibriert und anschließend im Dunkeln in der Färbelösung inkubiert bis die Banden sichtbar werden. Bevor das Hintergrundsignal zu stark wird, wird die Reaktion durch Waschen mit EDTA gestoppt. Die Membran wird zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.3.10 Hämextraktion

Die Isolierung von Häm erfolgt über saure Acetonextraktion [127]. Für die Extraktion aus ganzen *E. coli* Zellen werden 150 mL LB-Medium mit 2 mL einer entsprechenden Kultur angeimpft und über Nacht bei 32 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (Megafuge, 6000 rpm, 10 min, 4 °C). Anschließend wird das Pellet (1-2 g Zellen) in 10 mL basischem Aceton resuspendiert, etwa 2 Minuten kräftig gerührt und erneut zentrifugiert (Megafuge, 6000 rpm, 10 min, 4 °C).

Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 10 mL saurem Aceton resuspendiert und etwa 2 Minuten kräftig gerührt. Nach Zentrifugieren der Suspension (Megafuge, 6000 rpm, 10 min, 4 °C), wird der bräunliche Überstand in einen Scheidetrichter überführt und mit 10 mL Diethylether und 15 mL 1,2 M Salzsäure ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die obere Diethyletherphase, die nun das gelöste Häm enthält, noch ein weiteres Mal mit 15 mL 1,2 M Salzsäure ausgeschüttelt. Die Etherphase wird im Anschluss in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und im Abzug bei geöffnetem Deckel stehen gelassen, bis das Lösungsmittel verdampft ist. Das braune Hämpräzipitat wird in einer kleinen Menge DMSO gelöst und die Konzentration der einzelnen Hämkomponenten lässt sich über ein Pyridin-Hämochromspektrum (vgl. 2.4.2.2.) bestimmen.

Für die Hämextraktion aus vor- oder aufgereinigtem Protein, wird die Proteinlösung direkt mit saurem Aceton versetzt, und die weitere Hämextraktion erfolgt wie oben beschrieben.

2.3.11 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Auftrennung verschiedener Hämtypen erfolgt über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit einer μ RPC-C2/C18-Säule (GE Healthcare), wobei man hier das unterschiedliche Lösungsverhalten der einzelnen Hämpezies in organischem Lösungsmittel ausnutzt.

Nach der Hämextraktion (vgl. 2.3.10.) aus ganzen Zellen oder aufgereinigtem Protein wird die Probe in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen und sterilfiltriert. Die Säule (μ RPC-C2/C18-Säule, 1,66 mL, Äkta Purifier, Flussrate 0,5 mL/min) wird zunächst mit 5 SV 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA äquilibriert, und im Anschluss wird über einen 100 μ L *sample loop* aufgetragen. Es folgt ein Waschschriff mit 2 SV 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA gewaschen, bevor ein Gradient von 50 % bis 100 % Acetonitril mit einem Volumen von 5 SV angehängt wird. Die gesammelten Fraktionen von 1 mL werden nach Elutionspeaks gepoolt und das Lösungsmittel wird unter Vakuum in der SpeedVac abgezogen.

Das Hämpräzipitat wird dann in DMSO gelöst und in einem Pyridin-Hämochromspektrum (vgl. 2.4.2.2.) untersucht.

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Enzymaktivitätstests

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

2.4.1.1 Reduktion von Cytochrom *c*

25 mg Cytochrom *c* (aus Pferdeherz) werden in 500 μL Puffer gelöst und durch Zugabe von wenigen Kristallen Natriumdithionit reduziert. Diese Reaktion lässt sich durch einen Farbumschlag von dunkelrot nach rot-orange beobachten.

Anschließend wird überschüssiges Dithionit über eine Gelfiltration (Sephadex G25, Pharmacia) entfernt. Dithionit zeigt eine starke Absorption um 350 nm, zur Kontrolle wird daher ein Spektrum von 300 nm bis 650 nm aufgenommen. Durch Nachreduktion lässt sich feststellen, ob eine vollständige Reduktion der Cytochrom *c*-Lösung erreicht wurde. Zur Bestimmung der Konzentration wird ein Redoxspektrum im Bereich von 500 nm bis 650 nm aufgenommen ($\Delta\epsilon_{550-535} = 19,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.4.1.2 Reduktion von Decylubichinon

50 mg Decylubichinon werden in 3 mL Ethanol gelöst und mit 1 mL H_2O und 100 μL 1 M HCl versetzt. Man erhält eine intensive, gelbe Flüssigkeit. Die Reduktion erfolgt durch vorsichtige, kristallweise Zugabe von KBH_4 , wobei es zu einem Farbumschlag von gelb nach farblos und Gasentwicklung kommt. Schrittweise werden nun jeweils 20 μL 1 M HCl zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Dies dient dem Verbrauch von überschüssigem KBH_4 . Der pH-Wert der Lösung wird überprüft und sollte unter pH 4 liegen.

Im Anschluss werden 2 mL H_2O zugegeben, und die Lösung wird dreimal mit je 5 mL Cyclohexan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden zwei weitere Male mit je 2 mL H_2O ausgeschüttelt, und die organische Phase wird in Aliquots von 150 μL in 500 μL -Reaktionsgefäße überführt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum in der SpeedVac abgezogen, und die Aliquots werden bei -80°C gelagert.

Bei 100 %iger Ausbeute sollte nach Aufnahme des reduzierten Decylubihydrochinons in 30 μL 100 μM HCl/Ethanol eine 50 mM Stammlösung entstehen. Zur Konzentrationsbestimmung wird ein Spektrum einer 100 – 300 fachen Verdünnung im Bereich von 200 bis 350 nm aufgenommen. Im Anschluss wird mit

wenigen Mikrolitern einer 1 M NaOH-Lösung oxidiert und erneut ein Spektrum aufgenommen. Im Differenzspektrum lässt sich anhand des Absorptionsmaximums bei 275 nm ($\Delta\varepsilon_{(275 \text{ nm, oxred})} = 12,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Konzentration an Decylubihydrochinons bestimmen [128, 129].

2.4.1.3 Aktivitätsmessung der Cytochrom c Oxidase

Die aa_3 -Cytochrom c Oxidase katalysiert die Oxidation von Cytochrom c und vermittelt die Elektronenübertragung auf elementaren Sauerstoff.

Zur Bestimmung der Aktivität werden 20 μM reduziertes Cytochrom c als Substrat verwendet. Die Cytochrom-Stammlösung wird in der entsprechenden Verdünnung mit Aktivitätspuffer gemischt, und nach der Zugabe der Probe wird die Abnahme der Absorption bei 550 nm gemessen ($\Delta\varepsilon_{\text{cyt } c, 550 \text{ nm}} = 19,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die anfängliche Absorptionsänderung wird über einen Zeitraum von 10 Sekunden ermittelt, und die Steigung wird über lineare Regression bestimmt.

Die spezifische Aktivität wird über die untenstehende Formel berechnet.

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

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

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

2.4.1.4 Aktivitätsmessung der Ubichinoloxidase

Die ba_3 -Ubichinoloxidase katalysiert die Oxidation von Ubichinol und überträgt die Elektronen auf elementaren Sauerstoff.

Für den Aktivitätstest werden 50 μM reduziertes Decylchinon als Substrat verwendet. Da die Aktivität nicht vom isolierten Enzym, sondern von Membranpräparationen bestimmt werden soll, muss der *bc₁*-Komplex gehemmt werden, da er ebenfalls Decylhydrochinol als Substrat verwendet. Es werden dafür 50 μM des Strobilurin-Derivats PS278991 (BASF) in den Reaktionsansatz pipettiert.

Die Membranen werden in der entsprechenden Verdünnung mit Aktivitätspuffer gemischt, und nach Zugabe des Inhibitors wird bei 275 nm gemessen. Wenn sich eine stabile Grundlinie eingestellt hat, wird die Reaktion durch Zugabe von Decylchinol gestartet, und die Absorptionzunahme bei 275 nm aufgezeichnet ($\Delta\epsilon_{(\text{Decylchinol}, 275 \text{ nm})} = 12,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die anfängliche Absorptionsänderung wird über einen Zeitraum von 10 Sekunden ermittelt, und die Steigung wird über lineare Regression bestimmt. Die Aktivität des Enzyms lässt sich analog mit der in Abschnitt 2.4.1.3 beschriebenen Formel berechnen.

2.4.2 Spektroskopische Methoden

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

2.4.2.1 Native Redoxspektren

Für Membranspektren wird ein Teil der präparierten Membranen in Spektrenpuffer aufgenommen. Zum Herauslösen der Proteine aus der Membran werden 1,25 % (v/v) Triton X-100 zu der Probe pipettiert, die optimale Proteinkonzentration sollte bei 2,5 mg/mL liegen. Nach 30minütiger Zentrifugation (Biofuge, 13000 rpm, 4°C) befinden sich die Membranproteine im Überstand und können für die Messung verwendet werden. Aufgereinigtes Protein kann in entsprechender Verdünnung in DDM-haltigem Puffer direkt eingesetzt werden.

Es werden Differenzspektren aufgenommen, wobei die oxidierte Form von der reduzierten Form abgezogen wird. Die Absorption wird dabei in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 650 nm gemessen. Zunächst wird die Probe durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat vollständig oxidiert. Nach der Aufnahme

des Spektrums wird die Probe dann vollständig reduziert, indem einige Kristalle Natriumdithionit hinzugegeben werden. Es erfolgt die Aufnahme des reduzierten Spektrums.

Über die charakteristischen Absorptionsbanden im α - und β -Bereich des Hämspektrums lassen sich Hämkonzentrationen einer Probe bestimmen. Im Falle der aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase wird hierfür der Extinktionskoeffizient für Häm *a* von $\Delta\epsilon_{(\text{redox}, 605-630 \text{ nm})} = 11,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet [130].

2.4.2.2 Pyridin-Hämochromspektren

Mit Hilfe von Pyridin-Hämochromspektren lassen sich Hämkomponenten ohne ihre Proteinumgebung darstellen. Hierzu wird eine entsprechende Probe mit 20 % (v/v) Pyridin, 1 M NaOH versetzt, wobei die fünfte und sechste Koordinationstelle des Eisenzentralatoms durch Pyridin besetzt werden. Die Aufnahme der Redoxspektren erfolgt analog zu nativen Spektren (vgl. 2.4.2.1.) im Bereich von 500 – 650 nm.

Anhand charakteristischer Absorptionsbanden im α - und β -Bereich lassen sich die einzelnen Hämgruppen identifizieren, und eine Konzentrationsbestimmung ist über die Extinktionskoeffizienten möglich:

Hämtyp	Wellenlänge λ (nm)	Extinktionskoeffizient ϵ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Quelle
Häm <i>a</i>	587-620	21,7	[131]
Häm <i>b</i>	557-540	22,1	[131]
Häm <i>o</i>	552-535	24,0	[132]

2.4.2.3 Kohlenmonoxid-Bindungsspektren

Kohlenmonoxid ist ein kompetitiver Inhibitor der Cytochrom *c* Oxidase, der spezifisch an Häm a_3 bindet. Dadurch verändert sich das Spektrum in charakteristischer Weise.

Das Enzym wird in entsprechender Verdünnung mit einigen Kristallen Natriumdithionit reduziert, und es wird ein Spektrum im Bereich von 400 – 650 nm

aufgenommen. Im Anschluss wird die Probe in der Küvette mit Kohlenmonoxid für ca. 1 Minute begast. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Flussrate nicht zu hoch ist, da es aufgrund des DDM-haltigen Puffer zu starken Aufschäumen der Probe kommen kann. Nach Aufnahme eines weiteren Spektrums, wird nach Abzug des nicht ligandierten reduzierten Spektrums eine deutlich Blauverschiebung des α -Peaks nach 592 nm und ein Trog um 608 nm sichtbar. Im Soret-Bereich verschiebt sich das Absorptionsmaximum nach 445 nm, und bei 432 nm erscheint ein Trog.

2.4.2.4 Cyanid-Bindungsspektren

Auch Cyanid ist ein kompetitiver Inhibitor der Cytochrom *c* Oxidase, der spezifisch an das Häm α_3 -Cu_B Zentrum des Enzyms bindet, wodurch es zu einer Änderung der spektralen Eigenschaften kommt.

Das Enzym wird in entsprechender Verdünnung mit einigen Kristallen Natriumdithionit reduziert, und es wird ein Spektrum im Bereich von 500 – 650 nm aufgenommen. Im Anschluss wird Kaliumcyanid (pH 7) in einer Endkonzentration von 40 mM hinzupipettiert und ein weiteres Spektrum aufgenommen. Nach Abzug des nicht ligandierten reduzierten Spektrums sieht man eine deutlich Blauverschiebung des α -Peaks nach 592 nm, und ein Trog um 612 nm wird sichtbar.

2.4.3 Isotherme Titrationskalorimetrie

Für die isothermen Titrationskalorimetrie (ITC)-Messungen wurden Surf1-Stammlösungen nach der präparativen Gelfiltration (vgl. 2.3.5.2) in 20 mM NaP_i, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM (pH 8) und eine Häm α -Stammlösung in DMSO bereitgestellt.

Sämtliche ITC-Messungen wurden von Dr. Oliver Anderka (sanofi-aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) durchgeführt und ausgewertet.

2.4.4 Proteinkristallisation

Für die Proteinkristallisation wurden Surf1-Stammlösungen nach der präparativen Gelfiltration (vgl. 2.3.5.2) in 20 mM NaP_i, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM (pH 8) und mit einer Konzentration von 10 – 20 mg/mL bereitgestellt.

Sämtliche Versuche zur Proteinkristallisation von Surf1-Proteinen wurden von Dr. Orla Slattery (Arbeitskreis Prof. Pos, Membrane Transport Machinerics, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt am Main) durchgeführt und ausgewertet.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden in mehreren Teilbereichen dargestellt, wobei jedem experimentellen Teil ein theoretischer Teil vorangestellt ist.

3.1 Bioinformatische Untersuchungen

In Genom von *Paracoccus denitrificans* sind zwei homologe Surf1-Proteine kodiert. Da zu Beginn dieser Arbeit weder strukturelle noch ausreichende funktionelle Daten vorhanden waren, wurden im Vorfeld der experimentellen Analyse einige bioinformatische Untersuchungen durchgeführt, die im Folgenden dargestellt sind.

3.1.1 Organisation der *surf1*-Gene

In *P. denitrificans* konnte ein zuvor gefundener offener Leserahmen stromabwärts des *qox*-Operons [40] als *surf1*-Homolog identifiziert werden (Abb. 3.1b). Das translatierte Protein kann allerdings nur eine Transmembrandomäne ausbilden [45]. Eine genauere Analyse der Gensequenz ergab, dass sich 57 bp stromaufwärts des vermuteten Start-ATG im Leserahmen ein alternatives Start-Codon GTG mit einer entsprechenden Shine-Dalgarno-Sequenz befindet (Abb. 3.1c). Das Protein verlängert sich so um 19 Aminosäuren, so dass die Ausbildung einer N-terminalen Transmembranhelix möglich ist.

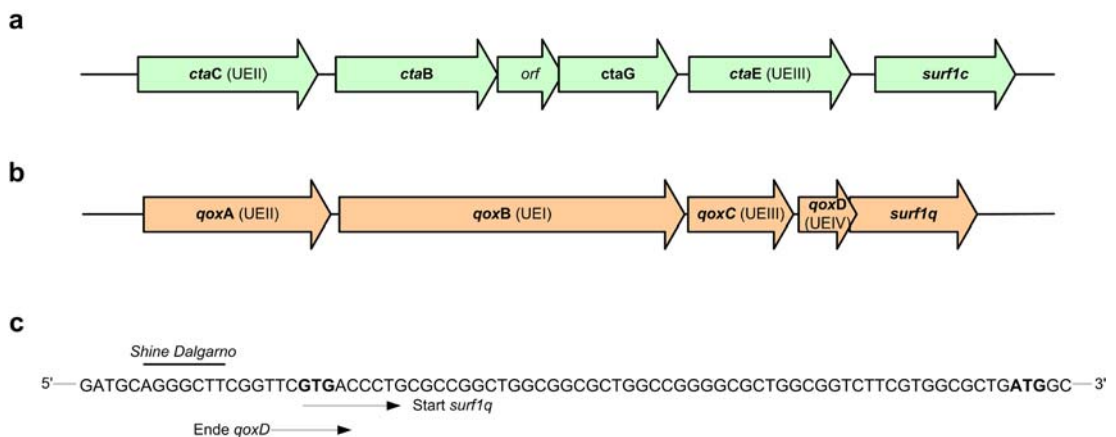


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des (a) *cta*-Operons und des (b) *qox*-Operons. In (c) ist ein Ausschnitt des *qox*-Operons dargestellt (pos. 4202 bis 4283). Das ursprüngliche Start-ATG sowie das alternative Start-GTG sind fett hervorgehoben.

Ein weiteres *surfl*-Homolog wurde im Zusammenhang mit einem offenen Leserahmen stromabwärts des *cta*-Operons gefunden (Abb. 3.1a). Zur Unterscheidung wird das *surfl*-Homolog im *cta*-Operon im Folgenden mit *surflc* bezeichnet, während *surflq* für das Gen stromabwärts des *qox*-Operon steht. Die Aminosäuresequenzen der translatierten Gene sind in Anhang wiedergegeben. Das translatierte Surf1c mit seinen 223 Aminosäuren hat ein Molekulargewicht von 24,6 kD, während Surf1q 230 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 24,7 kD besitzt.

3.1.2 Sequenzalignment

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Translationsprodukte der beiden *surfl*-Gene über ein Sequenzalignment mit anderen Surf1-Homologen verglichen, um festzustellen, ob Ähnlichkeiten zwischen den Spezies bestehen. Die Sequenzen wurden aus der Swiss-Prot-Datenbank entnommen.

Bei der Analyse der Sequenzen zeigt sich, dass alle der verglichenen Proteine starke Homologien untereinander aufweisen. Dabei können für Surf1c eine Sequenzidentität mit Surf1q von 31 % und eine Sequenzähnlichkeit von 47 % bestimmt werden. Ein Vergleich mit humanem Surf1 ergibt für Surf1c eine Sequenzübereinstimmung von 22 % und 33 % Sequenzähnlichkeit. Für das Hefe-Homolog Shy1 erhält man Werte von 18 % Sequenzidentität und 30 % Ähnlichkeit. Vergleicht man Surf1q mit humanem Surf1, können 28 % Sequenzidentität und 39 % Sequenzähnlichkeit bestimmt werden, für Shy1 ergeben sich Werte von 18 % und 29 %.

Das Sequenzalignment (Abb. 3.2) wurde mit dem Programm ClustalX 1.83 erstellt [101]. Neben den eukaryotischen Surf1-Homologen vom *Homo sapiens* (Swiss-Prot-Nr. Q15526), *Mus musculus* (P09925), *Drosophila melanogaster* (Q9U4F3) und *Saccharomyces cerevisiae* (P53266) wurden auch die bakteriellen Homologe aus *Rhodobacter sphaeroides* (Q3J5F5), *Agrobacterium tumefaciens* (A9CJX1) und *Caulobacter crescentus* für die graphische Darstellung ausgewählt. Für *C. crescentus* werden ebenfalls zwei Surf1-Proteine vorhergesagt, wobei wie bei *Paracoccus* ein Surf1-Protein (Q9A306) mit der Cytochrom *c* Oxidase und das andere Protein (Q9A7F4) mit einer Chinoloxidase assoziiert scheint.

Ergebnisse

Zwei auffällige hydrophobe Bereiche, in der Abbildung mit einem Querbalken hervorgehoben, bilden sich dabei aus, wobei einer nahe dem N-Terminus lokalisiert ist. Der zweite Cluster von hydrophoben Aminosäuren ist nahe dem C-Terminus gelegen. Die Länge dieser hydrophoben Bereiche reicht aus, um Transmembranhelices auszubilden.

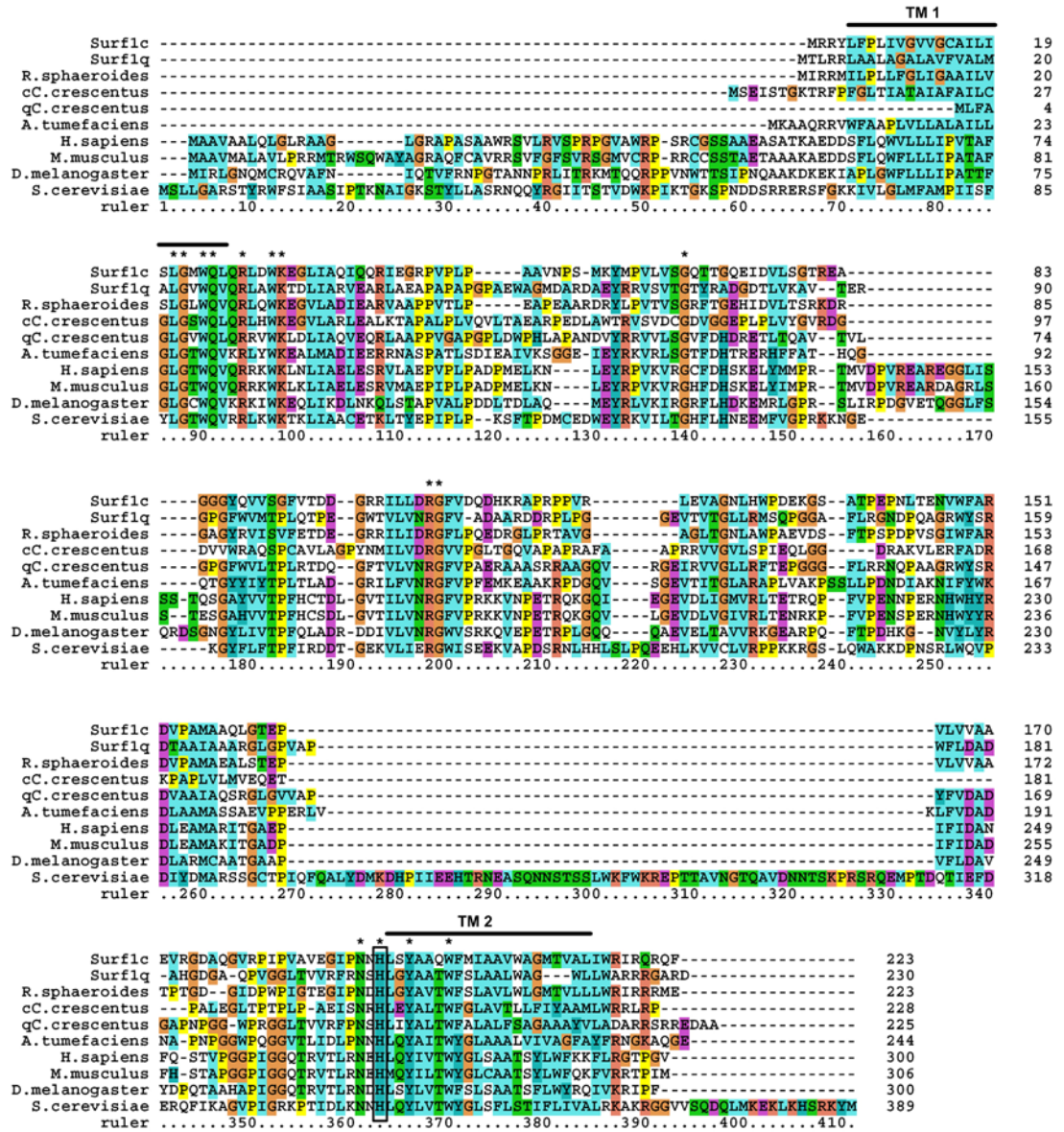


Abbildung 3.2: Aminosäure-Sequenzalignment von Surf1-Proteinen. Die hypothetischen Transmembranhelices sind mit einem Querbalken gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern (*) markiert und der in dieser Arbeit untersuchte, konservierte Histidinrest in der Nähe der zweiten Helix ist mit einem Kasten hervorgehoben. Die Sequenzen wurden der Swiss-Prot-Datenbank entnommen (siehe Text) und das Alignment wurde mit dem Programm ClustalX 1.83 erstellt.

Außerdem stechen zwei Bereiche mit konservierten Aminosäuren hervor, die in der Abbildung mit einem Stern (*) hervorgehoben sind. Nahe dem periplasmatischen

Teil der N-terminalen Helix befindet sich eine Anhäufung von konservierten Aminosäureresten. Ein weiterer Bereich mit konservierten Aminosäureresten ist an der periplasmatischen Seite der C-terminalen Helix lokalisiert. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang das konservierte Histidin (His193 für Surf1c und His202 für Surf1q), welches in späteren Abschnitten dieser Arbeit näher beschrieben wird.

3.1.3 Transmembranvorhersage

Wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert zeigen die beiden Surf1-Proteine von *P. denitrificans* Homologien zu eukaryotischen Surf1-Proteinen. Für diese wurden zwei Transmembranhelices vorhergesagt und eine Lokalisation in der inneren Mitochondrienmembran bestimmt [95, 99]. Wird für Surf1q das alternative Start-Codon GTG angenommen, kann sich eine N-terminale Membranhelix ausbilden, da in diesem verlängerten Bereich weitere hydrophobe Aminosäuren gefunden wurden. Auch Surf1c weist die beiden charakteristischen hydrophoben Bereiche auf.

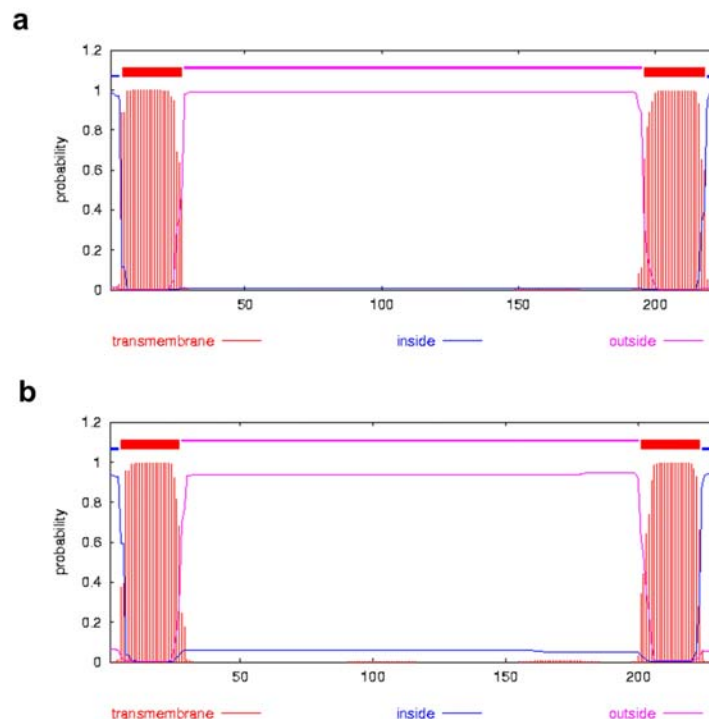


Abbildung 3.3: Darstellung der Transmembranvorhersage für (a) Surf1c und (b) Surf1q, erstellt mit dem Programm TMHMM (Technische Universität Dänemark). In blau sind Bereiche des Proteins dargestellt, die auf der Membraninnenseite liegen, in rot sind Transmembranbereiche hervorgehoben, magenta wird Bereichen des Proteins zugeordnet, die im Periplasma liegen.

Um weitere Hinweise auf konservierte Transmembrandomänen zu erhalten, wurden die Sequenzen der beiden Proteine mit dem Programm TMHMM (Technische Universität Dänemark, DTU) auf Membranhelices untersucht (Abb. 3.3). Das Programm sucht innerhalb der Aminosäuresequenz nach hydrophoben Bereichen und gibt Wahrscheinlichkeiten für Transmembranhelices an.

Im Falle von Surf1c sagt das Programm zwei Transmembranbereiche voraus. Eine der beiden Helices liegt nahe dem N-Terminus, während die zweite Helix am C-terminalen Ende des Proteins zu finden ist. Die beiden Termini liegen auf der Membranninnenseite, während ein großer Teil des Proteins im Periplasma zu finden ist. Die Transmembranvorhersage für Surf1q bestätigte die Vermutung, dass dieses Protein ebenfalls zwei Transmembrandomänen besitzt. Analog zu Surf1c wurden je eine Helix im N-terminalen Bereich und C-terminalen Teil des Proteins identifiziert. Auch hier liegen die beiden Termini im Cytoplasma, während der größte Teil des Proteins im Periplasma lokalisiert ist.

3.2 Charakterisierung von *surf1* Deletionsstämmen

Ziel dieses Teilbereichs ist, die Frage zu klären, welche Auswirkung die Deletion der Surf1-Proteine auf die Funktion und Assemblierung von terminalen Oxidasen bei *P. denitrificans* hat. In der vorangegangenen Diplomarbeit wurden bereits Deletionsstämme der beiden *surf1*-Gene konstruiert und teilweise charakterisiert [100]. Ein Doppeldeletionsstamm der beiden *surf1*-Gene konnte damals jedoch nicht erreicht werden, und der folgende Ergebnisteil knüpft hier an.

3.2.1 Konstruktion des Doppeldeletionsstamms

Die Herstellung von Deletionsstämmen in *P. denitrificans* verläuft über doppelt-homologe Rekombination der Genflanken mit Hilfe des Suizidvektors pRvS1, wobei das Zielgen durch ein geeignetes Antibiotikaresistenzgen ersetzt wird [107]. Die Einzeldeletionsstämme für *surf1q*, FA1, und *surf1q*, FA2, existierten zu Beginn dieser Arbeit bereits, so dass sie als Ausgangsmaterial für den Doppeldeletionsstamm dienen konnten.

Ergebnisse

Zur Konstruktion des Doppeldeletionsstamms muss der Suizidvektor für *surf1q*, pFA20, zunächst von *E. coli* in den *P. denitrificans*-Stamm FA2 gebracht werden. Dies wird über Konjugation erreicht. Das Plasmid pFA20 ist ein Derivat von pRvS1, welcher in *E. coli* jedoch nicht in *P. denitrificans* replizierbar ist. Die einzige Möglichkeit die Erbinformation des Vektors stabil zu erhalten, besteht in der homologen Rekombination in das Genom von *Paracoccus* (Abb. 3.4). Durch die Selektion über Antibiotika können nach dem *Mating* nur diejenigen Klone überleben, bei denen nach dem Plasmidtransfer homologe Rekombination stattgefunden hat. Für die Selektion werden zwei verschiedene Antibiotika eingesetzt, wobei nur *P. denitrificans* eine Rifampicinresistenz aufweist und Gentamycin für die Selektion auf die Integration in das Genom dient.

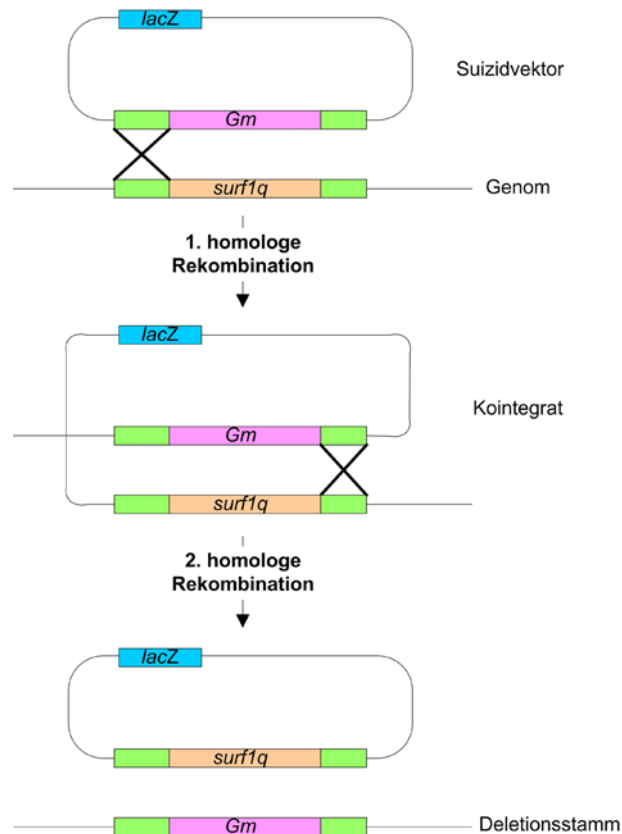


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der homologen Rekombination zur Generierung des *surf1*-Doppeldeletionsstamms. Für eine detaillierte Beschreibung, siehe Text.

Beim ersten Rekombinationsschritt, der einfach-homologen Rekombination, wird die gesamte Sequenz des Suizidvektors in das Genom integriert (Abb. 3.4, Mitte), wodurch ein Kointegrat entsteht. Kommt es daraufhin zu einem zweiten Rekombinationsschritt an der anderen homologen Flanke, wird nur das Resistenzgen im Tausch gegen *surf1q* genomisch integriert (Abb. 3.4, unten). Homologe

Rekombination an der ersten Flanke führt wieder zur Wildtyp-DNA. Da der Suizidvektor in *P. denitrificans* nicht replizierbar ist und über Gentamycin selektioniert wird, können diese Klone nicht wachsen. Zur Unterscheidung des Kointegrats von einem Deletionsstamm wurden die Klone einem Blau-Weiß-*Screening* unterzogen. Der Suizidvektor pRvS1 enthält das *lacZ*-Gen, das für die β -Galactosidase kodiert. Nur im Falle des Kointegrats wird dieses Gen in das *Paracoccus*-Genom integriert, und das Enzym wird exprimiert. Durch Zugabe von X-Gal lässt sich die β -Galactosidase-Aktivität in den einzelnen Kolonien nachweisen. Die Klone, die das *lacZ*-Gen tragen, färben sich beim *Screening* blau, während im Falle der doppelt-homologen Rekombination die Klone weiß bleiben.

3.2.1.1 *surf1*-Doppeldeletionsstamm

Durch das Einbringen von pFA20 in den *surf1c*-Deletionsstamm FA2 konnte der Doppeldeletionsstamm für *surf1q* und *surf1c*, FA3, erhalten werden, wobei die Selektion über Gentamycin und Rifampicin erfolgte. Beim Blau-Weiß-Screening konnten nur zwei weiße Klone erhalten werden. Um sicher zu gehen, dass die Antibiotikaresistenz an der richtigen Stelle integriert war, wurde die genomische DNA dieser Klone isoliert. Nach der Isolierung der genomischen DNA wurde zunächst versucht, die Deletion über PCR zu verifizieren. Allerdings konnte mit den gewählten Primern weder im Wildtyp noch im Deletionsstamm ein PCR-Produkt generiert werden. Deshalb wurde der Nachweis über Southern-Hybridisierung gewählt. Dafür wurden zunächst zwei Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt. Eine der Sonden richtete sich gegen das *gm^r*-Gen, die andere Sonde richtete sich gegen *surf1q*. Die genomische DNA von Wildtyp-*Paracoccus*, dem *surf1q*-Deletionsstamm FA1 und FA3 wurde einem Restriktionsverdau mit dem Enzym NcoI unterzogen. Innerhalb des *gox*-Operons befinden sich drei NcoI-Schnittstellen, zwei in *goxB* und eine weitere in *goxC*. Zusätzlich findet man eine NcoI-Site stromabwärts von *surf1q*, etwa 400 bp nach dem 3'-Ende der *downstream*-Flanke. Weder in *surf1q* noch innerhalb des *gm^r*-Gens befinden sich Schnittstellen dieses Enzyms. Ein Verdau mit NcoI liefert also sowohl für den Wildtyp als auch für die Deletion Fragmente um 2200 bp, an die die Sonden binden.

Ergebnisse

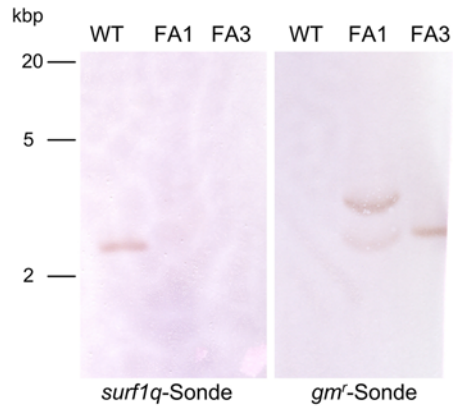


Abbildung 3.5: Southernblot der *surf1q*-Deletionstämmen FA1 und FA3 im Vergleich zum Wildtyp (WT). Je 1 µg genomische DNA wurden *Nco*I verdaut, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer *surf1q*-Sonde und einer *gmf*^r-Sonde hybridisiert.

Im Falle der *surf1q*-Sonde war in den Deletionstämmen kein Signal zu sehen und im Wildtyp (WT) wurde ein Signal um 2100 bp detektiert (Abb. 3.5). In den Deletionstämmen konnte mit der *gmf*^r-Sonde ein Signal in der Höhe von ca. 2300 bp erhalten werden, das im WT nicht zu sehen war. Im Falle von FA1 wurde ein zusätzliches größeres Fragment um 3000 bp detektiert, das wahrscheinlich durch einen unvollständigen Verdau der genomischen DNA hervorgerufen wurde (Abb. 3.5). So konnte FA3 eindeutig als *surf1*-Doppeldeletionsstamm identifiziert werden.

3.2.1.2 *surf1*-Komplementationsstämmen

Neben der Charakterisierung der Deletionstämmen sollte im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich festgestellt werden, ob sich durch gezieltes Einbringen von *surf1* in die Deletionstämmen etwaige Effekte der Deletion umkehren lassen.

Hierfür mussten in *Paracoccus* replizierbare Vektoren konstruiert werden, die das betreffende *surf1*-Gen tragen und sicherstellen, dass das Protein exprimiert wird. Als Ausgangsplasmid für die Klonierung diente hier der Vektor pFA39, ein Derivat des pET22b. Der Vektor wurde gewählt, weil er den starken konstitutiven Promotor für das *cta*-Operon von *P. denitrificans* trägt. Für *surf1c* handelt es sich hierbei gleichzeitig um den nativen Promotor.

Da für die Surf1-Proteine aus *P. denitrificans* bislang weder ein natives Aufreinigungsprotokoll noch Antikörper existieren, wurde beschlossen, beide Surf1-

Proteine mit einem N-terminalen His₁₀-tag zu versehen, um zum einen eine spätere Aufreinigung und zum anderen die Detektion des Proteins im Rahmen der Komplementationsversuche zu ermöglichen. Die beiden *surf1*-Gene wurden über PCR erhalten. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass geeignete Schnittstellen für die Klonierung hinter dem *cta*-Promotor verwendet werden konnten. An die *forward*-Primer wurden außerdem die Nukleotide zur Kodierung von zehn Histidinen angefügt. Nach erfolgreicher PCR wurden die Produkte in pFA39 kloniert. In einem weiteren Klonierungsschritt wurden die *cta-surf1*-Fragmente jeweils in pRI2, ein Derivat des *broad-host-range* Vektors pBBR1MCS, eingebracht und nach Reisolierung wurden die Komplementationsplasmide pFA61 für *surf1c* und pFA62 für *surf1q* erhalten.

Die Molekulargewichte der beiden Translationsprodukte wurden berechnet, und für Surf1c mit His-tag wurde ein Protein mit der Länge von 236 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 26,3 kD ermittelt. Surf1q mit His-tag besteht aus 243 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26,4 kD. Die Aminosäuresequenzen sind in Anhang wiedergegeben.

Die Expressionsvektoren pFA61 und pFA62 wurden sowohl für die Komplementationsversuche als auch für die Aufreinigung der beiden Surf1-Proteine aus *P. denitrificans* verwendet (Abschnitt 3.5).

Zur Komplementation der *surf1q*-Deletion wurde pFA62 über Konjugation in FA1 und FA3 eingeführt und über die Antibiotikaresistenzen Rifampicin, Gentamycin und Streptomycin selektioniert. Die daraus resultierenden Komplementationsstämme wurde FA1.62 und FA3.62 genannt. Durch Einbringen von pFA61 in FA2 und FA3 sollte die *surf1c*-Deletion komplementiert werden. Die Selektion erfolgt in diesem Fall über Rifampicin, Kanamycin und Streptomycin, wobei die erhaltenen Stämme mit FA2.61 und FA3.61 bezeichnet wurden.

3.2.2 Charakterisierung der Deletionsstämme in Membranen

Zur Untersuchung der Rolle von Surf1 wurden im Folgenden Aktivitätsmessungen der Oxidasen in Membranpräparationen vorgenommen. Zum Vergleich wurden Membranaktivitäten von Wildtyp-Präparationen herangezogen.

3.2.2.1 Westernblot-Analyse

Für die Aktivitätsmessungen wurden der Wildtypstamm Pd1222, die Deletionsstämme FA1, FA2 und FA3 sowie die Komplementationstämme FA1.62, FA2.61, FA3.61 und FA3.62 simultan in 500 mL Succinat-Medium angezogen. Um die Anzuchtbedingungen möglichst identisch zu halten, wurde für alle Stämme Medium aus dem gleichen Ansatz und vergleichbare Kolbengrößen verwendet, die mit entsprechenden Zellzahlen angeimpft wurden. Die Anzucht erfolgte bei 32 °C für 16 h, und die Membranpräparation aller acht Stämme erfolgte simultan.

Die isolierten Membranen wurden zunächst auf die Expression von Surf1 hin untersucht. Dazu wurde versucht mittels Western-Blot und anschließender immunologischer Detektion die beiden Proteine über ihren N-terminalen His-*tag* nachzuweisen (Abb 3.6a).

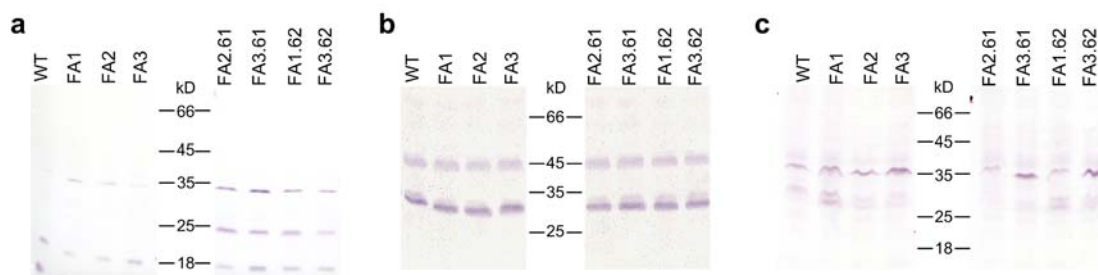


Abbildung 3.6: Immunologische Detektion von (a) His₁₀-Surf1, (b) COX UEI und UEII und (c) QOX UEII in *Paracoccus*-Membranen. Es wurden jeweils 100 µg Membranen auf 12 %ige SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembranen erfolgte die Detektion mit Penta-His-Antikörper für His₁₀-Surf1, BG-Antiserum für COX UEI und UEII und FP11-Antiserum für QOX UEII.

Westernblots gegen Untereinheiten der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase und der *ba*₃-Ubichinioxidase sollten zeigen, ob die Surf1-Deletionen Auswirkungen auf die Expression bzw. die *steady-state-levels* der einzelnen Oxidasen haben. Für die Untereinheiten I und II der *aa*₃-Oxidase (Abb. 3.6b) lässt sich kein Unterschied in den einzelnen Signalstärken erkennen. Auch für Untereinheit II der *ba*₃-Oxidase ist keine Steigerung oder Abnahme des Westernblot-Signals zu erkennen (Abb. 3.6c).

3.2.2.2 Aktivität der *cbb₃*-Cytochrom *c* Oxidase

Bevor die eigentlichen Aktivitätsmessungen für die *aa₃*-Cytochrom *c* Oxidase durchgeführt werden konnten, musste ausgeschlossen werden, dass die alternative *cbb₃*-Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus* die Messungen verfälscht, da sie in allen Stämmen auf dem Genom kodiert ist.

Für die Vergleichsmessungen wurde neben dem WT-Stamm Pd1222 der Stamm FA7.32 eingesetzt. Dieser Stamm basiert auf dem Oxidase-Deletionsstamm FA7, in dem neben den chromosomalen Deletionen für die Untereinheit I der COX (*ActaDI*::Km^r, *ActaDII*::Tet^r) auch eine Deletion des kompletten *cco*-Operons für die *cbb₃*-Cytochrom *c* Oxidase (*AccoNOQP*::Gm^r) enthalten ist. FA7.32 enthält das Plasmid pFA32, ein pRI2-Derivat, auf dem das *cco*-Operon *in trans* kodiert ist. Somit wird in FA7.32 nur die *cbb₃*-Cytochrom *c* Oxidase exprimiert.

Für die Messungen wurden simultane analytische Membranpräparationen vom WT und FA7.32 verwendet. Die Messungen fanden sowohl in *aa₃*-COX Aktivitätspuffer (20 mM KP_i, 20 mM KCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8) und *cbb₃*-COX-Aktivitätspuffer (20 mM Tris/HCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 7) statt, die sich im Wesentlichen in pH und Ionenstärke unterscheiden. Als Substrat diente reduziertes Cytochrom *c* aus Pferdeherz. Typische Aktivitätsmessungen für die *aa₃*-COX werden mit 1:100 bis 1:200 Verdünnungen der Membranen gemessen, während die *cbb₃*-COX im Allgemeinen eine geringere Aktivität aufweist und die Membranen nur in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt werden.

Spektroskopische Aktivitätsmessungen für FA7.32 (Abb. 3.7a) zeigen, dass die Aktivität der *cbb₃*-COX in *aa₃*-COX Aktivitätspuffer stark reduziert ist. Vergleicht man die Messkurven von WT und FA7.32 in *aa₃*-COX Aktivitätspuffer (Abb. 3.7b), erkennt man für Pd1222 eine wesentlich stärkere Abnahme des Cytochrom *c* Signals als für FA7.32.

Ergebnisse

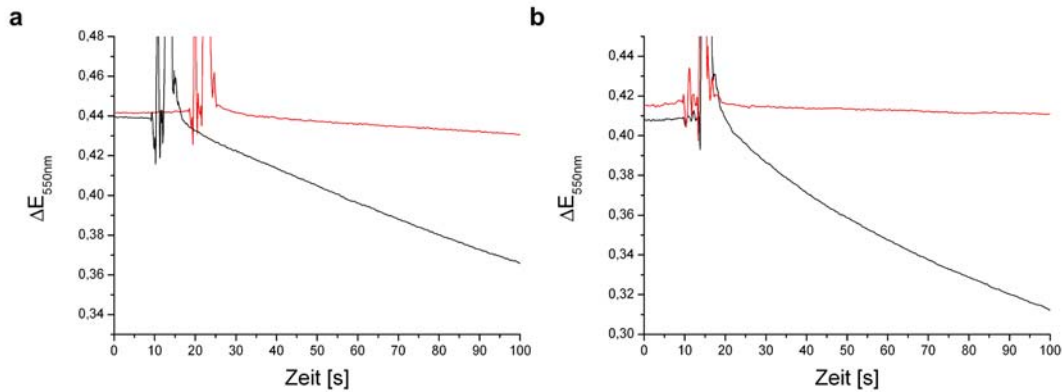


Abbildung 3.7: Zeitabhängige Abnahme des Signals für reduziertes Cytochrom c aus Pferdeherz nach Zugabe von *Paracoccus* Membranen. (a) zeigt die Messungen für Membranen eines Stammes der nur die *cbb*₃-Oxidase exprimiert (FA7.32) in einer 1:10 Verdünnung, wobei die schwarze Kurve die Messung in *cbb*₃-COX-Aktivitätspuffer (20 mM Tris/HCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 7) darstellt, die rote Kurve zeigt die Messung in *aa*₃-COX-Aktivitätspuffer (20 mM KPi, 20 mM KCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8). Die Proteinkonzentration in der Küvette betrug 16,4 µg/mL. In (b) sind die Messungen für Pd1222 Membranen in schwarz und FA7.32 Membranen in rot dargestellt. Die Messungen fanden hier in *aa*₃-COX-Aktivitätspuffer und in einer 1:100 Verdünnung der Membranen statt. Die Proteinkonzentrationen der Membranen in der Küvette waren für Pd1222 jeweils 1,98 µg/mL, für FA7.32 1,64 µg/mL.

Die Auswertungen der spektroskopischen Messungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Selbst in dem für die *cbb*₃-Oxidase idealem Puffer liegt die Gesamtaktivität von FA7.32 bei unter 10 % bezogen auf Pd1222 Aktivität. Für Messbedingungen, die ideal für die *aa*₃-Oxidase sind, liegt die Gesamtaktivität sogar bei unter 1 % bezogen auf den WT.

Tabelle 3.1: Cytochrom c Oxidase Aktivität in WT und FA7.32 Membranen

Stamm		Aktivität [U/mg]	Oxidase Aktivität [%]
Pd1222 (WT)	<i>aa</i> ₃ -Puffer	3,193	100
FA7.32	<i>cbb</i> ₃ -Puffer	0,222	7
	<i>aa</i> ₃ -Puffer	0,025	<1

Cytochrom c Oxidase (COX) Aktivität wurde mit 20 µM reduziertem Cytochrom c aus Pferdeherz bei 25 °C in verschiedenen Puffern gemessen. Im WT-Stamm Pd1222 werden sowohl die *aa*₃-COX als auch die alternative *cbb*₃-COX exprimiert. Der Stamm FA7.32 stellt einen COX-Deletionsstamm dar, in dem nur die *cbb*₃-COX *in trans* exprimiert wird.

Es konnte also ausgeschlossen werden, dass die *cbb*₃-Oxidase die im Folgenden dargestellten Aktivitätsmessungen für die *aa*₃-Cytochrom c Oxidase in den *surfl*-Deletionsstämmen verfälscht.

3.2.2.3 Aktivität der aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase

Im Folgenden werden die Auswirkungen *surf1*-Deletionen auf die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität in isolierten *Paracoccus*-Membranen dargestellt.

Für die Aktivitätsmessungen wurden der Wildtypstamm Pd1222, die Deletionsstämme FA1, FA2 und FA3, sowie die Komplementationsstämme FA1.62, FA2.61, FA3.61 und FA3.62 wie unter 3.2.2.1. beschrieben simultan angezogen und die Membranen gleichzeitig isoliert, um Schwankungen in den Anzuchsbedingungen möglichst gering zu halten.

Die Aktivitätsmessungen erfolgten in aa_3 -COX Aktivitätspuffer (20 mM KP_i , 20 mM KCl, 0,02 % (w/v) DDM, pH 8) bei 25 °C und mit 20 μ M reduziertem Cytochrom *c* aus Pferdeherz als Substrat. Es wurden jeweils die Membranen aus sieben unabhängigen Anzuchten vermessen und daraus die Aktivitäten und ihre Standardabweichung bestimmt.

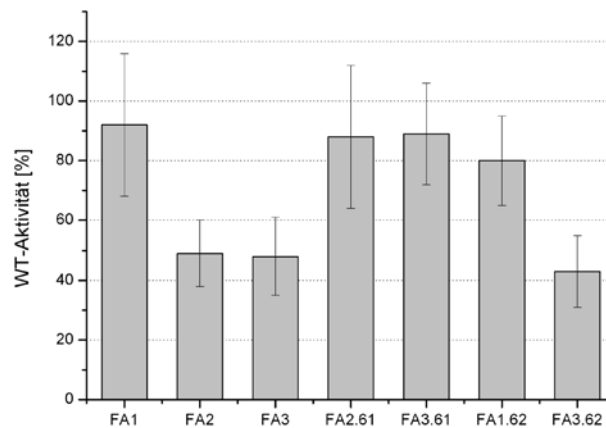


Abbildung 3.8: Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität in *Paracoccus*-Membranen im Vergleich zum WT. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus sieben verschiedenen Anzuchten und deren Standardabweichungen. Stammbeszeichnungen: FA1: $\Delta surf1q$, FA2: $\Delta surf1c$, FA3: $\Delta surf1q \Delta surf1c$, FA2.61: *surf1c in trans* in FA2, FA3.61: *surf1c in trans* in FA3, FA1.62: *surf1q in trans* in FA1, FA3.62: *surf1q in trans* in FA3 (siehe Abschnitt 2.1.8.2).

In Abbildung 3.8 sind die ermittelten Aktivitäten im Vergleich zum WT dargestellt. Für den *surf1c*-Deletionsstamm FA2 und den *surf1*-Doppeldelentionsstamm FA3 konnte reduzierte COX-Aktivitäten von 49 % bzw. 48 % gemessen werden, die durch die Expression von *Surf1c in trans* wieder WT-Werte erreichten. Die *surf1q*-Deletion hat hingegen keinen Einfluss auf die COX-Aktivität und eine Expression

von *Surflq in trans* kann die reduzierte WT-Aktivität von 43 % in FA3.62 nicht aufheben.

3.2.2.4 Aktivität der *ba*₃-Ubichinoloxidase

In diesem Abschnitt wird die Auswirkung der *surfl*-Deletionen auf die *ba*₃-Ubichinoloxidase in isolierten *Paracoccus*-Membranen dargestellt.

Für die Aktivitätsmessungen wurden die gleichen Membranen des Wildtypstamm Pd1222, die Deletionsstämme FA1, FA2 und FA3, sowie die Komplementationsstämme FA1.62, FA2.61, FA3.61 und FA3.62 wie in Abschnitt 3.2.2.3. eingesetzt.

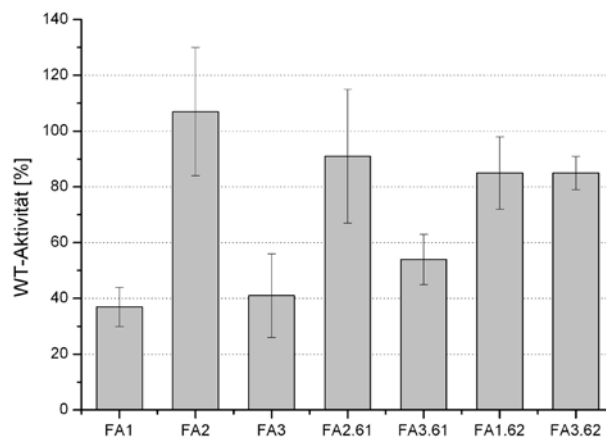


Abbildung 3.9: Ubichinoloxidase-Aktivität in *Paracoccus*-Membranen im Vergleich zum WT. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus sieben verschiedenen Anzuchten und deren Standardabweichungen. Stammbezeichnungen siehe Abb. 3.8 und Abschnitt 2.1.8.2.

Die Aktivitätsmessungen erfolgten in *ba*₃-QOX Aktivitätspuffer (50 mM KP_i , 0,02 % (w/v) DDM, pH 7) bei 25 °C mit 20 μ M Decylchinol als Substrat und in Anwesenheit von *bc*₁-Inhibitor. Es wurden jeweils die oben beschriebenen Membranen aus sieben unabhängigen Anzuchten vermessen und daraus die Aktivitäten und ihre Standardabweichungen bestimmt.

Im Falle der *surflq*-Deletion konnte reduzierte WT-Aktivität gemessen werden, jedoch nicht in den Stämmen, die nur eine *surflc*-Deletion aufwiesen (Abb. 3.9). Für den *surflq*-Deletionsstamm FA1 konnte lediglich eine QOX-Aktivität von 37 % bezogen auf den WT gemessen werden, für den *surfl*-Doppeldeletionstamm FA3

ergab sich eine QOX-Aktivität von 41 %. In beiden Stämmen kann die Reduktion der Aktivität durch die Anwesenheit von Surf1q *in trans* wieder aufgehoben werden. Die Deletion von *surf1c* hat hier hingegen keinen Einfluss auf die QOX-Aktivität und eine Expression von Surf1c *in trans* kann die reduzierte WT-Aktivität von 54 % in FA3.61 nicht aufheben.

3.2.3 Aufreinigung der Cytochrom c Oxidase

Die Deletion von *surf1c* führt zu einer reduzierten COX-Aktivität in *Paracoccus* Membranen. Um die Auswirkung der Deletion auf diese Oxidase genauer zu untersuchen, wurde die *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen isoliert und charakterisiert.

Für die Aufreinigung wurden jeweils 50 L-Succinat-Medium mit den *Paracoccus*-Stämme FA3 und FA3.61 angeimpft und für 16 Stunden bei 32 °C inkubiert. Nach der Ernte und der Präparation der Membran erfolgte die Aufreinigung. Da die Oxidase keinen *tag* trägt, erfolgte die Aufreinigung nach der klassischen Methode über einen Anionentauscher, eine Gelfiltration und einen weiteren Anionentauscher.

Cytochrom *c* Oxidase aus einem *surf1*-Wildtyp-Stamm wurde von Hans-Werner Müller (AK Ludwig, Universität Frankfurt) bereitgestellt.

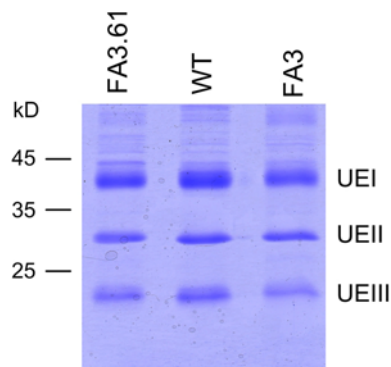


Abbildung 3.10: Coomassie gefärbtes 12 %iges SDS-PAGE von aufgereinigter COX aus den *Paracoccus*-Stämmen Pd1222 (WT), FA3 ($\Delta surf1c$, $\Delta surf1q$) und FA3.61 (*surf1c in trans* in FA3). Es wurden 3 μ g aufgereinigtes Protein pro Bahn aufgetragen. Die vierte Untereinheit mit einer Größe von 5,4 kD wird in diesem Gel nicht aufgelöst.

Sowohl aus dem *surf1*-Doppeldeletionsstamm FA3 als auch aus dem *surf1c*-Komplementationsstamm FA3.61 konnte *aa*₃-COX aufgereinigt werden. Auffällig war hierbei, dass aus FA3 nur etwa 3,8 mg Oxidase pro Gramm Membranprotein

erhalten werden konnten, was in etwa einem Drittel der Ausbeute aus FA3.61 mit 11,9 mg Oxidase pro Gramm Membranprotein entspricht, wobei diese im Bereich der üblichen Ausbeute für COX aus Wildtyp-Membranen liegt.

Die Analyse der Oxidase aus allen drei *Paracoccus*-Stämmen in einem SDS-PAG (Polyacrylamidgel) zeigte, dass sich die verschiedenen Präparationen weder im Grad der Verunreinigung noch in der Zusammensetzung der Untereinheiten unterscheiden (Abb. 3.10). Alle drei Untereinheiten sind gleich stark vertreten und laufen auf identischen Höhen im Gel.

3.2.3.1 Aktivitätsmessungen

Im Folgenden wurden die einzelnen Oxidase-Präparationen auf ihre Aktivität hin untersucht. Dazu wurde die zeitabhängige Oxidation von reduziertem Cytochrom *c* aus Pferdeherz nach Zugabe von aufgereinigter COX gemessen.

Tabelle 3.2: Enzymaktivität von aufgereinigter Cytochrom *c* Oxidase aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen

Stamm	Wechselzahl [s ⁻¹]	Aktivität [%]
Wildtyp	476	100
FA3 ($\Delta surf1c \Delta surf1q$)	133	28
FA3.61 (<i>surf1c in trans</i> in FA3)	429	91

COX-Aktivität wurde mit 20 μ M reduziertem Cytochrom *c* aus Pferdeherz bei 25 °C in *aa*₃-Aktivitätspuffer gemessen.

Cytochrom *c* Oxidase aus dem *surf1*-Doppeldeletionsstamm FA3 zeigte hier eine deutlich reduzierte Aktivität mit nur etwa 30 % WT-Aktivität (Tabelle 3.2). Dies entspricht in etwa den Werten, die auch in isolierten Membranen für die *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase gemessen werden können. Für die Oxidase-Präparation aus dem *surf1c*-Komplementationsstamm wurden Aktivitäten bestimmt, die den Werten für Oxidase aus WT-*Paracoccus* entsprechen.

3.2.3.2 Spektrale Untersuchungen

Um der Ursache für den Aktivitätsverlust der COX aus FA3 auf den Grund zu gehen, wurden die einzelnen Oxidase-Präparationen verschiedenen spektralen Untersuchungen unterzogen. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf den Häm α -Gehalt der einzelnen Präparationen gelegt.

Die Bestimmung der Häm α -Stöchiometrie wird üblicherweise zur Abschätzung des Reinheitsgrades einer COX-Präparation herangezogen. Dabei wird der Häm α -Gehalt über Pyridin-Hämochromspektren bestimmt und in Relation mit der Proteinkonzentration gesetzt. Der theoretische Wert für aufgereinigte Oxidase liegt hierbei bei 16 nmol Häm α pro mg Protein. Für WT-Oxidase konnte ein Wert von 16,2 nmol/mg bestimmt werden, während für die Oxidase aus FA3 nur ein Wert von 8,8 nmol/mg ermittelt werden konnte (Tabelle 3.3). Für Präparation aus dem Komplementationsstamm FA3.61 ergab sich ein Wert von 16,0 nmol/mg. Da im Gel (Abb. 3.10) keine größeren Verunreinigungen in der Präparation von FA3 zu erkennen sind, musste davon ausgegangen werden, dass der Häm α -Gehalt dieser Präparation verglichen zum WT um etwa die Hälfte verringert ist.

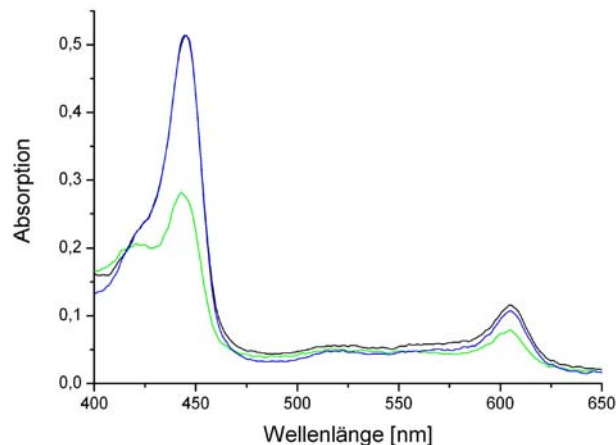


Abbildung 3.11: Spektren aufgereinigter aa_3 -Cytochrom c Oxidase im reduzierten Zustand aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen. COX aus WT-*Paracoccus* ist in schwarz dargestellt, in grün COX aus FA3 und in blau COX aus FA3.61. Die Proteinkonzentration für alle Spektren war 2,5 μ M, die Reduktion erfolgte durch Zugabe von Natriumdithionit.

Absorptionsspektren der reduzierten Form der Oxidase bestätigten diese Vermutung (Abb. 3.11). Die grüne Kurve für Oxidase aus FA3 zeigte hier eine weniger starke Absorption im Soret-Bereich um 440 nm und im α -Bereich bei 605 nm, während die

Absorptionen für Oxidase aus WT-*Paracoccus* (schwarze Kurve) und FA3.61 (blaue Kurve) nahezu identisch waren. Eine ausgeprägte Schulter im Soret-Bereich um 420 nm wies darauf hin, dass das Enzym im Vergleich zum WT nicht vollständig reduziert werden kann.

Über Ligandenbindungsspektren kann man die beiden α -Typ Häm e der Cytochrom *c* Oxidase unterscheiden. Dabei macht man sich zu nutze, dass die kompetitiven Inhibitoren der COX, Kohlenmonoxid (CO) und Cyanid (CN⁻) nur an das *high spin* Häm a_3 im binukleären Zentrum binden, jedoch nicht an das *low spin* Häm *a*. Die Inhibitoren nehmen dabei die Stelle des sechsten Liganden des Eisenzentralatoms ein. Im Gegensatz zu CO, das an Häm a_3 allein bindet, wird CN⁻ nur gebunden, wenn das Cu_B-Atom im binukleären Zentrum vorhanden ist. In beiden Fällen kommt es nach der Bindung des Inhibitors an das reduzierte Enzym zu einer spektralen Verschiebung der Absorption. Für CO verschiebt sich das Absorptionsmaximum im Soret-Bereich von 445 nm zu 432 nm, so dass im Differenzspektrum das Maximum bei 432 nm liegt und ein Trog bei 445 nm. Im α -Bereich des Spektrums kommt es zu einer Blauverschiebung des Maximums von 605 nm auf 592 nm, und man erhält ein Differenzspektrum mit einem Maximum von 592 nm und einem Trog um 608 nm. Bindet Cyanid an das reduzierte Enzym, kommt es ebenfalls zu einer Blauverschiebung im α -Bereich des Spektrums, das im Differenzspektrum sieht man ein Absorptionsmaximum um 592 nm und einen Trog bei 612 nm.

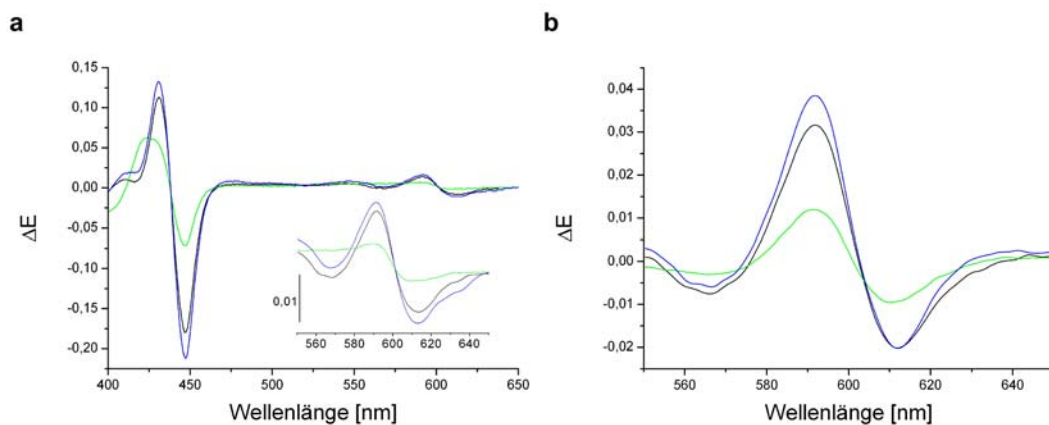


Abbildung 3.12: Ligandenbindungsspektren aufgereinigter aa_3 -Cytochrom *c* Oxidase aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen. **(a)** Kohlenmonoxid-Differenzspektrum. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des α -Bereichs. **(b)** Cyanid-Differenzspektrum. COX aus WT-*Paracoccus* ist in schwarz dargestellt, in grün COX aus FA3 und in blau COX aus FA3.61. Die Proteinkonzentration für alle Spektren betrug 2,5 μ M.

Ergebnisse

Die Ligandenbindungsspektren für die Oxidase-Präparationen aus WT-*Paracoccus* und FA3.61 unterschieden sich nicht wesentlich in ihren Absorptionswerten. Die Bindung von CO und CN⁻ schienen unbeeinflusst zu sein (Abb. 3.12). Obwohl die gleiche Menge an Enzym wie in den Vergleichsmessungen für die Spektren eingesetzt wurde, war die Bindung von CO an das Enzym aus FA3 stark verringert (Abb. 3.12a), und auch die Fähigkeit zur Bindung von CN⁻ des Enzym ist stark reduziert (Abb. 3.12b).

Für die Quantifizierung des Häm *a*₃-Gehalts wurden zunächst Extinktionskoeffizienten für die CO- und CN⁻-Bindung bestimmt. Dafür wurde WT-COX in bekannten Konzentration zur Messung eingesetzt und nach Aufnahme der Spektren, konnte aus den Absorptionmaxima mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes Extinktionskoeffizienten ermittelt werden. Für die CO-Bindung erhält man im Soret-Bereich einen Koeffizient von $\Delta\epsilon_{(432-445)} = 136,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für den α -Bereich einen Wert von $\Delta\epsilon_{(592-608)} = 10,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für die Bindung von CN⁻ an das Enzym konnte ein Extinktionskoeffizient von $\Delta\epsilon_{(592-612)} = 21,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ errechnet werden.

Aus den CO-Spektren konnte für die COX aus FA3 ein Häm *a*₃-Gehalt von nur 40 % verglichen mit dem WT ermittelt werden (Tabelle 3.3). Über CN⁻-Bindungsspektren wurde der Anteil an intaktem Häm *a*₃-Cu_B auf ebenfalls 40 % im Vergleich zum WT bestimmt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das gesamte Häm *a*₃ mit einem Cu_B-Ion assoziiert ist. Für die Oxidase aus dem Komplementationstamm wurden keine Veränderungen im Vergleich zum WT festgestellt.

Tabelle 3.3: Häm *a*-Gehalt in verschiedenen Cytochrom *c* Oxidase Präparationen

	Häm <i>a</i> : Protein [nmol/mg] ¹	relativer Häm <i>a</i> ₃ Gehalt ²
Wildtyp	16,2	1,0
FA3	8,8	0,4
FA3.61	16,0	1,2

¹Der Häm *a*-Anteil wurde über Pyridin-Hämochromspektren bestimmt. ²Der Häm *a*₃-Gehalt wurde über CO-Differenzspektren an aufgereinigtem Enzym mit gleicher Proteinkonzentration bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reduktion der Oxidase-Aktivität in der FA3-Präparation auf einen Verlust der Häm *a*-Moleküle zurückzuführen ist. Dabei scheint die Präparation eine Mischpopulation verschiedener Cytochrom *c* Oxidasen-

Formen zu sein. Etwa 40 % der Präparation entsprechen vollständig aktiver COX mit einem intakten Häm a_3 -Cu_B-Zentrum, 10 % der Präparation enthalten nur das *low spin* Häm a und die verbleibenden 50 % enthalten keines der redox-aktiven Häm a -Zentren in UEL.

3.2.4 Surf1-Histidinmutanten

Aminosäuresequenz-Vergleiche verschiedener Surf1-Homologe zeigten mehrere komplett konservierte Aminosäuren (vgl. Abschnitt 3.1.2), und im Rahmen dieser Arbeit wurde das konservierte Histidin in der Nähe der C-terminalen Helix auf eine mögliche Beteiligung an der Häm a -Bindung von Surf1 hin untersucht (siehe folgende Abschnitte). Dazu wurde das konservierte Histidin gegen Alanin ausgetauscht (H193A für Surf1c, H202A für Surf1q).

In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss der Mutation auf die Aktivitäten der aa_3 -Cytochrom c Oxidase und der ba_3 -Ubichinoxidase untersucht werden. Dafür mussten zunächst die mutierten Gene für Surf1 in die Komplementationsplasmide umklontiert werden. Die Gene wurden aus den Expressionsplasmiden für die heterologe Expression in *E. coli* pFA48-H193A und pFA49-H202A herausgeschnitten (vgl. Abschnitt 3.3.2.1) und in den NdeI-SacI-verdauten pFA61 kloniert, so dass die Plasmide pFA61-H193A und pFA62-H202A entstanden. Der N-terminale Dekahis-tag blieb dabei erhalten, um die Proteine später leichter detektieren und aufzureinigen zu können. Nach der Sequenzierung der Plasmide wurden sie jeweils in den *surf1*-Doppeldeletionsstamm FA3 konjugiert, und die erhaltenen Stämme wurden FA3.61-H193 und FA3.62-H202A genannt.

Für die Aktivitätsmessungen wurden der *Paracoccus* Wildtyp-Stamm Pd1222, der *surf1*-Doppeldeletionsstamm FA3, die Komplementationsstämme FA3.61 und FA3.62, sowie die Surf1-Mutantenstämme FA3.61-H193 und FA3.62-H202A in der bereits beschriebenen Weise parallel in Succinat-Medium angezogen, und die Membranpräparationen erfolgten simultan.

Die Westernblot-Analyse der präparierten Membranen zeigte, dass die beiden Mutanten Surf1c-H193A und Surf1q-H202A exprimiert werden, und die Mutationen schienen keine Auswirkung auf die Signalstärke zu haben (Abb.3.13a).

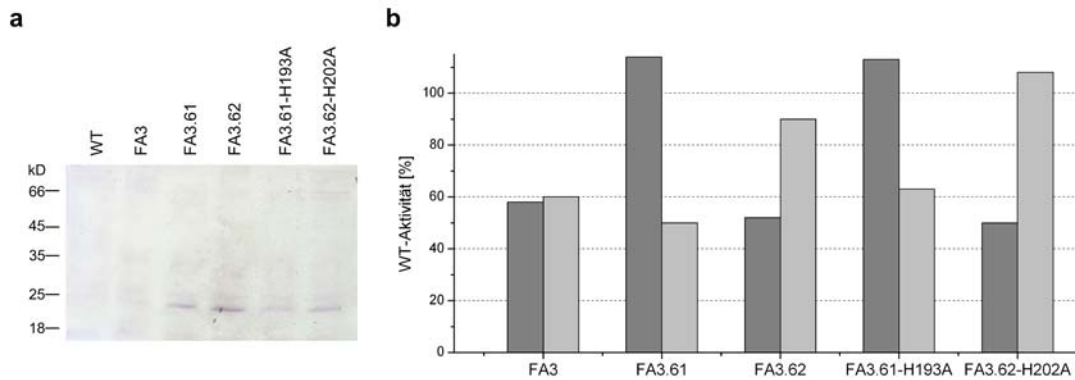


Abbildung 3.13: (a) Anti-His Westernblot von isolierten *Paracoccus*-Membranen. Es wurden jeweils 100 µg Protein aufgetragen. (b) Aktivitäten von COX (dunkelgrau) und QOX (hellgrau) in *Paracoccus*-Membranen im Vergleich zum WT. Stammbezeichnungen: FA3: $\Delta surf1q \Delta surf1c$, FA3.61: WT-*surf1c* *in trans* in FA3, FA3.62: WT-*surf1q* *in trans* in FA3, FA3.61-H193A: *surf1c* mit H193A-Mutation *in trans* in FA3, FA3.62-H202A: *surf1q* mit H202A-Mutation *in trans* in FA3 (siehe Abschnitt 2.1.8.2).

Die Aktivitätsmessungen für die beiden Oxidasen wurden wie oben beschrieben in den jeweiligen Puffern durchgeführt. Für FA3 konnte auch hier sowohl für die COX als auch für QOX eine reduzierte Aktivität verglichen mit dem Wildtyp Pd1222 gemessen werden. Die COX-Aktivität für FA3.61 und FA3.61-H193A lag im Bereich des Wildtyps, die Expression beider *Surf1c*-Varianten hatte keinen Einfluss auf die reduzierte QOX-Aktivität (Abb. 3.13b). Im Gegenzug konnte die reduzierte QOX-Aktivität von FA3 nur durch die Expression der beiden *Surf1q*-Varianten in FA3.62 und FA3.62-H202A kompensiert werden (Abb. 3.13b).

Überraschenderweise zeigte der Austausch des konservierten Histidins keinen Einfluss auf die Funktion von *Surf1* und somit die Aktivität der beiden Oxidasen.

3.3 Heterologe Aufreinigung von *Surf1* aus *E. coli*

Dieser Teilbereich stellt die Ergebnisse zur heterologen Expression der beiden *Surf1*-Proteine aus *Paracoccus*, *Surf1c* und *Surf1q*, in *E. coli* dar.

3.3.1 *Surf1*-Expressionsplasmide

Für die heterologe Expression der *Surf1*-Proteine in *E. coli* wurde ein induzierbares Überexpressionssystem basierend auf den pET-Vektoren gewählt.

Die pET-Vektoren tragen die regulatorischen Elemente des *lac*-Operons hinter einem Promotor für die RNA-Polymerase des Phagen T7, welche im Genom des Expressionsstamms kodiert ist und ebenfalls unter der Kontrolle des *lac*-Operators steht. Durch die Induktion mit IPTG, einem synthetischen Galactose-Analogons, kann zunächst die T7-RNA-Polymerase exprimiert werden, die dann ihrerseits in der Lage ist, die auf den pET-Plasmiden kodierten Gene zu transkribieren. So lässt sich gezielt die Expression des Zielgens zu einem beliebigen Zeitpunkt einschalten.

Das *surflc*-Gen wurde mittels PCR amplifiziert, wobei der *forward*-Primer die Sequenz für einen Deka-His-*tag* und eine NdeI-Schnittstelle und der *reverse*-Primer die Sequenz für eine SacI-Schnittstelle enthielt. Als *template* diente genomische *Paracoccus*-DNA. Das erhaltene Produkt von etwa 720 bp wurde nach der Reinigung mit den Enzymen NdeI und SacI geschnitten und in den Vektor pET22b ligiert. Nach der Reisolation des Vektors aus den Transformanden wurde das Surflc-Expressionsplasmid pFA48 über Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Im Anschluss wurde das Plasmid in den *E. coli*-Expressionstamm C41(DE3) transformiert, der den Namen FA48 erhielt.

Für das Surflq-Expressionsplasmid wurde das *surflq*-Gen ebenfalls über PCR mit genomischer *Paracoccus*-DNA als *template* amplifiziert. Analog zu *surflc* enthielten auch hier der *forward*-Primer die Sequenz für einen Deka-His-*tag* und eine NdeI-Schnittstelle und der *reverse*-Primer die Sequenz für eine SacI-Schnittstelle. Das etwa 750 bp große Produkt wurde einem Restriktionsverdau mit NdeI und SacI unterzogen und in pET22b ligiert. Nach der Reisolation des Vektors aus den Transformanden wurde das Surflq-Expressionsplasmid pFA49 ebenfalls überprüft und in den *E. coli*-Expressionstamm C41(DE3) transformiert, der FA49 genannt wurde.

3.3.1.1 Häm *a*-Biosynthese-Plasmid

Um eine mögliche Häm *a*-Bindung von Surfl zu untersuchen, sollten die Proteine in Anwesenheit eines Häm *a*-Biogenese-Plasmids exprimiert werden.

Die Häm *a*-Biosynthese wird im Wesentlichen von zwei Enzymen gewährleistet (Abb. 3.14). Sie startet mit der Farnesylierung von Häm *b*, welche durch die Häm *o* Synthase CtaB katalysiert wird [133, 134]. Im Anschluss wird eine Methylgruppe zu

einer Formylgruppe oxidiert. Diese Reaktion ist sauerstoffabhängig und wird von der Häm *a* Synthase CtaA katalysiert [135-137].

Im Gegensatz zu *Paracoccus* besitzt *E. coli* keine endogene Häm *a* Synthase, da die terminale Ubichinoloxidase ein *o*₃-Häm im aktiven Zentrum trägt. Da vorab nicht klar war, ob das endogene CtaB-Homolog CyoE mit *Paracoccus* CtaA interagiert, sollten beide *P. denitrificans* Gene, CtaA und CtaB, in *E. coli* exprimiert werden.

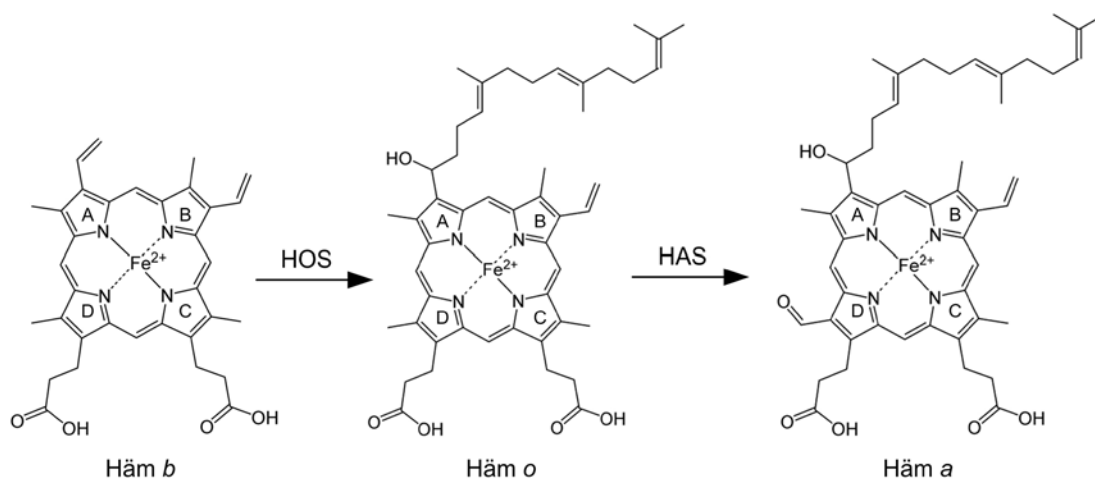


Abbildung 3.14: Häm *a*-Biosynthese ausgehend von Häm *b*. Die Farnesylierung des A-Rings wird von den CtaB (Häm *o* Synthase, HOS) katalysiert. Die Oxidation des Methylrests am D-Ring erfolgt durch CtaA (Häm *a* Synthase, HAS). Abbildung nach [135].

Um die Verfügbarkeit von Häm *a* in *E. coli* zu gewährleisten, wurde das Plasmid pGR52 verwendet, das die Gene für die Häm *a* Biosynthese kodiert. Dieses Plasmid beinhaltet einen konstitutiven *tet*-Promotor für *E. coli*, hinter den in einem synthetischen Operon die Gene *ctaB* und *ctaA* mit entsprechenden Shine-Dalgarno-Sequenzen kloniert wurden (Hannappel, AK Ludwig, Universität Frankfurt).

Das Plasmid wurde in die Surfl-Expressionsstämme FA48 und FA49 transformiert, so dass die Stämme FA48/GR52 und FA49/GR52 entstanden. Für Vergleichsanalysen wurde pGR52 auch in C41(DE3) transformiert, der dann GR52 genannt wurde.

Um die Häm *a* Synthase zu überprüfen, wurden Hämextrakte der Stämme hergestellt und spektroskopisch untersucht. Hierfür wurden die *E. coli*-Stämme FA48/GR52 und FA49/GR52, FA48 und FA49, GR52 und der leere Expressionsstamm C41(DE3) in kleinem Maßstab in LB-Medium über Nacht angezogen. Dabei wurden Schikanekolben verwendet, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, und alle Stämme wurden gleichzeitig angezogen, um Schwankungen

in den Wachstumsbedingungen zu minimieren. Nach der Ernte der Zellen wurden die Hämfraktionen über saure Acetonextraktion präpariert und mit Pyridin-Hämochromspektren auf Häm *a* hin untersucht.

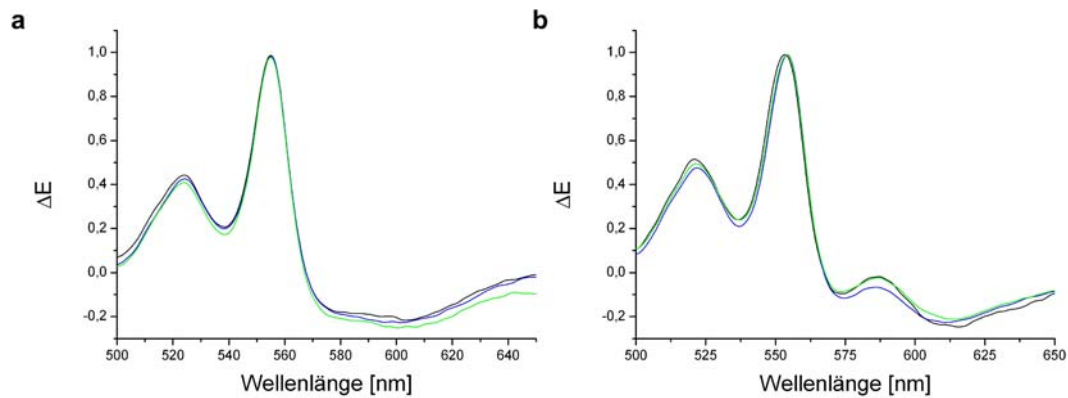


Abbildung 3.15: Pyridin-Hämochromspektren von Hämextrakten aus *E. coli* Stämmen. (a) Extrakte aus Stämmen ohne Häm *a*-Biosynthese-Plasmid: C41 (schwarz), FA48 (blau), FA49 (grün). (b) Extrakte aus Stämmen mit Häm *a*-Biosynthese-Plasmid: GR52 (schwarz), FA48/GR52 (blau), FA49/GR52 (grün). Weitere Details im Text.

Pyridin-Hämochromspektren von *E. coli*-Hämextrakten zeigen üblicherweise nur ein Absorptionsmaximum im α -Bereich bei 554 nm, das durch die Überlagerung der Absorptionen von *b*-Typ und *o*-Typ Hämen entsteht. Die Spektren für Extrakte aus C41-Zellen, FA48 und FA49 zeigten, wie erwartet nur diese charakteristischen Absorptionen (Abb. 3.15a). Die Extrakte aus den Stämmen GR52, FA48/GR52 und FA49/GR52, die zusätzlich das Biosynthese-Plasmid enthalten, wiesen ein zusätzliches Maximum bei 587 nm auf, das charakteristisch für Häm *a* ist (Abb. 3.15b). Somit konnte bewiesen werden, dass diese *E. coli*-Stämme in der Lage sind, Häm *a* zu synthetisieren.

3.3.1.2 Surf1-Histidinmutanten

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, zeigten Aminosäuresequenz-Vergleiche verschiedener Surf1-Homologe mehrere konservierte Aminosäuren. Ein besonderes Augenmerk wurde vor allem auf das konservierte Histidin in der Nähe der C-terminalen Helix gelegt. Für Surf1c handelt es sich um das Histidin an Position 193, bei Surf1q befindet sich das Histidin an Position 202. Um eine mögliche Beteiligung dieses Restes an der Häm *a*-Bindung der beiden Surf1-Proteine zu untersuchen,

wurde das Histidin mit Hilfe der gerichteten Mutagenese gegen einen Alaninrest ausgetauscht.

Für Surf1c wurde der Aminosäureaustausch über die Quik ChangeTM-Methode erreicht. Dabei wurde ein mutagener Primer, der die Basen für den Austausch enthält und als *template* pFA48-Plasmid-DNA eingesetzt. Der Primer fügte außerdem eine stille Mutation ein, durch die eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle entsteht, über die eine erste Auswahl möglicher positiver Klone möglich war. Nach der Reisolation des Plasmids und der Sequenzierung wurde das entstandene Plasmid pFA48-H193A in den *E. coli*-Stamm GR52 transformiert, wodurch der FA48-H193A/GR52 entstand.

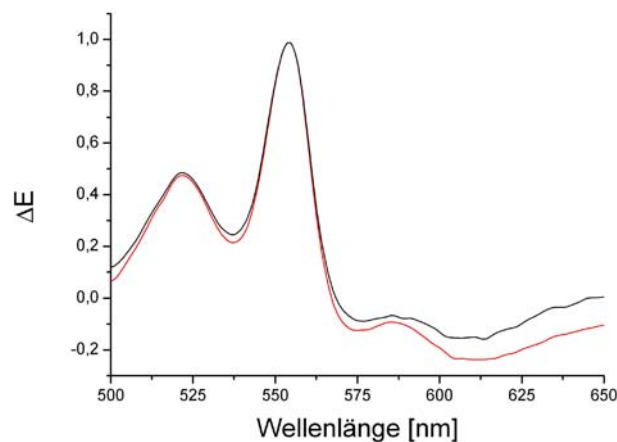


Abbildung 3.16: Pyridin-Hämochromspektrern von Hämextrakten aus den *E. coli*-Stämmen FA48-H193A/GR52 (schwarz) und FA49-H202A/GR52 (rot).

Für Surf1q konnten zunächst mit der Quik ChangeTM-Methode keine Mutanten erzielt werden. Deswegen wurde das gesamte *template*-Plasmid pFA49 mit einer klassischen PCR amplifiziert. Der *forward*-Primer trug hierbei die Sequenz für den Aminosäureaustausch, der außerdem eine zusätzliche BseYI-Schnittstelle einfügt. Als *reverse*-Primer diente *Surf1q-641-rv*. Nach der Amplifikation des Plasmids wurde das ca. 6200 bp große Produkt religiert und in *E. coli*-Zellen transformiert. Nach der Reisolation und Sequenzierung wurde das entstandene Plasmid pFA49-H202A in den *E. coli*-Stamm GR52 transformiert und der resultierende Stamm wurde FA49-H202A/GR52 genannt.

Pyridin-Hämochromspektrern von Hämextrakten aus den neuentstandenen Stämmen zeigten, dass auch hier ein Absorptionsmaximum bei 587 nm erscheint (Abb. 3.16) und somit die Synthese von Häm *a* in diesen Stämmen gewährleistet ist.

3.3.2 Aufreinigung von Surf1 über Affinitäts-tags

Die Aufreinigung der Surf1-Proteine sollte über einen Histidin-*tag* erfolgen, der ein bewährtes Mittel für Reinigung rekombinanter Proteine darstellt. Die Aufreinigung erfolgt dabei über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (*immobilised metal ion affinity chromatography*, IMAC), wobei man die Bindung von deprotonierten Histidinen an zweiwertige Metallionen ausnutzt. Das hier verwendete Säulenmaterial NTA-Agarose wird mit Ni²⁺-Ionen beladen, die von den NTA-Molekülen komplexiert werden. Über den Oligo-Histidin-*tag* bindet das Zielprotein und kann mit Imidazol wieder eluiert werden.

Im Falle von Surf1c und Surf1q wurde, wie in Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben, ein N-terminaler Dekka-His-*tag* an die Proteine angefügt. Die Versuche mit den Komplementationsstämmen in *Paracoccus* zeigten, dass der *tag* die Funktion des Proteins nicht beeinflusst (Abschnitt 3.2.2).

3.3.2.1 Testexpressionen

Bevor die Surf1-Expressionstämme FA48 und FA49 in großem Maßstab angezogen werden konnten, wurden im kleinen Maßstab die Expressionsbedingungen optimiert.

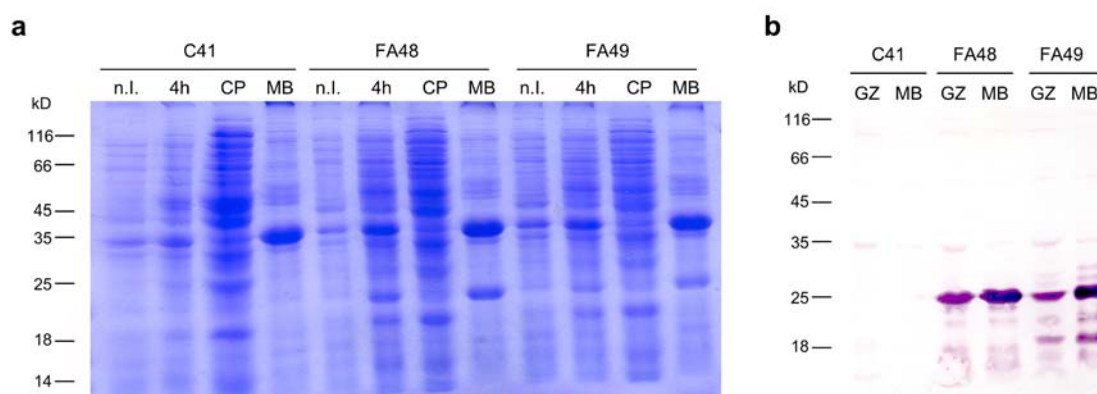


Abbildung 3.17: Testexpression von Surf1c und Surf1q in *E. coli*. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium bei 32 °C (a) Coomassie-gefärbtes SDS-PAG. n.l.: Ganzzelllysate direkt nach der Induktion mit 1 mM IPTG; 4h: Ganzzelllysate nach vier Stunden Induktion; CP: Cytoplasmafraktion; MB: Membranfraktion. Für die Ganzzelllysate wurden gleiche Zellmengen aus OD = 1 in Probenpuffer resuspendiert und jeweils 10 µL auf das Gel aufgetragen, von der Cytoplasma- und Membranfraktion wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. (b) Anti-His-Westernblot. GZ: Ganzzelllysate nach vier Stunden Induktion mit 1 mM IPTG; MB: Membranfraktion. Für die Ganzzelllysate wurden gleiche Zellmengen aus OD = 1 in Probenpuffer resuspendiert und jeweils 10 µL auf das Gel aufgetragen, von der Membranfraktion wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen.

Hierfür wurden 500 mL LB-Kulturen von FA48 und FA49 sowie leerer C41 bei 32 °C und bei 37 °C angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben für die PAGE-Analyse abgenommen, und nach vier Stunden erfolgten die Ernte der Zellen und die anschließende Membranpräparation. Es zeigte sich hierbei, dass die beiden Proteine in etwa gleich gut exprimiert werden, wobei kein großer Unterschied bei beiden Temperaturen festzustellen war. Die PAGE-Analyse der Anzucht bei 32 °C zeigte, dass nach vier Stunden eine Bande um 25 kD erscheint, die in C41-Zellen ohne Plasmid nicht zu finden ist (Abb.3.17). Nach der Zellfraktionierung bleibt diese Bande in der Membranfraktion erhalten und ein Westernblot bestätigte, dass es sich hierbei um His-getaggtetes Protein handelte (Abb. 3.17b).

3.3.2.2 Optimierung der Aufreinigung

Für die Aufreinigung der beiden Surf1-Proteine wurden Membranen aus einer 15 L-Kultur präpariert und mit Triton X-100 solubilisiert. Da dieses Detergenz eine starke Absorption bei 280 nm aufweist und in Folgeversuchen stören könnte, wurde ein Detergenztausch auf der Ni²⁺-NTA-Säule vorgenommen. Nach dem Beladen der Säule mit Solubilisat wurde mit mindestens 10 Säulenvolumen (SV) DDM-haltigen Puffer gewaschen, bis man eine stabile Basislinie der UV-Absorption erhält. Dieser Puffer enthielt zusätzlich 20 mM Imidazol, um in diesem Schritt unspezifisch-gebundenes Protein schon von der Säule zu waschen.

Bei den ersten Aufreinigungsversuchen wurde nach diesem Waschschrift ein linearer Gradient von 20 mM bis 250 mM angelegt und Fraktionen von 2 mL Volumen gesammelt. Dabei sollte festgestellt werden, ab welcher Imidazol-Konzentration die Surf1-Proteine zu eluieren beginnen. Die Einzelfraktionen wurden dann in einem SDS-Gel und Westernblot untersucht. Surf1c und Surf1q wiesen dabei ein nahezu identisches Elutionsverhalten auf. Beide Proteine beginnen schon bei einer Imidazolkonzentration von etwa 100 mM von der Säule zu eluieren, wobei ein Elutionsmaximum bei einer Konzentration von etwa 170 mM Imidazol erreicht wird.

Für alle folgenden Aufreinigungen wurde dann ein Stufenelutionsprotokoll etabliert, das nach dem Detergenztausch zwei Waschschriffe mit 50 mM und 80 mM Imidazol und die Elution der Surf1-Proteine mit 200 mM Imidazol beinhaltet.

Ergebnisse

In Abbildung 3.18 sind exemplarisch ein Elutionsprofil und das dazugehörige PAG für eine Aufreinigung von Surf1c aus FA48 gezeigt.

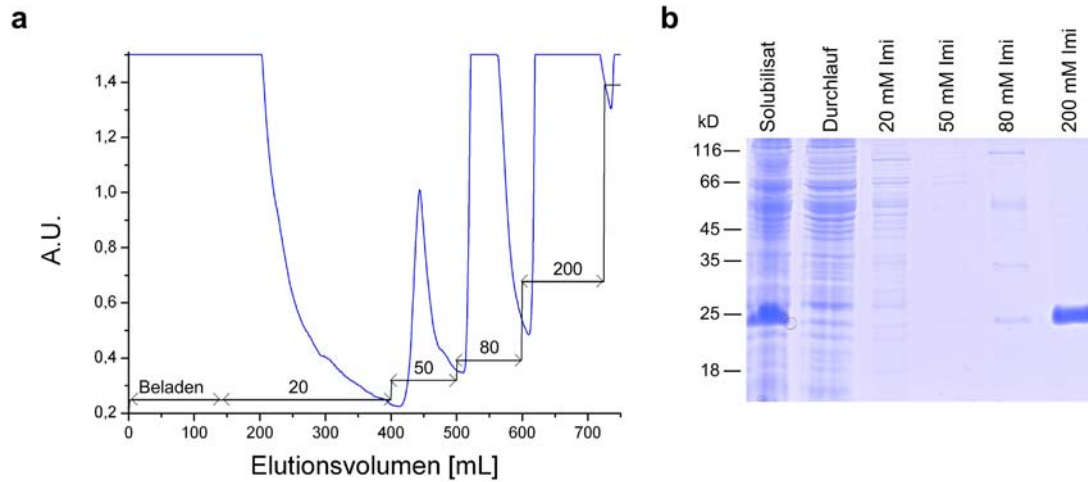


Abbildung 3.18: Aufreinigung von Surf1c aus FA48 (a) Elutionsprofil. Die UV-Absorption ist in blau, die Imidazolkonzentration in schwarz dargestellt, die einzelnen Stufen der Elution sind beschriftet. (b) Coomassie gefärbtes SDS-PAG der einzelnen Fraktionen. Das 200 mM Imidazol-Eluat wurde ankonzentriert und 5 μ g Protein wurden auf das Gel aufgetragen, die anderen Fraktionen wurden jeweils 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 20 μ L wurden auf das Gel geladen.

Oben ist zu sehen, dass geringe Mengen an Surf1c zwar schon bei 80 mM Imidazol eluieren, nach der Elution mit 200 mM Imidazol war die farblose Proteinlösung aber nahezu frei von Verunreinigungen. Für die Aufreinigung von Surf1q aus FA49 wurden nahezu identische Ergebnisse erzielt (Abb. 3.19). Auch hier kann mit diesem Protokoll nahezu sauberes farbloses Protein erhalten werden.

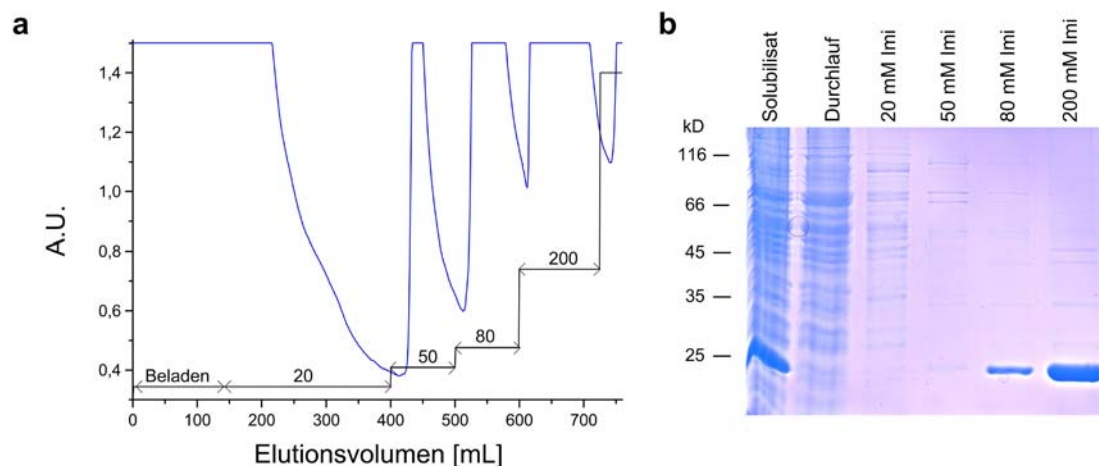


Abbildung 3.19: Aufreinigung von Surf1q aus FA49 (a) Elutionsprofil. Die UV-Absorption ist in blau, die Imidazolkonzentration in schwarz dargestellt, die einzelnen Stufen der Elution sind beschriftet. (b) Coomassie gefärbtes SDS-PAG der einzelnen Fraktionen. Das 200 mM Imidazol-Eluat wurde ankonzentriert und 5 μ g Protein wurden auf das Gel aufgetragen, die anderen Fraktionen wurden jeweils 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 20 μ L wurden auf das Gel geladen.

Surf1c und Surf1q können mit durchschnittlichen Ausbeuten von 1-2 mg Protein pro Liter Kulturmedium aufgereinigt werden.

3.3.3 Hämbindung von Surf1

Für die Untersuchung einer potentiellen Hämbindung von Surf1 wurden Surf1c und Surf1q in Gegenwart des Häm *a*-Biogenese-Plasmids exprimiert. Die Anzucht der Stämme FA48/GR52 und FA49/GR52, sowie der Histidinmutanten unterschieden sich von der Expression der apo-Proteine dadurch, dass sie in Schikanekolben durchgeführt wurde und die Induktion der Surf1-Expression bei einer OD₆₀₀ von 1,0 stattfand. Für die Aufreinigungen über den His-tag wurde das gleiche Protokoll wie für die apo-Proteine verwendet, und Präparationen glichen sich in Ausbeuten und Reinheit (Abb. 3.20a).

Die Elutionen von Surf1c und Surf1q aus FA48/GR52 und FA49/GR52 wiesen eine deutliche braun-grüne Farbe auf, wohingegen die Surf1-Histidinmutanten farblos waren. Hämfärbungen in einem semi-denaturierenden Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Gelsystem konnten nachweisen, dass im Gegensatz zu den Präparationen der apo-Formen und der Histidinmutanten die Surf1c- und Surf1q-Präparationen Häm beinhalten, das durch vollständige Denaturierung der Proteine mit SDS verloren geht (Abb. 3.20b).

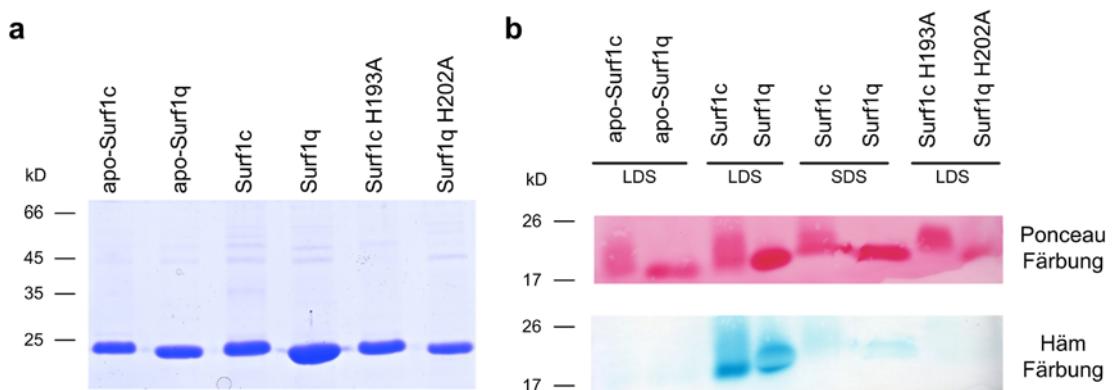


Abbildung 3.20: (a) Coomassie gefärbtes SDS-PAG von Surf1-Proteinen. (b) LDS-PAG von Surf1-Proteinen. Das Gel wurde nach dem Lauf auf eine PVDF-Membran geblotet und einer Hämfärbung unterzogen (unterer Streifen). Im Anschluss wurde der Blot wieder entfärbt und mit einer Ponceau S-Lösungen wurden alle Proteine sichtbar gemacht (oberer Streifen). Surf1c und Surf1q, sowie deren Histidin-Mutanten wurden in Anwesenheit des Häm *a*-Biosynthese-Plasmid exprimiert. Auf das Gel wurden jeweils ca. 5 µg der ankonzentrierten 200 mM Imidazol-Eluate aufgetragen.

Pyridin-Hämochromspektren für Surf1c zeigten, dass es sich hier hauptsächlich um Häm *a* handelt, da das Absorptionsmaximum bei 587 nm liegt (Abb. 3.21a). Allerdings war ein weiterer *peak* um 552 nm zu sehen, bei dem es sich um Häm *o* oder Häm *b* handeln könnte, da die Absorptionsmaxima dieser Gruppen hier überlappen. Native Redox-Differenzspektren zeigten ein Absorptionsmaximum im α -Bereich bei 595 nm und der zusätzliche Häm-*peak* war hier als kleine Schulter um 560 nm zu sehen (Abb. 3.21b). Aus denaturierenden Spektren konnte für Surf1c ein molares Häm *a*:Protein Verhältnis von $0,17 \pm 0,05$ (Standardabweichung aus vier unterschiedlichen Präparationen) erhalten werden.

Für Surf1q war ebenfalls in den Pyridin-Hämochromspektren ein Häm *a*-Maximum bei 587 nm zu sehen und ein weiteres Maximum bei 552 nm (Abb. 3.21a). Im nativen Redox-Differenzspektrum zeigte sich für Surf1q ein breites Häm *a*-Maximum bei 600 nm und eine kleine Schulter um 560 nm (Abb. 3.21b). Über die denaturierenden Spektren konnte für Surf1q ein molares Häm *a*:Protein Verhältnis von $0,09 \pm 0,03$ (Standardabweichung aus drei unterschiedlichen Präparationen) erhalten werden.

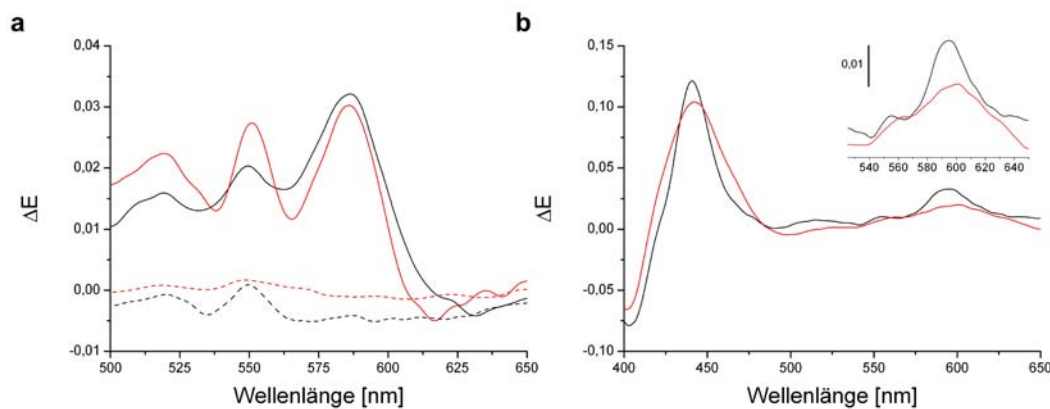


Abbildung 3.21: Redox-Differenzspektren von Surf1c und Surf1q. Die Proteine wurden in Gegenwart des Häm *a*-Biosynthese-Plasmids exprimiert. **(a)** Pyridin-Hämochromspektren von Surf1c (schwarz, durchgezogen), Surf1c H193A (schwarz, gestrichelt), Surf1q (rot, durchgezogen) und Surf1q H202A (rot, gestrichelt). **(b)** native Redoxpektren von Surf1c (schwarz) und Surf1q (rot). Der Einschub zeigt eine Vergrößerung des α -Bereichs. Für alle Spektren wurden 20 μM Protein eingesetzt.

Im Unterschied zu den Wildtyp-Proteinen war in den Pyridin-Hämochromspektren für die beiden Histidinmutanten kein Häm *a* zu sehen, und nur für Surf1c-H193A wurde ein kleiner *peak* im Bereich der Häm *b*/Häm *o*-Absorption detektiert (Abb. 3.21a).

3.3.3.1 HPLC-Experimente

Um der Frage auf den Grund zu gehen, welche Häm-Spezies in den Surf1-Wildtyp Präparationen vorhanden sind, wurden *reverse phase* HPLC-Experimente durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

Zunächst mussten die Häm-Gruppen aus den Proteinlösungen extrahiert werden. Dafür wurden jeweils 2 mg aufgereinigtes Protein einer sauren Hämextraktion unterzogen und anschließend auf eine μ RPC-C2/C18-Säule aufgetragen. Diese Methode trennt die Moleküle nach ihrer Hydrophobizität auf bzw. ihrer Fähigkeit, sich in dem organischen Lösungsmittel Acetonitril zu lösen. Beim Auftragen auf die Säule binden die einzelnen Komponenten an die langen Kohlenwasserstoff-Moleküle der Säulenmatrix. Die Elution erfolgt dann durch das Anlegen eines linearen Gradienten von 50 % bis 100 % Acetonitril.

Es wurden ebenfalls Extrakte aus aufgereinigter *aa*₃-COX und *E. coli*-Membranen, die nur Häm *b* und Häm *o* enthalten, hergestellt und über HPLC untersucht, um die einzelnen *peaks* den Häm-Gruppen zuordnen zu können. Häm *b* eluiert bei dieser Methode sehr früh, da es im Gegensatz zu Häm *a* oder Häm *o* keinen Farnesylrest trägt (Abb. 3.22a). Die Retentionszeit von Häm *a* ist kürzer als die von Häm *o*, da es eine Formylgruppe trägt (Abb. 3.22a).

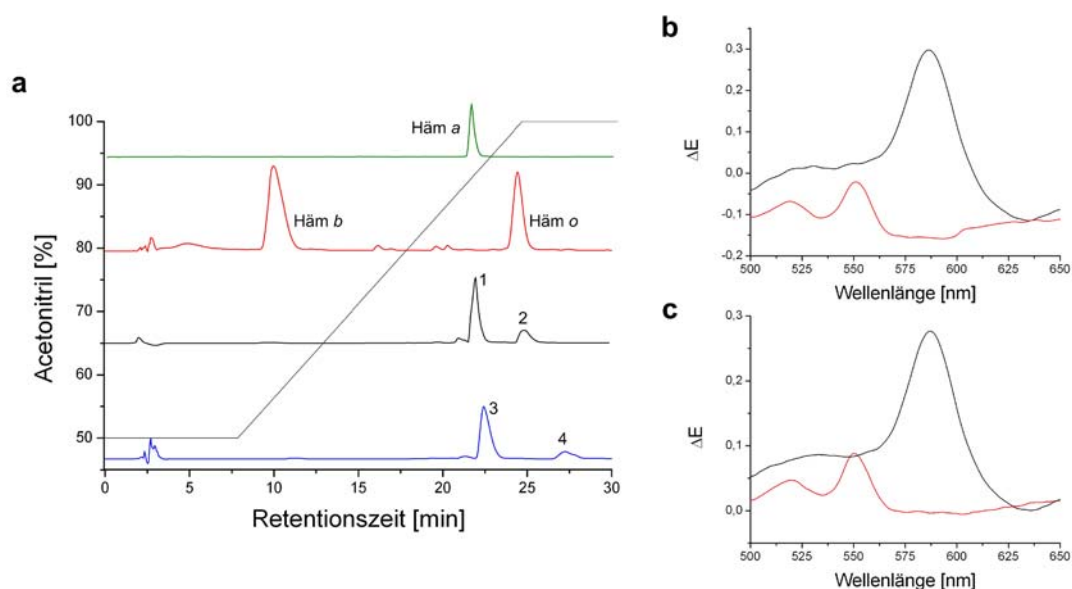


Abbildung 3.22: (a) HPLC-Elutionsprofile der Hämextrakte von *aa*₃-Cytochrom c Oxidase (grün), *E. coli* WT-Membranen (rot), Surf1c (schwarz) und Surf1q (blau). Dargestellt sind jeweils die Häm-Absorptionen bei 410 nm. Die schwarze Linie bezeichnet den angelegten Acetonitril-Gradienten. (b) Pyridin-Hämochromspektren der ankonzentrierten in (a) dargestellten Elutionsfraktionen 1 (schwarz) und 2 (rot) von Surf1c-Extrakt. (c) Pyridin-Hämochromspektren der ankonzentrierten in (a) dargestellten Elutionsfraktionen 3 (schwarz) und 4 (rot) von Surf1q-Extrakt.

Sowohl für die Extrakte aus Surf1c als auch Surf1q konnten jeweils zwei Elutionsfraktionen erhalten werden (Abb. 3.22a). Der erste *peak* eluiert bei für Häm *a* typischen Retentionszeiten, während der zweite *peak* Häm *o* zuzurechnen war. Im Extrakt von Surf1q eluierte der zweite *peak* jedoch um einiges später als in der Vergleichsprobe (Abb. 3.22a, Nummer 4). Zur Verifizierung wurden die Fraktionen in der *speedvac* bis zur Trockene eingengt, anschließend in DMSO resuspendiert und in Pyridin-Hämochromspektren untersucht (Abb. 3.22b und c). Die Spektren bestätigten die Annahme, dass es sich bei dem frühen *peak* um Häm *a* handelte, während der spätere *peak* ein typisches Häm *o*-Absorptionmaximum aufwies. Für die größere Retentionszeit des Häm *o* im Surf1q-Extrakt könnten die nicht idealen Laufbedingungen bei 4 °C verantwortlich sein. Möglicherweise war die Säule auch nach der langen Lagerung nicht ausgiebig genug äquilibriert worden.

3.3.3.2 Verbesserung der Expressionsbedingungen

Der Gehalt an Häm *a*, aber auch an Häm *o* in den einzelnen Surf1-Präparationen unterlag relativ starken Schwankungen, die von den Expressionsbedingungen abzuhängen schienen. Wie im Folgenden dargestellt, wurde versucht, die Expressionsbedingungen dahingehend zu verbessern, dass nur noch Häm *a* in den Proteinpräparationen vorhanden ist.

Nach mehreren erfolglosen Expressionsversuchen in konventionellem LB-Medium, bei denen die Induktion bei höheren Zelldichten erfolgte und die IPTG-Konzentration reduziert wurde, wurden die Expressionsstämme von Surf1c FA48/GR52 und Surf1q FA49/GR52 in autoinduzierendem Medium (AI-Medium) angezogen.

Dieses Medium basiert auf normalem Vollmedium, enthält aber zusätzlich Glucose und Lactose im Verhältnis 1 zu 4 (w/w). Das hat den Vorteil, dass die Kultur nicht mehr induziert werden muss. Zunächst wird die Proteinexpression des pET-Plasmids durch die Anwesenheit von Glucose gehemmt. Erst wenn die Glucose verstoffwechselt ist, kommt es zur Induktion der Surf1-Expression über die Lactose im Medium, die ihrerseits verstoffwechselt werden kann. Durch diese sanfte Autoinduktion des Mediums werden viel höhere Zelldichten vor der Induktion erlangt. Da das Häm *a*-Biosynthese-Plasmid pGR52 einen konstitutiven Promotor

besitzt, steht theoretisch schon mehr Häm *a* zur Verfügung, wenn die eigentliche Surf1-Expression beginnt.

Die Hauptkulturen wurden 1 %ig in Schikanekolben angeimpft und bei 32 °C für 24 h inkubiert. Nach der Ernte erfolgten die Membranpräparationen und die Proteinaufreinigungen wie zuvor beschrieben.

Redox-Differenzspektren der aufgereinigten Proteine zeigten, dass die Präparationen von Surf1c als auch von Surf1q nun nur noch Häm *a* enthielten (Abb. 3.23). Aus den Pyridin-Hämochromspektren konnte für Surf1c ein molares Häm *a* zu Protein Verhältnis von 0,13 bestimmt werden, welches sich nicht wesentlich von den vorherigen Ergebnissen unterschied. Für Surf1q hingegen konnte ein Wert von 0,35 berechnet werden, der in etwa dem vierfachen des zuvor ermittelten Wertes entsprach.

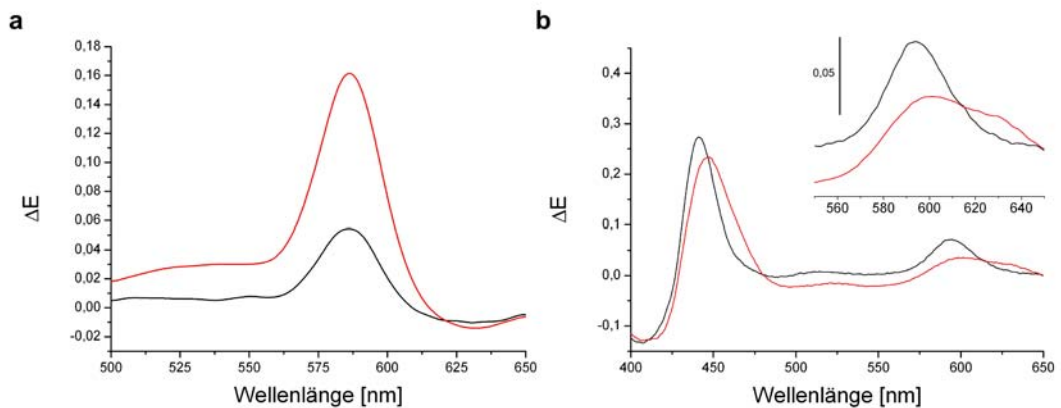


Abbildung 3.23: Redoxspektren von Surf1c aus FA48/GR52 (schwarz) und Surf1q aus FA49/GR52 (rot). Für die Expression wurden die Stämme in in AI-Medium angezogen. (a) Pyridin-Hämochromspektren. (b) native Redoxpektren. Der Einschub zeigt eine Vergrößerung des α -Bereichs. Für alle Spektren wurden 20 μ M Protein eingesetzt.

3.4 Biochemische Untersuchung von Surf1

Der folgende Abschnitt stellt die Ergebnisse zur Untersuchung der aufgereinigten Surf1-Proteine zusammen. Alle Surf1-Formen wurden dazu heterolog in *E. coli* exprimiert und über IMAC aufgereinigt.

Neben der Untersuchung der Proteine über ihr Elutionsverhalten in der Gelfiltration, die eine Aussage über die Monodispersität und möglicherweise den Dimeren-

Zustand treffen sollte, werden hier verschiedene Analysen zur Hämbindung der Proteine dargestellt. Außerdem wurden die mögliche Interaktion der apo-Proteine mit der Häm *a* Synthase untersucht und erste Versuche zur Kristallisation unternommen.

3.4.1 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie sollte untersucht werden, in wie weit die Surf1-Proteine als einheitliche Fraktion, also Monomer oder Dimer nach der ersten Säule vorlagen.

Die Gelfiltrations- oder Größenausschluss-Chromatographie trennt die Moleküle nach ihrer Größe auf. Das Säulenmaterial besteht aus kleinen Kügelchen (*beads*) eines porösen Polymers. Kleinere Moleküle dringen in die *beads* ein und verbleiben länger auf der Säule als große Moleküle. Je nach Größe der Kügelchen können unterschiedliche Trennbereiche erreicht werden. Das Säulenmaterial Superose6 besitzt eine theoretische Trennleistung von 5 kD bis 5000 kD, die allerdings für lösliche globuläre Proteine berechnet wird und für detergenzhaltige Puffer und Membranproteine stark vermindert sein kann.

Für die Analyse von Surf1 wurden 100 bis 250 µg aufgereinigtes Protein auf eine Superose6 10/300-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und mit 1,5 SV 50 mM NaP_i (pH 8), 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM an einem ÄktaPurifier (GE Healthcare) Chromatographiesystem eluiert.

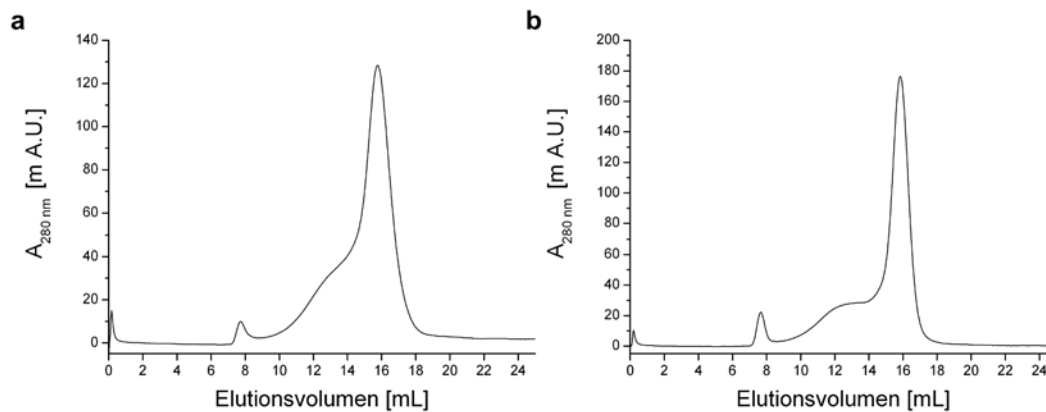


Abbildung 3.24: Superose6-Elutionsprofil von (a) apo-Surf1c und (b) apo-Surf1q.

Für die beiden apo-Proteine wurde ein Hauptelutionsmaximum erhalten. Allerdings war eine breite Schulter bei kleineren Elutionsvolumina zu erkennen, die für Surf1q deutlich kleiner ausfällt (Abb. 3.24). Diese Schulter weist auf einen relativ hohen Aggregationsgrad des Proteins hin.

In der Gelfiltrationsanalyse von Surf1c und Surf1q, die Häm gebunden haben, wurden die Proteine verwendet, die konventionell exprimiert wurden und neben Häm *a* auch Häm *o* enthalten. Neben der UV-Absorption der Proteine wurde auch die Soret-Absorption bei 410 nm während des Laufs detektiert (Abb. 3.25).

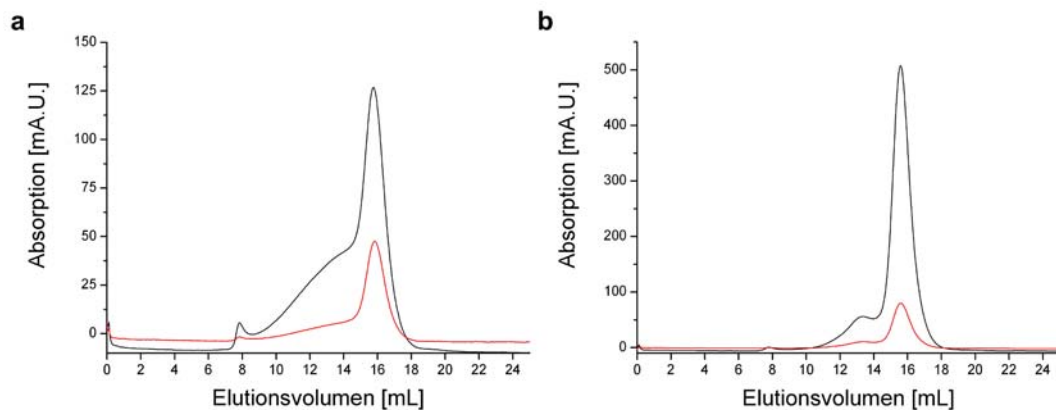


Abbildung 3.25: Superose6-Elutionsprofil von (a) Surf1c und (b) Surf1q. Die Proteine wurden in Anwesenheit des Häm *a*-Biosynthese-Plasmids in LB-Medium exprimiert. Die UV-Absorption der Proteine bei 280 nm (schwarz), sowie die Soret-Absorption der Häm-Gruppen bei 410 nm (rot) sind dargestellt.

In den Elutionsprofilen sah man deutlich, dass die Häm- und Proteinfractionen koeluiieren. Auch hier waren die Aggregatschultern zu sehen. Im Falle für Surf1c war die Schulter für die Soret-Absorption weit weniger ausgeprägt als für die UV-Absorption, was darauf hinweist, dass unbeladenes Protein stärker zur Aggregation neigt (Abb. 3.25a). Für Surf1q war die Schulter im Vergleich zum apo-Protein weit weniger ausgeprägt, so dass es scheint, als ob das Protein mit seinem Häm-Kofaktor ebenfalls weit weniger zur Aggregation neigt.

Des Weiteren wurden die Surf1-Histidinmutanten untersucht (Abb. 3.26). Für Surf1c H193A sind hier sogar zwei Schultern zu erkennen, während im Falle von Surf1q H202A die Schulter nicht aufgelöst werden kann.

Ergebnisse

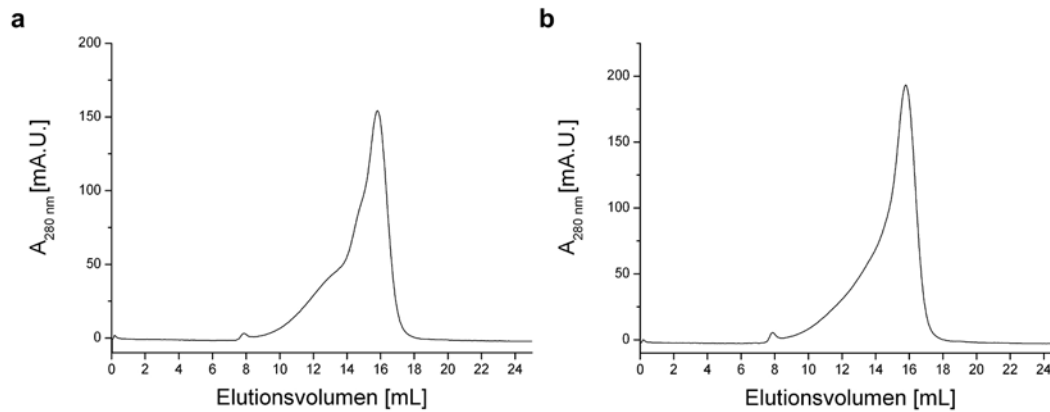


Abbildung 3.26: Superose6-Elutionsprofil von (a) Surf1c H193A und (b) Surf1q H202A. Die Proteine wurden in Anwesenheit des Häm α -Biosynthese-Plasmids exprimiert.

Im Folgenden sollte versucht werden, ein Molekulargewicht für die Surf1-Proteine abzuschätzen, wozu eine Eichreihe für die Superose6-Säule angefertigt wurde (Abb. 3-26).

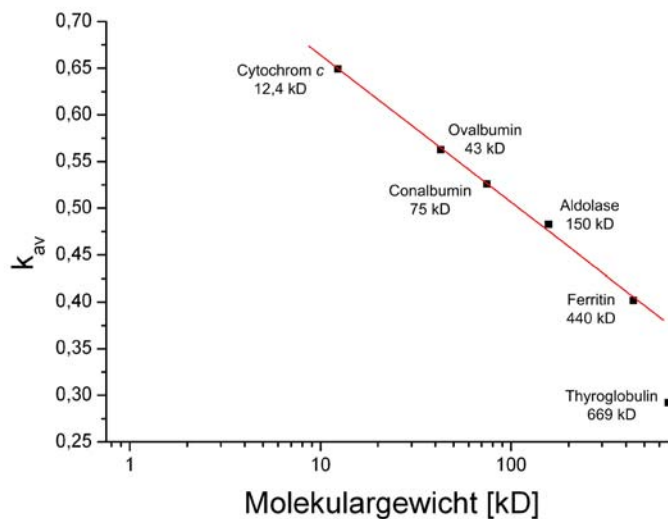


Abbildung 3.27: Eichkurve der analytischen Superose6 mit löslichen globulären Proteinen in 50 mM NaP_i (pH 8), 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM. Die Auftragung des Verteilungskoeffizienten erfolgt in Abhängigkeit des Molekulargewichts in halblogarithmischer Darstellung. Der Wert für Thyroglobulin liegt nicht mehr im linearen Auftrennungsbereich der Säule und wurde nicht in die Eichkurve miteinbezogen.

Für mehrere lösliche globuläre Proteine wurden im Laufpuffer mit DDM (50 mM NaP_i (pH 8), 300 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM) die Elutionsvolumina V bestimmt. Über die bekannten Werte des Säulenvolumens V_c und des Ausschlussvolumens V_0 erhält man den Verteilungskoeffizienten k_{av} mit Hilfe der Formel:

Ergebnisse

$$k_{av} = \frac{V - V_0}{V_c - V_0}$$

Der Verteilungskoeffizienten ist linear abhängig vom Logarithmus des Molekulargewichts. Für das oben genannte Puffersystem lag Thyroglobin mit 669 kD nicht mehr im Trennbereich der Säule (Abb. 3.27) und wurde nicht in die Eichgerade mit einbezogen. Mit Hilfe der Eichgeraden wurden die Molekulargewichte für die verschiedenen Surf1-Proteine aus den Elutionsmaxima berechnet (Tabelle 3.4).

Alle Proteine scheinen ein Molekulargewicht von etwa 110 kD zu haben, wobei hier die Detergenzmicelle der Membranproteine mitgezählt wird. Für DDM gilt eine durchschnittliche Micellengröße von etwa 50 kD. Zieht man diesen Wert ab, erhält man Molekulargewichte von Surf1 um 50 kD, was einem Surf1-Dimer entspräche. Allerdings kann nicht genau bestimmt werden, wie viele Detergenzmoleküle tatsächlich an das Protein gebunden sind, und eine definitive Aussage kann nicht getroffen werden.

Tabelle 3.4: Molekulargewichtsabschätzung von Surf1 mittels analytischer Gelfiltration

	Elutionsvolumen ^a [mL]	Molekulargewicht ^b [kD]
apo-Surf1c	15,77	113,2
apo-Surf1q	15,87	105,4
Surf1c	15,80	110,2
Surf1q	15,74	116,3
Surf1c H193A	15,81	109,2
Surf1q H202A	15,77	113,2

^aDie Elutionsvolumina beziehen sich auf den Hauptpeak der UV-Absorption. ^bAlle hier angegebenen Molekulargewichte wurden mit Hilfe der Eichgerade für die Superose6-Säule bestimmt (Abb. 3.27). Es handelt sich hierbei um das Gesamtgewicht der Proteine mit gebundenem Detergenz.

Mit dieser Methode lässt sich nicht eindeutig klären, ob Surf1 als Monomer oder Dimer vorliegt, da hierfür eine genaue Kenntnis der gebundenen DDM-Menge an das Protein notwendig wäre. Möglicherweise könnte man das Problem mit einer Eichkurve mit geeigneten Membranproteinen umgehen.

3.4.2 Hämbindungseigenschaften von Surf1

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Häm α -Bindung von Surf1 dargestellt.

3.4.2.1 Kohlenmonoxid-Bindungsspektren

Das Eisenzentralatom eines Häm-Moleküls wird über bis zu sechs Liganden gebunden. Vier Liganden stellen dabei die Stickstoffatome des Porphyrinrings dar, während die beiden verbleibenden axialen Liganden von Proteinseitengruppen gestellt werden können. Im Falle der Cytochrom c Oxidase wird das Häm α von zwei Histidinresten koordiniert, während das Häm α_3 nur über ein Histidin als fünften Liganden koordiniert ist und Sauerstoff bei der Katalyse den sechsten Ligand stellt. Kohlenmonoxid (CO) bindet an das Eisenzentralatom von Hämgruppen, wenn kein sechster Ligand vorhanden ist, wodurch es zu einer spektralen Verschiebung der Häm-Absorption kommt und, wie in Abschnitt 3.2.3.2 beschrieben, eine Unterscheidung zwischen den beiden Häm-Molekülen möglich macht.

Im Zusammenhang mit Surf1 sollten CO-Bindungsspektren Aufschluss darüber geben, ob das Häm α Molekül über fünf oder sechs Liganden koordiniert ist.

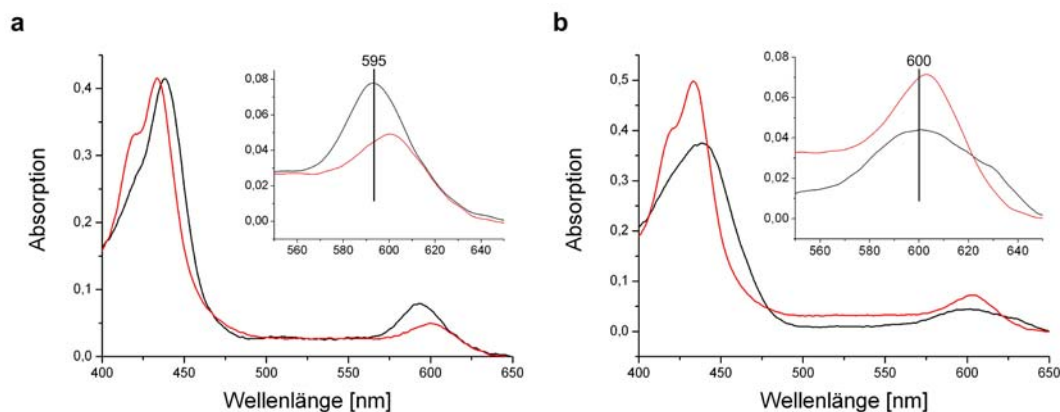


Abbildung 3.28: Spektren von reduziertem (a) Surf1c und (b) Surf1q. Spektren der reduzierten Form (schwarz) und anschließende Spektren nach 1minütiger CO-Begasung (rot). Die Einschübe zeigen eine Vergrößerung des α -Bereichs.

Dazu wurden Surf1c und Surf1q verwendet, die aus FA48/GR52 bzw. FA49/GR52 aufgereinigt wurden, die in AI-Medium angezogen worden waren (Vgl. 3.3.3.2). So wurde sichergestellt, dass nur Häm *a* in der Proteinlösung vorhanden war. Zunächst wurden Spektren der reduzierten Form von Surf1c und Surf1q aufgenommen, dann wurden die reduzierten Proben in der Küvette ca. eine Minute mit CO begast und ein weiteres Spektrum aufgenommen.

Sowohl für Surf1c als auch für Surf1q konnte nach der CO-Inkubation eine deutliche Verschiebung der Absorptionen im Soret- und α -Bereichs des Spektrums beobachtet werden (Abb. 3.28). Im Soret-Bereich verschob sich das Maximum von Surf1c und Surf1q von 437 nm auf 432 nm, im α -Bereich kam es zu einer Rotverschiebung, wobei das neue Maximum von Surf1c bei 601 nm, von Surf1q bei 604 nm lag. Dies weist darauf hin, dass das gebundene Häm *a* in diesen Proteinen nur fünf Liganden aufweist. Die Schulter im Soret-Bereich um 420 nm zeigte eine teilweise Oxidation des Häm *a*, die durch Sauerstoff hervorgerufen wurde, der bei der Begasung mit CO in die Küvette gelangt sein könnte.

3.4.2.2 *In vitro*-Titration

Heterolog exprimiertes Surf1 weist eine sub-stöchiometrische Hämbindung auf, so dass im Folgenden versucht wurde, die maximale Häm:Protein Stöchiometrie zu bestimmen.

Zunächst wurde in einem *in vitro*-Ansatz versucht, Häm *a* und apo-Surf1c zu mischen und die beiden Komponenten wieder über eine IMAC-Säule voneinander zu trennen. Dazu wurden 2 mg aufgereinigtes apo-Surf1c mit 152 nmol Häm *a* in einem 50 mL Ansatz gemischt, was einem molaren Verhältnis von 1:2 entspricht. Das Gemisch wurde 10 min auf Eis inkubiert und enthielt zusätzlich 5 % (v/v) DMSO, um die Löslichkeit von Häm *a* im wässrigen Puffersystem zu erhöhen. Im Anschluss wurde das Gemisch auf eine 5 mL Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen, gewaschen und stufenweise mit 5 SV verschiedenen Imidazolkonzentrationen eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend über PAGE analysiert (Abb. 3.29).

Wie zu erwarten, eluierte Surf1c hauptsächlich bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM, allerdings war das Protein auch in allen anderen Fraktionen zu finden (Abb. 3.28a). Dies lässt sich möglicherweise mit der relativ hohen Flussrate während

Ergebnisse

dieses Experiments erklären. Die Häm-färbung der Fraktionen zeigte, dass sich auf der Säule das freie Häm *a* nicht vollständig von Surf1c trennen ließ (Abb. 3.29c), und eine spektrale Analyse der Eluate erschien wenig viel versprechend.

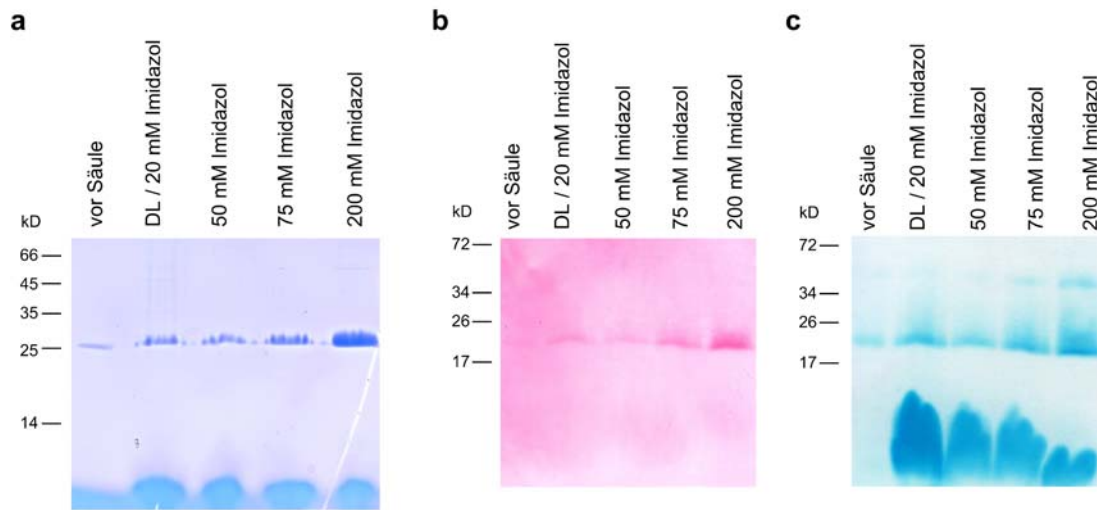


Abbildung 3.29: *in vitro*-Hämbindung von apo-Surf1c. Häm *a* und apo-Surf1c wurden im Verhältnis 2:1 (w/w) gemischt und auf eine 5 mL Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen. Die Fraktionen der Stufenelution wurden ankonzentriert 1:1 mit PAGE-Probenpuffer versetzt und zur Analyse 10 μ L auf ein Gel aufgetragen. (a) Coomassie gefärbtes SDS-PAGE. (b) Ponceau-gefärbter Blot eines LDS-PAGE. (c) Häm-färbung des Blots in (b).

Spektrale Untersuchungen von Surf1c und Surf1q und freiem Häm *a* zeigten, dass sich die Häm *a*-Absorptionen von freiem und proteingebundenen Häm *a* unterscheiden lassen. Die Verschiebung im Spektrum ist am deutlichsten im Soret-Bereich in der oxidierten Form, wo freies Häm *a* ein Maximum bei 412 nm aufweist und Surf1c-gebundenes Häm *a* ein Absorptionsmaximum bei 419 nm zeigt (Abb. 3.30).

Im Folgenden sollte versucht werden, ob diese spektrale Verschiebung spezifisch der Bindung von Häm *a* an Surf1 zuzuordnen ist. Hierzu wurden die einzelnen Surf1-Proteine zu einer 3,75 μ M Häm *a*-Lösung pipettiert, und jeweils Spektren ausgenommen. Apo-Surf1c, Surf1c H193A, apo-Surf1q und Surf1q H202A wurden jeweils in einer Endkonzentration von 20 μ M verwendet. Der etwa 5,3 fache Überschuss an Protein sollte sicherstellen, dass alle Häm *a*-Moleküle gebunden werden können. Nach einer Inkubation von etwa zwei Minuten wurden wieder Spektren aufgenommen.

Die Zugabe von apo-Surf1c und apo-Surf1q führte zu einer Verschiebung der Häm α -Absorption von 412 nm auf 419 nm, während die Zugabe der Surf1-Histidinmutanten keine Änderung der Häm α -Absorption bewirkte (Abb. 3.30).

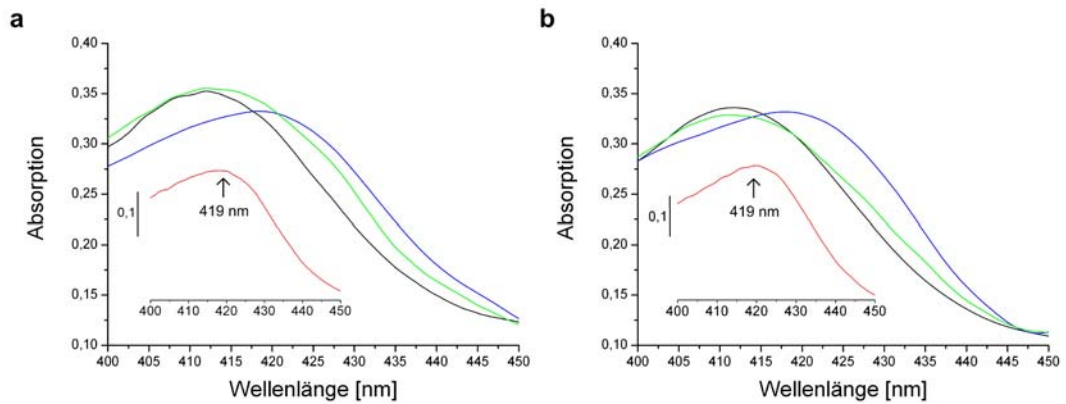


Abbildung 3.30: Spektren der oxidierten Form von Häm α nach Zugabe von Surf1-Proteinen. (a) Häm α allein (schwarz), nach Zugabe von apo-Surf1c (blau) und Surf1c H193A (grün). Der Einschub zeigt das Spektrum der oxidierten Form von Surf1c aus der Koexpression mit den Häm α synthetisierenden Proteinen (FA48/GR52, rot). (b) Häm α allein (schwarz), nach Zugabe von apo-Surf1q (blau) und Surf1q H202A (grün). Der Einschub zeigt das Spektrum der oxidierten Form von Surf1q aus der Koexpression mit den Häm α synthetisierenden Proteinen (FA49/GR52, rot). Für alle Spektren wurden 3,75 μ M Häm α und 20 μ M Protein eingesetzt.

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde ein *in vitro*-Titrationsexperiment geplant, das die Änderung der Häm α -Absorption in Abhängigkeit der Proteinkonzentration darstellen sollte. Analog zu oben beschriebenen Versuchen wurde eine 5 μ M Häm α -Lösung in der Küvette vorgelegt und Protein in unterschiedlichen Konzentrationen hinzu pipettiert, worauf die Aufnahme eines Spektrums folgte. Die Konzentrationen wurden derart gewählt, dass in der Küvette das molare Protein:Häm-Verhältnis in einem Bereich von 0 bis 5 lag. Von den insgesamt 16 Spektren, wurde die Änderung der Absorption $\Delta E_{419-412\text{nm}}$ bestimmt und die erhaltenen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen (Abb. 3.31).

Die Änderung der Absorption $\Delta E_{419-412\text{nm}}$ für die Titration mit apo-Surf1c und apo-Surf1q zeigten den Verlauf einer Sättigungskurve (Abb. 3.31), wobei die Werte für apo-Surf1q weit stärker von der Idealform abweichen (Abb. 3.31b). Allerdings zeigten auch die Werte für die Histidinmutanten für kleine Proteinkonzentrationen einen Anstieg der Absorptionsänderung. Bei höheren Konzentrationen blieb die Änderung jedoch weitgehend stabil und deutlich kleiner als die Werte für die apo-Proteine.

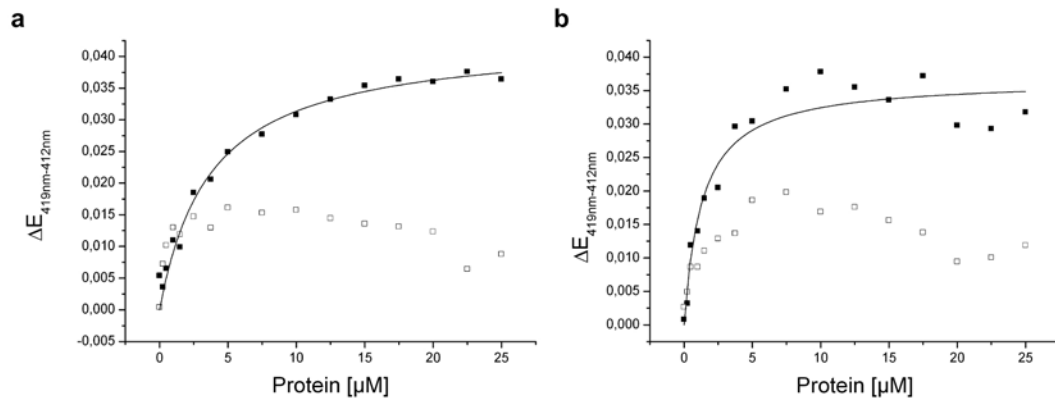


Abbildung 3.31: Zunahme der Absorptionsänderung (419-412 nm) von Häm *a* in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. (a) apo-Surf1c (■) und Surf1c H193A (□). Die Kurve zeigt den *Fit* für Apo-Surf1c nach einem *single-site binding model* ($R^2=0,979$) (b) apo-Surf1q (■) und Surf1q H202A (□). Die Kurve zeigt den *Fit* für apo-Surf1q nach einem *single-site binding model* ($R^2=0,928$). Die Häm *a* Konzentration wurde konstant bei 5 μM gehalten.

Für beide apo-Proteine konnten die Werte mit der Formel für die Bindung eines Liganden (*single-site binding model*) gefittet werden:

$$y = \frac{Bx}{K + x}$$

Die Variable x ist hier mit der Proteinkonzentration gleichzusetzen, während die Konstante K dem Wert für x bei halbmaximaler Sättigung B entspricht. Der Wert für K kann also der Dissoziationskonstante K_d gleichgesetzt werden. Der *Fit* ergab für Surf1c einen Wert von $K_d = 3,71 \mu\text{M}$ und für Surf1q einen Wert von $K_d = 1,31 \mu\text{M}$.

Da die Methode jedoch noch nicht ausgereift ist, sind diese Werte nur mit Vorsicht zu interpretieren. Die absoluten Beträge der Absorptionsänderungen sind hier relativ gering und anfällig für systematische Fehler. Nichtsdestotrotz gibt diese Methode eine Tendenz an und die Tatsache, dass sich die Kurven mit dem Model für eine Bindungsstelle fitten lassen, spricht für eine 1:1 Stöchiometrie der Hämbindung.

3.4.2.3 Isotherme Titrationskalorimetrie

Eine sehr viel genauere Methode zur Bestimmung von Bindungsparametern stellt die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) dar. Neben den Bindungsparametern wie der Dissoziationskonstante K_d und der Bindungstöchiometrie N erhält man hier auch thermodynamische Parameter wie die Bindungsenthalpie ΔH und die

Bindungsentropie ΔS . Dieser Kalorimetriemethode nutzt als Messwert die Wärme, die durch die Bindung eines Liganden an seinen Bindungspartner entsteht.

Die Ligandenlösung wird über eine Spritze in die Messzelle titriert. Über eine Referenzzelle wird die Heizleistung gemessen, die notwendig ist, um die beiden Zellen auf der gleichen Temperatur zu halten. So entsteht ein Diagramm, das die Heizleistung in Abhängigkeit der Zeit darstellt, wobei jede Injektion durch einen Ausschlag repräsentiert wird (Abb. 3.32).

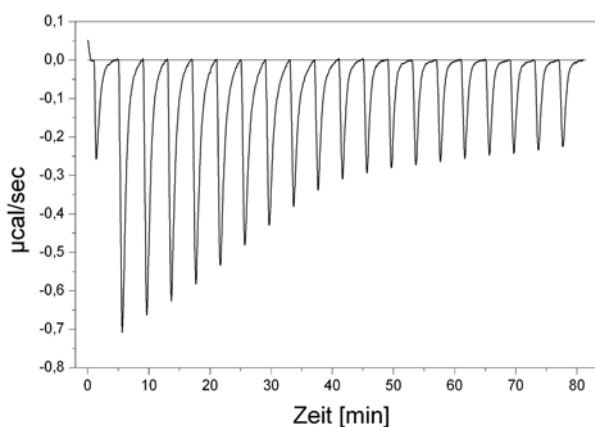


Abbildung 3.32: Rohdaten eines ITC-Experiments. Die Heizleistung in Abhängigkeit der Zeit ist dargestellt, wobei jeder Ausschlag eine Injektion des Liganden repräsentiert.

Durch Integration der *peaks* über die Zeit erhält man die Bindungswärme, die sich in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses der Bindungspartner auftragen lässt. Aus der entstandenen Bindungsisothermen lassen sich alle weiteren Parameter ermitteln.

Vor den ITC-Messungen wurden alle Surf1-Proteine auf eine präparative Superose6-Säule aufgetragen. Dies diente dazu etwaige Protein-Aggregate zu entfernen, die die Messergebnisse eventuell beeinflusst hätten. Hierzu wurden bis zu 15 mg aufgereinigtes Protein auf eine Superose6-Säule mit etwa 200 mL SV aufgetragen, die zuvor in 20 mM NaP_i (pH 8), 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte über Nacht mit 1,5 SV Puffer an einem ÄktaPurifier-Chromatographiesystem. Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden vereinigt und ankonzentriert, wobei Fraktionen, die mit der Aggregatschulter überlappen, nicht übernommen wurden. Im Folgenden wurden die Proteine und eine Häm α -Lösung über Nacht im selben Puffer dialysiert, da die Methode sehr anfällig für Änderungen der Pufferbedingungen ist.

Ergebnisse

Alle ITC-Messungen wurden von Dr. Oliver Anderka (sanofi-aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) durchgeführt und ausgewertet. Alle Titrations wurden bei 25 °C durchgeführt, wobei die Probenkonzentration in der Messzelle 10 μM war, während die Konzentration in der Spritze 100 μM betrug. Es wurde sowohl Häm *a* zu den einzelnen Proteinen titriert, als auch in umgekehrter Richtung Protein zu Häm *a*. Hier wurden keine Unterschiede in Bezug auf Proteinkonzentration oder Richtung der Titration festgestellt. Die hier präsentierten Bindungsdaten wurden aus dem *Fit* der Kalorimetriedaten an ein *single-site binding model* erhalten und stellen Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.) aus zwei bis drei Messungen dar.

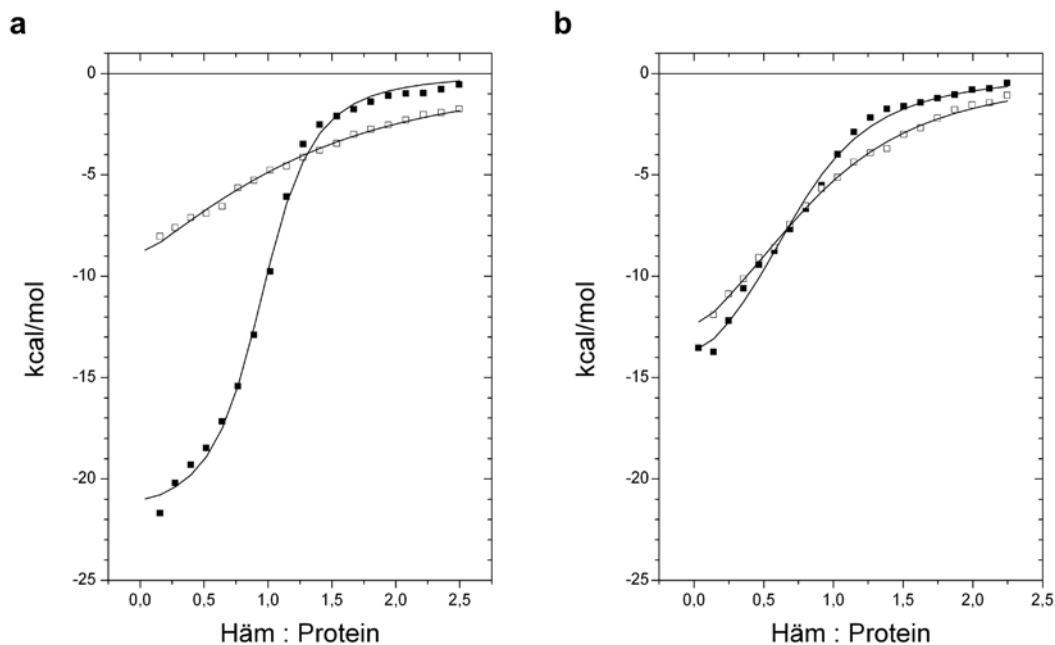


Abbildung 3.33: ITC-Titrationskurven von Surf1 und Häm *a* (a) Isothermen zur Häm *a*-Bindung an apo-Surf1c (■) und Surf1c H193A (□). (b) Isothermen zur Häm *a*-Bindung an apo-Surf1q (■) und Surf1q H202A (□). Es wurde jeweils Häm *a* aus der Spritze zu der Proteinlösung titriert. Die Kurven zeigen den *Fit* der Daten nach einem *single-site-binding model*.

Für die Bindung von Häm *a* an apo-Surf1c wurde eine typische Bindungsisotherme erhalten, während die Kurve für die Surf1c H193A Variante einen deutlich flacheren Verlauf zeigte (Abb. 3.33a). Die Isothermen für die Surf1q Varianten wiesen im Vergleich zu apo-Surf1c einen flacheren Verlauf auf, und der Unterschied zwischen apo-Surf1q und Surf1q H202A war weit weniger stark ausgeprägt als bei Surf1c (Abb. 3.33b). Alle Titrations ergaben Bindungstöchiometrien von etwa 1, was auf die Bindung eines Häm *a* Moleküls pro Surf1-Molekül hinwies (Tabelle 3.5). Für die

Ergebnisse

beiden Wildtyp-Formen von Surf1 konnten sub-mikromolare Affinitäten gemessen werden, wobei Surf1c ($K_d = 303$ nM) eine etwa doppelt so hohe Affinität zu Häm α wie Surf1q aufwies ($K_d = 650$ nM).

In beiden Fällen war Häm α -Bindung exotherm, wobei der ΔH -Wert für Surf1c etwa zweimal so groß wie der Wert für Surf1q (-21.1 vs. -11.6 kcal/mol) war. Dies weist darauf hin, dass die größere Häm α -Affinität von Surf1c auf zusätzliche polare Interaktionen zurückzuführen ist, die durch erhöhte Bindungsenthalpien gekennzeichnet werden [138].

Tabelle 3.5: Thermodynamische Parameter für die Häm α -Bindung an Surf1c und Surf1q

	N^a	K_d [nM]	ΔH [kcal/mol]	$T\Delta S$ [kcal/mol]
Surf1c	$0,9 \pm 0,0$	303 ± 28	$-21,1 \pm 0,1$	$-12,3 \pm 0,1$
Surf1q	$0,9 \pm 0,0$	650 ± 40	$-11,6 \pm 0,2$	$-3,2 \pm 0,3$
Surf1c H193A	$0,8 \pm 0,2$	3253 ± 1049	$-10,5 \pm 0,8$	$-2,9 \pm 1,0$
Surf1q H202A	$0,9 \pm 0,1$	1650 ± 543	$-11,9 \pm 2,0$	$-4,0 \pm 2,2$

^aBindungsstöchiometrie

Der Austausch des konservierten Histidin gegen ein Alanin beeinflusste die Affinität der Hämbindung stark, wobei der negative Effekt für Surf1c stärker ausgeprägt ist als für Surf1q. Die Bindungsaffinität fiel um etwa den Faktor 11, während sie für Surf1q nur um etwa den Faktor 3 zurückging (Tabelle 3.5). Für Surf1c H193A wurde zusätzlich eine stark verringerte Bindungsenthalpie im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (-12.3 kcal/mol vs. -21.1 kcal/mol).

Für Surf1q wurden nur geringe Änderungen der thermodynamischen Bindungsparameter ermittelt. Die ermittelten Daten legen die Vermutung nahe, dass das konservierte Histidin in Surf1c eine größere Rolle für die Häm α -Bindung spielt als in Surf1q. Die verminderte Bindungsenthalpie in der Surf1c H193A Variante weist auf den Verlust von polaren Interaktionen des Hämliganden mit dem Protein hin.

3.4.3 Interaktion von Surf1 und Häm *a* Synthase

Aufgrund der Redoxaktivität des Häm *a* Moleküls ist anzunehmen, dass Häm *a* *in vivo* hauptsächlich in proteingebundener Form vorliegt. Die Bindung von Häm *a* an Surf1 sollte daher über spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung mit einem anderen Häm *a*-Bindeprotein erreicht werden. Wie in Abschnitt 3.3.3 dargestellt, binden sowohl Surf1c als auch Surf1q Häm *a* und können mit ihrem Kofaktor aufgereinigt werden, wenn die heterologe Expression in Anwesenheit der Häm *a* Synthase (HAS) aus *P. denitrificans* stattfindet. Da der heterologe Wirt *E. coli* kein endogenes Häm *a* und entsprechend auch keine Häm *a*-Bindeproteine besitzt, die den Transfer von Häm *a* vermitteln könnten, ist eine direkte Interaktion von Häm *a* Synthase und den Surf1-Proteinen wahrscheinlich. Im Folgenden sind die Ergebnisse eines ersten *in vitro* Häm *a*-Transferexperiments zwischen den beiden Proteinen dargestellt.

Die Experimente mit dem Häm *a*-Biosynthese-Plasmids zeigten, dass sich die Häm *a* Synthase in funktioneller Form heterolog in *E. coli* exprimieren lässt. Des Weiteren wurde sie mit einem His-tag versehen, so dass sie über IMAC aufgereinigt werden konnte (A. Hannappel, unveröffentlichte Daten). Je nach Anzuchtbedingung können dabei drei verschiedene Formen des Enzyms erhalten werden: das „leere“ Enzym, das nur den Kofaktor Häm *b* enthält, eine Form, die neben Häm *b* auch das Substrat Häm *o* gebunden hat und eine Form, in der Häm *b* und das Produkt Häm *a* enthalten sind. Allerdings sind die Hämgruppen in allen drei Formen unterrepräsentiert (A. Hannappel, unveröffentlichte Daten). Für das Häm-Transferexperiment wurde eine Präparation der Häm *a* Synthase verwendet, die neben Häm *b* auch Häm *a* enthielt.

Jeweils 5 µg apo-Surf1c, Surf1c H193A, apo-Surf1q und Surf1q H202A wurden mit 8 µg HAS in einem 10 µL Ansatz gemischt. Das molare Verhältnis der beiden Komponenten betrug dabei ungefähr 1 (18 nmol vs. 19 nmol). Als Kontrollen dienten jeweils Ansätze mit 8 µg HAS allein und je 5 µg der Surf1-Proteine allein. Nach der Inkubation der Proben für 15 min bei 25 °C wurden 10 µL LDS-Probenpuffer hinzugegeben, und die Ansätze wurden auf ein semi-denaturierendes LDS-PAG aufgetragen. Im Anschluss an die Auftrennung wurden die Gele geblottet und einer Hämfarbung unterzogen.

Aufgrund ihres Häm *b*-Kofaktors zeigt die Häm *a* Synthase bei der Häm färbung immer ein Signal. Die Mischung von apo-Surf1c und der HAS zeigte in der Häm färbung des Blots zwei Signale auf der Höhe von Surf1c und der HAS, während eine Mischung der H193A-Variante von Surf1c und der HAS nur ein Signal für die Häm *a* Synthase lieferte (Abb. 3.34a). Auch für Surf1q konnte nur in der Mischung mit dem Wildtyp-Protein ein Signal auf der Höhe von Surf1q beobachtet werden (Abb. 3.34b), während in dem Ansatz mit Surf1q H202A kein Hämtransfer nachgewiesen werden konnte.

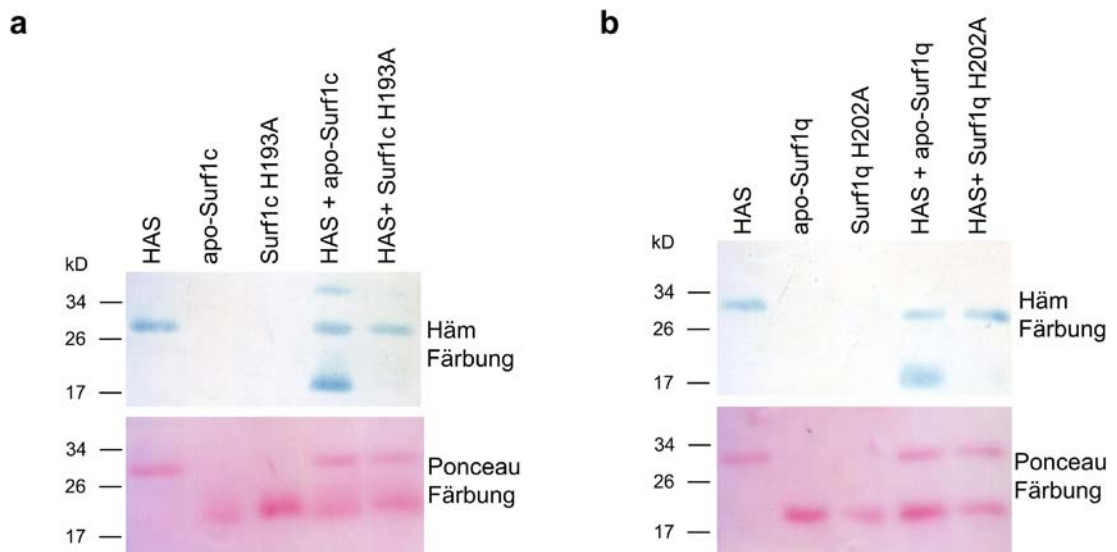


Abbildung 3.34: Häm *a* Transfer von Häm *a* Synthase (HAS) auf Surf1. (a) Häm *a* Transfer von HAS auf Surf1c-Proteinen. (b) Häm *a* Transfer von HAS auf Surf1q-Proteinen. Gezeigt sind Blots der LDS-PAG-Analyse. Es wurden jeweils 8 µg HAS und 5 µg Surf1 gemischt und nach Zugabe von Probenpuffer auf ein LDS-Gel aufgetragen. Als Kontrollen dienten 8 µg HAS und je 5 µg Surf1-Protein. Nach der Häm färbung wurden die Blots einer Proteinanfärbung mit PonceauS-Lösung unterzogen.

Für die beiden Wildtyp-Proteine lies sich in diesem Ansatz ein Hämtransfer von Häm *a* Synthase *in vitro* nachweisen. Allerdings konnte keine quantitative Aussage über die Effizienz getroffen werden. Hierzu müssten größeren Mengen von Surf1 und Häm *a* Synthase eingesetzt werden, die nach einer chromatographische Trennung der Komponenten eine spektrale Untersuchung der Proteine vor und nach dem Transfer ermöglichen würden. Zwar kann der His-tag der HAS aufgrund der ebenfalls eingefügten TEV-Schnittstelle proteolytisch abgespalten werden, allerdings waren die Ausbeuten an sauberem Enzym bisher zu gering für diese Art der quantitativen Untersuchung des Hämtransfers.

3.4.4 Proteinkristallisation

Für die Untersuchung der Funktion und insbesondere der Hämbindung von Surf1 wäre es von besonderem Interesse, die räumliche Struktur des Proteins zu kennen, und bisher wurde die 3D-Struktur eines Surf1-Protein noch nicht gelöst.

Mit Hilfe der Röntgen-Kristallographie lassen sich Protein-Raumstrukturen ermitteln. Die Verfügbarkeit von entsprechenden Proteinkristallen stellt dabei die Hauptschwierigkeit der Methode dar. Durch die Verringerung der Löslichkeit eines Proteins kann es von der gelösten Form in eine kristalline Form übergehen. Meistens kommt es jedoch nur zu der Ausbildung eines amorphen Niederschlags und nur unter günstigen Bedingungen zur Kristallisation.

Die Verringerung der Löslichkeit wird durch eine hohe Konzentration an Fällungsmittel erreicht, so dass Wasser aus der Proteinlösung diffundiert und die Lösung ankonzentriert. Insbesondere die Diffusion durch den Gasraum (*vapor diffusion*) hat sich für die Proteinkristallisation als geeignet erwiesen. Als Fällungsmittel können Salze, organische Lösungsmittel und Polymere wie PEG (Polyethylenglykol) dienen. Salze beeinflussen die Ionenstärke, während organische Lösungsmittel und Polymere die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels herabsetzen. Des Weiteren spielt der pH-Wert eine große Rolle, da die Löslichkeit von Proteinen an isoelektrischen Punkt im Allgemeinen am niedrigsten ist.

Die Surf1-Proteine konnten bei der heterologen Expression in *E. coli* bereits nach einem Chromatographieschritt sauber und in relativ hohen Ausbeuten erhalten werden (Vgl. Abschnitt 3.3), so dass sie in ausreichender Menge für die Proteinkristallisation zur Verfügung standen.

Die Proteine wurden wie in Abschnitt 3.4.2.3 beschrieben über eine präparative Superose6-Säule nachgereinigt, um Aggregate, die die Kristallisation negativ beeinflussen, abzutrennen. Zur Kontrolle der Homogenität der Proteinlösung wurde exemplarisch eine kleine Menge Surf1c nach der präparativen Säule über eine analytische Gelfiltration untersucht (Abb. 3.35). Das Elutionsprofil wies nur noch einen einzigen *peak* auf, und die Aggregatschulter war verschwunden.

Für die Kristallisation wurden sowohl die apo-Proteine als auch die Formen mit Häm bereitgestellt, wobei die Präparation von Surf1q neben Häm *a* noch Häm *o* enthielt, da zu diesem Zeitpunkt die Expression noch nicht optimiert worden war (siehe

Abschnitt 3.3). Die Proteinlösungen lagen in 20 mM NaP_i (pH 8), 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM und einer Konzentration von 10 bis 20 mg/mL vor.

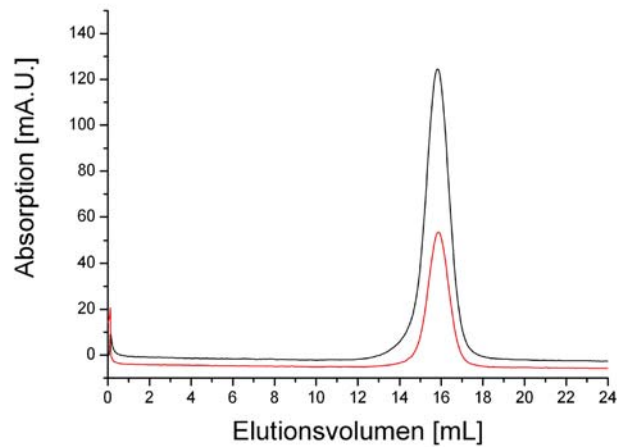


Abbildung 3.35: Elutionsprofil der analytischen Gelfiltration von Surf1c aus FA48/GR52. Eine Probe des Proteins wurde hier nach der präparativen Gelfiltration auf die Homogenität des Eluats hin untersucht.

Alle Versuche zur Proteinkristallisation wurden von Dr. Orla Slattery (AK Prof. Pos, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt am Main) durchgeführt.

Zunächst wurde in breiten Ansatz Kristallisationsbedingungen mit der *sitting drop*-Methode getestet. Hierbei liegt das Fällungsmittel in hohen Konzentrationen in einem Reservoir vor. Die Proteinlösung wird mit der Fällungslösung gemischt und auf eine Plattform pipettiert, so dass sie nur über den gesättigten Gasraum mit dem Reservoir verbunden ist. Leider lieferten die getesteten Bedingungen bisher größtenteils nur Präzipitat und führten nicht zur Ausbildung von Kristallen.

Des Weiteren wurde versucht, mit der Methode der *free interface diffusion* (FID) geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden. Hierbei wird in einer Kapillare die Probe in Flüssigkeitskontakt mit der Fällungslösung gebracht. Die beiden Lösungen diffundieren mit der Zeit ineinander, so dass Konzentrationsgradienten für die Protein- und Fällungslösung entlang der Kapillare entstehen. Kristalle können sich sowohl an der Zwischenphase als auch an den Enden der Kapillare bilden.

Ergebnisse

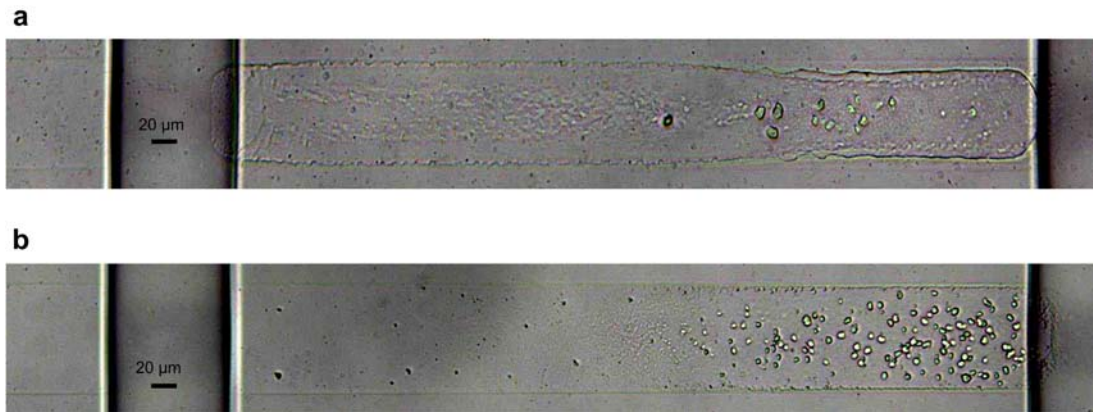


Abbildung 3.36: Bilder der erhaltenen Kristalle mit FID-Methode. (a) Kristalle für apo-Surf1c. Die Proteinlösung lag in 20 mM NaPi (pH 8), 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM und 15,9 mg/mL vor, die Präzipitatlösung war 0,8 M Ammoniumacetat, 0,1 M MES (pH 6,0), 20 % (w/v) PEG 4600. (b) Kristalle für Surf1q mit Häm. Die Proteinlösung lag in 20 mM NaPi (pH 8), 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM und 14,3 mg/mL vor, die Präzipitatlösung war 0,4 M KAc, 0,1 M HEPES (pH 7,5), 30 % (w/v) PEG 1000

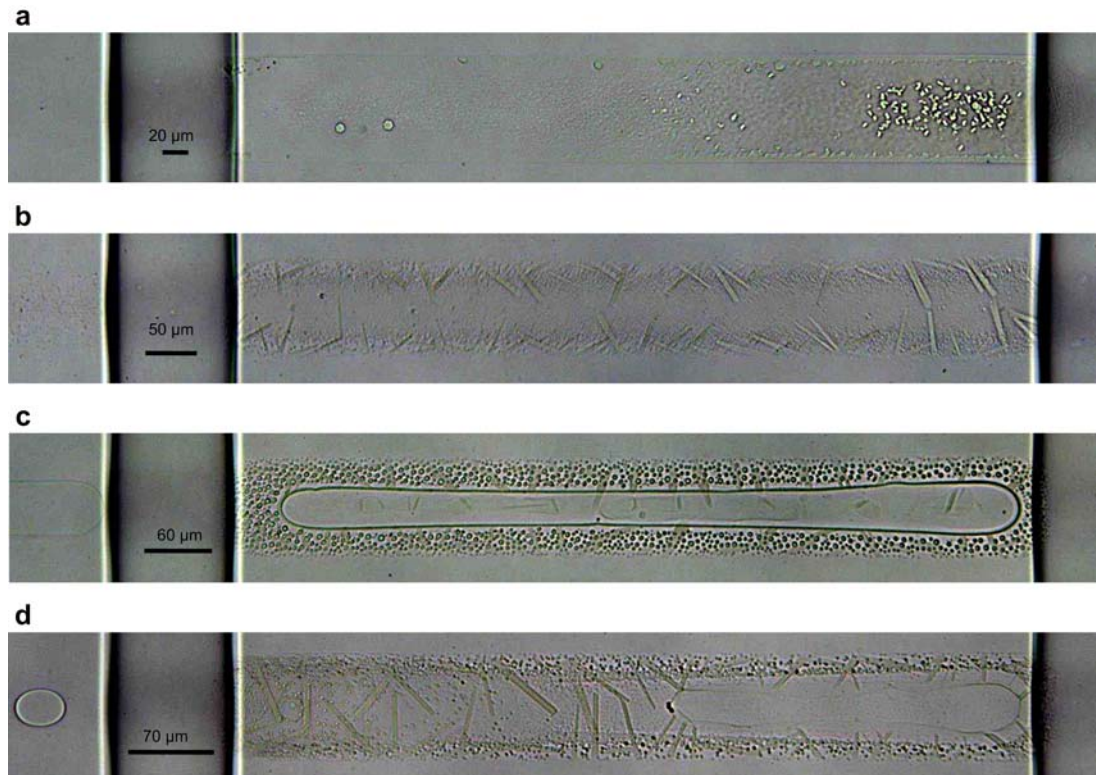


Abbildung 3.37: Bilder der erhaltenen Kristalle mit FID-Methode für Surf1c mit Häm a. Das Protein lag in in 20 mM NaPi (pH 8), 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) DDM und 16,4 mg/mL vor (a) Präzipitatlösung: 0,6 M MgCl₂, 20 % (w/v) PEG MME 1900. (b) Präzipitatlösung: 0,4 M Na-Malonat, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5). (c) Präzipitatlösung: 0,2 M Na-Malonat, 0,1 M Na-Citrat (pH 5,6), 10 % (w/v) PEG MME 1900. (d) Präzipitatlösung: 0,5 M Na Malonat, 10 % (w/v) PEG 8000.

In ersten Versuchen mit dieser Methode konnten Mikrokristalle für apo-Surf1c und Surf1q mit Häm erreicht werden (Abb. 3.36). Die Optimierung zur Verbesserung der Kristallisationsbedingungen, die zu größeren Kristallen führen soll, laufen

gegenwärtig noch. Bessere Ergebnisse konnten für Surf1c mit gebundenem Häm *a* erreicht werden. Neben Mikrokristallen (Abb. 3.37a) konnten für mehreren Bedingungen größere nadelförmige Kristalle gezüchtet werden (Abb. 3.37b-d). Hierfür schien vor allem die Anwesenheit von Natriummalonat als Präzipitationsmittel nötig. Auch hier laufen gegenwärtig die Optimierungen.

3.5 Homologe Aufreinigung von Surf1 aus *P. denitrificans*

Der folgende Teilbereich stellt die Ergebnisse zur homologen Aufreinigung von Surf1 aus *Paracoccus* dar. Für die Aufreinigung der Wildtyp-Proteine wurden die *Paracoccus*-Stämme FA3.61 und FA3.62 verwendet (vgl. 3.2.1.2). Die Surf1-Histidinmutanten wurden aus den Stämmen FA3.61-H193A und FA3.62-H202A isoliert (Vgl. 3.2.4). Des Weiteren wurden Wildtyp-Surf1c und Wildtyp-Surf1q aus einem Oxidase-Deletionsstamm isoliert. Hierzu wurden die Komplementationsplasmide pFA61 und pFA62 über Konjugation in den Stamm TSP24 eingebracht. In diesem Stamm wurden die Gene für die Untereinheit I der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase *ctaDI* und *ctaDII* sowie das *qox*-Operon durch Antibiotika-Resistenzgene ersetzt (Schröter, Universität Frankfurt). Die erhaltenen Expressionsstämme wurden für Surf1c FA61TSP24 und für Surf1q FA62TSP24 genannt.

Alle Stämme wurden in 50 L Succinat-Kulturen angezogen und die Membranen wurden isoliert. Im Gegensatz zu heterolog exprimiertem Surf1 wurden die Membranproteine mit DDM im Verhältnis 1:2 (w/w) solubilisiert. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des N-terminalen Dekahis-tag der Proteine über eine Ni²⁺-NTA-Säule, die sich von dem in Abschnitt 3.3.2.2. beschriebenen Protokoll nur dadurch unterschied, dass nach dem Beladen der Säule durch das Wegfallen des Detergenztauschs der Waschschriff mit 20 mM Imidazol verkürzt werden konnte, bis eine stabile UV-Basislinie erreicht wurde. Auch hier folgte nach zwei weiteren Waschschriffen mit 50 mM und 80 mM Imidazol die Elution der Proteine mit 200 mM Imidazol.

Die Ausbeuten waren im Vergleich zum heterologen Überexpressionssystem sehr viel geringer, und es konnten durchschnittlich 0,5 bis 0,75 mg Protein pro Gramm Membranprotein nach der IMAC erhalten werden.

3.5.1 Hämgehalt

Die Proteinpräparationen aus FA3.61 und FA3.62 wiesen nach der IMAC eine deutliche grün-braune Farbe auf, und die spektrale Analyse der Eluate zeigte charakteristische Häm α -Absorptionen (Abb. 3.38). Das Absorptionsmaximum im α -Bereich des Spektrums lag für die Surf1c-Präparation aus FA3.61 bei 597 nm, während für die Surf1q-Präparation aus FA3.62 ein Maximum von 601 nm ermittelt wurde (Abb. 3.38b). Es konnte kein weiterer Häm-Typ nachgewiesen werden.

Die Surf1-Präparationen aus den Oxidase-Deletionsstämmen FA61TSP24 und FA62TSP24 zeigten ebenfalls eine grün-braune Farbe. Die Analyse der Spektren zeigte auch hier, dass sie auf die Anwesenheit von Häm α in der Präparation zurückzuführen ist. Auch hier wurde kein weiterer Häm-Typ nachgewiesen. Die Präparationen der Histidinmutanten waren farblos.

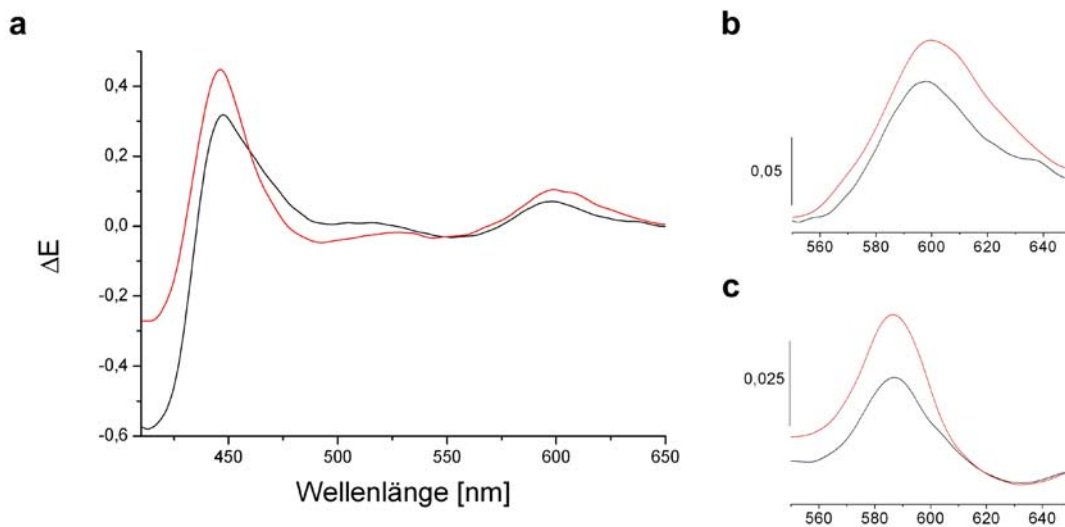


Abbildung 3.38: Redoxspektren von Surf1-Präparationen aus FA3.61 (Surf1c, schwarz) und FA3.62 (Surf1q, rot). (a) Native-Redoxspektren, (b) Vergrößerung des α -Bereichs in (a). (c) Pyridin-Hämochromspektren. Die Proteinkonzentration war 20 μ M in allen Messungen.

Aus Pyridin-Hämochromspektren wurden das Häm α :Protein-Verhältnis der einzelnen Präparationen bestimmt (Tabelle 3.6). Die Präparation aus FA3.61 wies ein molares Verhältnis von 0,47 auf, während für die Präparation aus FA3.62 ein sehr viel höheres Verhältnis von 0,77 berechnet werden konnte. Für die Histidinmutanten konnten nur sehr kleine molare Verhältnisse bestimmt werden, die im Vergleich zu den Wildtyp-Formen FA3.61 und FA3.62. um 12- bzw. 25-mal geringer waren.

Ergebnisse

Überraschenderweise lag das Häm zu Protein Verhältnis in den Präparationen aus den Oxidase-Deletionsstämmen nur bei 0,14 für Surf1c bzw. 0,10 für Surf1q.

Tabelle 3.6: Häm:Protein-Verhältnis in Surf1-Präparationen aus *P. denitrificans*

Stamm	Charakteristika	Häm / Protein ^a
FA3.61	WT- <i>surf1c</i> in <i>surf1</i> -Doppeldeletionsstamm	0,47
FA3.62	WT-Surf1c in <i>surf1</i> -Doppeldeletionsstamm	0,77
FA61TSP24	WT- <i>surf1c</i> in Oxidase-Deletionsstamm	0,14
FA62TSP24	WT- <i>surf1q</i> in Oxidase-Deletionsstamm	0,10
FA3.61-H193A	<i>surf1c</i> H193A in <i>surf1</i> -Doppeldeletionsstamm	0,04
FA3.62-H202A	<i>surf1q</i> H202A in <i>surf1</i> -Doppeldeletionsstamm	0,03

^aDie molaren Verhältnisse wurden aus Pyridin-Hämochromspektren berechnet.

3.5.2 Koelution von COX Untereinheit I

Eine genauere Untersuchung über PAGE der Eluate nach der IMAC zeigte, dass die Präparationen bei weitem nicht so sauber waren wie bei der Aufreinigung nach heterologer Expression.

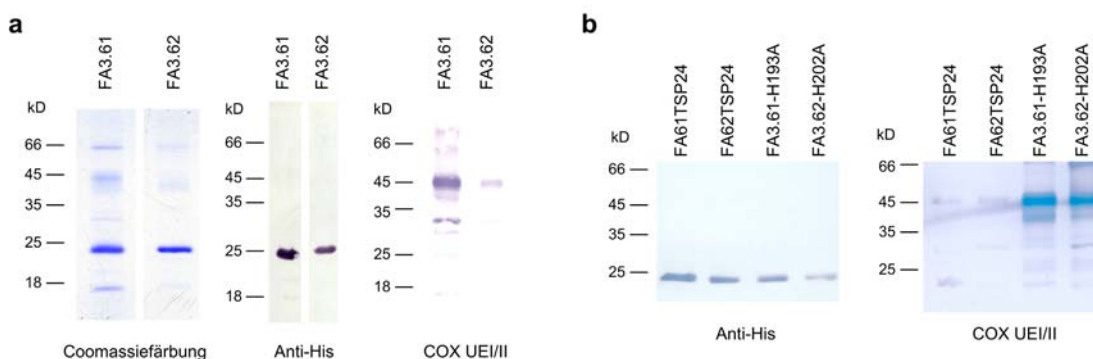


Abbildung 3.39: (a) PAGE-Analyse von Surf1c aus FA3.61 und Surf1q aus FA3.62. (b) Anti-His und COX UEI/II-Westernblots für Präparationen aus FA61TSP24, FA62TSP24, FA3.61-H193A und FA3.62-H202A. Es wurden jeweils 5 µg Protein auf alle Gele aufgetragen. Stammbeschreibungen siehe Tabelle 3.6 und Abschnitt 2.1.8.2.

Obwohl der Hauptteil der Proteinfraktion Surf1 zuzuordnen war, zeigte insbesondere die Präparation von Surf1c aus FA3.61 mehrere klar definierte Banden. Eine dieser Banden konnte in einer Westernblot-Analyse Untereinheit I der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase zugeordnet werden (Abb. 3.39a). Zudem schien auch Untereinheit II der *aa*₃-COX in kleineren Mengen vorhanden zu sein. Obwohl die Präparation von

Ergebnisse

Surflq aus FA3.62 schwächere Zusatzbanden aufwies, konnte auch in dieser Präparation, wenn auch in geringerem Umfang, Untereinheit I der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase nachgewiesen werden (Abb. 3.39a). Eine Analyse der Präparationen der Surfl-Histidinmutanten zeigte, dass auch hier Untereinheit I der *aa*₃-COX eluiert war (Abb. 3.39b).

Um auszuschließen, dass UEI und UEII der COX mit dem verwendeten Protokoll ebenfalls aufgereinigt werden, wurde der *surfl*-Doppeldeletionsstamm FA3 in großem Maßstab angezogen und Membranen präpariert. Das Solubilisat wurde auf die Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen und mit dem oben beschriebenen Protokoll eluiert. Das Elutionsprofil zeigte, dass bereits ab einer Imidazolkonzentration von 80 mM nahezu kein Protein mehr eluiert (Abb. 3.40a). Der Anti-COX UEI/II Westernblot der einzelnen Fraktionen zeigte, dass die *aa*₃-COX zwar an das Säulenmaterial bindet, jedoch schon nach dem Waschschrift mit 50 mM Imidazol fast vollständig von der Säule eluiert war und in der Fraktion mit 200 mM Imidazol lies sich keine UEI nachweisen (Abb. 3.40b).

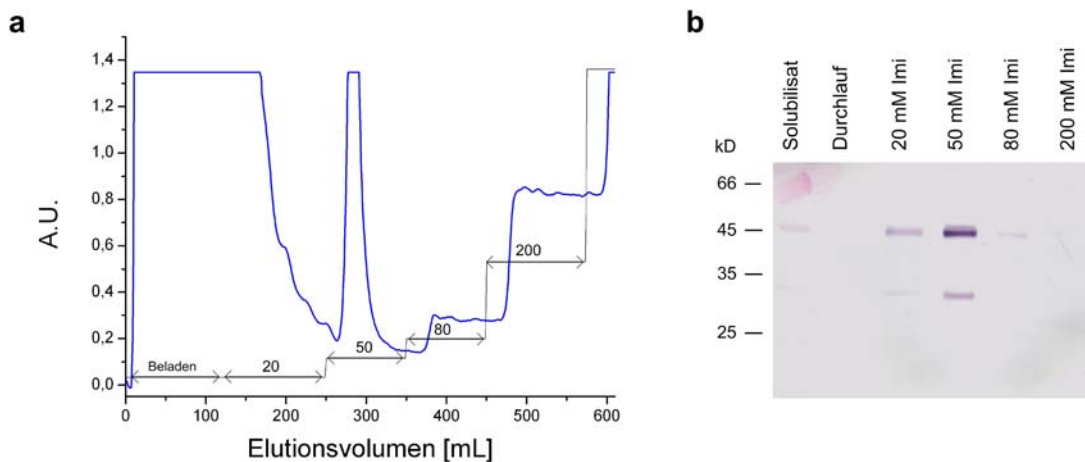


Abbildung 3.40: (a) Elutionsprofil der IMAC von solubilisierten Membranen aus FA3. (b) Anti-COX UEI/II Westernblot der Fraktionen. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils 1:1 mit Probenpuffer verdünnt, und es wurden jeweils 25 μ L auf das Gel aufgetragen.

Untereinheit I der *ba*₃-Ubichinioxidase läuft in etwa auf der gleichen Höhe wie Untereinheit I der *aa*₃-COX um 45 kD [43]. Obwohl eine Doppelbande in diesem Bereich zu sehen war (Abb. 3.39a), konnte bisher leider keine Aussage darüber getroffen werden, ob oder in welchem Umfang diese Untereinheit ebenfalls in den verschiedenen Präparationen vorhanden war, da kein Antikörper zur Verfügung stand.

Die Anwesenheit von COX Untereinheit I in den Präparationen warf die Frage auf, ob sie auch ihren Kofaktor Häm *a* enthält. Eine Hämfärbung eines semi-denaturierenden PAG konnte jedoch nur die Assoziation von Häm *a* an Surf1 nachweisen (Abb. 3.41). Die schwache Anfärbung in der Hämfärbung um 40 kD in den Präparationen von FA3.61 und FA3.62 Banden geht höchstwahrscheinlich auf Surf1-Dimere zurück, da sie ebenfalls in den Positivkontrollen der Surf1-Präparationen aus *E. coli* (FA48/GR52, FA49/GR52) zu sehen war.

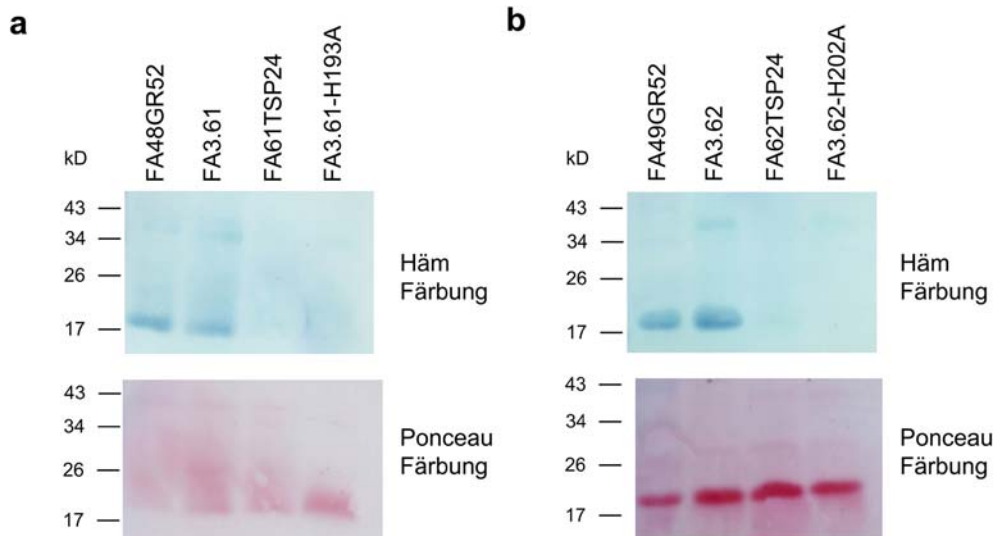


Abbildung 3.41: LDS-PAG von Surf1c (a) und Surf1q (b) aus verschiedenen Expressionstämmen. Die Gele wurde nach dem Lauf auf eine PVDF-Membran geblottet und einer Hämfärbung unterzogen (oberer Streifen). Im Anschluss wurde der Blot wieder entfärbt und mit einer Ponceau-S-Lösungen wurden alle Proteine sichtbar gemacht (unterer Streifen). Auf das Gel wurden jeweils ca. 5 µg der ankonzentrierten 200 mM Imidazol-Eluat aufgetragen.

Diese Methode ist allerdings nicht sensitiv genug, um relativ kleine Mengen an Häm *a* zu detektieren, da in den Bahnen für Surf1 aus dem Oxidase-Deletionsstämmen kein Signal für Häm *a* zu erkennen war (Abb. 3.41).

3.5.3 Nachreinigung von Surf1 mittels Anionentauscher

Die beiden Surf1-Proteine aus *Paracoccus* sind stark basische Proteine, deren isoelektrischer Punkt (pI) deutlich über 7 liegt. Dieser Effekt wird durch den Dekahis-tag noch verstärkt, so dass für His₁₀-Surf1c ein pI von 9,26 und für His₁₀-Surf1q sogar ein pI von 10,71 berechnet wird.

Ergebnisse

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie binden die Proteine aufgrund ihrer Oberflächenladungen. An der Säulenmatrix befinden sich geladene funktionelle Gruppen, die reversibel Gegenionen binden. Je nach Art des Gegenions unterscheidet man zwischen Anionenaustausch- und Kationenaustausch-Chromatographie. Die Elution der Proteine erfolgt durch Waschen mit hochmolaren Salzlösungen, wobei die Salzionen die Proteine von der Säule verdrängen.

Mit Hilfe des starken Anionentauschers MonoQ wurde versucht, die Surf1-Proteine weiter aufzureinigen. Sie sollten in diesem Versuch nicht an das Säulenmaterial binden, während andere Proteine später eluieren. Außerdem wurde versucht nachzuweisen, ob eine spezifische Bindung zwischen Surf1 und COX-UEI vorliegt. UEI der *aa*₃-COX hat einen theoretischen pI von 6,58 und sollte daher im Gegensatz zu Surf1 an das Säulenmaterial binden.

Die Säule (MonoQ HR 5/5, 1 mL SV) wurde an einem ÄktaPurifier Chromatographiesystem mit Niedersalzpuffer (pH 8) äquilibriert, der eine Salzkonzentration 40 mM NaCl enthielt. Es wurden jeweils etwa 500 µg der Surf1-Präparationen aus FA3.61 und FA3.62 geladen, und die Elution erfolgte durch Anlegen eines linearen Salzgradienten von 40 mM – 500 mM NaCl. Von Beginn an wurden die UV- und Soret-Absorptionen bei 280 nm und 410 nm aufgezeichnet und Eluate fraktioniert gesammelt und anschließend über PAGE untersucht.

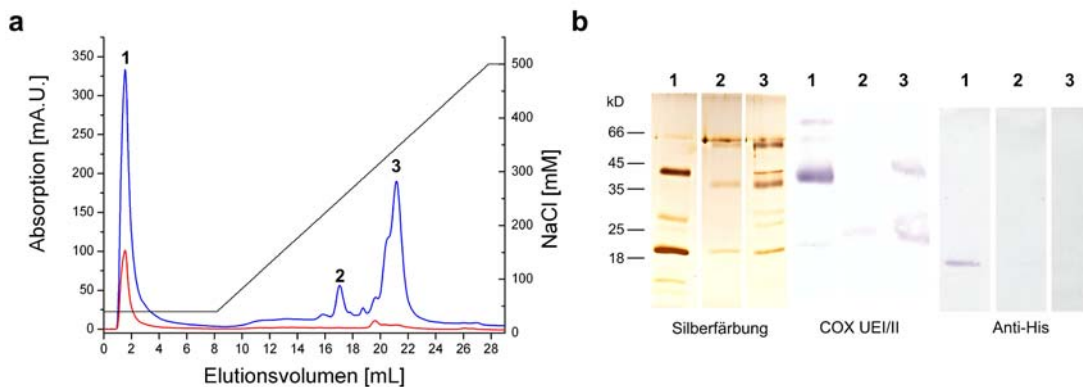


Abbildung 3.42: (a) MonoQ-Elutionsprofil von Surf1c aus FA3.61. Neben der UV-Absorption (blau) ist auch die Soret-Absorption des Häm bei 410 nm (rot) dargestellt. (b) PAGE-Analyse der Fraktionen 1, 2 und 3 aus a. Die Fraktionen wurden jeweils 1:1 mit Probenpuffer gemischt und es wurden 25 µL auf die Gele aufgetragen.

Das Elutionsprofil von Surf1c aus FA3.61 weist den größten UV-*peak* gleich zu Beginn der Aufzeichnung auf, was dem Durchlauf der Säule entspricht, und auch für

die Soret-Absorption liegt hier das Maximum (Abb. 3.42a). Die PAGE-Analyse zeigte, dass sich in dieser Fraktion neben Surf1 immer noch andere Proteine befanden, darunter auch COX-UEI. Kleinere Mengen an Untereinheit I eluieren zusammen mit Untereinheit II neben anderen Proteinen erst bei höheren Salzkonzentrationen (Abb. 3.42b), und es wurde kein Hämsignal in diesem Bereich detektiert.

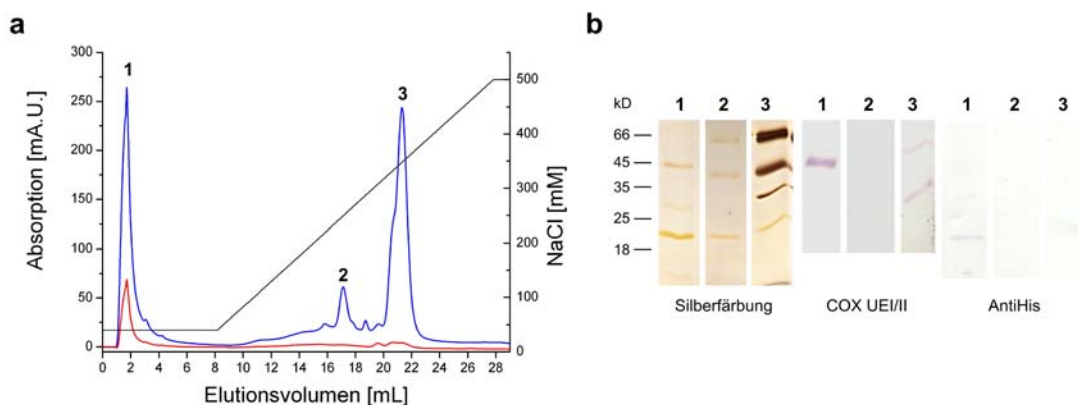


Abbildung 3.43: (a) MonoQ-Elutionsprofil von Surf1q aus FA3.62. Neben der UV-Absorption (blau) ist auch die Soret-Absorption des Häms bei 410 nm (rot) dargestellt. (b) PAGE-Analyse der Fraktionen 1, 2 und 3 aus a. Die Fraktionen wurden jeweils 1:1 mit Probenpuffer gemischt und es wurden 25 μ L auf die Gele aufgetragen.

Für Surf1q aus FA3.62 ergab sich ein nahezu identisches Elutionsprofil (Abb. 3.43a). Hier wurde Surf1 ebenfalls im Durchlauf detektiert, allerdings waren auch andere Proteine vorhanden und COX-UEI wurde nachgewiesen (Abb. 3.43b). Bei höheren Salzkonzentrationen eluieren unter anderen Proteinen auch Untereinheit I und II der COX.

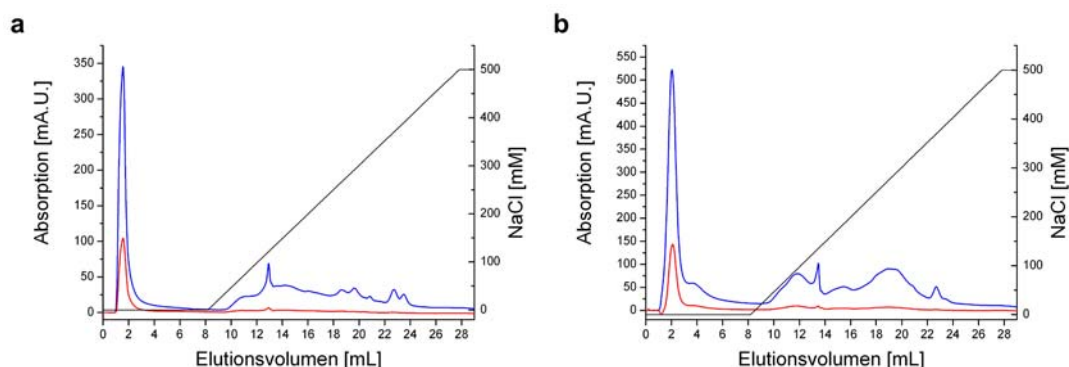


Abbildung 3.44: MonoQ-Elutionsprofile von (a) Surf1c aus FA61TSP24 und (b) Surf1q aus FA62TSP24. Neben der UV-Absorption (blau) ist auch die Soret-Absorption des Häms bei 410 nm (rot) dargestellt.

Da sich Untereinheit I der *aa₃*-COX nicht von Surf1 abtrennen lies, wurden als Kontrolle ebenfalls Präparationen von Surf1c aus FA61TSP24 und Surf1q aus FA62TSP24 über den Anionentauscher aufgetrennt. Die Elutionsprofile zeigten einen ähnlichen Verlauf wie für die Präparationen aus FA3.61 und FA3.62 (Abb. 3.44), obwohl hier ein Salzgradient von 0 – 500 mM NaCl angelegt wurde. Auch hier lief Surf1 durch die Säule, und das Hämsignal war ebenfalls im Durchlauf zu finden.

3.5.4 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie sollte untersucht werden, ob die Surf1-Proteine mit Untereinheit I der COX oder anderen Proteinen assoziiert sind. Eine Bindung von einem oder mehreren Surf1-Proteinen an UEI würde aufgrund der Größenänderung das Laufverhalten durch die Gelmatrix beeinflussen und das Elutionsvolumen zu kleineren Volumina hin verschieben.

Für die Analyse der IMAC-Präparationen wurden 100 bis 250 µg aufgereinigtes Protein auf eine Superose6 10/300-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben eluiert.

Die Elutionsprofilen glichen im Wesentlichen denen für die heterolog exprimierten Surf1-Proteine (vgl. Abschnitt 3.4.1.), wobei sich für die Histidinmutanten und die Präparationen aus den Oxidase-Deletionsstämmen ein zweiter kleinerer *peak* bei kleineren Elutionvolumina ausbildet (Abb. 3.45). Das Häm-Absorptionssignal war allerdings mit dem späteren Elutionspeak assoziiert, und die PAGE-Analyse zeigte, dass sich neben Surf1 jeweils noch andere Proteine in dieser Elutionsfraktion befanden.

Mit Hilfe der Eichgeraden für die Superose6-Säule wurden die Molekulargewichte für die Elutionsmaxima berechnet (Tabelle 3.7).

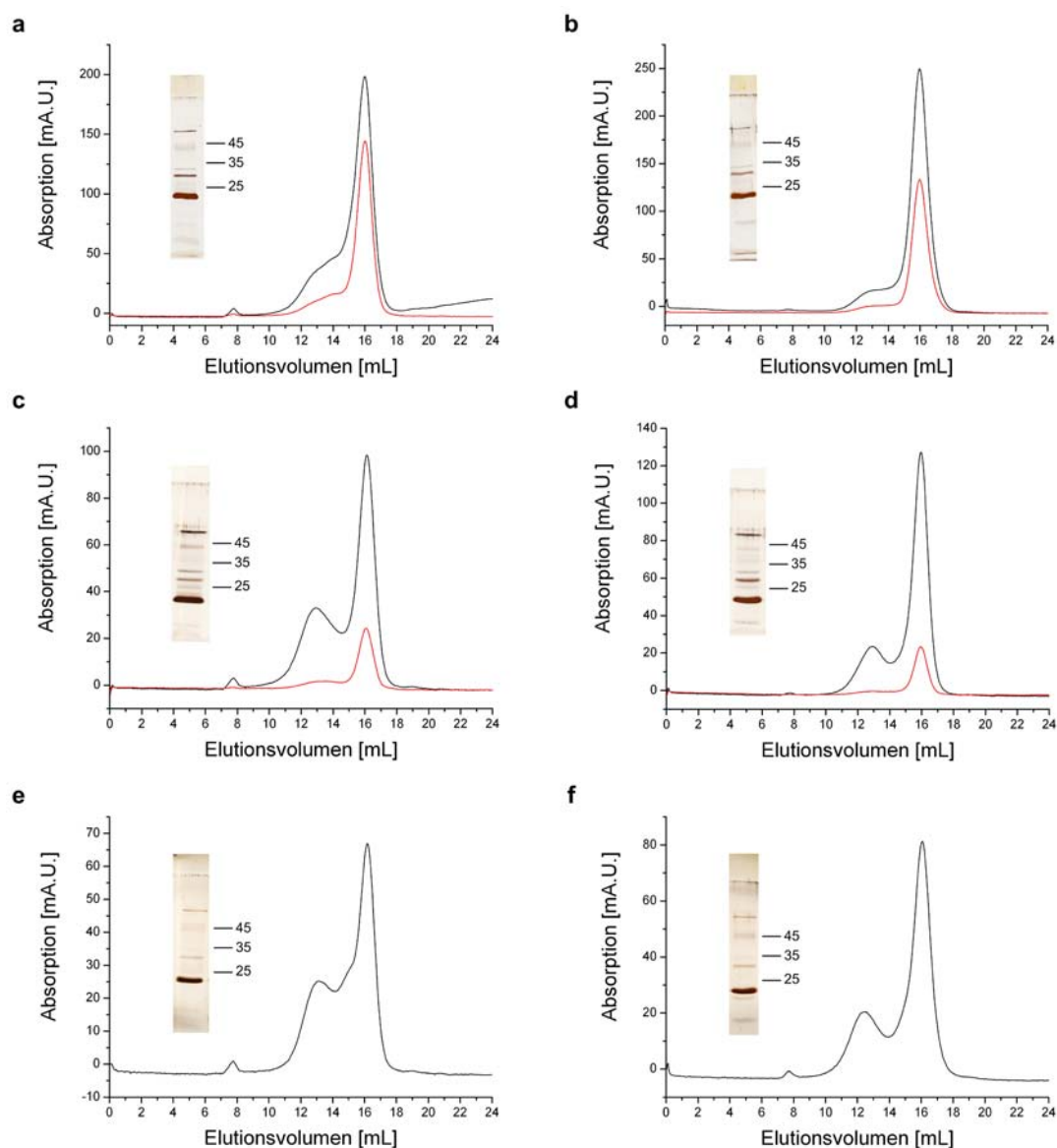


Abbildung 3.45: Elutionsprofile der analytischen Superose6 Surf1-Präparationen aus verschiedenen *Paracoccus*-Stämmen. (a) Surf1c aus FA3.61. (b) Surf1q aus FA3.62. (c) Surf1c aus FA61TSP24. (d) Surf1q aus FA62TSP24. (e) Surf1c H193A aus FA3.61-H193A. (f) Surf1q H202A aus FA3.62-H202A. Gezeigt sind neben der UV-Absorption (schwarz), auch die Absorption bei 410 nm (rot). Die Fraktionen wurden 1:1 mit Probenpuffer verdünnt, wovon 25 μ L auf ein Gel geladen wurden, und die Silberfärbung der Fraktion mit dem Hauptelutionspeak ist jeweils gezeigt. Stammbeschreibungen siehe Tabelle 3.6 und Abschnitt 2.1.8.2.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die heterolog exprimierten Surf1-Proteine wurden hier kleinere Molekulargewichte zwischen 85 kD und 95 kD bestimmt. Dies widerspricht einer Bindung von Surf1 an andere Membranproteine, da hierfür eine Verschiebung hin zu größeren Molekulargewichten erwartet wurde. Surf1 scheint also nicht in einem Komplex mit anderen Proteinen vorzuliegen. Allerdings wurde bereits in Abschnitt 3.4.1 auf die Schwierigkeiten bei der Auswertung von

Ergebnisse

Gelfiltrationen in Gegenwart von Detergenz hingewiesen, so dass die hier präsentierten Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind.

Tabelle 3.7: Molekulargewichtsabschätzung von Surf1 mittels analytischer Gelfiltration

	Elutionsvolumen ^a [mL]	Molekulargewicht ^b [kD]
FA3.61	16,01	91,4
FA3.62	15,97	94,7
FA61TSP24	16,09	85,1
FA62TSP24	15,93	98,1
FA3.61-H193A	15,97	94,7
FA3.62-H202A	16,00	92,2

^aDie Elutionsvolumina beziehen sich auf den Hauptpeak der UV-Absorption. ^bAlle hier angegebenen Molekulargewichte wurden mit Hilfe der Eichgerade für die Superose6-Säule bestimmt (Abb. 3.27). Es handelt sich hierbei um das Gesamtgewicht der Proteine mit gebundenem Detergenz.

3.5.5 Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Als weitere Methode zur Untersuchung der möglichen Komplexbildung von Surf1 mit anderen Proteinen stand die Blau-Nativ (BN)-Gelelektrophorese zur Verfügung.

Bei diesem Gelsystem lagert sich der negativgeladene Farbstoff Coomassie-Blau an Proteine, ohne diese zu denaturieren. So können diese gemäß ihrer Größe in nativem Zustand in einem Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Auch Komplexe aus mehreren Untereinheiten oder Proteinen bleiben so erhalten. In der zweiten Dimension, die denaturierende Bedingungen aufweist, werden diese Komplexe dann in ihre Komponenten aufgetrennt. Entlang der Vertikalen lassen sich so zusammengehörige Proteine identifizieren.

Für die Analyse der Surf1-Präparationen wurden für die erste Dimension 3,5 – 18 %ige BN-Gele für die erste Dimension und 12 %ige LDS-Gele für die zweite Dimension verwendet. Es wurden jeweils 5 µg Protein auf die BN-Gele aufgetragen und nach dem Lauf der zweiten Dimension wurden die Gele silbergefärbt. Zum Vergleich wurden jeweils 500 ng Protein in einem BN-Gel und einem LDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe von Silberionen angefärbt.

Ergebnisse

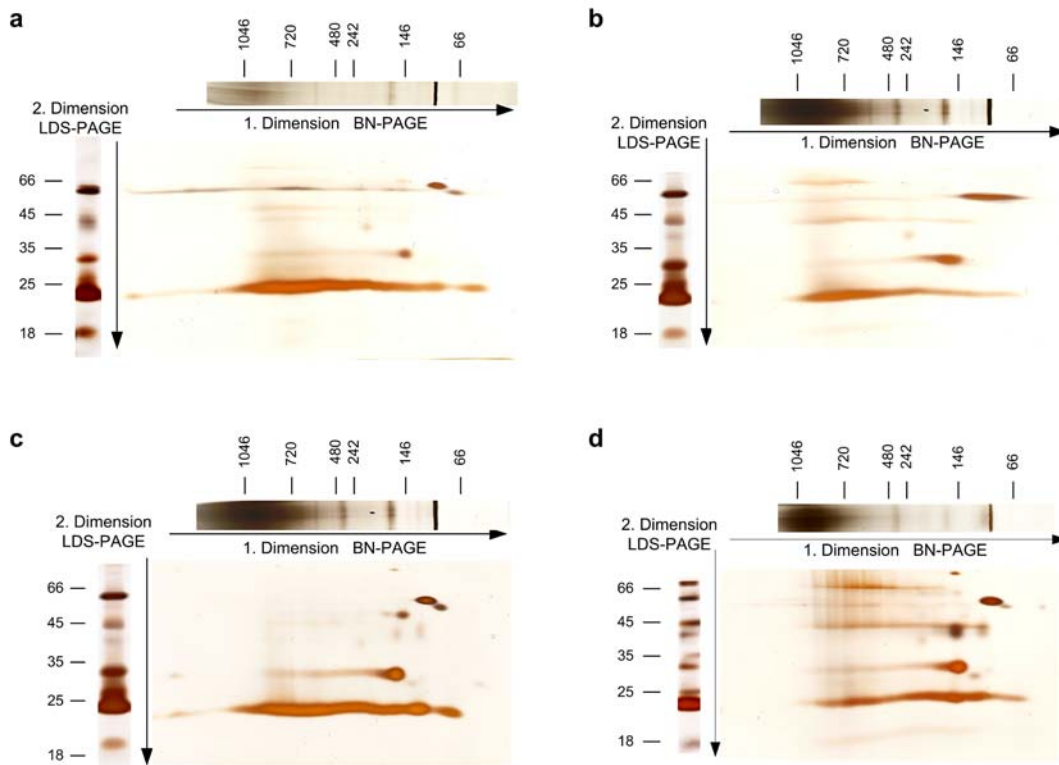


Abbildung 3.46: 2D-Elektrophorese der IMAC-Präparationen von (a) Surflc aus FA3.61; (b) Surflq aus FA3.62; (c) Surflc aus FA61TSP24; (d) Surflq aus FA62TSP24. Jeweils 5 µg Protein wurden auf ein 3,5 – 18 %iges BN-Gel aufgetragen, das nach dem Lauf in Streifen entlang der Laufrichtung geschnitten wurde. Die Streifen wurden für die zweite Dimension in einem 12 %igen LDS-Gel über Nacht aufgetrennt. Zum Vergleich wurden je 500 ng Protein in einem 3,5 – 18 %igen BN-Gel und einem 12 %igen LDS-Gel aufgetrennt und silbergefärbt.

Die Ergebnisse der 2D-Elektrophorese waren leider nicht eindeutig. Beide Surfl-Proteine „schmier“ in der Nativelektrophorese über einen weiten Bereich und konnten nicht in klare Banden aufgetrennt werden (Abb. 3.46). Möglicherweise ist hierfür der stark basische pI der beiden Proteine verantwortlich, so dass sich der Coomassiefarbstoff zwar anlagern kann, aber größtenteils nur zur Neutralisation der Proteine führt und keine für die Auftrennung erforderliche negative Nettoladung erreicht werden kann. Auch die Erhöhung der Coomassiekonzentration in Proben- und Laufpuffer konnte die Ergebnisse nicht verbessern.

Nichtsdestotrotz konnten in der in der ersten Dimension einzelne Banden identifiziert werden, die sich in der zweiten Dimension in einzelne Punkte auftrennen ließen. So ließen sich zwei Subkomplexe um 100 kD und um 180 kD ermitteln, die aus verschiedenen Proteinkomponenten bestehen (Abb. 3.46). Für alle untersuchten Surfl-Präparationen sahen diese Komplexe gleich aus. Der kleinere Komplex um 100 kD schien im Wesentlichen aus einer Proteinkomponente zu bestehen, die im denaturierenden System um 66 kD läuft. Der größere Komplex konnte in

Komponenten um 45 kD und 35 kD aufgetrennt werden. Ob und in wie weit Surf1 in diesen Komplexen vorhanden ist, lässt sich nur mit Vorsicht beurteilen, da die beiden Surf1-Proteine nahezu über die gesamte Länge des BN-Gels verteilt waren. Interessanterweise schienen die Proteine aber in Präparationen aus den Oxidase-Deletionsstämmen weiter in das Gel zu laufen, während die Surf1-Verteilung in Präparationen aus FA3.61 und FA3.62 eher zu größeren Molekulargewichten hin verschoben war.

Abschließend konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um eine spezifische Interaktion von Surf1 mit anderen Proteinen handelt oder um ein Artefakt der Aufreinigung. Hierzu wäre zu allererst eine genaue Identifizierung der zusätzlichen Banden in der Präparation nötig.

4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Untersuchung der *Paracoccus* Homologe des Cytochrom *c* Oxidase Assemblierungsfaktors Surf1. Die Bedeutung von Surf1 in der COX-Biogenese wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass seine Abwesenheit zu schwerem Oxidase-Mangel führt und das neurodegenerative Leigh-Syndrom auslöst [89, 90]. Die Aufklärung der genauen Rolle von Surf1 könnte daher die Entwicklung von Behandlungsmethoden für das Leigh-Syndrom beschleunigen.

Die mitochondriale Cytochrom *c* Oxidase ist der terminale Komplex der Atmungskette und besteht aus bis zu 13 Untereinheiten. Der korrekte Zusammenbau dieses Redoxenzym ist wesentlich für seine Funktion, und Defekte in der Biogenese führen oft zu schweren respiratorischen Mangelkrankungen [46, 47].

Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt arbeiten daran, den Biogeneseweg der Oxidase aufzuklären, und bisher konnte eine große Zahl von Hilfsproteinen identifiziert werden [49, 139]. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird bevorzugt als Modellorganismus für die Untersuchung der COX-Biogenese herangezogen. Allerdings sind viele der mehr als 30 bisher beschriebenen Proteinfaktoren, die an der COX-Assemblierung in Hefe beteiligt sind, in Bakterien aber auch in höheren Eukaryoten nicht konserviert [49, 74]. Die Biogenese der COX scheint in diesem fakultativ anaeroben Organismus also weitaus stärker reguliert zu sein, möglicherweise um eine schnelle Anpassung an die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen und Sauerstoff zu erlauben. Tatsächlich regulieren nahezu alle nicht-konservierten Assemblierungsfaktoren die Translation der mitochondrial-kodierten Untereinheiten in Hefe oder sind an frühen Assemblierungsschritten wie der Membraninsertion beteiligt [49, 74].

Die *aa₃*-Cytochrome *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* besteht aus nur vier Untereinheiten, wobei die Untereinheiten I, II and III den mitochondrial-kodierten der Eukaryoten entsprechen [31, 140]. Die Assemblierung der Oxidase in Bakterien sollte dementsprechend weniger kompliziert sein. Allerdings legt die nahe Verwandtschaft zwischen *Paracoccus denitrificans* und den Mitochondrien im Rahmen der Endosymbiontentheorie nahe, dass essentielle Schritte der Biogenese, insbesondere der *Core*-Untereinheiten, im Laufe der Evolution konserviert blieben.

So wurden für *Paracoccus denitrificans* nur fünf Arten von Assemblierungsfaktoren durch bioinformatische Analyse des Genoms identifiziert, die in direktem Zusammenhang mit der COX Biogenese stehen [74]: für die Häm *a* Biosynthese die Farnesyltransferase CtaB und die Häm *a* Synthase (CtaA), das COX11-Homolog CtaG, das möglicherweise beim Cu_B-Einbau eine Rolle spielt [141, 142], zwei Sco1-Homologe, wovon eines oder beide wahrscheinlich an der Bildung des Cu_A-Zentrums in Untereinheit II beteiligt sind [141, 142], und die zwei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Surf1-Homologe.

Das *cta*-Operon von *P. denitrificans* enthält neben den Genen für Untereinheit II und III der aa₃-COX die Gene *ctaB*, *ctaG* und einen offenen Leserahmen, der als Gen für Surf1c identifiziert wurde (siehe Ergebnisteil, Abb. 3.1a). Diese Anordnung deutet auf eine direkte funktionelle Rolle der Proteine in der Oxidase-Biogenese hin.

Zusätzlich wird ein weiteres Surf1-Gen, *surf1q*, im *qox*-Operon mit den strukturellen Genen für die ba₃-Ubichinioxidase kodiert [45]. In der vorhergesagten Sequenz fehlte die N-terminale Transmembranhelix, allerdings konnte ein alternatives Start-Codon GTG im Leserahmen stromaufwärts des ursprünglichen ATG gefunden werden, so dass die Ausbildung der N-terminalen Helix ermöglicht wäre (Abb. 3.1b,c).

Die Analyse der Aminosäuresequenzen ergab hohe Homologien der verglichenen Surf1-Proteine, wobei die Sequenzidentitäten und –ähnlichkeiten der *Paracoccus* Homologe zu humanem Surf1 höher sind als zu Shy1 aus *S. cerevisiae*. Das Hefehomolog nimmt eine Sonderstellung ein, da es mit ca. 45 kD größer als Homologe aus anderen Spezies ist, die eine Größe zwischen 25 und 35 kD haben. Auffällig ist dabei eine Region von etwa 60 Aminosäuren, die in anderen Surf1-Proteinen nicht vorkommt.

Tabelle 4.1: konservierte Aminosäurereste in Surf1c, Surf1q und humanem Surf1

	Surf1c	Surf1q	Humanes Surf1
N-terminale Region	L21, G22, W24, Q25, K32	L22, G23, W25, Q26, K33	L76, G77, W79, Q80, K87
Zentrale Region	G67, R105, G106	G74, R112, G113	G124, R179, G180
C-terminale Region	H193, Y196, W200	H202, Y205, W209	H271, Y274, W278

In vorangegangenen Studien [45] und im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere konservierte Aminosäurereste identifiziert werden, die in drei Bereichen des Proteins gehäuft vorkommen (Tabelle 4.1): nahe dem periplasmatischen Ende der N-terminalen Helix, im der zentralen Loop-Region und am periplasmatischen Teil der C-terminalen Helix. Die Häufung der konservierten Reste im Bereich der beiden Helices legt die Vermutung nahe (Abb. 4.1), dass diese für die Funktion von Surf1 zwingend erforderlich sind.

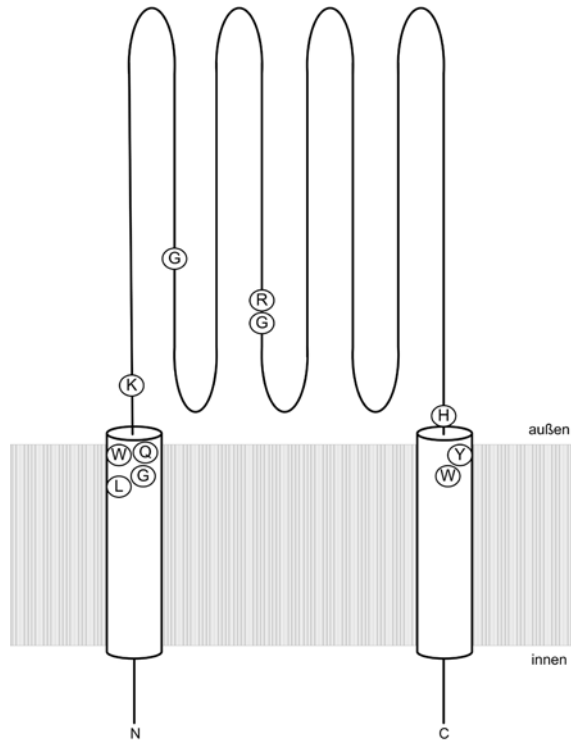


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung von Surf1. Die Positionen der in Tabelle 4.1 aufgelisteten konservierten Aminosäuren sind in der Abbildung als Kreise hervorgehoben.

Das Leigh-Syndrom wird in den meisten Fällen durch akuten Mangel an COX hervorgerufen [80, 88], wobei dieser durch Mutationen in humanen *surf1*-Gen verursacht wird [89, 90]. Interessanterweise konnte in einigen Fällen von Leigh-Syndrom statt der erwarteten *surf1*-Deletion Punktmutationen im Gen der Häm *a* Synthase Cox15 als Ursache ermittelt werden [91, 92]. Dies könnte als erster Hinweis gedeutet werden, dass der Oxidasemangel bei Leigh-Syndrom-Patienten mit der Biogenese des Häm *a* Kofaktors zusammenhängt.

Untersuchungen an Patientenzelllinien haben zur Identifikation von diversen Mutationen des *surf1*-Gens geführt, wobei bisher nur wenige Punktmutationen gefunden werden konnten (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Auswahl an Mutationen von *surf1* in Patienten mit Leigh-Syndrom

Art der Mutation	Beispiel	Referenz
Deletion	845delCT	[143]
Insertion	882insT	[90]
Deletionen/Insertionen	326insATdelTCTGCCAGCC	[90]
Splicing Site Mutation	337+2T-C in Donorsite	[90]
Punktmutationen	Q251stop	[90]
	G124E	[144]
	G180E*	[145]
	I246T	[45]
	Y274D	[146]

* Die Mutation G180E ist zwar mit COX-Mangel assoziiert und letal, führt aber nicht zur Ausbildung des klassischen Leigh-Syndroms

Die Deletion oder Insertion von einer oder mehreren Basen führt zu einer Verschiebung des Leserasters und/oder der Ausbildung von verfrühten Stopp-Codons, so dass kein sinnvolles *surf1*-Genprodukt erhalten werden kann. Gleiches gilt für Mutationen der *splicing sites*, die zum Verlust von ganzen Exons führen können. Die meisten beschriebenen Punktmutationen führen ebenfalls zu verfrühten Stopp-Codons und so zum Verlust des Proteins, aber es sind auch einige Mutationen bekannt, die keine Symptome verursachen [147].

Nur vier Punktmutationen, die zum Verlust der Surf1-Funktion führen, sind bisher beschrieben [45, 144-146], und drei davon betreffen konservierte Aminosäuren: G124E, G180E und Y274D. Die Punktmutationen G124E und I246T führen zum Verlust des Surf1-Proteins [147], und auch für die Mutation G180E kann Surf1 in den Patientenzellen nicht nachgewiesen werden [145]. Man kann also annehmen, dass diese Punktmutationen einen drastischen Effekt auf die Struktur des Proteins haben, so dass möglicherweise keine korrekte Faltung oder Membraninsertion erreicht werden kann, und das Protein proteolytisch abgebaut wird.

Da bisher keine strukturellen Daten zu Surf1 vorliegen, kann man nur über die Rolle dieser Reste spekulieren. Bei Glycin handelt es sich um die kleinste Aminosäure, die auch als „Helixbrecher“ bezeichnet wird. Die Mutation könnte dabei bewirken, dass sich statt eines potentiellen Helix-Turn-Helix Motivs nur eine einzige lange Helix ausbildet, was die Tertiärstruktur des Proteins signifikant ändert und zum

Funktionsverlust führen könnte. Des Weiteren kann der Austausch in Glutamat allein aufgrund der Änderung in Größe und Ladung ebenfalls die native Struktur des Proteins negativ beeinflussen.

Isoleucin 246 ist nicht konserviert, allerdings findet sich an dieser Stelle in nahezu allen Surf1-Homologen ein hydrophober Aminosäurerest (V167 für Surf1c, L178 für Surf1q). Die Sekundärstruktur-Vorhersage für humanes Surf1 ergab, dass sich an dieser Stelle ein β -Sheet flankiert von zwei *coil*-Regionen ausbilden sollte und der Austausch der hydrophoben Aminosäure in ein polares Threonin würde die vorhergesagte β -Sheet-Struktur auflösen [45].

Tyrosin 274 befindet sich in der C-terminalen Helix von Surf1 und in unmittelbarer Nähe zu dem konservierten Histidin 271, das wie in dieser Arbeit beschrieben an der Hämbindung von Surf1 in *P. denitrificans* beteiligt ist. Der Austausch von Tyrosin in ein Aspartat führt eine negative Ladung ein, die die Hämbindung beeinträchtigen könnte. Ausserdem ist nicht auszuschließen, dass das Tyrosin ebenfalls an der Hämbindung beteiligt ist.

Da weder eine Raumstruktur von Surf1 noch funktionelle Analysen über die anderen konservierten Aminosäurenreste vorliegen, lassen sich an dieser Stelle keine weiteren Aussagen über deren Beteiligung an der Hämbindung oder an Interaktionen mit anderen Proteinen wie der Häm *a* Synthase oder Untereinheit I treffen.

Zukünftige Untersuchungen mit Hilfe gerichteter Mutagenese, ITC-Bindungsstudien der Mutanten oder die Aufklärung der Surf1-Raumstruktur sollen hier Abhilfe schaffen.

4.1 *surf1*-Deletionen

Die Deletionen von *surf1c* und *surf1q* in *P. denitrificans* führen zum Aktivitätsverlust beider Oxidasen, wobei immerhin noch 30 – 50 % Restaktivität gegenüber dem Wildtyp in Membranen gemessen werden kann. Dabei hat die Deletion von *surf1c* nur Einfluss auf die *aa*₃-COX, und die Abwesenheit von *surf1q* bewirkt nur einen Aktivitätsverlust der *ba*₃-QOX. Die Effekte der Deletion können dabei ebenfalls nur von dem jeweiligen Gen *in trans* komplementiert werden. Beide Proteine sind also spezifisch für ihre jeweiligen Oxidasen zuständig, allerdings

scheinen sie nicht strikt essentiell für die Funktion notwendig. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen aus anderen Organismen inklusive Patientenzelllinien, wo ebenfalls Restaktivität von COX in $\Delta surf1$ -Zellen gemessen werden konnte [89, 90, 99, 148, 149].

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse kann festgehalten werden, dass beide Surf1-Proteine nicht überlappende Funktionen besitzen und spezifisch für ihre jeweiligen Oxidasen verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, dass kein weiteres drittes Surf1-Homolog in *Paracoccus* zu finden ist, wie es vielleicht zu erwarten wäre, da das Bakterium über eine dritte terminale Oxidase verfügt. Dieses Enzym gehört zum *cbb₃*-Typ der Häm-Kupfer-Oxidasen Familie, und der augenscheinlichste Unterschied in Bezug auf die *aa₃*-COX und die *ba₃*-QOX besteht in der Abwesenheit eines *a*-Typ Häms im binukleären Zentrum. Dies kann als erster Hinweis für die Rolle von Surf1 beim Häm *a*-Einbau gewertet werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein Surf1-Protein an der Assemblierung einer Chinoloxidase beteiligt ist. Studien an der *bo₃*-Ubichinoloxidase aus *E. coli* weisen darauf hin, dass die Assemblierung der Untereinheit I durch den Hämeinbau begünstigt wird [150]. Im Fall der *ba₃*-QOX von *Paracoccus* könnte also durchaus eine spezifische Wechselwirkung von Untereinheit I und /oder Häm *a* Synthase für den fehlerfreien Einbau des *high spin* Häms nötig sein.

Aufgereinigte *aa₃*-COX aus dem *surf1*-Doppeldeletionsstamm zeigte einen etwa 70 %igen Aktivitätsverlust gegenüber Oxidase, die aus Wildtyp-*Paracoccus* isoliert wurde. Da beide Enzyme keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Untereinheiten aufweisen, kann ausgeschlossen werden, dass die geringere Aktivität durch den Verlust von Untereinheiten hervorgerufen wird.

Die spektrale Analyse des Enzyms ergab, dass der Aktivitätsverlust eindeutig mit dem Verlust an Häm *a* einhergeht. Für das nahverwandte Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* konnte gezeigt werden, dass COX unabhängig von der Anwesenheit des Häm *a* assembliert werden kann [151]. Dies könnte auch in *Paracoccus* der Fall sein und tatsächlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass mehrere Subpopulationen an COX in der Präparation aus FA3 vorliegen. So enthalten etwa 40 % ein normales Häm *a₃*/Cu_B-Zentrum, während in etwa 50 % kein Häm *a* zu finden ist und etwa

10 % enthalten nur das *low-spin* Häm *a*. Analoge Beobachtungen konnten schon früher bei der Charakterisierung der Oxidase aus einem *surfl*-Deletionsstamm von *R. sphaeroides* gemacht werden [68].

Trotzdem sollte an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass die Ausbeute an COX bei der Aufreinigung aus dem *surfl*-Deletionsstamm FA3 deutlich geringer ausfällt als bei der Aufreinigung aus WT-*Paracoccus* oder dem Komplementationsstamm. Da es sich um ein klassisches Aufreinigungsprotokoll handelt, und das Protein keinen spezifischen *tag* trägt, ist anzunehmen, dass Assemblierungsintermediate nicht an den Anionentauscher binden und so die Ausbeute vermindern. Nur vollständig assemblierte Oxidase mit ihren vier Untereinheiten wird aufgereinigt, und es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob oder in wie weit Vorstufen der COX in Membranen akkumulieren.

Die Hämverteilung legt nahe, dass Surfl eine frühere Rolle bei der Biogenese von Untereinheit I spielt als bisher beschrieben und am Häm *a*-Einbau beteiligt ist. Da Surfl nicht essentiell für die COX-Biogenese ist, sollte es eher den Einbau der Kofaktoren erleichtern als direkt daran beteiligt zu sein. Man kann sich vorstellen, dass die hydrophoben Häm *a*-Moleküle kotranslational in Untereinheit I eingebaut werden, noch während die neusynthetisierte Polypeptidkette in die Cytoplasmamembran inseriert wird. Untereinheit I besteht aus 12 Transmembranhelices, die in drei Bündeln à vier Helices organisiert sind, so dass die endgültige Struktur des Proteins mehr oder weniger spontan erreicht wird, indem sich die Bündel um Häm *a* Moleküle falten. Spezifische Interaktionen zwischen apo-Untereinheit I und Surfl könnten einen transienten Komplex zwischen Untereinheit I und der membrangebundenen Häm *a* Synthase stabilisieren. Die konservierten Aminosäurereste in Surfl-Proteinen, nahe den periplasmatischen Seiten der beiden Transmembranhelices wären Kandidaten, die an einer solchen Interaktion beteiligt sein könnten. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Hämbindung von Surfl widerspricht jedoch teilweise der Annahme einer indirekten Beteiligung am Häm *a*-Einbau, und im Folgenden (Abschnitt 4.2) wird darauf näher eingegangen.

Es konnte gezeigt werden, dass exogene Häm *a*-Inkubation die Assoziation von Untereinheit I mit Untereinheit II und III fördert, was für einen frühen Häm *a* Einbau vor der Interaktion mit anderen Untereinheiten spricht [50, 152]. Allerdings fehlt einer Variante der Oxidase, in der durch Mutation die Wechselwirkung zwischen

Untereinheit I und II gestört ist, das Häm a_3 [153], und Daten aus *R. sphaeroides* deuten darauf hin, dass erst die Bindung von Untereinheit II zu einer stabilen Bildung des aktiven Häm a_3 -Cu_B-Zentrums in Untereinheit I führt [154]. Die Kristallstruktur der aa_3 -COX aus *P. denitrificans* zeigt, dass der hydrophobe Farnesylrest des Häm a_3 an der Kontaktfläche zu Untereinheit II aus Untereinheit I herausragt und mit Untereinheit II wechselwirkt (Abb. 4.2).

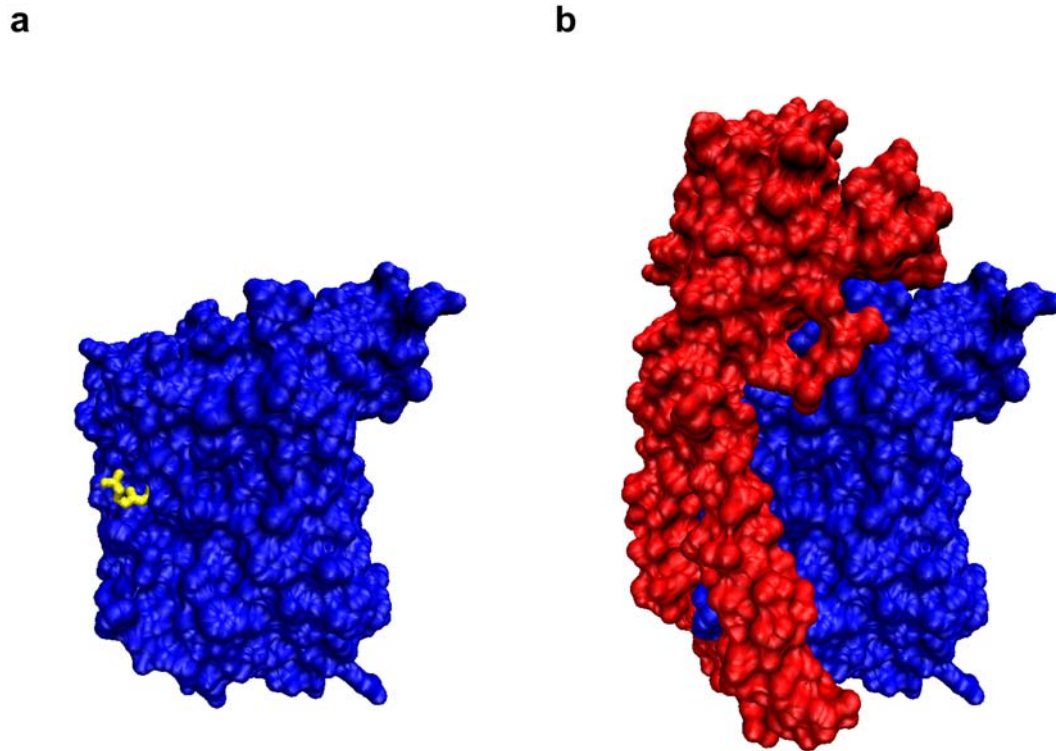


Abbildung 4.2: Oberflächendarstellung der COX aus *P. denitrificans*. (a) Der Farnesylschwanz des Häm a_3 (gelb) ragt aus Untereinheit I (blau) heraus. (b) Untereinheit II (rot) bedeckt Untereinheit I und wechselwirkt mit dem Farnesylrest des Häm a_3 . Die Abbildung wurde mit dem Programm VMD erstellt (pdb-Code: 1QLE)

Da sowohl für das humane Surf1 als auch für das Hefe-Homolog Shy1 Interaktionen mit Untereinheit II nachgewiesen werden konnten [155], ist eine Rolle von Surf1 als stabilisierendes Protein bei der Assoziation der beiden Untereinheiten wahrscheinlich. Neben einer direkten Beteiligung am Häm a -Einbau könnte es zusätzlich an einer Art Kontrollmechanismus mitwirken, so dass in Eukaryoten nur korrekt assemblierte Untereinheiten I und II zusammengefügt werden.

Über die dritte redox-aktive Komponente in Untereinheit I, das Cu_B-Ion, welches zusammen mit dem Häm a_3 das binukleäre Zentrum bildet, kann anhand der hier diskutierten Ergebnisse keine Aussage getroffen werden. Für den Einbau des Cu_B-

Ions scheint das Kupferchaperon Cox11 verantwortlich zu sein [59], und Studien in Hefe weisen auf einen kotranslationalen Einbau hin [60, 61]. Allerdings ist unklar, in welcher zeitlichen Abfolge der Einbau der Häm *a*-Moleküle und des Kupferions in Untereinheit I stattfindet. Es ist aber anzunehmen, dass zuerst die Häm *a*-Moleküle in Untereinheit I eingebaut werden. So konnten in *R. sphaeroides* COX-Subpopulationen mit Häm *a*₃ ohne Cu_B-Assoziation nachgewiesen werden [68], und auch bei der Assemblierung der *bo*₃-Chinoloxidase von *E. coli* hat die Häminsertion einen weit aus größeren Effekt auf die Assemblierung als der Cu_B-Einbau [150].

4.2 Hämbindung von Surf1

Ein Hauptaspekt dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der beiden Surf1-Proteine von *Paracoccus*, um die Rolle von Surf1 im Rahmen der Oxidase-Biogenese zu untersuchen. Soweit bekannt, handelt es sich um die erste Arbeit, in der aufgereinigtes Surf1 detailliert beschrieben wird.

Im Gegensatz zu früheren Vorschlägen zur Surf1-Funktion, die von der Stabilisierung gefalteter Untereinheit I bis zur Beteiligung an der Kupferhomöostase reichen [156, 157], zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass beide Surf1-Homologe in *Paracoccus* Häm *a* in äquimolaren Mengen mit submikromolarer Affinität binden. Für bakterielle Häm-Aufnahmesysteme wurden bereits Hämbindungsaffinitäten im gleichen molaren Konzentrationsbereich ermittelt [158, 159]. Interessanterweise bindet Surf1c Häm *a* in den ITC-Experimenten mit etwa doppelt so hoher Affinität wie Surf1q (303 nM vs. 650 nM). Die *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase enthält zwei Häm *a* Moleküle, während die *ba*₃-Ubichinoloxidase ein Häm *b* und ein Häm *a* beinhaltet. So gesehen wird mehr Häm *a* für die Assemblierung der COX benötigt, und da Surf1c und Surf1q spezifisch ihre korrespondierenden Oxidasen beliefern, könnte es sich bei dem Unterschied der Affinitäten um einen möglichen Regulationsmechanismus handeln, mit dem die richtige Häm *a*-Verteilung in der Zelle sichergestellt wird.

Außerdem scheinen die beiden Surf1-Proteine unterschiedliche Bindungsstellen für Häm *a* zu besitzen, worauf zum einen die unterschiedlichen Absorptionsmaxima in der α -Region des Redoxspektrums hinweist (595 nm für Surf1c vs. 600 nm für Surf1q) und zum anderen der deutliche Unterschied in der Enthalpie ΔH für die

Hämbindung (-21,1 kcal/mol für Surf1c vs. -11,6 kcal/mol für Surf1q). Die Substitution des konservierten Histidins hat zudem einen viel größeren Effekt auf die Hämbindung von Surf1c als von Surf1q.

Es ist nicht anzunehmen, dass die Bindung von Häm *a* an Surf1 allein durch das konservierte Histidin vermittelt wird, und weitere Interaktionen des Kofaktors mit anderen Aminosäureresten und/oder dem Proteinrückgrat sind wahrscheinlich. Gerade die Frage nach der Art der Häm *a*-Bindung und der daran beteiligten Aminosäurereste macht die Strukturaufklärung der beiden Surf1-Proteine so wichtig und wird in Zukunft im Vordergrund der Untersuchungen zu Surf1 stehen.

In dieser Arbeit wurde der heterologe Wirt *E. coli* verwendet, in den der Häm *a*-Biosyntheseapparat von *Paracoccus* eingebracht wurde: die Häm *a* Synthase CtaA (Cox15 in Eukaryoten) sowie die Häm *o* Synthase CtaB (Cox10 in Eukaryoten). Die *in vivo* Hämbindung von heterolog exprimiertem Surf1 in Anwesenheit von CtaA und CtaB war abhängig von den Wachstumsbedingungen. Insbesondere die Luftzufuhr hatte einen starken Effekt auf den Hämgehalt, was sich mit der Sauerstoffabhängigkeit von CtaA erklären lässt. Der Hämgehalt variierte in den einzelnen Präparationen und erreichte nie ein molares 1:1 Verhältnis von Häm zu Protein. In diesem experimentellen System wurden CtaA und CtaB konstitutiv exprimiert, während Surf1 jeweils über Induktion überexprimiert wurde und man kann annehmen, dass die Rate der Häm *a* Synthase nicht mit dieser starken Expression von Surf1 schritthalten kann. In diesem Zusammenhang kann die beobachtete Häm *o*-Bindung an Surf1c und Surf1q als experimentelles Artefakt angesehen werden. Häm *o* und Häm *a* unterscheiden sich nur durch die Formylgruppe des Häm *a*, und es ist nicht unwahrscheinlich, dass Häm *o* in die vermutete hydrophobe Bindungstasche für Häm *a* hineinpasst und locker gebunden wird. Häm *o* wird in *E. coli* für die terminale *bo*₃-Ubichinoloxidase benötigt und sollte deshalb in relativ großen Mengen vorhanden sein, sodass eine unspezifische Bindung an Surf1 vorstellbar ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Surf1-Proteine auch aus ihrem nativen Wirt *P. denitrificans* aufgereinigt. Dabei enthalten die verschiedenen Präparationen nur Häm *a* und kein anderer Häm-Typ kann nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die beobachtete Häm *o*-Bindung in *E. coli* unspezifischer Natur ist. Häm *o* kommt in *Paracoccus* nur in geringem Umfang als

Intermediat bei der Häm *a* Biosynthese vor [28]. Die α -Absorptionsmaxima in nativen Redox-Differenzspektren liegen mit 597 nm für Surf1c und 601 nm für Surf1q im gleichen Bereich wie für heterolog exprimiertes Surf1 und sind nur leicht rot-verschoben. Da die Präparationen nicht vollständig homogen sind und geringe Mengen an Untereinheit I der *aa*₃-COX enthalten, ist nicht ausgeschlossen, dass die leichte Rotverschiebung im Spektrum durch die Absorption von mit UE I assoziiertem Häm *a* hervorgerufen wird. Das α -Absorptionsmaximum für die *aa*₃-COX liegt im nativen Spektrum bei 605 nm [130] und für das *a*₃-Häm der *ba*₃-QOX sieht man im α -Bereich einen *peak* bei 609 nm [40]. Ob sich Untereinheit I der QOX ebenfalls in den Präparationen befindet, ließ sich bisher nicht nachweisen.

Auch bei der Aufreinigung von Surf1 aus *Paracoccus* erhält man kein molares Häm *a* zu Protein Verhältnis von 1:1 (vgl. Tabelle 3.6). Der Wert für Surf1c aus FA3.61 ist mit etwa 0,5 aber deutlich höher als für heterolog exprimiertes Surf1c. Auch für Surf1q aus FA3.62 kann mit einem Verhältnis von etwa 0,8 im homologen System ein mehr als doppelt so hoher Wert erzielt werden. Da die Präparationen jedoch noch Verunreinigungen enthalten, sollte der reale Wert noch deutlich höher liegen und könnte 1 erreichen, wenn angenommen wird, dass das gesamte Häm *a* an Surf1 gebunden ist.

Interessanterweise enthalten Surf1-Präparationen aus den Oxidase-Deletionsstämmen FA61TSP24 und FA62TSP24 weit weniger Häm *a* (vgl. Tabelle 3.6) und das Häm : Protein-Verhältnis liegt nur zwischen 0,1 und 0,15. Eine erste Vermutung war, dass es sich bei dem fehlenden Betrag um den Anteil an Häm *a* handelt, der an Untereinheit I gebunden ist. Die Intensität der Untereinheit I-Bande in den Gelen und somit der Anteil an der Proteinpräparation müsste dann allerdings sehr viel stärker sein (vgl. Abb. 3.39a). Es scheint vielmehr, dass durch die Abwesenheit der beiden Oxidasen die Verfügbarkeit von Häm *a* herabgesetzt wird. Dies geschieht möglicherweise durch die Reduktion der Expression oder der Aktivität der Häm *a* Synthase und/oder der Häm *o* Synthase, da weder Häm *a* noch Häm *o* in der Zelle benötigt werden, und könnte einen *feed-back* Mechanismus darstellen. Eine mögliche Kommunikation zwischen den einzelnen Genloci für Untereinheit I *ctaDI* und *ctaDII* und dem *cta*-Operon konnte bereits früher gezeigt werden. Fehlen die Gene für Untereinheit II, CtaB und CtaG, kann auch Untereinheit I nicht mehr immunologisch nachgewiesen werden [39]. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus in umgekehrter Richtung, bei dem die Abwesenheit der COX-Untereinheit I die Expression auf

bisher unbekanntem Weg oder die *steady-state-level* über Abbau der anderen Untereinheiten und Assemblierungsfaktoren beeinflusst, scheint wahrscheinlich.

Die Präparationen der Surf1-Varianten, in denen das konservierte Histidin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, zeigen nur sehr geringe Häm *a*-Konzentrationen für die Aufreinigung aus *P. denitrificans*, während in den Präparationen aus *E. coli* kein Häm *a* nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse der Kalorimetriemessungen zeigen ebenfalls, dass die beiden Mutanten noch in der Lage sind Häm *a* zu binden, jedoch mit weit geringeren Affinitäten im mikromolaren Bereich (vgl. Tabelle 3.5). Nichtsdestotrotz kann man annehmen, dass dieser Histinrest den fünften Ligand des Eisenzentralatoms des Häm *a*-Moleküls stellt. Die charakteristische Verschiebung der Absorption des oxidierten Häm *a* von 412 nm auf 419 nm durch die Bindung an Surf1 ist bei den Mutanten nicht mehr zu beobachten (vgl. Abb. 3.30). Der Histidinrest ist also nicht nur an der Bindung des Häm-Moleküls beteiligt, sondern verändert dadurch auch die spektralen Eigenschaften des Häms, was auf eine direkte Wechselwirkung mit dem delokalisierten π -Elektronensystem des Porphyrinrings hinweist.

Es wird allgemein angenommen, dass Häm *a* in der Membran nicht frei vorkommt, da es in dieser ungebundenen Form schädlich für die Zelle ist [160, 161]. In Eukaryoten wurde deshalb bisher ein direkter Hämtransfer von Cox15 zu COX UEI angenommen. Expressionsrate und Aktivität der Häm *a* Synthase sind in Hefe stark reguliert, insbesondere über die Häm *b*-Konzentration [162]. Häm *b* ist dabei nicht nur ein Vorläufer des Endprodukts Häm *a*, sondern auch der Kofaktor der Häm *a* Synthase [136]. Die Anwesenheit von apo-Untereinheit I oder Assemblierungsintermediaten könnte zusätzlich die Freisetzung von Häm *a* aus Cox15 regulieren, so dass eine unkontrollierte Abgabe von freiem, potentiell schädlichem Häm *a* verhindert wird [162]. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass Surf1 nicht nur mit CtaA interagiert, sondern auch Häm *a* bindet, legen eine Reservoir-Funktion von Surf1c und Surf1q nahe, die den Häm *a*-Fluss von CtaA zu den Untereinheiten I der *aa*₃-COX und der *ba*₃-QOX regulieren.

Diese mögliche Reservoirfunktion lässt sich in einem ersten Modell zusammenfassen. Membranständiges Surf1 interagiert dabei mit der Häm *a* Synthase und übernimmt Häm *a* aus deren aktiven Zentrum, um dann abzudiffundieren und neue Kofaktor-Synthese zu ermöglichen. Im Anschluss könnte so über eine

spezifische Wechselwirkung von Surf1 und Untereinheit I Häm *a* übertragen werden (Abb.4.3).

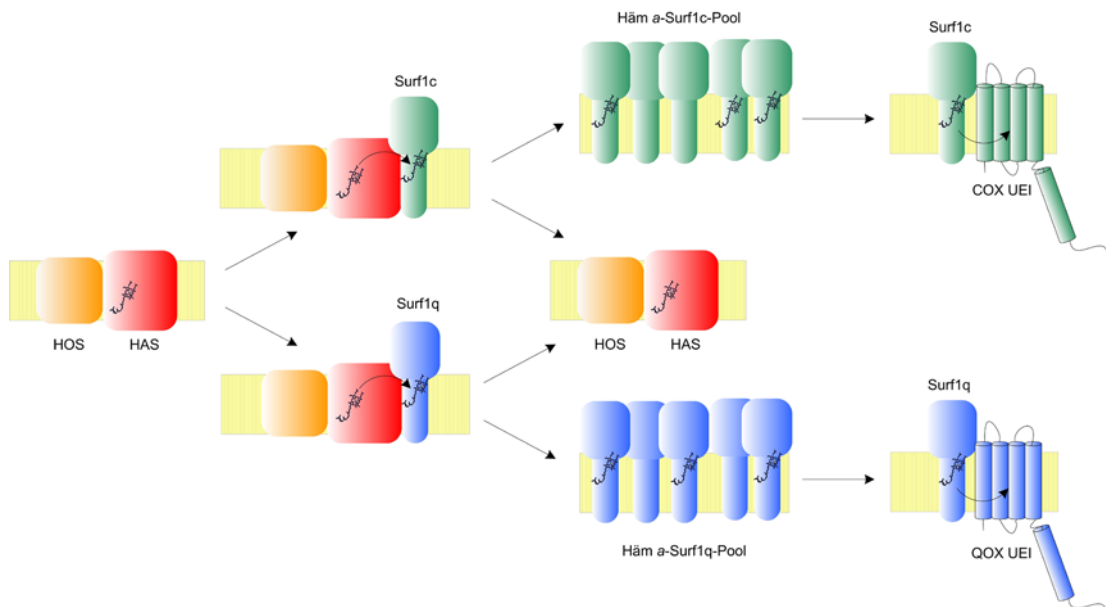


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der möglichen Häm *a*-Reservoirfunktion von Surf1. An einen Komplex aus Häm o Synthase (HOS) und Häm a Synthase (HAS) binden abwechselnd Apo-Surf1c (grün) und Apo-Surf1q (blau). Nach dem Transfer von Häm *a* diffundiert Surf1 ab und ermöglicht die neuerliche Bildung von Häm *a*. So haben mehrere Surf1-Proteine Häm *a* gebunden und stellen es in einer Art Häm *a*-Pool für UEI zur Verfügung, und der Transfer des Kofaktors auf UEI der Oxidase findet dann kotranslational statt.

Untersuchungen der Oxidase-Aktivität in Membranen zeigen, dass die Histidin-Mutanten immer noch den Phänotyp der *surf1*-Deletionen komplementieren können (vgl. Abschnitt 3.2.4, Abb. 3.13). Die Mutation hat also keinen großen Einfluss auf die Funktion des Proteins und die verminderte Häm *a*-Affinität von Surf1c und Surf1q reichen vermutlich aus, um einen einwandfreien Häm *a*-Einbau in die Oxidase zu gewährleisten. Dabei sollte beachtet werden, dass Surf1 nicht essentiell für die Assemblierung der Oxidasen ist. Wie bereits beschrieben, werden in *P. denitrificans surf1*-Deletionsstämmen immerhin noch etwa 30-50 % funktionelles Enzym nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass noch andere von Surf1 unabhängige Mechanismen für den Häm *a*-Transfer auf Untereinheit I der Oxidasen existieren.

Die Rolle von Surf1 im Rahmen der Oxidase-Biogenese und der mögliche Mechanismus des Häm *a*-Transfers auf Untereinheit I werden in den folgenden Abschnitten weiter ausführlich diskutiert.

4.3 Interaktion von Surf1 mit anderen Proteinen

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, weisen die Ergebnisse zur Häm *a*-Bindung von Surf1 in *E. coli* auf eine direkte Interaktion von Surf1 mit der Häm *a* Synthase CtaA (Cox15 in Eukaryoten) *in vivo* hin. Der heterologe Wirt *E. coli* besitzt keine endogene Häm *a* Synthase, da die terminalen Ubichinoloxidasen vom *bo*₃-Typ und *bd*-Typ sind [132, 134, 163]. Es ist also mehr als unwahrscheinlich, dass Häm *a*-Bindeproteine vorhanden sind, die außerdem spezifisch mit den *P. denitrificans* Proteinen CtaA und Surf1 interagieren, um einen Häm-Transfer zu übernehmen. Eine direkte Interaktion zwischen Surf1 und Häm *a* Synthase *in vivo* kann demnach als erwiesen angesehen werden, da die Aufnahme von freiem Häm *a* aus der Umgebung unwahrscheinlich ist, denn freies Häm *a* in der Membran hätte schädliche Effekte auf die Zelle. Zusätzlich wurde eine Interaktion der beiden Proteine in einem *in vitro*-Hämtransferexperiment nachgewiesen (vgl. Abb. 3.34), wobei eine quantitative Analyse jedoch noch aussteht. Es konnte bisher nur gezeigt werden, dass Häm von CtaA auf beide Surf1-Proteine übertragen wird, allerdings konnte auf dem Blot keine Aussage darüber getroffen werden, um welchen der beiden in CtaA vorhandenen Hämtypen es sich handelt und wie effizient dieser Transfer ist.

Wie bereits beschrieben, konnte bei der Aufreinigung von Surf1 aus *P. denitrificans* auch Untereinheit I der *aa*₃-COX in den Präparationen nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.5.2). Dies war überraschenderweise nicht nur für Surf1c der Fall, sondern auch, wenn auch in geringerem Umfang, für Surf1q. Eine solche Interaktion sollte aber aufgrund der Spezifität von Surf1q für die *ba*₃-QOX ausgeschlossen sein. Eine unspezifische Bindung von COX-Untereinheiten an die IMAC-Säule kann allerdings ausgeschlossen werden, da weder Untereinheit I und II mit dem verwendeten Protokoll aus dem *surf1*-Deletionsstamm FA3 aufgereinigt werden konnten (vgl. Abb. 3.40). Zumindest für Surf1c kann eine spezifische Assoziation mit Untereinheit I angenommen werden, da dieses Protein auch noch nach einem zweiten Reinigungsschritt in der Präparation nachgewiesen werden kann (Abb. 3.42). Dies trifft zwar auch für die Präparation von Surf1q zu, allerdings kann nicht generell ausgeschlossen werden, dass das *aa*₃-Antiserum nicht auch Untereinheit I der *ba*₃-QOX unspezifisch detektiert.

Neben COX-UEI finden sich in den einzelnen Präparationen noch andere Proteine (Abb. 3-39). Es ist nicht ausgeschlossen, dass es sich hierbei um Artefakte der Aufreinigung handelt, allerdings koeleuieren diese Banden ebenfalls im zweiten Reinigungsschritt (Abb. 3.42 und Abb. 3.43). In der Analyse der Präparationen mit nativer PAGE ließen sich zwei Subkomplexe um 100 kD und 180 kD nachgewiesen (Abb. 3.46), die neben Surf1 unterschiedliche Proteinkomponenten beinhalten. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Identifizierung der Proteine mehr vorgenommen werden.

Des Weiteren konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob Untereinheit I in dieser Präparation bereits Häm *a* enthält. Die hier verwendeten Nachweismethoden sind nicht empfindlich genug, um einen eventuellen Häm *a*-Gehalt in den vorhandenen geringen Mengen an UEI zu demonstrieren. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass COX-UEI in diesen Präparationen ihre beiden Häm-Kofaktoren noch nicht erhalten hat. Nichtsdestotrotz spiegelt die Koelution von COX-UEI mit Surf1 die Wechselwirkung der beiden Proteine bei der Assemblierung wider, und die Anwesenheit von zusätzlichen Proteinbanden lässt darauf schließen, dass hier möglicherweise Assemblierungsintermediate aufgereinigt wurden.

Vor allem für das Hefe-Homolog Shy1 konnten bereits früher diverse Interaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. So lässt sich Shy1 wie bereits beschrieben in einem etwa 250 kD großen Komplex nachweisen, der auch COX-UEII enthält [155], und in der gleichen Studie wurde auch für humanes Surf1 solch ein Komplex beschrieben.

Shy1 interagiert zudem mit Mss51 und Cox14, zwei membranständigen mitochondrialen COX Assemblierungsproteinen, die bei Expressionsregulation von Untereinheit I eine Rolle spielen [64, 65]. Mss51 wirkt als Translationsaktivator von Untereinheit I, während Cox14 die Synthese des Proteins negativ beeinflusst. Beide Proteine interagieren miteinander und bilden so ein striktes Regulationssystem für die Synthese von UEI. Neugebildete UEI wird von Mss51 und Cox14 gebunden. Während in weiteren Assemblierungsschritten Mss51 aus dem Komplex freigesetzt wird und so weiter positiv auf die Translation einwirken kann [64], scheint Cox14 auch weiterhin mit COX-UEI assoziiert zu bleiben [67]. Kann die Assemblierung von UEI nicht fortschreiten, verbleibt Mss51 im Komplex und steht nicht weiter für eine Interaktion mit den Ribosomen zur Verfügung.

Man nimmt an, dass Shy1 stromabwärts von Mss51 und Cox14 wirkt, wobei es vollständig assemblierte UEI bindet und stabilisiert und so für die Freisetzung von Mss51 sorgt. So können weitere Untereinheiten und Assemblierungsfaktoren für die Biogenese der COX gebunden werden [67]. An dieser Interaktion ist ebenfalls der membranständige Assemblierungsfaktor Coa1 beteiligt [164]. Zusammen mit Shy1 übernimmt Coa1 die neusynthetisierte Untereinheit und ermöglicht weitere Assemblierungsschritte wie den Kofaktoreinbau.

Sowohl Shy1 und auch Cox14 scheinen im Assemblierungskomplex zu verbleiben und konnten in Superkomplexen aus COX und dem bc_1 -Komplex gefunden werden [67]. Für Shy1 wird deshalb angenommen, dass es neben seiner Rolle in der COX-Biosynthese auch möglicherweise die Bildung von Superkomplexen fördert.

An dieser Stelle sollte nochmals festgehalten werden, dass Mss51, Cox14 und Coa1 nur bei Pilzen gefunden werden und keine Homologe in höheren Eukaryoten und Bakterien existieren. Nichtsdestotrotz legen die Beobachtungen in *S. cerevisiae*, dass Shy1 mit Translationsregulatoren interagiert, eine frühe Beteiligung von Shy1 im Assemblierungsprozess der COX nahe. Das Hefe-Homolog verfügt, wie zuvor bereits erwähnt, über einen zusätzlichen internen Bereich, der in keinem anderen Surf1-Homolog konserviert ist (siehe Abb. 3.2). Da die Häm α -Insertion wahrscheinlich kotranslational erfolgt, widerspricht die Interaktion von Shy1 mit dem Translationsapparat nicht seiner in dieser Arbeit zugewiesenen direkten Rolle beim Häm α -Einbau, und seine beobachtete Assoziation mit Untereinheit I in späteren Assemblierungsintermediaten deutet auf eine zusätzliche Funktion von Shy1 bei der COX-Biogenese in *S. cerevisiae* hin [67, 155, 164]. So könnte Shy1 in Hefe möglicherweise eine Art „Assemblierungskeim“ bilden, an dem der Zusammenbau der Oxidase beginnt und weiter reguliert wird.

Zusammen mit den Hefe-Befunden kann Surf1 als Chaperon angesehen werden, das die neusynthetisierten Helices von UEI bindet und sie in einer Form festhält, die den Einbau der Hämgruppen ermöglicht und so eine fehlerfreie Bildung des aktiven Zentrums gewährleistet. Nur wenn Häm α exakt gebunden ist, wird UEI freigegeben und weitere Assemblierungsschritte können stattfinden, wobei Surf1 noch Teil des Komplexes sein kann. Eine Interaktion der apo-UEI-Helices und Surf1 erklärt auch die Tatsache, dass die ba_3 -QOX ihr eigenes Surf1-Protein für eine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung benötigt.

In Hefe kann ein Δ Shy1-Phänotyp durch die gleichzeitige Überexpression von Mss51 und der Häm α Synthase Cox10 unterdrückt werden [164]. Dadurch wird nicht nur die Verfügbarkeit von Häm α in den Membranen und die Wahrscheinlichkeit des Häm α -Einbaus erhöht, sondern auch die Untereinheit I-Konzentration, was diesen kompensierenden Effekt erklären könnte. Auch die Überexpression des Assemblierungsfaktors Coa2 kann die Effekte in Δ Shy1-Zellen aufheben [165]. Coa2 agiert in der COX-Biosynthese parallel mit Shy1 und scheint einen stabilisierenden Effekt auf Untereinheit I nach dem Einbau der Kofaktoren zu haben. Einen ähnlichen Effekt scheint die Assoziation der Untereinheiten Va und VI an UEI zu haben, und sowohl für Hefe als auch im humanen System konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser Untereinheiten die Effekte einer *surf1*-Deletion zumindest teilweise aufheben kann [166].

Alle diese Kompensationseffekte führen entweder zu erhöhter Konzentration von Untereinheit I durch Erhöhung der Expression oder durch Stabilisierung und somit Schutz vor proteolytischem Abbau. Eine Aussage über die genaue Funktion von Surf1 oder Shy1 lässt sich dabei nur schwer treffen, da das Protein für die Assemblierung nicht essentiell ist, und es ist nicht verwunderlich, dass die erhöhte Verfügbarkeit von Untereinheit I für weitere Assemblierungsschritte einen kompensierenden Effekt in Surf1-defizienten Zellen hat. Allerdings konnten anhand dieser Studien die einzelnen Schritte und Intermediate in der eukaryotischen COX-Biosynthese besser aufgelöst werden.

4.4 Surf1 als Hämtransportmolekül

Die Häm α -Biosynthese ist essentiell für die Assemblierung, und Mutationen der beiden beteiligten Enzyme Cox10 und Cox15 führen zur Oxidasemangelstörungen [133, 167-172]. Über den Häm α -Transfer von der Häm α Synthase zu seinem Bestimmungsort in UEI ist bisher nur wenig bekannt.

Freies Häm stellt eine potentielle Gefahr für die Zelle dar [160, 161], da das Eisenzentralatom aufgrund seiner Redoxaktivität die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Sauerstoffradikale begünstigt [173, 174]. Diese als Fenton-Chemie bezeichnete Reaktion kann von allen reduzierten Übergangsmetallen katalysiert werden [173, 174], und besonders Kupfer(I)-Ionen gelten als toxisch für

lebende Zellen [175]. In Eukaryoten existieren deshalb diverse Kupfer-bindende Proteine, die als Chaperone Kupfer zu seinem Bestimmungsort ringen, so dass nahezu kein freies Kupfer in der Zelle vorkommt [142]. Im Falle der Cytochrom *c* Oxidase wird Kupfer für das Cu_A-Zentrum in Untereinheit II und das binukleäre Häm *a*₃/Cu_B-Zentrum in UEI benötigt. So wird vermutet, dass das Kupferchaperon Cox17 Kupfer in das Mitochondrium bringt und dort auf Sco1 und Cox11 überträgt [63], die dann ihrerseits Kupfer an Untereinheit II bzw. Untereinheit I weiterreichen [59, 139]. Im Gegensatz zum Kupfertransfer ist wenig über den Transfer und Einbau von Häm *a* in die Oxidase bekannt. Gerade wegen seiner potentiellen Toxizität sollten auch für Häm-Kofaktoren Proteinkomponenten für einen sicheren Transport und Einbau existieren. In *E. coli* konnten eine Reihe von Proteinen für den Einbau des Häm *c*-Kofaktors in Cytochrom *c* identifiziert werden [176], für den Einbau der Häm *a*-Moleküle in die COX wurde jedoch bisher kein spezifisches Häm-Chaperon gefunden. Mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Häm-Bindung von Surf1 lässt sich diese Lücke nun zum ersten Mal zumindest teilweise füllen.

Für die bakteriellen Homologe aus *B. subtilis* und *R. sphaeroides* konnte ein 1:1 Komplex aus CtaB und CtaA nachgewiesen werden und beide Proteine formen einen Häm *a*-Biosynthesekomplex [177]. Da *P. denitrificans* mit *R. sphaeroides* nah verwandt ist, kann ein solcher Komplex auch für *P. denitrificans* angenommen werden. Im Gegensatz dazu konnte in Hefe weder eine Interaktion von Cox10 und Cox15 nachgewiesen werden [178], noch ließ sich ein 1:1 Verhältnis der beiden Komponenten ermitteln. Vielmehr liegt das Verhältnis zwischen Cox15 und Cox10 in Hefe bei 8:1. Desweiteren wird die Expression und Aktivität von Cox15 in Hefe vor allem durch Häm *b* reguliert, also der Verfügbarkeit eines Substratvorläufers [162]. In Abwesenheit von Cox15 in Hefe-Deletionsstämmen findet keine Akkumulation von Häm *o* in den Zellen statt, und im Gegenteil sinkt die detektierbare Menge an Häm *o* [57]. Es wird angenommen, dass Cox15 oder dessen Produkt positiv auf die Aktivität der Farnesyltransferase wirkt [178].

Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Häm *a* Synthese scheint die Assemblierung der COX selbst zu sein. In COX-defizienten Zellen sinkt der Level an Häm *a* dramatisch [178]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse für *Paracoccus* indirekt bestätigt werden, da Surf1-Präparationen aus Oxidase-Deletionsstämmen signifikant weniger Häm *a* enthalten als analoge Präparationen aus Oxidase Wildtyp-Stämmen (vgl. Tabelle 3.6). Man nimmt an, dass

Assemblierungsintermediate oder Untereinheit I selbst die Aktivität und kontrollierte Freisetzung von Häm *a* aus Cox15 beeinflussen [162, 178].

Es ist vorstellbar, dass Surf1 mehrere Funktionen beim Häm *a* Transfer einnimmt. Die Untersuchungen der COX aus den *surf1*-Deletionsstämmen, die einen fehlerhaften Häm *a*-Einbau in UEI der COX aufwiesen, und die gezeigte Häm *a*-Bindung des Proteins legen eine direkte Beteiligung am Häm *a*-Transfer nahe.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt können nur Spekulationen zum Mechanismus des Häm *a*-Einbaus in Untereinheit I angestellt werden. Studien zur Häminsertion in Vier-Helix-Bündel, die die COX-Struktur nachahmen, zeigten Bindungsaffinitäten im niedrigen nano-molaren Bereich [179]. Diese hohe Affinität würde einen Transfer von Häm *a* erlauben, da die Affinitäten von Surf1 für Häm *a* etwa eine Größenordnung niedriger liegen. Ein kotranslationaler Hämeinbau ist am wahrscheinlichsten. Die finale Oxidase-Struktur aus zwölf Transmembranhelices stellt ein eher starres Protein-Gerüst dar, das keine Zugänglichkeit der Häm *a*-Bindstelle mehr erlaubt, was auch dadurch bestätigt wird, dass langwierige und teils harsche Aufreinigungsbedingungen nicht zum Verlust ihrer Häm-Kofaktoren führen.

Surf1 könnte als weiterer Proteinfaktor mit dem Häm *a*-Biosynthesekomplex interagieren, wobei es mit der Häm *a* Synthase wechselwirkt und Häm *a* bindet. Neusynthetisierte UEI könnte ebenfalls an diesen Komplex binden und Surf1-vermittelter Häm-Einbau stattfinden. In Abbildung 4.4 sind der vorgeschlagene Häm *a*-Biosynthesekomplex und der mögliche Hämtransfer in einem alternativen Modell schematisch dargestellt. Surf1 bildet dabei keinen ständigen Bestandteil des Komplexes, vielmehr bindet ein Surf1-Molekül und verlässt zusammen mit UEI den Komplex, wobei der Hämtransfer sowohl im Komplex als auch zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden kann. Dass weder die Häm *a* Synthase noch die Häm *o* Synthase mit Surf1 aus *E. coli* aufgereinigt werden können, gibt einen Hinweis auf diese transiente Wechselwirkung und würde die abwechselnde Interaktion von Surf1c und Surf1q mit dem Komplex möglich machen.

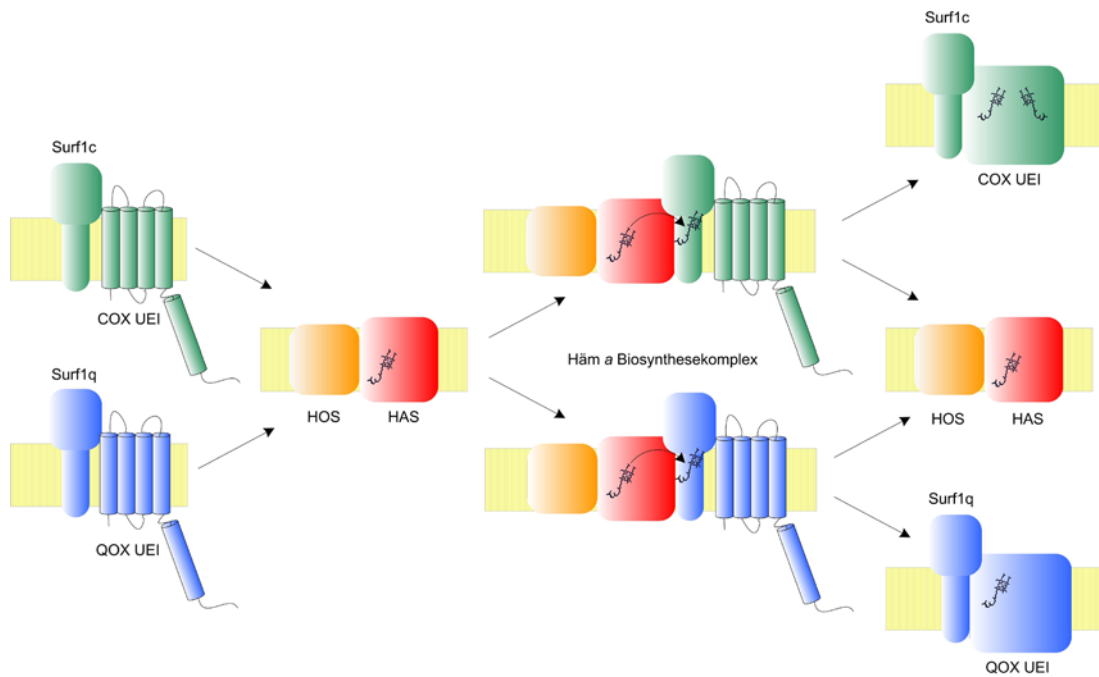


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des möglichen Häm a -Transfers auf Untereinheit I. Schon während der Translation bindet das jeweilige Surf1-Protein an Untereinheit I und rekrutiert diese an den Komplex aus Häm o Synthase (HOS) und Häm a Synthase (HAS). Hämtransfer findet zunächst nur auf Surf1 statt. Von dort gelangen die Häm-Moleküle in Untereinheit I, die dann zusammen mit Surf1 den Komplex wieder verlässt.

Im Rahmen dieser Diskussion über die Rolle von Surf1 als Hämtransfer-Protein sollte nicht unerwähnt bleiben, dass für *B. subtilis* kein Surf1-Homolog existiert. Das ist insofern verwunderlich, als dass das Bakterium gleich zwei terminale Oxidasen mit Häm a -Kofaktoren besitzt: eine *caa3*-Cytochrom c Oxidase und eine *aa3*-Ubichinoloxidase [180, 181]. Auch thermophile Bakterien wie *Thermus thermophilus* besitzen a -Typ Häm enthaltende terminale Oxidasen [182], und auch hier gibt es kein Surf1-Homolog. Für diese Oxidasen müssen also andere Mechanismen für den Häm a -Einbau existieren. Im Rahmen der Endosymbionten-Hypothese nimmt man an, dass die Mitochondrien aus den α -Proteobakterien hervorgegangen sind [14, 25], und die Anwesenheit von *surf1*-Genen in Vertretern dieser Untergruppe wie *P. dentrificans* und *R. sphaeroides* weist darauf hin, dass Surf1 erst relativ spät in der Evolution entstanden sein könnte, um den Häm a -Einbau effizienter regulieren zu können.

Es bleibt festzuhalten, dass Surf1 und seine Homologe in anderen Organismen nicht essentiell für die Assemblierung sind, und geringe Mengen an vollständig assemblierter und funktioneller Oxidase können nachgewiesen werden [89, 90, 99, 148, 149]. Trotz der Hämbindung von Surf1c und Surf1q scheinen die beiden

Proteine also nur eine vermittelnde Rolle zu spielen, die die Effizienz des Häm *a*-Einbaus nur verbessert. Eine direkte Aufnahme von freiem Häm *a* in UEI erscheint wegen der vermuteten sehr geringen Konzentration an freiem Häm *a* in der Membranumgebung mehr als unwahrscheinlich. Eine kotranlative Interaktion von UEI mit dem Häm *a*-Biosynthesekomplex wäre hingegen auch in Abwesenheit von Surf1 wahrscheinlich. Die angenommene hohe Affinität der Helixbündel würde auch einen Surf1-unabhängigen Häm-Transfer von CtaA auf UEI erklären. Durch die Abwesenheit von Surf1 könnten sich die einzelnen Helixbündel der UEI allerdings mehr oder weniger spontan falten, und Häm *a* würde nicht mehr effizient in Untereinheit I eingebaut. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass bisher noch unbekannte weitere Proteinfaktoren die Rolle von Surf1 beim Hämeinbau unterstützen und so in dessen Abwesenheit einen kompensierenden Effekt ausüben könnten.

Zusammenfassend ist eine vielfältige Funktion von Surf1 bei der COX Biogenese vorstellbar. Surf1 könnte die Häm *a* Synthese-Aktivität regulieren, indem es das Produkt Häm *a* aus dem aktiven Zentrum von CtaA abzieht und so eine kontinuierliche Synthese ermöglicht. Allerdings scheint auch die Anwesenheit der Oxidase-Untereinheiten hierbei eine Rolle zu spielen, und Surf1 allein hat keinen positiven Effekt auf die HAS-Aktivität. Andernfalls ließe sich in *E. coli* Membranen bei gleichzeitiger Expression von CtaA und CtaB mit Surf1 mehr Häm *a* in den Zellen nachweisen als bei alleiniger Expression der Ham *a* Biosynthese Gene. Des Weiteren verhindert seine Funktion als Häm-Reservoir die Gegenwart von freiem Häm *a* und dessen toxische Wirkung auf die Zelle und stellt Häm *a* in ausreichendem Maße für UEI zur Verfügung. Drittens liefert es Häm *a* an sein finales Ziel in Untereinheit I der beiden Oxidasen und positioniert den Kofaktor in dem entstehenden Membranelix-Gerüst, wobei es als stabilisierendes Protein im weiteren Assemblierungsprozess mit UEI assoziiert bleiben kann.

5 Zusammenfassung

Die mitochondriale Atmungskette und insbesondere die Cytochrom *c* Oxidase als deren terminales Enzym sind essentiell für den Energiestoffwechsel eukaryotischer Zellen. Die Assemblierung der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase mit ihren bis zu 13 Untereinheiten ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt, aber es handelt sich um einen geordneten, stark regulierten Prozess, und Defekte der Assemblierung sind häufig Ursache für neurodegenerative und myopathische Erkrankungen. In Eukaryoten sind bisher mehr als 30 Proteine identifiziert worden, die an der Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase beteiligt sind, darunter Surf1. Beim Menschen führt der Verlust von Surf1 zu einer letalen neurodegenerativen, als Leigh-Syndrom bezeichneten Krankheit, wobei die genaue Rolle von Surf1 bei der Assemblierung der Cytochrom *c* Oxidase unklar ist. Das Bodenbakterium *Paracoccus denitrificans* kann als Modellorganismus für die mitochondriale Atmungskette dienen, da seine aeroben Atmungskettenkomplexe eine deutliche Homologie zu denen der Mitochondrien aufweisen.

P. denitrificans besitzt zwei homologe Gene für Surf1, die in Operons mit terminalen Oxidasen assoziiert sind: *surf1c* ist im *cta*-Operon lokalisiert, das für Untereinheiten der *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase kodiert, und *surf1q* im *qox*-Operon, das die Gene für die *ba*₃-Ubichinioxidase enthält. Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es, diese beiden Gene und ihre Translationsprodukte zu charakterisieren und auf ihre Funktion hin zu untersuchen.

Chromosomale Einzel- und Doppeldeletionen beider *surf1*-Gene führten zu einem spezifischen Aktivitätsverlust der jeweiligen Oxidase in Membranen, wobei *surf1c* und *surf1q* unabhängig von einander für ihre korrespondierenden Oxidasen zuständig sind und keine überlappenden Funktionen besitzen. Dies war der erste experimentelle Hinweis, dass ein Surf1-Protein auch bei der Assemblierung einer Chinioxidase eine Rolle spielt. Untersuchungen an aufgereinigter *aa*₃-Cytochrom *c* Oxidase ergaben, dass der Hämgehalt im Fall der *surf1c*-Deletion stark vermindert ist. Diese Ergebnisse bestätigten frühere Vermutungen, dass Surf1 eine Rolle beim Häm-Einbau in UEI spielt.

Diese Arbeit untersuchte zum ersten Mal aufgereinigtes Surf1-Protein und lieferte mit der Charakterisierung weitere Hinweise auf seine Rolle beim Häm *a*-Einbau in

terminale Oxidasen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Surf1c und als auch Surf1q Häm *a in vivo* binden. Mit Hilfe spektroskopischer Methoden und der isothermen Titrationskalorimetrie konnte die Bindung von Häm *a* an apo-Surf1c und Apo-Surf1q quantifiziert werden. Beide Proteine binden Häm *a* mit submikromolaren Affinitäten in einer 1:1 Stöchiometrie.

Ligandenbindungsspektren wiesen weiterhin darauf hin, dass das Eisenatom des Häm *a* in Surf1 nur über fünf Liganden koordiniert ist. Über gerichtete Mutagenese konnte der konservierte Histidinrest His193 für Surf1c und His202 für Surf1q als möglicher fünfter Ligand des Eisenatoms identifiziert werden.

Untersuchungen zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen zeigten eine direkte Interaktion zwischen der Häm *a* Synthase und den beiden Surf1-Proteinen *in vivo* und *in vitro*, die zuvor noch für kein anderes Surf1-Homolog beschrieben war. Zusätzlich konnte ein Transfer von Häm von der Häm *a* Synthase auf Surf1c bzw. Surf1q *in vitro* erreicht werden. Für Surf1c ließ sich außerdem eine Interaktion mit Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase nachweisen.

Obwohl die Funktion von Surf1 im Rahmen der Biogenese der Cytochrom *c* Oxidase noch nicht abschließend geklärt werden konnte, liefern die Ergebnisse dieser Arbeit nichtsdestotrotz klare Hinweise auf eine direkte Beteiligung von Surf1 beim Einbau der Häm *a*-Kofaktoren, und ein neues Modell für die Funktion von Surf1 konnte erstellt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Olson, J.M., Photosynthesis in the Archean era. *Photosynth Res*, 2006. **88**(2): p. 109-17.
2. Mitchell, P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 1961. **191**: p. 144-8.
3. Dürr, K., *Gerichtete Mutagenese im D-Kanal der Untereinheit I der aa₃-Cytochrom c Oxidase aus Paracoccus denitrificans* Diplomarbeit. 2003: Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main.
4. Brandt, U., Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem*, 2006. **75**: p. 69-92.
5. Carroll, J., *et al.*, Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem*, 2006. **281**(43): p. 32724-7.
6. Lancaster, C.R., Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1553**(1-2): p. 1-6.
7. Mitchell, P., The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett*, 1975. **59**(2): p. 137-9.
8. Hunte, C., H. Palsdottir, and B.L. Trumpower, Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc₁ complex. *FEBS Lett*, 2003. **545**(1): p. 39-46.
9. Saraste, M., *et al.*, The happy family of cytochrome oxidases. *Biochem Soc Trans*, 1991. **19**(3): p. 608-12.
10. Devenish, R.J., M. Prescott, and A.J. Rodgers, The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008. **267**: p. 1-58.
11. DiMauro, S. and E.A. Schon, Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, 2003. **348**(26): p. 2656-68.
12. Fernandez-Vizarra, E., V. Tiranti, and M. Zeviani, Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(1): p. 200-11.
13. Beijerinck, M., Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II* 1910. **25**: p. 30-63.
14. Woese, C.R., Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987. **51**(2): p. 221-71.
15. Baker, S.C., *et al.*, Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. **62**(4): p. 1046-78.
16. Katayama, Y., A. Hiraishi, and H. Kuraishi, *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology*, 1995. **141** (Pt 6): p. 1469-77.

17. Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J.C., Glavina del, *et al.*, Complete Sequence of the *Paracoccus denitrificans* PD1222 Genome. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA., 2006.
18. Winterstein, C. and B. Ludwig, Genes coding for respiratory complexes map on all three chromosomes of the *Paracoccus denitrificans* genome. *Arch Microbiol*, 1998. **169**(4): p. 275-81.
19. Harms, N. and R.J. van Spanning, C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*: genetics of *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr*, 1991. **23**(2): p. 187-210.
20. Friedrich, C.G., Mitrenga G. , Oxidation of thiosulfate by *Paracoccus denitrificans* and other hydrogen bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1981. **10**(2): p. 209-212.
21. Haddock, B.A. and C.W. Jones, Bacterial respiration. *Bacteriol Rev*, 1977. **41**(1): p. 47-99.
22. van Verseveld, H.W. and G. Bosma, The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Microbiol Sci*, 1987. **4**(11): p. 329-33.
23. Margulis, L., Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts? *J Theor Biol*, 1970. **26**(2): p. 337-42.
24. John, P. and F.R. Whatley, *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature*, 1975. **254**(5500): p. 495-8.
25. Yang, D., *et al.*, Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(13): p. 4443-7.
26. Turba, A., M. Jetzek, and B. Ludwig, Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c552 and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem*, 1995. **231**(1): p. 259-65.
27. Bosma, G., *et al.*, Subfractionation and characterization of soluble c-type cytochromes from *Paracoccus denitrificans* cultured under various limiting conditions in the chemostat. *Eur J Biochem*, 1987. **165**(3): p. 665-70.
28. de Gier, J.W., *et al.*, The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol Microbiol*, 1994. **13**(2): p. 183-96.
29. Stouthamer, A.H., Metabolic regulation including anaerobic metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *J Bioenerg Biomembr*, 1991. **23**(2): p. 163-85.
30. Garcia-Horsman, J.A., *et al.*, The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol*, 1994. **176**(18): p. 5587-600.
31. Iwata, S., *et al.*, Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 1995. **376**(6542): p. 660-9.
32. Ostermeier, C., *et al.*, Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10547-53.
33. Witt, H., *et al.*, Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-c oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Involvement of a

- hydrophobic patch in the docking reaction. *J Biol Chem*, 1998. **273**(9): p. 5132-6.
34. Steinrucke, P., *et al.*, Subunit II of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. DNA sequence, gene expression and the protein. *Eur J Biochem*, 1987. **167**(3): p. 431-9.
35. Haltia, T., *et al.*, Deletion of the gene for subunit III leads to defective assembly of bacterial cytochrome oxidase. *EMBO J*, 1989. **8**(12): p. 3571-9.
36. Haltia, T., *et al.*, Thermodynamic and structural stability of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry*, 1994. **33**(32): p. 9731-40.
37. Bratton, M.R., M.A. Pressler, and J.P. Hosler, Suicide inactivation of cytochrome c oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site. *Biochemistry*, 1999. **38**(49): p. 16236-45.
38. Witt, H. and B. Ludwig, Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(9): p. 5514-7.
39. Steinrucke, P., E. Gerhus, and B. Ludwig, *Paracoccus denitrificans* mutants deleted in the gene for subunit II of cytochrome c oxidase also lack subunit I. *J Biol Chem*, 1991. **266**(12): p. 7676-81.
40. Richter, O.M., *et al.*, A cytochrome *ba₃* functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J Biol Chem*, 1994. **269**(37): p. 23079-86.
41. Zickermann, I., *et al.*, Expression studies on the *ba₃* quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A *bb₃* variant is enzymatically inactive. *Eur J Biochem*, 1997. **246**(3): p. 618-24.
42. Abramson, J., *et al.*, The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(10): p. 910-7.
43. Zickermann, I., *et al.*, Biochemical and spectroscopic properties of the four-subunit quinol oxidase (cytochrome *ba₃*) from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1277**(1-2): p. 93-102.
44. Saiki, K., *et al.*, Probing a role of subunit IV of the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase by deletion and cross-linking analyses. *J Biol Chem*, 1996. **271**(26): p. 15336-40.
45. Poyau, A., K. Buchet, and C. Godinot, Sequence conservation from human to prokaryotes of *Surf1*, a protein involved in cytochrome c oxidase assembly, deficient in Leigh syndrome. *FEBS Lett*, 1999. **462**(3): p. 416-20.
46. Robinson, B.H., Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr Res*, 2000. **48**(5): p. 581-5.
47. Shoubridge, E.A., Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet*, 2001. **106**(1): p. 46-52.
48. Vogt, S., *et al.*, Regulation of oxidative phosphorylation by inhibition of its enzyme complexes *via* reversible phosphorylation. *Current Enzyme Inhibition*, 2007. **3**: p. 189-206.

49. Zee, J.M. and D.M. Glerum, Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(6): p. 859-69.
50. Nijtmans, L.G., *et al.*, Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem*, 1998. **254**(2): p. 389-94.
51. Fox, T.D., Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia*, 1996. **52**(12): p. 1130-5.
52. Rodeheffer, M.S., *et al.*, Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 8616-22.
53. Naithani, S., *et al.*, Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(1): p. 324-33.
54. Kuhn, A., *et al.*, The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(10): p. 510-6.
55. Preuss, M., *et al.*, Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(5): p. 1085-96.
56. Carr, H.S. and D.R. Winge, Assembly of cytochrome *c* oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res*, 2003. **36**(5): p. 309-16.
57. Barros, M.H., *et al.*, Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett*, 2001. **492**(1-2): p. 133-8.
58. Barros, M.H., F.G. Nobrega, and A. Tzagoloff, Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 9997-10002.
59. Hiser, L., *et al.*, Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem*, 2000. **275**(1): p. 619-23.
60. Carr, H.S., *et al.*, Functional analysis of the domains in Cox11. *J Biol Chem*, 2005. **280**(24): p. 22664-9.
61. Khalimonchuk, O., K. Ostermann, and G. Rodel, Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome *c* oxidase. *Curr Genet*, 2005. **47**(4): p. 223-33.
62. Beers, J., D.M. Glerum, and A. Tzagoloff, Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 33191-6.
63. Horng, Y.C., *et al.*, Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome *C* oxidase. *J Biol Chem*, 2004. **279**(34): p. 35334-40.

64. Barrientos, A., A. Zambrano, and A. Tzagoloff, Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 2004. **23**(17): p. 3472-82.
65. Perez-Martinez, X., S.A. Broadley, and T.D. Fox, Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J*, 2003. **22**(21): p. 5951-61.
66. Williams, S.L., *et al.*, Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 7462-9.
67. Mick, D.U., *et al.*, Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J*, 2007. **26**(20): p. 4347-58.
68. Smith, D., *et al.*, Assembly of cytochrome-c oxidase in the absence of assembly protein Surf1p leads to loss of the active site heme. *J Biol Chem*, 2005. **280**(18): p. 17652-6.
69. Herrmann, J.M., *et al.*, Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 27079-86.
70. Funes, S., *et al.*, The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1853-61.
71. Hell, K., *et al.*, Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J Biol Chem*, 2000. **275**(7): p. 4571-8.
72. Leary, S.C., *et al.*, Human SCO2 is required for the synthesis of CO II and as a thiol-disulphide oxidoreductase for SCO1. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(12): p. 2230-40.
73. Abriata, L.A., *et al.*, Mechanism of Cu(A) assembly. *Nat Chem Biol*, 2008. **4**(10): p. 599-601.
74. Greiner, P., *et al.*, Biogenesis of cytochrome c oxidase -- in vitro approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2008. **1777**(7-8): p. 904-911.
75. Neupert, W. and J.M. Herrmann, Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 723-49.
76. Church, C., *et al.*, A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a pet100 mutant. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 1854-63.
77. Pfeiffer, K., *et al.*, Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*, 2003. **278**(52): p. 52873-80.
78. Schagger, H., Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1555**(1-3): p. 154-9.
79. Barrientos, A., *et al.*, Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*, 2002. **286**(1): p. 53-63.

80. Van Coster, R., *et al.*, Cytochrome c oxidase-associated Leigh syndrome: phenotypic features and pathogenetic speculations. *J Neurol Sci*, 1991. **104**(1): p. 97-111.
81. Leigh, D., Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1951. **14**(3): p. 216-21.
82. Dahl, H.H., Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome. *Am J Hum Genet*, 1998. **63**(6): p. 1594-7.
83. DiMauro, S. and D.C. De Vivo, Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Ann Neurol*, 1996. **40**(1): p. 5-7.
84. Bugiani, M., *et al.*, Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1659**(2-3): p. 136-47.
85. Loeffen, J.L., *et al.*, Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat*, 2000. **15**(2): p. 123-34.
86. Bourgeron, T., *et al.*, Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*, 1995. **11**(2): p. 144-9.
87. Tatuch, Y., *et al.*, Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet*, 1992. **50**(4): p. 852-8.
88. Lombes, A., *et al.*, Biochemical and molecular analysis of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome. *Neurology*, 1991. **41**(4): p. 491-8.
89. Tiranti, V., *et al.*, Mutations of *SURF-1* in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet*, 1998. **63**(6): p. 1609-21.
90. Zhu, Z., *et al.*, *SURF1*, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet*, 1998. **20**(4): p. 337-43.
91. Bugiani, M., *et al.*, Novel mutations in COX15 in a long surviving Leigh syndrome patient with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet*, 2005. **42**(5): p. e28.
92. Oquendo, C.E., *et al.*, Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet*, 2004. **41**(7): p. 540-4.
93. Weraarpachai, W., *et al.*, Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet*, 2009. **41**(7): p. 833-7.
94. Duhig, T., *et al.*, The human Surfeit locus. *Genomics*, 1998. **52**(1): p. 72-8.
95. Yao, J. and E.A. Shoubridge, Expression and functional analysis of *SURF1* in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(13): p. 2541-9.
96. Pecina, P., *et al.*, Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res*, 2004. **53** Suppl 1: p. S213-23.

97. Stiburek, L., *et al.*, Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem J*, 2005. **392**(Pt 3): p. 625-32.
98. Tiranti, V., *et al.*, Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(13): p. 2533-40.
99. Mashkevich, G., *et al.*, *SHY1*, the yeast homolog of the mammalian *SURF-1* gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *J Biol Chem*, 1997. **272**(22): p. 14356-64.
100. Bundschuh, F.A., *Konstruktion und Charakterisierung von Surf1-Deletionsmutanten in Paracoccus denitrificans*. Diplomarbeit. 2003: Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main.
101. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(22): p. 4673-80.
102. Turchin, A. and J.F. Lawler, Jr., The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis. *Biotechniques*, 1999. **26**(4): p. 672-6.
103. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
104. Alexeyev, M.F., Three kanamycin resistance gene cassettes with different polylinkers. *Biotechniques*, 1995. **18**(1): p. 52, 54, 56.
105. Arslan, E., *et al.*, Overproduction of the Bradyrhizobium japonicum c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **251**(3): p. 744-7.
106. Pfitzner, U., *et al.*, Cytochrome c oxidase (heme *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *J Bioenerg Biomembr*, 1998. **30**(1): p. 89-97.
107. Van Spanning, R.J., *et al.*, A method for introduction of unmarked mutations in the genome of *Paracoccus denitrificans*: construction of strains with multiple mutations in the genes encoding periplasmic cytochromes *c*₅₅₀, *c*_{551i}, and *c*_{553i}. *J Bacteriol*, 1991. **173**(21): p. 6962-70.
108. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985. **33**(1): p. 103-19.
109. Schweizer, H.D., Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *Biotechniques*, 1993. **15**(5): p. 831-4.
110. Hanahan, D., Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 1983. **166**(4): p. 557-80.
111. Hanahan, D. and M. Meselson, Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, 1983. **100**: p. 333-42.

112. Hedges, R.W. and A.E. Jacob, Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol Gen Genet*, 1974. **132**(1): p. 31-40.
113. Miroux, B. and J.E. Walker, Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 1996. **260**(3): p. 289-98.
114. DeVries, G.E., *et al.*, Isolation and Characterization of *Paracoccus denitrificans* mutants with increased conjugation frequencies and pleiotropic loss of a (nGATCn) DNA-modifying property. *Archives of Microbiology*, 1989. **152**(1): p. 52-57.
115. Sambrook, J., Russell, D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 ed. 2000: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
116. Studier, F.W., Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 2005. **41**(1): p. 207-34.
117. Ludwig, B., Cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Methods Enzymol*, 1986. **126**: p. 153-9.
118. Southern, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975. **98**(3): p. 503-17.
119. Lowry, O.H., *et al.*, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
120. Markwell, M.A., *et al.*, A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 1978. **87**(1): p. 206-10.
121. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
122. Delepelaire, P. and N.H. Chua, Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4 degrees C: Characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(1): p. 111-115.
123. Schagger, H. and G. von Jagow, Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 1991. **199**(2): p. 223-31.
124. Thomas, P.E., D. Ryan, and W. Levin, An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1976. **75**(1): p. 168-76.
125. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
126. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
127. Weinstein, J.D. and S.I. Beale, Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(11): p. 6799-807.

128. Crane, F.L., *et al.*, *Determination of ubiquinones*, in *Methods in Enzymology*. 1971, Academic Press. p. 137-165.
129. Kröger, A., Determination of contents and redox states of ubiquinone and menaquinone. *Methods Enzymol*, 1978. **53**: p. 579-91.
130. Ludwig, B. and G. Schatz, A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa3) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(1): p. 196-200.
131. Williams, J.N., Jr., A Method for the Simultaneous Quantitative Estimation of Cytochromes a, B, C1, and C in Mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1964. **107**: p. 537-43.
132. Puustinen, A., *et al.*, Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1991. **30**(16): p. 3936-42.
133. Glerum, D.M. and A. Tzagoloff, Isolation of a human cDNA for heme A:farnesyltransferase by functional complementation of a yeast cox10 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(18): p. 8452-6.
134. Puustinen, A. and M. Wikstrom, The heme groups of cytochrome o from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(14): p. 6122-6.
135. Brown, K.R., *et al.*, Identification of novel hemes generated by heme A synthase: evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry*, 2002. **41**(36): p. 10906-13.
136. Svensson, B., K.K. Andersson, and L. Hederstedt, Low-spin heme A in the heme A biosynthetic protein CtaA from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*, 1996. **238**(1): p. 287-95.
137. Svensson, B., M. Lubben, and L. Hederstedt, *Bacillus subtilis* CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis. *Mol Microbiol*, 1993. **10**(1): p. 193-201.
138. Holdgate, G.A., Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques*, 2001. **31**(1): p. 164-6, 168, 170 passim.
139. Khalimonchuk, O. and G. Rödel, Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 2005. **5**(6): p. 363-88.
140. Richter, O.M. and B. Ludwig, Cytochrome c oxidase - structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2003. **147**: p. 47-74.
141. Bertini, I. and G. Cavallaro, Metals in the "omics" world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. *J Biol Inorg Chem*, 2008. **13**(1): p. 3-14.
142. Cobine, P.A., F. Pierrel, and D.R. Winge, Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1763**(7): p. 759-72.
143. Pequignot, M.O., *et al.*, Mutations in the SURF1 gene associated with Leigh syndrome and cytochrome C oxidase deficiency. *Hum Mutat*, 2001. **17**(5): p. 374-81.

144. Poyau, A., *et al.*, Missense mutations in SURF1 associated with deficient cytochrome c oxidase assembly in Leigh syndrome patients. *Hum Genet*, 2000. **106**(2): p. 194-205.
145. Von Kleist-Retzow, J.C., *et al.*, Mutations in SURF1 are not specifically associated with Leigh syndrome. *J Med Genet*, 2001. **38**(2): p. 109-13.
146. Teraoka, M., *et al.*, Two novel mutations of SURF1 in Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Genet*, 1999. **105**(6): p. 560-3.
147. Dubot, A., *et al.*, Pathogenicity of missense mutations in SURF1 deficiency inducing the Leigh syndrome. Importance in diagnosis. *Mitochondrion*, 2004. **4**(1): p. 41-7.
148. Agostino, A., *et al.*, Constitutive knockout of *Surf1* is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(4): p. 399-413.
149. Baden, K.N., *et al.*, Early developmental pathology due to cytochrome c oxidase deficiency is revealed by a new zebrafish model. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 34839-49.
150. Stenberg, F., G. von Heijne, and D.O. Daley, Assembly of the cytochrome *bo*₃ complex. *J Mol Biol*, 2007. **371**(3): p. 765-73.
151. Hiser, L. and J.P. Hosler, Heme A is not essential for assembly of the subunits of cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 45403-7.
152. Wielburski, A. and B.D. Nelson, Heme a induces assembly of rat liver cytochrome c oxidase subunits I--III in isolated mitochondria. *FEBS Lett*, 1984. **177**(2): p. 291-4.
153. Rahman, S., *et al.*, A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet*, 1999. **65**(4): p. 1030-9.
154. Bratton, M.R., *et al.*, Identification of the structural subunits required for formation of the metal centers in subunit I of cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 2000. **39**(42): p. 12989-95.
155. Nijtmans, L.G., *et al.*, Shylp occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett*, 2001. **498**(1): p. 46-51.
156. Barrientos, A., *et al.*, Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(1): p. 97-107.
157. Stiburek, L., *et al.*, Loss of function of Sco1 and its interaction with cytochrome c oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009.
158. Izadi-Pruneyre, N., *et al.*, The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site. *J Biol Chem*, 2006. **281**(35): p. 25541-50.

159. Krieg, S., *et al.*, Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(4): p. 1045-50.
160. Mense, S.M. and L. Zhang, Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res*, 2006. **16**(8): p. 681-92.
161. Thony-Meyer, L., Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997. **61**(3): p. 337-76.
162. Wang, Z., Y. Wang, and E.L. Hegg, Regulation of the heme A biosynthetic pathway: differential regulation of heme A synthase and heme O synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(2): p. 839-47.
163. Miller, M.J. and R.B. Gennis, The purification and characterization of the cytochrome d terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J Biol Chem*, 1983. **258**(15): p. 9159-65.
164. Pierrel, F., *et al.*, Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J*, 2007. **26**(20): p. 4335-46.
165. Pierrel, F., *et al.*, Coa2 is an assembly factor for yeast cytochrome c oxidase biogenesis that facilitates the maturation of Cox1. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(16): p. 4927-39.
166. Fontanesi, F., *et al.*, Transcriptional activators HAP/NF-Y rescue a cytochrome c oxidase defect in yeast and human cells. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(6): p. 775-88.
167. Antonicka, H., *et al.*, Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(20): p. 2693-702.
168. Antonicka, H., *et al.*, Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(1): p. 101-14.
169. Glerum, D.M., *et al.*, COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 1997. **272**(30): p. 19088-94.
170. Moraes, C.T., F. Diaz, and A. Barrientos, Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme c and heme a in yeast and mammals. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1659**(2-3): p. 153-9.
171. Nobrega, M.P., F.G. Nobrega, and A. Tzagoloff, COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 1990. **265**(24): p. 14220-6.
172. Valnot, I., *et al.*, A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(8): p. 1245-9.
173. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett*, 1992. **307**(1): p. 108-12.

-
174. Wardman, P. and L.P. Candeias, Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*, 1996. **145**(5): p. 523-31.
 175. Gaetke, L.M. and C.K. Chow, Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003. **189**(1-2): p. 147-63.
 176. Thony-Meyer, L., A heme chaperone for cytochrome c biosynthesis. *Biochemistry*, 2003. **42**(45): p. 13099-105.
 177. Brown, B.M., *et al.*, Heme O synthase and heme A synthase from *Bacillus subtilis* and *Rhodobacter sphaeroides* interact in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 2004. **43**(42): p. 13541-8.
 178. Barros, M.H. and A. Tzagoloff, Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2002. **516**(1-3): p. 119-23.
 179. Gibney, B.R., *et al.*, Self-assembly of heme A and heme B in a designed four-helix bundle: implications for a cytochrome c oxidase maquette. *Biochemistry*, 2000. **39**(36): p. 11041-9.
 180. Lauraeus, M., *et al.*, *Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem-A-containing terminal oxidases. *Eur J Biochem*, 1991. **197**(3): p. 699-705.
 181. Saraste, M., *et al.*, The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme. *Eur J Biochem*, 1991. **195**(2): p. 517-25.
 182. Pereira, M.M., M. Santana, and M. Teixeira, A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1505**(2-3): p. 185-208.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
abs.	absolut
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxosulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CIAP	calf intestine alkalic phosphatase
COX	Cytochrom <i>c</i> Oxidase
Cyt	Cytochrom
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid
Dig	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung

Anhang

Gm	Gentamycin
h	Stunde
Hac	Essigsäure
HAS	Häm <i>a</i> Synthase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani-Medium
LDS	Lithiumdodecysulfat
min	Minute
mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol
mtDNA	Mitochondriale DNA
mV	Millivolt
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

Anhang

QOX	Ubichinol-Oxidase
red	reduziert
Rif	Rifampicin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
SV	Säulenvolumen
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMBZ	3-3'-5-5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Trypton-Yeast-Extrakt
U	Unit
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
UZ	Ultrazentrifuge
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Aminosäuresequenzen

Surf1c

MRRYLFPLIVGVVGCAILISLGMWQLQRLDWKEGLIAQIQQRIEGRPVPPLPA
AVNPSMKYMPVLVSGQTTGQEIDVLSGTREAGGGYQVVSFGFVTDDGRRILL
DRGFVDQDHKRAPRPPVRLEVAGNLHWPDEKGSATPEPNLTENVWFARDV
PAMAAQLGTEPVLVVAEVRGDAQGVRPIPVAVEGIPNNHLSYAAQWFMIA
AVWAGMTVALIWRIRQRQF

His₁₀-Surf1c

MARHHHHHHHHHHMRRYLFPLIVGVVGCAILISLGMWQLQRLDWKEGLIA
QIQQRIEGRPVPPLPAAVNPSMKYMPVLVSGQTTGQEIDVLSGTREAGGGYQV
VSGFVTDDGRRILLDRGFVDQDHKRAPRPPVRLEVAGNLHWPDEKGSATPE
PNLTENVWFARDVPAMAAQLGTEPVLVVAEVRGDAQGVRPIPVAVEGIPN
NHLSYAAQWFMIAAVWAGMTVALIWRIRQRQF

Surf1q

MTLRRLAALAGALAVFVALMALGVWQVQRLAWKTDLIARVEARLAEAPA
PAPGPAEWAGMDARDAEYRRVSVTGTYRADGDTLVKAVTERGPGFWVMT
PLQTPEGWTVLVNRGFVADAARDRPLPGGEVTVTGLLRMSQPGGAFLRG
NDPQAGRWYSRDTAAIAAARGLGPVAPWFLDADAHGDAQPVGGLTVVRF
RNSHLGYAATWFSLAALWAGWLLWARRRGARD

His₁₀-Surf1q

MARHHHHHHHHHHVTLRRLAALAGALAVFVALMALGVWQVQRLAWKTD
LIARVEARLAEAPAPAPGPAEWAGMDARDAEYRRVSVTGTYRADGDTLVK
AVTERGPGFWVMTPLQTPEGWTVLVNRGFVADAARDRPLPGGEVTVTGL
LRMSQPGGAFLRGNDPQAGRWYSRDTAAIAAARGLGPVAPWFLDADAHGDA
QAPVGGGLTVVRFNRNSHLGYAATWFSLAALWAGWLLWARRRGARD

Publikationen

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

Bundschuh, F.A., Hoffmeier, K., and B. Ludwig, *Two variants of the assembly factor Surfl target specific terminal oxidases in Paracoccus denitrificans*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(10): p. 1336-43.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Freya Alena Bundschuh
Geburtstag und -ort	17.05.1979 in Darmstadt
Wohnort:	Nieder Kirchweg 3, 65934 Frankfurt am Main

Berufserfahrung

09.2009 – heute	Wissenschaftliche Assistentin Goethe-Universität, Frankfurt am Main Institut für Biochemie, Membrane Transport Machineries
06.2004 – 08.2009	Wissenschaftliche Assistentin Goethe-Universität, Frankfurt am Main Institut für Biochemie, Molekulare Genetik
11.2003 – 03.2004	Laborpraktikum University of Waikato, Department of Biological Sciences, Thermophile Research Unit, Hamilton, Neuseeland

Ausbildung

06.2004 – heute	Promotionsstudium in Biochemie Goethe-Universität, Frankfurt am Main Thema: Häm-Kupfer-Oxidase aus <i>Paracoccus denitrificans</i>
09.2003	Diplomarbeit in Biochemie, Note: sehr gut Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main Institut für Biochemie, Molekulare Genetik Thema: Konstruktion und Charakterisierung von <i>Surf1</i> - Deletionsmutanten in <i>Paracoccus denitrificans</i>

Anhang

10.1998 – 09.2003	Studium der Biochemie Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie, Zellbiologie
1995 – 1998	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt am Main, Abitur
1989 – 1995	Helene-Lange-Gymnasium, Frankfurt am Main, mittlere Reife

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Freya Alena Bundschuh, geboren am 17.05.1979, die hier vorgelegte Dissertation „Untersuchungen zur Funktion des Oxidase-Biogenesefaktors Surf1 aus *Paracoccus denitrificans*“ selbständig und nur unter zu Hilfenahme der hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht und weder diese noch eine andere Arbeit vorgelegt.

Frankfurt am Main

Freya Alena Bundschuh

Danksagung

Die Anfertigung dieser Arbeit war nur Dank der zahlreichen Unterstützung vieler Seiten möglich. Hierfür bedanke ich mich an dieser Stelle bei:

Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Überlassung dieses spannenden Themas und Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine unerschöpfliche Bereitschaft zur Diskussion, Unterstützung und optimale Betreuung.

Prof. Klaas Martinus Pos für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Möglichkeit mich weiterhin an „meinem“ Protein auszutoben und vor allem die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe.

Dr. Oliver Anderka für seinen Einsatz für Surf1 und die engagierte Zusammenarbeit, sowie langwierige aber konstruktive Paperkorrekturen.

Dr. Orla Slattery für ihren Enthusiasmus und Optimismus bei den ersten Surf1-Kristallisationsversuchen.

Dr. Thomas Kleinschroth für die jahrelange tolle Laborgemeinschaft und die „besten“ Witze der Welt, die ich sehr vermisse.

Dem Schlappmaul Frau Andrea “Herrmännche” Herrmann für die tolle technische Unterstützung, grenzenlose Geduld und Verständnis für das Chaos in meinem Kopf.

Hans-Werner Müller für Oxidaseaufreinigungskurse, Fußballfachgespräche und wunderbare Raucherpausen auf der stillen Treppe.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Molekulare Genetik für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern für Unterstützung, ohne die ich dieses lange Studium niemals heil überstanden hätte.

Meiner kleinen Schwester T, die mich immer unterstützt und aufgebaut hat und wohl am meisten unter meinen Launen zu leiden hatte.

Krachim für alles, aber besonders für seine Geduld und Kaffee ans Bett.