



Strukturelle und funktionelle Untersuchungen  
am Cytochrom  $bc_1$ -Komplex aus  
*Paracoccus denitrificans*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie

von Oliver Anderka  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2005

(DF1)



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

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig, Prof. Dr. U. Brandt

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





*meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Oxidative Phosphorylierung und Atmungskette	1
1.1.1	Aufbau der Atmungskette	2
1.1.2	Modellorganismus <i>Paracoccus denitrificans</i>	3
1.1.3	Respiratorische Superkomplexe	5
1.2	Der Cytochrom $bc_1$ -Komplex	6
1.2.1	Untereinheitenzusammensetzung und genetische Organisation	7
1.2.2	Struktur des $bc_1$ -Komplexes	7
1.2.3	Das Rieske-[2Fe-2S]-Protein	10
1.2.4	Mechanismus des $bc_1$ -Komplexes	14
1.2.5	Struktur von $b_6f$ -Komplexen	19
1.3	Eisen-Schwefel-Proteine	20
1.3.1	Struktur und Funktion von Eisen-Schwefel-Proteinen	21
1.3.2	Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen	22
1.3.3	Rekonstitution und heterologe Expression von Fe-S-Proteinen	25
1.4	Zielsetzung der Arbeit	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Materialien	29
2.1.1	Chemikalien	29
2.1.2	Proteine	30
2.1.3	Chromatographiematerialien	31
2.1.4	Geräte	31
2.1.5	Lösungen	32
2.1.6	Größenstandards und Kits	36
2.1.7	Verwendete Oligonucleotide und Primer	37
2.1.8	Plasmide	38
2.1.9	Verwendete Mikroorganismen und Bakteriophagen	40
2.1.10	Antibiotika	41
2.1.11	Nährmedien	41
2.1.12	Anzucht und Lagerung	42
2.1.13	Programme und Datenbanken	42
2.2	Molekularbiologische Arbeiten	43
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)	43
2.2.2	Isolierung genomischer DNA	43
2.2.3	Restriktion von DNA	44
2.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	44
2.2.5	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	45
2.2.6	Ligation	45
2.2.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	45
2.2.8	Hitzeschocktransformation	46
2.2.9	Phosphorylierung von Oligonucleotiden	46
2.2.10	Gerichtete Mutagenese	46
2.2.11	DNA-Sequenzierung	48
2.2.12	Polymerase Chain Reaction (PCR)	48
2.2.13	Konjugation	49

## II Inhaltsverzeichnis

2.2.14	Southern Blot	50
2.3	Proteinbiochemische Arbeiten	51
2.3.1	Proteinfällung	51
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	51
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.3.4	Native Proteingelelektrophorese	53
2.3.5	Gelfärbung	54
2.3.6	Western Blot	54
2.3.7	Chemisches <i>crosslinking</i>	55
2.3.8	<i>magnetic bead pull-down assay</i>	56
2.3.9	Membranpräparation	56
2.3.10	Präparation des Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplexes	57
2.3.11	Aufreinigung des respiratorischen Superkomplexes	58
2.3.12	Expression und Aufreinigung des nativen Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub>	59
2.3.13	Aufreinigung des nativen Rieske-Fragments	59
2.3.14	Löslichkeitsbestimmung nach heterologer Expression	60
2.3.15	Aufreinigung der unlöslichen Fraktion des rekombinanten ISF	60
2.3.16	Aufreinigung der löslichen Fraktion des rekombinanten ISF	61
2.3.17	Rückfaltung des rekombinanten Rieske-Proteinfragments	62
2.3.18	Rekonstitution des rekombinanten Rieske-Proteinfragments	63
2.4	Biophysikalische Methoden	64
2.4.1	Redoxspektren	64
2.4.2	EPR-Spektren	66
2.4.3	Redox-FTIR-Spektroskopie	66
2.4.4	Analytische Ultrazentrifugation	67
2.4.5	Messung von Enzymaktivitäten	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>71</b>
3.1	Expression eines Rieske-Proteinfragments	71
3.1.1	Klonierung des Rieske-Proteinfragments	71
3.1.2	Expression der ISF-Konstrukte	73
3.1.3	Nachweis und proteolytische Entfernung des His- <i>tags</i>	78
3.1.4	Aufreinigung des H6-ISF-Proteins	80
3.1.5	Rückfaltungsexperimente	85
3.1.6	Rekonstitution des [2Fe-2S]-Zentrums	89
3.1.7	Untersuchung der löslichen Fraktion des H6-ISF	98
3.1.8	Homologe Expression des Rieske-Proteinfragments	102
3.2	Transplantation eines Epitops des Rieske-Proteins	104
3.2.1	Analyse der Epitopregion in der Kristallstruktur	104
3.2.2	Identifikation der homologen Region im <i>Paracoccus-bc</i> <sub>1</sub> -Komplex	107
3.2.3	Klonierung der Mutanten und Chimären	112
3.2.4	Biochemische Charakterisierung der Epitop-Mutanten	113
3.2.5	Analyse der Antikörperbindung	116
3.3	Assoziationszustand des Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplexes	118
3.3.1	Gewinnung eines homogenen und stabilen Präparats	118
3.3.2	Analytische Gelfiltration und Blau-Nativ-Gelelektrophorese	123
3.3.3	Analytische Ultrazentrifugationsexperimente	127
3.4	Untersuchungen am respiratorischen Superkomplex	131
3.4.1	Versuche zur Quervernetzung des Superkomplexes	131

3.4.2	Untersuchung von Deletionsstämmen	137
3.5	Gerichtete Mutagenese an sauren Resten des ISP	143
3.5.1	Planung der Mutanten	143
3.5.2	Etablierung eines neuen Mutagenesesystems	145
3.5.3	Konstruktion einer Mutagenesekassette und eines Expressionsvektors	146
3.5.4	Mutagenese der sauren Reste des ISP	147
3.5.5	Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der Fünffach-Mutante	148
3.6	FTIR-spektroskopische Untersuchungen am $bc_1$ -Komplex	151
3.6.1	Aufreinigung des $bc_1$ -Komplexes und löslicher Fragmente	151
3.6.2	Bestimmung der Chinonstöchiometrie	153
3.6.3	Protonierung von Aminosäureseitenketten in Abhängigkeit von der Chinonbindung	157
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>161</b>
4.1	Wege zur Strukturaufklärung: Rieske-Modul und Ko-Komplex von $F_V$ -Fragment und Cytochrom $bc_1$	162
4.1.1	Rekonstitution des Rieske-Holo-Proteins	163
4.1.2	Expression des Rieske-Holo-Proteins	170
4.1.3	Homologe Expression des Rieske-Proteins und Untersuchung des Transports	173
4.1.4	Generierung einer monoklonalen Antikörperbindungsstelle auf dem $bc_1$ -Komplex	176
4.2	Assoziationszustand des $bc_1$ -Komplexes und Bildung von Superkomplexen	181
4.2.1	Untersuchungen am isolierten $bc_1$ -Komplex	182
4.2.2	Wechselwirkung mit anderen Atmungskettenkomplexen	188
4.3	Protonentranslokation und Chinonbindungsstöchiometrie	195
4.3.1	Entkopplungseffekt eines sauren Restes in der Rieske-Untereinheit	196
4.3.2	Untersuchung der Chinonbindung	200
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>205</b>
	<b>Literatur</b>	<b>207</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>223</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>225</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>227</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>229</b>



# 1 Einleitung

Charakteristische Vorgänge des Lebens wie Wachstum, Teilung oder Bewegung sind offensichtlich mit einem Umsatz von Energie verbunden. Auch der außergewöhnlich hohe Grad an Ordnung, den lebende Systeme aufweisen, ist weit entfernt vom thermodynamischen Gleichgewichtszustand und kann allein durch permanente Energiewandlung aufrechterhalten werden. Im Laufe der Evolution haben sich Organismen verschiedenste Energiequellen erschlossen. Nach der Entwicklung der oxygenen Photosynthese - dem primären Prozess der Energiewandlung - reichte sich die Erdatmosphäre mit Sauerstoff an. Mit der Nutzung dieses zunächst toxischen Molekül hat die Evolution aus der Not eine Tugend gemacht: Lebewesen können den Großteil der Freien Energie von Nährstoffen oxidativ „extrahieren“.

## 1.1 Oxidative Phosphorylierung und Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) ist die primäre Energiequelle aerob lebender Organismen. Mit dem Abbau von Nährstoffen wird die Freie Energie zunächst in den Molekülen NADH und FADH<sub>2</sub> gespeichert, Nucleotiden mit hohem Elektronenübertragungspotential. Der Transfer der Elektronen von diesen Nucleotiden auf molekularen Sauerstoff erfolgt unter Bildung von Wasser und ist eine stark exergone Reaktion. Die freiwerdende Energie wird zur Synthese von ATP, dem universellen Energieträger der Zelle genutzt. Nach der chemiosmotischen Hypothese [1] erfolgt dieser Elektronentransfer über eine Atmungskette, also eine Reihe von Redoxzentren, die innerhalb großer Membranproteinkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran oder der bakteriellen Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Gekoppelt an die Elektronentransferreaktionen wird ein Protonengradient über der Membran aufgebaut, die Freie Energie der Redoxreaktionen somit in einem elektrochemischen Protonengradienten gespeichert. Der exergone Rückstrom von Protonen auf die elektronegative Seite der Membran ist im letzten Schritt dieses Prozesses mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP gekoppelt.

Dieser vom Konzept einfache Prozess ist mechanistisch äußerst komplex. Insbesondere die Frage, wie die Kopplung von Elektronentransfer und Protonentranslokation über die Membran funktioniert, ist nur ansatzweise geklärt. In den letzten Jahre hat die Erforschung der OXPHOS einen qualitativen Sprung erlebt: Nachdem es gelang, Kristallstrukturen von mehreren Membranproteinkomplexen der Atmungskette zu

## 2 Einleitung

bestimmen (z.B. [2]), eröffnen sich jetzt völlig neue experimentelle Möglichkeiten, Struktur/Funktionsbeziehungen zu untersuchen.

### 1.1.1 Aufbau der Atmungskette

Das klassische Modellsystem für die OXPHOS ist die mitochondriale Atmungskette. Vom NADH zum Sauerstoff umfasst die Elektronentransportkette drei große Membranproteinkomplexe: NADH:Q-Oxidoreduktase (Komplex I), Q:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (III) und die Cytochrom *c*-Oxidase (IV). Zwischengeschaltet sind zwei Elektronenüberträger, das Lipidmolekül Ubichinon und das hydrophile Protein Cytochrom *c*.

Komplex I transferiert zwei Elektronen von NADH auf Ubichinon, das dabei zu Ubihydrochinon reduziert wird. Auf einem mechanistisch noch unverstandenen Weg überträgt das Enzym dabei vier Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum des Mitochondriums [ $2 \text{ H}^+/\text{e}^-$ ]. Möglicherweise spielen für die Kopplung dieser Prozesse größere konformationelle Änderungen im Enzym eine Rolle [3]. Komplex I ist das größte Enzym der Atmungskette; elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen ein L-förmiges Molekül. Ein „Arm“ des Proteinkomplexes liegt dabei integral in der Membran, der andere „Arm“ ist hydrophil und ragt in den Matrixraum. NADH-Dehydrogenase trägt als Kofaktoren ein Flavinmononucleotid (FMN), ein kovalent gebundenes Phosphopantethein und acht verschiedene Eisen-Schwefel-Zentren vom Typ [ $2\text{Fe-2S}$ ] und [ $4\text{Fe4S}$ ].

Das Enzym Cytochrom *c*-Reduktase, auf das später im Detail eingegangen wird, erhält Elektronen von Ubihydrochinon und transferiert sie auf zwei Moleküle Cytochrom *c*. Daran gekoppelt überträgt es netto zwei Protonen pro oxidiertem Ubihydrochinon in den Intermembranraum [ $1 \text{ H}^+/\text{e}^-$ ]. Die Kopplung erfolgt hier nach einem Redoxschleifenprinzip, dem sogenannten Q-Zyklus [4]. Der  $bc_1$ -Komplex (Komplex III) ist ein Homodimer; die Kristallstruktur von Enzympräparationen aus verschiedenen Organismen konnte bereits bestimmt werden. Als Kofaktoren besitzt Komplex III pro Monomer drei Hämgruppen und ein Fe-S-Cluster.

Terminales Enzym der Atmungskette ist die Cytochrom-Oxidase. Von diesem Atmungskettenkomplex konnte als erstes eine Kristallstruktur bestimmt werden [5,2]. Untereinheit I der Cytochrom-Oxidase enthält zwei redoxaktive Zentren: Häm *a* und das binucleäre Zentrum aus Häm  $a_3$  und  $\text{Cu}_B$ . Untereinheit II trägt das Redoxzentrum



$\text{Cu}_A$  mit zwei Kupferionen; hier tritt das Elektron des Substrats Cytochrom *c* in das Enzym ein. Die Cytochrom-Oxidase katalysiert die Bildung von Wasser aus molekularem Sauerstoff am binucleären Zentrum. Die vier Protonen, die für die Bildung von zwei Wassermolekülen aus einem  $\text{O}_2$ -Molekül benötigt werden, werden aus dem mitochondrialen Matrixraum aufgenommen. Neben diesen sogenannten „chemischen Protonen“ transportiert Komplex IV vier „Pumpprotonen“ [ $1 \text{ H}^+/\text{e}^-$ ] vom Matrixraum in den Intermembranraum. Der exakte Pumpmechanismus wird intensiv untersucht und ist Gegenstand kontroverser Diskussionen [6].

Einen „Quereinstieg“ in die Atmungskette bieten verschiedene Dehydrogenasen, von denen die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) den prominentesten Vertreter darstellt. Hier werden Elektronen von  $\text{FADH}_2$  auf Ubichinon übertragen. Im Gegensatz zur NADH-Dehydrogenase überträgt Komplex II keine Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Auf die Succinat-Dehydrogenase soll hier nicht weiter eingegangen werden, genauso wenig auf die ATP-Synthase (Komplex V), die in der zweiten Phase der oxidativen Phosphorylierung als „molekulare Turbine“ den exergonen Rückstrom von Protonen in den Matrixraum für die Synthese von ATP nutzbar macht.

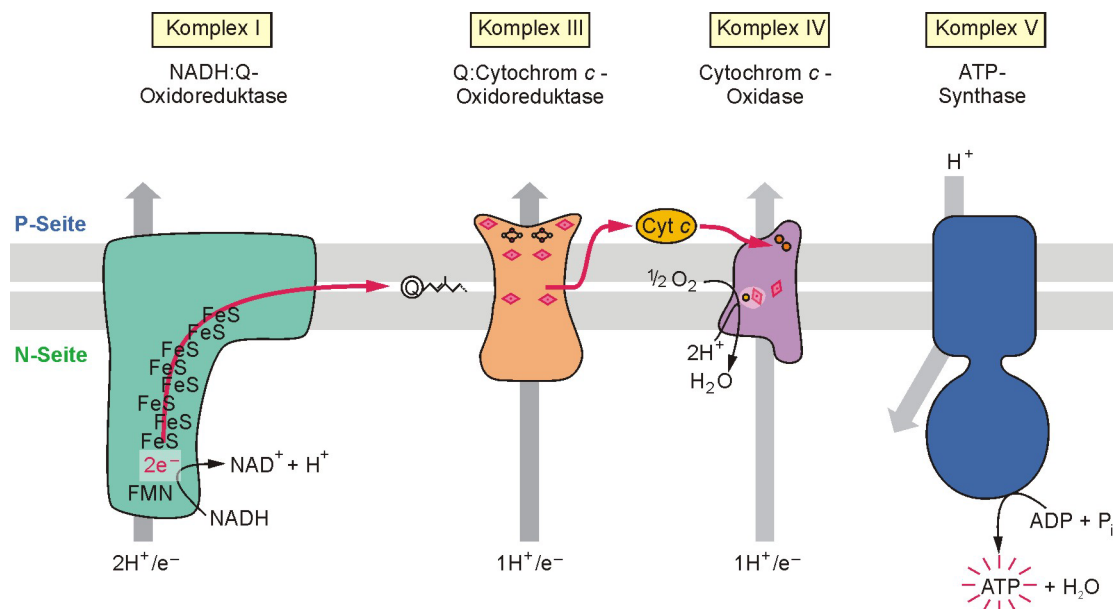


Abbildung 1 Schematische Übersicht zu den Atmungskettenkomplexen.

### 1.1.2 Modellorganismus *Paracoccus denitrificans*

Der Endosymbiontentheorie [7] zufolge sind Mitochondrien Organellen endosymbiontischen Ursprungs. Demnach wäre ein freilebendes, zur aeroben Atmung

#### 4 Einleitung

befähigtes Bakterium von einer amöboiden, auf Fermentation angewiesenen Zelle aufgenommen worden. Im Laufe der Evolution hätte der Endosymbiont weitgehend seine Autonomie verloren und sich im wesentlichen auf den OXPHOS-Prozess „im Dienste“ der Wirtszelle beschränkt.

Die Ahnen heutiger Mitochondrien werden in der  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien gesehen [8,9]. Zu diesen zählt auch *Paracoccus denitrificans*, ein gramnegatives, kokkenförmiges und unbewegliches Bodenbakterium [10,11]. Unter aeroben Anzuchtbedingungen exprimiert *P. denitrificans* eine Atmungskette, die weit reichende Übereinstimmungen mit der mitochondrialen Atmungskette aufweist. Die zu den Komplexen I, III und IV äquivalenten Enzyme besitzen zwar deutlich weniger Untereinheiten als im mitochondrialen System; die katalytisch essentiellen, Redox-Kofaktor tragenden Untereinheiten (UE) finden sich jedoch in *Paracoccus* komplett wieder. Vergleicht man die jeweiligen Primärsequenzen, zeigt sich ein hohes Maß an Sequenzidentität: Die Atmungsenzyme von *P. denitrificans* sind offenkundig homolog zu denen der Mitochondrien. Den stichhaltigsten Beleg hierfür liefert der Vergleich der Kristallstrukturen der Cytochrom-Oxidasen von *P. denitrificans* und Rind [5,2]: Die drei zentralen Untereinheiten gleichen sich in hohem Maß. In *P. denitrificans* sind die für die respiratorischen Komplexe codierenden Gene zum größten Teil in Genclustern organisiert. Eukaryoten weisen hier einen zusätzlichen Grad an Komplexität auf: Ein Teil der Gene für die Atmungskettenkomplexe ist auf dem mitochondrialen Genom codiert, der überwiegende Teil findet sich jedoch im nucleären Genom. Zusammenfassend machen die nahe Verwandtschaft der Enzymkomplexe bei gleichzeitigem einfacheren Aufbau sowie die problemlose mikrobiologische Handhabung und vor allem die gegenüber Eukaryoten deutlich erleichterte genetische Manipulierbarkeit *P. denitrificans* zu einem attraktiven Modellsystem für die Erforschung der Enzyme der Atmungskette.

Über das mitochondriale Komplement hinaus verfügt *P. denitrificans* über alternative Elektronentransportwege, um auf wechselnde Umweltbedingungen flexibel reagieren zu können. So besitzt das Bakterium zwei weitere terminale Oxidasen [12]: eine *cbb*<sub>3</sub>-Oxidase, die bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck verstärkt exprimiert wird, und eine *ba*<sub>3</sub>-Chinoloxidase, die die direkte Oxidation von Hydrochinon unter O<sub>2</sub>-Verbrauch katalysiert. Ein weiterer - namensgebender - Atmungsweg für *P. denitrificans* ist die Denitrifikation, die dem Bakterium auch ein anaerobes Wachstum ermöglicht.

### 1.1.3 Respiratorische Superkomplexe

Die Vorstellung darüber, wie die Atmungskette in der Membran angeordnet sein könnte, hat sich im Laufe der vergangenen 50 Jahre mehrfach gewandelt. Ursprünglich wurde angenommen, dass diese funktionelle Einheit auch eine strukturelle Einheit bildet; dies ist das sogenannte *solid state*-Modell [13]. Die ersten Präparationsversuche lieferten jedoch durchweg individuelle Atmungskettenenzyme, die in dieser Form auch funktionell waren (Übersicht in [14]). Diese experimentellen Befunde führten dazu, dass das *solid state*-Modell zunehmend durch ein *liquid-state*-Modell verdrängt wurde. Hier stellt man sich die einzelnen Atmungskettenkomplexe als freie und unabhängig voneinander im zweidimensionalen Membranraum diffundierende Einheiten vor. Der erfolgreiche Elektronentransfer entlang der Kette hängt demnach von zufälligen Kollisionen der Einzelkomponenten ab [15,16]. Diese Vorstellung befindet sich im Einklang mit dem Flüssigmosaikmodell biologischer Membranen [17].

Einige Aufreinigungsprotokolle, mit denen zwei oder mehr Atmungskettenkomplexe gemeinsam isoliert werden konnten, was somit Hinweise auf permanente Assoziate lieferte, führten zu einer zaghaften Wiederbelebung des *solid state*-Modells [18,19,20]. Neuere Studien belegen überzeugend, dass mitochondriale Atmungskettenkomplexe aus Rind und Hefe nicht zufällig in der inneren Mitochondrienmembran verteilt sind, sondern vielmehr eine elektrophoretisch und chromatographisch nachweisbare, stöchiometrisch zusammengesetzte strukturell-funktionelle Einheit bilden, die als Superkomplex oder Respirasom bezeichnet wird [21,22]. Bei Rinderherzmitochondrien konnte ein stöchiometrischer Verbund der Komplexe I, III und IV nachgewiesen werden; Succinat-Dehydrogenase und ATP-Synthase sind nicht Bestandteil dieser strukturellen Einheit.

Auch in den Atmungsketten von *P. denitrificans*, *Corynebacterium glutamicum*, des thermophilen Bakteriums PS3 sowie *Sulfolobus sp.* konnten supramolekulare Assoziate nachgewiesen werden [23,24,25,26]. In diesen Arbeiten wurden jedoch lediglich stabile Interaktionen von Cytochrom *c*-Reduktase und Cytochrom-*c*-Oxidase gefunden; dieser Verbund funktionierte enzymatisch als Chinoloxidase. Eine Beteiligung von Komplex I wie im Falle der rindermitochondrialen Atmungskette konnte jedoch nicht gezeigt werden. Möglicherweise ist Komplex I also nicht Teil dieser bakteriellen Superkomplexe. Eine andere Erklärung besteht darin, dass NADH-Dehydrogenase in der Cytoplasmamembran noch Teil dieser strukturellen Einheit ist, aber aufgrund einer

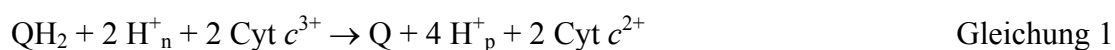
## 6 Einleitung

ausgeprägten Detergenzsensitivität nicht chromatographisch mitisoliert werden kann. Dafür spricht, dass der bakterielle Komplex I bislang nur in wenigen Fällen intakt isoliert werden konnte [27,28,29,30].

Für den biologische „Nutzen“ von Superkomplexen als Respirasomen - funktionell und strukturell autonomen Einheiten der zellulären Atmung - sprechen mehrere Punkte. Zum einen müssten die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom *c* ihre Reaktionspartner nicht durch Diffusion und zufällige Kollision finden, sondern könnten direkt „durchgereicht“ werden (*substrate channeling*). In diesem Zusammenhang muss man erwähnen, dass *P. denitrificans* über ein untypisches, nämlich mit Membrananker versehenes Cytochrom *c*<sub>552</sub> verfügt, welches als Teil des Chinoloxidase-Verbundes mitisoliert werden konnte [23] - hier könnte das *substrate channeling* also so weit optimiert worden sein, dass das Substrat Cytochrom *c* fest im Superkomplex verankert werden kann. Das *substrate channeling* macht die Elektronentransferreaktionen zwischen den Einzelkomplexen unabhängig vom Vorhandensein eines Substratpools und dessen momentanen Redoxzustand. Das „Durchreichen“ der Substrate könnte auch zu einer Reaktionsbeschleunigung führen und für die Effizienz der Energietransduktion in der OXPHOS bedeutsam sein. Auch die Vermeidung radikalischer Intermediate, regulatorische Aspekte und nicht zuletzt die mögliche strukturelle Stabilisierung der Einzelkomponenten im Superkomplex liefern funktionelle Argumente für diese Form der Organisation.

### 1.2 Der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex

Der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex (Ubihydrochinon: Cytochrom *c*-Oxidoreduktase) ist das mittlere Glied der Atmungskette. Die katalysierte Reaktion wird durch folgende Stöchiometrie beschrieben:



Zwei Elektronen von Ubihydrochinon werden auf zwei Cytochrom *c*-Moleküle übertragen. Die Freie Energie dieser Reaktion wird dazu genutzt, Protonen gegen das Potentialgefälle der Membran zu verschieben.

Der „prototypische“ mitochondriale *bc*<sub>1</sub>-Komplex ist Teil einer Familie von Cytochrom *bc*-Komplexen. Diese Enzymklasse ist weit verbreitet in den drei Reichen des Lebens. Sie spielt eine wesentliche Rolle in verschiedenen für die Biosphäre maßgeblichen

Prozessen und trägt ~ 30 % der globalen biologischen Energiewandlung [31]. *bc*-Komplexe sind zentrale Glieder mitochondrialer und bakterieller Atmungsketten, Partner des purpurbakteriellen Reaktionszentrums in der zyklischen Photophosphorylierung, und sind ferner an der bakteriellen Stickstofffixierung und Denitrifikation beteiligt. Die Untergruppe der *b<sub>6</sub>f*-Komplexe koppelt die Photosysteme I und II in grünen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien. Mit der biologischen Bedeutung geht eine große biotechnologische Relevanz einher: Das Chinoloxidationszentrum ist ein wichtiger Angriffsort für Fungizide [32] und auch ein wertvolles *target* in der Bekämpfung von Malaria [33,34].

### 1.2.1 Untereinheitenzusammensetzung und genetische Organisation

Allen *bc<sub>1</sub>*-Komplexen sind drei Untereinheiten mit redoxaktiven Kofaktoren gemein: Cytochrom *b* (Cyt *b*) mit zwei Hämen, Cytochrom *c<sub>1</sub>* (Cyt *c<sub>1</sub>*) mit einem kovalent gebundenen Häm und das ein [2Fe-2S]-Cluster tragende Rieske-Protein (ISP). Das Enzym aus *P. denitrificans* besteht lediglich aus diesen drei Untereinheiten [35]. Eukaryotische Komplexe enthalten darüber hinaus bis zu acht weitere UE [36] von z.T. noch ungeklärter Funktion. Auf diese „akzessorischen“ UE wird hier nur am Rande eingegangen. Die eukaryotischen und bakteriellen Homologen der UE Cyt *b* und ISP zeigen hohe Sequenzähnlichkeit; bei Cyt *c<sub>1</sub>* ist die Verwandtschaft weniger ausgeprägt.

Von den Strukturgenen des eukaryotischen Enzyms ist lediglich das für Cyt *b* auf dem Mitochondriengenom codiert; die übrigen Gene sind nucleär lokalisiert [37]. Aus diesem „Zwiespalt“ heraus erklärt sich möglicherweise auch die Funktion einiger akzessorischer UE: Eventuell werden sie für den komplexen Import- und Assemblierungsprozess des Enzyms benötigt. In *P. denitrificans* sind die drei Gene für den *bc<sub>1</sub>*-Komplex im *fbc*-Operon organisiert [38]: *FbcF* codiert für das Rieske-Protein, *fbcB* für Cyt *b* und *fbcC* für Cyt *c<sub>1</sub>*. Die Strukturgene folgen direkt aufeinander und sind lediglich durch zehn bis zwölf Nucleotide getrennt. Die Promotorstruktur konnte noch nicht bestimmt werden, es wird aber vermutet, dass das *fbc*-Operon unter der Kontrolle einer „Haushaltsgen“-RNA-Polymerase steht, analog zur  $\sigma_{70}$ -RNA-Polymerase von *E. coli* [39].

### 1.2.2 Struktur des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes

Der Aufbau des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes wurde in den vergangenen Jahrzehnten unter anderem in chemischen Modifikationsexperimenten [40], Proteolyseversuchen [41], mit

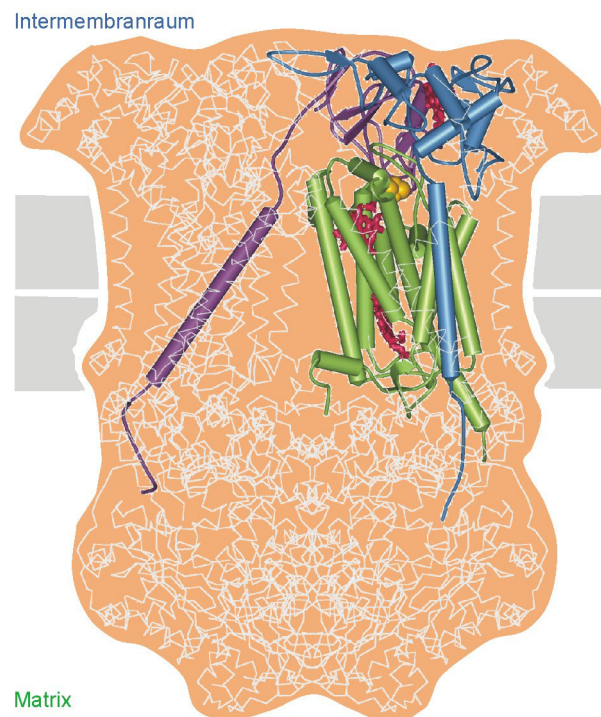
## 8 Einleitung

spektroskopischen Sonden [42] sowie molekulargenetisch [43] intensiv erforscht. Bereits in den 1980er Jahren konnten Kristalle des eukaryotischen Komplex III gewonnen werden [44]. Es dauerte jedoch bis Ende der 90er Jahre, ehe Kristallstrukturen des Komplexes aus verschiedenen Organismen bestimmt werden konnten [45,46,47]. Die höchstauflösende Struktur (2,3 Å) wurde für das Stigmatellin-inhibierte Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen [48]. Von diesem Enzym liegen ferner eine Kristallstruktur für den ternären Komplex mit dem Substratprotein Cytochrom *c* [49], sowie eine Struktur mit dem im Chinoloxidationszentrum gebundenen Inhibitor UHDBT vor [50]. Das Hefeenzym wurde in den drei genannten Arbeiten mit einem rekombinanten F<sub>v</sub>-Fragment gegen die Rieske-UE kokristallisiert. Das Antikörperfragment vergrößert die hydrophilen Bereiche, die aus der Protein-Detergenz-Mizelle herausragen und erleichtert somit die Ausbildung von Kristallkontakten [51]. In jüngster Zeit konnten ferner die Kristallstrukturen zweier *b<sub>6</sub>f*-Komplexe bestimmt werden [52,53]. Strukturen prokaryotischer Enzyme sind derzeit noch nicht bekannt.

Die kristallographisch untersuchten Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexe sind Dimere; es gibt Hinweise, dass auch die prokaryotischen Komplexe als Dimer vorliegen [54,55,56]. Die größte katalytische UE ist das Cytochrom *b* mit acht Transmembranhelices und vier horizontalen Helices auf der Intermembranseite des Komplexes. N- und C-Terminus liegen auf der Matrixseite. Cyt *b* trägt zwei Hämgruppen, Häm *b<sub>L</sub>* (niedriges Mittelpunktspotential  $\sim -30$  mV) auf der Intermembranseite und Häm *b<sub>H</sub>* (hohes Mittelpunktspotential:  $E_m \sim +120$  mV) nahe der Matrixseite. Neben den unterschiedlichen Redoxpotentialen besitzen die beiden chemisch identischen Hämgruppen unterschiedliche, wenn auch überlappende Absorptionsspektren; diese charakteristischen Unterschiede beruhen auf der lokal unterschiedlichen Proteinumgebung von Häm *b<sub>L</sub>* und Häm *b<sub>H</sub>*. Beide Häme liegen in einer Art Kanal, der von den Transmembranhelices A-D gebildet wird; die axialen Histidinliganden liegen auf den Helices B und D. Zwei distinkte Inhibitorbindungsstellen liegen im Cytochrom *b*; sie reflektieren zwei auf entgegengesetzten Seiten der Membran liegende Substratbindungstaschen. Antimycin als prototypischer Q<sub>i</sub>-Inhibitor bindet nahe Häm *b<sub>H</sub>* auf der elektronegativen Seite der Membran. Für das Q<sub>o</sub>-Zentrum auf der elektropositiven Membranseite unterscheidet man zwei verschiedene Inhibitorunterklassen, die in unterschiedlichen, wenn auch überlappenden Bereichen

binden. Stigmatellin, UHDBT, HHDBT oder NQNO sind sogenannte Klasse I-Inhibitoren, die relativ zu Häm  $b_L$  in einer distalen Position binden und mit der ISP-Ektodomäne (Abschnitt 1.2.3) wechselwirken. Typ II-Inhibitoren wie Myxothiazol oder MOA-Stilben binden tiefer in der  $Q_6$ -Tasche, proximal zu Häm  $b_L$  [57].

Cytochrom  $c_1$  besitzt einen C-terminalen Membrananker, die katalytische Domäne liegt im Intermembranraum. Diese besteht aus sechs  $\alpha$ -Helices und einem zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit löslichen  $c$ -Typ-Cytochromen. Häm  $c$  ist im Gegensatz zu den  $b$ -Hämen über Thioetherbrücken kovalent mit dem Protein verknüpft und besitzt als axiale Liganden ein Histidin und ein Methionin. Cyt  $c_1$  trägt die Bindungsstelle für das Substratprotein Cytochrom  $c$ . Auf der Oberfläche von Cyt  $c_1$  findet sich ein negativ geladener Bereich in der Nähe der Hämtasche; Cytochrom  $c$  trägt in entsprechender Position einen Ring von Lysin. Das Andocken des Substrats wird somit vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt. Den unmittelbaren Kontakt im Enzym-Substrat-Komplex hingegen stellen hydrophobe Wechselwirkungen und Kation- $\pi$ -System-Bindungen her [49].



**Abbildung 2 Übersicht zur Struktur des  $bc_1$ -Komplexes.** Das Modell wurde mit dem Programm WebLabViewer auf Basis der Koordinaten 1EZV des Hefeenzym [48] erstellt. Die Position der Membran und die Oberflächenkontur sind angedeutet. Das Polypeptid-Rückgrat aller Untereinheiten des dimeren Komplexes sind hellgrau dargestellt. Für ein funktionelles Monomer sind die katalytischen UE mit schematischer Wiedergabe der Sekundärstruktur gezeigt: Cyt  $b$  in grün, Cyt  $c_1$  in blau, ISP in violett. Die Häm-Kofaktoren sind rot dargestellt, das [2Fe-2S]-Zentrum in gelb.

### 1.2.3 Das Rieske-[2Fe-2S]-Protein

Das charakteristische EPR-Signal lieferte den Anhaltspunkt für die Aufreinigung des Rieske-Fe-S-Proteins (ISP) aus Komplex III von Rindermitchondrien [58]. Die Funktion blieb zunächst unklar; in der Folge wurde es als der „Oxidationsfaktor“ des mitochondrialen Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes identifiziert [59]. Später konnte das Rieske-Protein auch in den bakteriellen  $bc_1$ -Komplexen [60], den plastidiären und cyanobakteriellen  $b_6f$ -Komplexen [61] sowie in der Atmungskette der Archeae [62] nachgewiesen werden. Einen mit den Rieske-Proteinen verwandten phylogenetischen Zweig bilden die Rieske-Typ-Proteine, Untereinheiten NAD(P)H-abhängiger Dioxygenasen, die aromatische Verbindungen abbauen [63]. Rieske- und Rieske-Typ-Proteinen ist folgendes Sequenzmotiv gemein:

**Cys-X-His-X<sub>15-47</sub>-Cys-X-X-His**

In Rieske-Proteinen finden sich drei weitere absolut konservierte Reste (unterstrichen):

**Cys-X-His-X-Gly-Cys-X<sub>12-44</sub>-Cys-X-Cys-His**

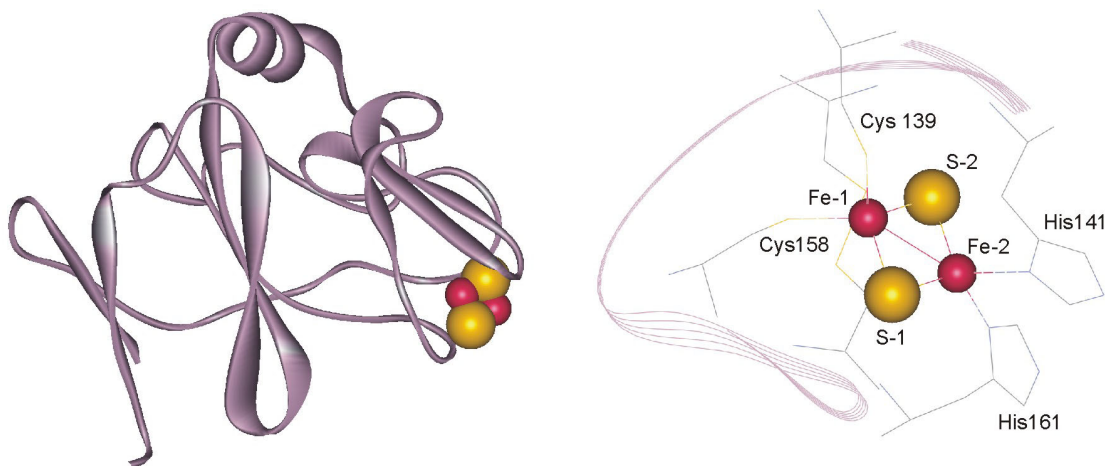
Das Rieske-Protein weist eine ähnliche Topologie auf wie das Cyt  $c_1$ , jedoch mit umgekehrten Vorzeichen: Die membranverankere, lange  $\alpha$ -Helix befindet sich am N-Terminus, die C-terminale Hälfte liegt als redoxaktive, hydrophile Domäne im Intermembranraum (Ektodomäne). Zwischen beiden Teilen des Proteins liegt ein kurzes Verbindungsstück. Eine überraschende Beobachtung in den Kristallstrukturen war, dass das Rieske-Protein die beiden Dimerhälften des  $bc_1$ -Komplexes kreuzweise verschränkt. Ein ISP ist strukturell im Membranbereich der einen Dimerhälfte verankert, ragt aber mit dem katalytischen Kopf in die andere Dimerhälfte und bildet dort mit Cyt  $b$  und Cyt  $c_1$  eine funktionelle Einheit.

Die Primärstruktur des N-terminalen Abschnitts bakterieller und plastidiärer Rieske-Proteine weist auf einen Einbau in die Membran über den *twin arginine translocation* (Tat) bzw.  $\Delta$ pH-Weg hin [64]. Im Chloroplastensystem wurde dies experimentell bestätigt [65]. In Bakterien konnte bislang nur in einer Studie gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Tat-Translocons die Bildung eines  $bc_1$ -Komplexes verhindert. Bakterielle ISPs scheinen die für Tat-Substrate charakteristische Sequenzsignatur (S/T-R-R-x-F-L-K) zu besitzen, die Rieske-Proteine von Chloroplasten weisen statt des üblichen Argininpaars ein Lysin-Arginin-Paar auf. Rieske-Proteine sind insofern außergewöhnliche Tat-Substrate, als das N-terminale Exportsignal nicht abgespalten



wird, sondern als Membrananker dient. Der eigentliche Einbau des ISP in den  $bc_1$ -Komplex ist weder im prokaryotischen noch im mitochondrialen System geklärt. Im mitochondrialen Fall scheint das ISP eine der letzten UE zu sein, die in den präassemblierten Komplex eingebaut werden [66].

Die redoxaktive Ektodomäne des Rieske-Proteins kann als *iron sulfur protein fragment* (ISF) proteolytisch aus dem Gesamtkomplex präpariert werden. Mit dem ISF aus Rind konnte röntgenkristallographisch die erste Struktur einer Komponente des  $bc_1$ -Komplexes bestimmt werden [67]. Das ISF ist ein kompaktes sphärisches Protein; die Struktur besteht aus drei Schichten antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter, eine kurze  $\alpha$ -Helix und eine längere Schleife werden von einem Polypeptidsegment zwischen den  $\beta$ -Strängen 3 und 4 gebildet. Das [2Fe-2S]-Cluster ist in einer separaten kleinen Domäne (*cluster binding fold* im Gegensatz zum *base fold*) gebunden, die sich aus kurzen *loop*-Regionen bildet. Sie ist intern durch eine Disulfidbrücke stabilisiert und durch ein extensives Salz/Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit dem *base fold* verankert. Hochkonservierte Reste finden sich vor allem in den *loop*-Regionen des Proteins [68]. Außer der Struktur des Rinder-ISF konnten unter anderem auch die Strukturen des ISF aus dem  $b_6$ -Komplex von Spinat [69], aus einem putativen  $bc_1$ -Komplex des Bakteriums *Thermus thermophilus* [70], sowie die Struktur eines Rieske-Typ-Proteins aus *Pseudomonas sp.* [71] bestimmt werden. Die Struktur eines ISF aus  $\alpha$ -Proteobakterien wie *P. denitrificans* steht bislang noch aus.



**Abbildung 3 Struktur des Rieske-Proteins.** **a** Bändermodell der Ektodomäne des bovinen ISP (Koordinaten 1RIE). Im Kugelmodell sind die Atome des Metallzentrums dargestellt (Schwefel gelb, Eisen rot). **b** Detailansicht der Clusterumgebung. Ligandierende Reste und Aminosäuren, die H-Brücken zum Fe-S-Cluster ausbilden, sind als Stabmodell gezeigt.

Die Strukturen der bekannten Rieske- und Rieske-Typ-Proteine ähneln sich insbesondere in der Clusterbindedomäne. Sequenzalignments und Strukturen zeigen jedoch, dass viele Rieske-Proteine über den strukturellen Kern hinaus verschiedene Variationen zeigen [68]. In mitochondrialen ISP stellt die bereits erwähnte Helix und Schleife zwischen  $\beta 3$  und  $\beta 4$  eine Erweiterung des Rieske-*fold*s dar, die mit dem „Boden“ der Clusterbindedomäne wechselwirkt. In  $\alpha$ -proteobakteriellen Komplexen ist diese Insertion noch ausgedehnter. Rieske-Proteine aus *b<sub>6</sub>f*-Komplexen besitzen eine  $\beta 1$ - $\beta 2$ -Insertion von 11 AS mit einem kurzen zusätzlichen  $\beta$ -Strang und einer  $\alpha$ -Helix sowie einen um 16 AS verlängerten C-terminalen Bereich, der möglicherweise wie die  $\beta 3$ - $\beta 4$ -Insertion in mitochondrialen Rieske-Proteinen das Cluster stabilisiert. Faltblatt 1 ist stark gekrümmt, statt eines Sandwichs bildet es eine  $\beta$ -Fasstruktur mit Faltblatt 2. In Rieske-Proteinen schirmt eine Disulfidbrücke das Cluster von einer Seite ab; von der gegenüberliegenden Seite schützt der sogenannte *Pro-loop*  $\beta 8$ - $\beta 9$  mit dem hochkonservierten Sequenzelement Gly-Pro-Ala-Pro das [2Fe-2S]-Zentrum. Mutationen im *Pro-loop* führen meist zum Verlust des Clusters [72]. Rieske-Typ-Proteinen fehlt genannte Disulfidbrücke. Die *Pro*-Schleife ist länger und liegt nicht in der unmittelbaren Clusterumgebung [71]. Eine Stabilisierung des Clusters ist in Rieske-Typ-Proteinen scheinbar nicht nötig, da er in der Kontaktfläche zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Rieske-Typ-Dioxygenase verborgen liegt.

Das [2Fe-2S]-Cluster besitzt, anders als klassische Ferredoxine mit vier Cysteinliganden, zwei Histidin- und zwei Cysteinliganden. Diese außergewöhnliche Ligandierung wurde durch ESEEM- und ENDOR-Spektroskopie [73,74] sowie Mutagenesestudien [75,76] vorhergesagt und letztlich durch die Kristallstruktur bestätigt. Die Schleifen  $\beta 4$  und  $\beta 5$  tragen die ligandierenden Reste, jeweils ein Cystein und ein Histidin. Das Cluster sitzt an der Spitze der Bindungsdomäne. Das zum Proteininneren gewandte und durch die umgebenden Schleifen abgeschirmte Fe-1 hat zwei Cysteinliganden. Das nach außen gewandte Fe-2 ist His-ligandiert; die Histidinreste sind in Kontakt mit der wässrigen Phase. Im reduzierten Cluster ist die zusätzliche Ladung auf Fe-2 lokalisiert. Das Redoxpotential ist mit  $\sim +300$  mV ungewöhnlich hoch, wenn man es mit den  $\sim -400$  mV von vier Cys-ligandierten [2Fe-2S]-Zentren der Ferredoxine vergleicht [58]. Gründe hierfür sind die geringe Nettoladung (0/-1) des Clusters, die Elektronegativität der His-Liganden und die Lösungsmittelzugänglichkeit des Fe-2 [67]. Einen weiteren maßgeblichen Einfluß hat

ein extensives Netzwerk von H-Brücken, in die das Cluster eingebunden ist [77,78]. In  $bc_1$ -Komplexen aus Menahydrochinon-oxidierenden Organismen wie z.B. *Bacillus subtilis* liegt das Redoxpotential etwa 150 mV tiefer. Das das Cluster umgebende H-Brücken-Netzwerk ist hier weniger ausgeprägt. Das gleiche gilt auch für Rieske-Typ-Cluster, deren Mittelpunktspotential bei  $\sim -100$  mV liegt. Die hydrophobe Umgebung des Clusters senkt das Potential hier noch zusätzlich. Das Mittelpunktspotential des Clusters ist maßgeblich für die Geschwindigkeit des Elektronentransfers im Hochpotentialzweig des  $bc_1$ -Komplexes [79]. Mutanten mit herabgesetztem Mittelpunktspotential zeigen verringerte katalytische Aktivität. Die Reduktion des Rieske-Proteins scheint somit direkt am oder unmittelbar vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des  $bc_1$ -Reaktionsmechanismus zu stehen [77,80].

Das [2Fe-2S]-Cluster ist in seiner reduzierten Form paramagnetisch mit einem charakteristischen anisotropen EPR-Signal. Lage und Form insbesondere der  $g_x$ -Bande wird durch die Besetzung des  $Q_o$ -Zentrums beeinflusst [81]. Das Signal ist breit mit einem *peak* zwischen 1,75 und 1,77, wenn das  $Q_o$ -Zentrum unbesetzt ist oder Ubihydrochin bzw. einen Typ II-Inhibitor enthält, aber auch im Falle der isolierten ISP-Ektodomäne. Die Gegenwart von Ubichinon oder Typ I-Inhibitoren wie Stigmatellin verstärken das  $g_x$ -Signal und führen zu einer Hochfeldverschiebung mit  $g_x \sim 1,80$ . Untersuchungen zum Mechanismus der Chinoloxidation stützen sich wesentlich auf diese EPR-Beobachtungen. Im sichtbaren und Nah-UV-Bereich zeigt das ISP eine sehr breite redoxabhängige Absorption mit wenig ausgeprägten *peaks*. Die meisten dieser überlappenden Absorptionsbanden rühren von einem  $S \rightarrow Fe^{III}$ -Ladungstransfer her. Circular dichroismus (CD) liefert besser aufgelöste Banden und damit ein charakteristischeres Spektrum.

In der ersten Kristallstruktur konnte die katalytische ISP-Domäne nicht aufgelöst werden; über die anomale Beugung wurde jedoch das Metallzentrum in einer Position nahe der Oberfläche von Cyt *b* lokalisiert [45]. Die folgende Struktur des Hühner- $bc_1$ -Komplexes zeigt diese Domäne hingegen nicht in der zuerst beobachteten „*b*-Position“, sondern in einer vom Cyt *b* abgewandten „*c*-Position“ nahe des Cyt  $c_1$ -Häms [46]. In Gegenwart von Stigmatellin konnte jedoch auch hier eine „*b*-Position“ induziert werden. Diese unerwarteten Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die ISP-Kopfgruppe in ihrer Position im Komplex flexibel ist und einen mobilen

Elektronenüberträger zwischen den Cytochromen  $b$  und  $c_1$  darstellt [82,46]. Diese Domänenbewegung würde eine Drehung des ISP-Kopfes um  $57^\circ$  und eine Translation von  $16 \text{ \AA}$  beinhalten. Das bereits erwähnte Verbindungsstück zwischen Transmembranhelix und Ektodomäne wird als flexible Gelenkregion (*hinge*) gedeutet.

In unterschiedlichen Kristallformen des Rinderkomplexes konnte neben der schon bekannten  $c$ -Position eine dritte, intermediäre Position beobachtet werden, in der der ISP-Kopf van-der-Waals-Kontakte zu einem konformationell deutlich veränderten *ef-loop* von Cyt  $b$  zeigt [47]. Darüber hinaus postulieren die Autoren eine interne Konformationsänderung in der ISP-Domäne selbst. Während die Struktur in der  $c$ -Position der des löslichen Fragments gleicht [67], löst sich in der intermediären Position der *cluster binding fold* vom *base fold* ab, der Spalt zwischen beiden Subdomänen wird wasserzugänglich. Für die Gelenkregion wird in der  $c$ -Position eine  $3_{10}$ -Helix beschrieben, die in der intermediären Position fehlt.

### 1.2.4 Mechanismus des $bc_1$ -Komplexes

Peter Mitchell schlug als allgemeines Prinzip der Kopplung von Elektronentransport und Protonentranslokation den Redoxschleifen-Mechanismus vor [1]. Nach diesem Modell wechseln sich in der Atmungskette Protonen- und Elektronenüberträger wie etwa Ubihydrochinon mit reinen Elektronenträgern wie Cyt  $c$  ab. Die Protonenträger nehmen  $H^+$  auf der elektronegativen Seite der Membran auf und geben sie bei der Oxidation durch die reinen Elektronenträger auf der elektropositiven Seite wieder ab. Mitchell favorisierte dieses Konzept lange Zeit als allgemeingültiges Modell für alle Atmungskettenenzyme [4]. Heute findet es sich „nur“ in Form des Q-Zyklus [83] als weithin anerkannter Mechanismus des  $bc_1$ -Komplexes wieder.

Bevor der Q-Zyklus formuliert wurde, gab es zahlreiche Versuche, einen linearen Elektronentransport von Ubihydrochinon über die beiden  $b$ -Häme, ISP und Cyt  $c_1$  zum Cyt  $c$  zu konstruieren. Thermodynamische Argumente sprechen jedoch gegen einen linearen Elektronentransport: Die  $b$ -Häme besitzen ein weitaus niedrigeres Redoxpotential als Ubihydrochinon, was einen Elektronentransfer in diese Richtung unwahrscheinlich werden lässt; erst durch die Oxidation zu einem Ubisemichinon ergibt sich eine Situation, in der dieser Transfer energetisch möglich wird. Verschiedene experimentelle Ergebnisse ließen sich nicht mit einem linearen Arrangement vereinbaren. Gibt man einen Sauerstoffpuls auf zuvor langsam atmende Mitochondrien,

führt dies wie zu erwarten zu einer gesteigerten Oxidation von ISP, Cyt  $c_1$  und Cyt  $c$ . Überraschenderweise kommt es aber gleichzeitig zu einer vorübergehenden Reduktion von Cyt  $b$  - bei einem linearen Elektronentransfer wäre gleichfalls eine Oxidation zu erwarten. Gestützt auf diese Beobachtung wurde postuliert, dass die beiden Elektronen des Ubihydrochinons getrennte Wege nehmen: Die Sauerstoff-induzierte Oxidation von Cyt  $c_1$  beschleunigt die Oxidation von Ubihydrochin zum Semichinon, dieses kann auf einem zweiten Weg die  $b$ -Häme reduzieren. Mitchell verband diese Idee mit seinem Konzept der Redoxschleifen zur Q-Zyklus-Hypothese [83]. Die Reaktion läuft in zwei Teilzyklen ab. Das erste Ubihydrochinon wird am sogenannten  $Q_o$ -Zentrum oxidiert. Ein Elektron wird auf ISP übertragen, das andere auf Häm  $b_L$ . Dabei werden zwei  $H^+$  auf der positiven Seite der Membran abgegeben. Im Hochpotentialzweig gelangt das  $e^-$  über ISP zu Cyt  $c_1$  und reduziert schließlich Cyt  $c$ . Das  $e^-$  im Tiefpotentialzweig wandert über Häm  $b_L$  und Häm  $b_H$  auf die andere Seite der Membran zum  $Q_i$ -Zentrum und reduziert ein dort gebundenes Ubichinon zum Ubisemichinon-Radikal. Der zweite Teilzyklus läuft am  $Q_o$ -Zentrum genauso ab wie der erste, am  $Q_i$ -Zentrum wird das „geparkte“ Semichinon weiter zum Ubihydrochinon reduziert. Dabei werden zwei Protonen von der negativen Seite der Membran aufgenommen. Das Nettoergebnis ist in Gleichung 1 zusammengefasst.

Das entscheidende Ereignis des Q-Zyklus besteht in der Gabelung der Elektronen des Ubihydrochinon am  $Q_o$ -Zentrum. Diese Aufspaltung ist obligatorisch: Selbst wenn beide  $b$ -Häme durch den  $Q_i$ -Inhibitor Antimycin in reduziertem Zustand gehalten werden, der Tiefpotentialzweig damit blockiert wird, erfolgt kein zweiter Elektronentransfer auf den Hochpotentialzweig [84]. Eine Reihe von Hypothesen versucht, dieses scheinbare thermodynamische Paradoxon der *electron bifurcation* aufzulösen.

Entscheidenden Aufschluss über die Chinoloxidation könnte die Kenntnis des Enzym-Substrat-Komplexes liefern. Leider ist in keiner der bislang aufgeklärten Strukturen ein Chinonmolekül im  $Q_o$ -Zentrum gebunden. Enzym-Inhibitor-Komplexe zeigen jedoch eine Wasserstoffbrücke zwischen  $-N_eH$  von  $^{Bt}His161$ , einem Liganden des Rieske-Zentrums und dem in der distalen Position des  $Q_o$ -Zentrums gebundenen Typ I-Inhibitor Stigmatellin, HHDBT oder NQNO [46,50,85,85]. Im Falle von Stigmatellin ist der H-Brückenakzeptor eine Ringcarbonylgruppe. Die starke Wechselwirkung distal bindender Inhibitoren mit dem reduzierten  $[2Fe-2S]$ -Zentrum war lange vor Kenntnis

der Strukturen durch EPR-Experimente belegt [86,81,87,88]. Auch das Reaktionsprodukt Chinon zeigt diese Wechselwirkung. Gepulste EPR-Experimente bestätigen die Wasserstoffbrücke zwischen Stigmatellin und  $-N_\epsilon H$  von  $^{Bt}His161$  und zeigen, dass auch Chinon die beschriebene H-Brücke ausbildet [89]. Die Geschwindigkeit der Chinoloxidation zeigt sowohl in *steady-state* als auch in *pre-steady-state*-Experimenten eine starke pH-Abhängigkeit [90,91]. Als titrierbare Gruppe wird der Rest  $^{Bt}His161$  gehandelt, unter der Annahme, dass dieser für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes deprotoniert vorliegen muss [92,93]. Diese Annahme unterstützen Mutanten, bei denen ein veränderter pK-Wert des ISP zu einer Verschiebung des pH-Reaktionsprofils führt [94].

Nach der Natur des postulierten Enzym-Substrat-Komplexes lassen sich die zahlreichen mechanistischen Szenarien in zwei Gruppen unterteilen:

(a) ISP nimmt das erste Elektron von  $QH_2$  auf, es entsteht ein kurzlebiges, instabiles Semichinon, das als Reduktionsmittel für Cyt  $b_L$  dient. - Da das Semichinon in der distalen  $Q_0$ -Position für einen raschen Elektronentransfer zu weit von Häm  $b_L$  entfernt ist, wird ein zweites Chinonmolekül postuliert, das in proximaler Position zu Häm  $b_L$  sitzen soll und den raschen ET vermittelt [95]. Das *proton-gated charge transfer*-Modell geht gleichermaßen von einem Chinonpaar aus, das nach Symproportionierung zwei Semichinone liefert, die gleichzeitig den ET auf beide Zweige vermitteln [96]. Diese *double occupancy*-Modelle mit zwei verschiedenen stark bindenden Chinon-Spezies stützen sich auf die differentielle Titration des EPR-Signals bei Extraktion des Chinonpools [87]. Inhibitortitrationsversuche, in denen das verdrängte Ubichinon NMR-spektroskopisch quantifiziert wird, deuten ebenfalls auf eine Doppelbelegung hin [97]. Andere Modelle postulieren, dass das Semichinon von der distalen in die proximale Position wechselt und sich so die Entfernungen zwischen den verschiedenen Redoxpartnern ändern [57].

(b) ISP und  $QH_2$  bilden einen stabilen Komplex, der Cyt  $b_L$  zu reduzieren vermag; die Dissoziation in Produkte erfolgt nach dem zweiten ET. - Der *proton-gated affinity change*-Mechanismus geht von einem stabilen Semichinon aus [98]. Er stützt sich auf die Beobachtung, dass das ISP-Redoxpotential in Gegenwart von Stigmatellin deutlich erhöht ist [81]. Dies wird so erklärt, dass Stigmatellin eine sehr viel höhere Affinität zu  $ISP_{red}$  als zu  $ISP_{ox}$  besitzt und somit das Gleichgewicht in Richtung  $ISP_{red}$  verschiebt. Stigmatellin wird als Analogon zum Semichinon-Zustand angesehen [99]. Im

Analogieschluss wird also ein Semichinon-Radikal durch die Bindung an den protonierten Histidinliganden von  $\text{ISP}_{\text{red}}$  stabilisiert. Das reduzierte ISP wird in einer festen Bindung gehalten. Der ET auf Cyt  $c_1$  kann erst erfolgen, wenn das zweite  $e^-$  auf Häm  $b$  übertragen wurde, da die Affinität des verbleibenden oxidierten Chinons zum ISP um Größenordnungen niedriger ist als die des Radikals. Der Haupteinwand gegen dieses Modell liegt darin, dass das Semichinon-Radikal nicht experimentell beobachtet wird. Ein Grund dafür könnte die Kopplung der benachbarten Spins von SQ und  $\text{ISP}_{\text{red}}$  sein [98]. Ein weiteres Modell sieht einen gleichzeitigen, konzertierten Transfer beider Elektronen vor [100]. Eine interessante Variante hierzu bietet die Überlegung, dass das [2Fe-2S]-Cluster inklusive His-Liganden und  $\text{QH}_2$  ausgedehnte delokalisierte  $\pi$ -Systeme besitzen, die lediglich durch eine H-Brücke voneinander getrennt sind. In der Zeitskala, in der sich die Chinoloxidation vollzieht, könnte ein Elektron komplett über beide Systeme delokalisiert sein. Dieser Komplex könnte stark reduzierend wirken und ein Elektron auf Häm  $b_L$  übertragen, da die Reaktion ohne instabile Intermediate direkt den Weg zum EPR-spektroskopisch charakterisierten, stabilen Enzym-Produkt-Komplex  $\text{Q}\cdot\text{ISPH}_{\text{red}}$  nehmen würde [101].

Die überraschende Beobachtung, dass die ISP-Kopfgruppe beweglich ist, muss in aktuellen mechanistischen Modellen berücksichtigt werden. Sie könnte einen Schlüssel für den *bifurcation*-Mechanismus darstellen, kompliziert aber zunächst die Situation, da das ISP gewissermaßen als mobiles Substrat angesehen werden muss. Die ISP-Bewegung wurde in den letzten Jahren extensiv untersucht. EPR-Untersuchungen an orientierten Membranen zeigten, dass  $\text{ISP}_{\text{ox}}$  und  $\text{ISP}_{\text{red}}$  unterschiedliche Positionen einnehmen [102]; ähnliche Beobachtungen konnten für den *b<sub>6</sub>f*-Komplex gemacht werden [103,104]. In limitierten Proteolyseversuche konnte die Proteaseempfindlichkeit der Gelenkregion durch Typ I-Inhibitoren wie Stigmatellin verringert, durch Myxothiazol hingegen erhöht werden. Mutageneseversuche in der *hinge*-Region zeigten, dass eine Versteifung dieses Bereichs durch Einführung von Prolinresten oder Disulfidbrücken das Enzym inaktiviert [105,106,107,88]. Das gleiche gilt für die Verlängerung der *hinge*-Region [88,108,109]. Eine Verkürzung hatte hingegen keinen drastischen Effekt auf die Enzymaktivität [88]. Möglicherweise kann letzteres dadurch erklärt werden, dass eine gewisse „Federspannung“ in der *hinge*-Region nötig ist, um den Enzym-Produkt-Komplex zu trennen [110]. Generell gibt es zwei unterschiedliche Sichtweisen zur ISP-Bewegung. Es könnte sich zum einen um eine rein

diffusionsgesteuerte, stochastische Bewegung handeln. Zum anderen könnte die Bewegung durch allosterische Vorgänge und Konformationsänderungen gesteuert werden, entweder durch direkte Unterstützung der Bewegung oder indirekt, indem die Affinitäten zur *b*- und *c*-Position verändert werden [101].

Da in der  $Q_o$ -Reaktion Protonen freigesetzt, in der  $Q_i$ -Reaktion Protonen aufgenommen werden, stellt sich die Frage nach möglichen Wegen, die die Protonen nehmen. Ein  $H^+$  verlässt das  $Q_o$ -Zentrum als  $ISP_{red}\cdot H^+$ . Das zweite  $QH_2$ -Proton wird möglicherweise vom Cyt *b*-Rest  $^{Sc}Glu272$  aufgenommen. Kristallstrukturen zeigen diesen Rest als zweiten H-Brücken-Partner in der Bindung der Inhibitoren Stigmatellin [48] oder NQNO [85]; bei letzterem wird die Bindung über ein Wassermolekül vermittelt. In anderen Strukturen besitzt die Carboxylseitenkette eine andere Konformation, wendet sich von einem möglichen Bindungspartner ab und weist in Richtung von Häm  $b_L$  [46,85,50]. In dieser Richtung finden sich in der  $bc_1$ -Struktur zahlreiche Wassermoleküle [111,48]. Somit könnte das zweite  $H^+$  von der Carboxylatgruppe von  $^{Sc}Glu272$  aufgenommen und zu einem Netzwerk von  $H_2O$ -Molekülen „durchgereicht“ werden, das mit der wässrigen Phase der P-Membranseite in Kontakt steht [94].  $^{Sc}Glu272$  könnte somit auch für den Mechanismus der Chinoloxidation von Bedeutung sein; Mutanten an der entsprechenden Position im *R. sphaeroides*-Enzym zeigen eine deutlich herabgesetzte Enzymaktivität und sind Stigmatellin-resistent [94]. In chemischen Modifikationsexperimenten führte die Modifikation eines sauren Restes im ISP überraschenderweise zu einem entkoppelten Phänotyp, eine Beobachtung, die sich nicht ohne weiteres aus den gängigen Schemata erschließt [112].

Während die Substratbindung in der  $Q_o$ -Position letztlich ungeklärt ist, konnte in verschiedenen Kristallstrukturen ein Chinonmolekül in der  $Q_i$ -Position charakterisiert werden [46,48,49,85]. Übereinstimmend zeigen diese Strukturen, dass das Chinon direkt oder indirekt - *via* strukturell definierter  $H_2O$ -Moleküle - über H-Brücken an die Reste  $^{Sc}His202$ , Asp229 und Ser206 bindet. In vier Strukturen weisen die ligandierenden Reste dabei interessanterweise drei verschiedene Konfigurationen auf, was mit einer unsicheren Zuordnung der Elektronendichte oder aber auch mit struktureller Plastizität erklärt werden könnte [113]. Gepulste EPR-Experimente belegen, dass einer der  $Q$ -Liganden ein Stickstoffatom ist, das vermutlich von  $^{Sc}His202$  stammt [114]. Dieser Rest vermittelt möglicherweise den Transfer von  $H^+$  und/oder  $H_2O$  zwischen  $Q_i$  und N-



Membranseite. Ferner wird ein spezifisch gebundenes Cardiolipin-Molekül als  $H^+$ -Überträger in die  $Q_i$ -Tasche diskutiert [115].

Eine Reihe von Arbeiten deutet auf eine Wechselwirkung der beiden Dimerhälften im  $bc_1$ -Komplex hin, die über eine rein strukturelle Rolle hinausweisen [116,117,100,49]. So zeigte die Kokristallstruktur des Hefe- $bc_1$ -Komplexes mit Cyt *c* eine überraschende Korrelation zwischen Besetzung von  $Q_i$ -site in einem Monomer und der Bindung von Cyt *c* im anderen Monomer, was zu Spekulationen über eine *half-of-the-sites reactivity* Anlass gibt [49,118]. Trumpower und Mitarbeiter konnten überzeugend den Elektronentransfer zwischen den Dimerhälften demonstrieren [119]. Ob diesen Beobachtungen eine für die Funktion des Q-Zyklus essentielle oder eher eine regulatorische Rolle zugesprochen werden kann, ist unklar. In bakteriellen Systemen konnten vergleichbare Phänomene bislang nicht beobachtet werden [113].

### 1.2.5 Struktur von $b_6f$ -Komplexen

Nachdem bereits eine Fülle struktureller Information über mitochondriale  $bc_1$ -Komplexe vorliegt, konnten in jüngster Vergangenheit auch die Strukturen eines cyanobakteriellen und eines plastidären  $b_6f$ -Komplexes bestimmt werden [52,53]. Im strukturell-funktionellen Kern des Enzyms zeigen sich weitgehende Übereinstimmungen zwischen  $bc_1$ - und  $b_6f$ -Komplexen, jedoch gibt es einige bemerkenswerte Unterschiede.

Die überraschendste Beobachtung war sicher die zusätzliche Hämgruppe - Häm *x* - in direkter Nachbarschaft zu Häm  $b_H$ . Dieses zusätzliche Häm ist kovalent über einen Thioether mit Cyt  $b_6$  verbunden. Die Bindetasche für Häm *x* ist strukturell analog zur  $Q_i$ -Bindungsstelle in  $bc_1$ -Komplexen; Plastochinon bindet dementsprechend nicht in dieser Tasche, sondern an der durch Häm *x* ausgekleideten Oberfläche von Cyt  $b_6$ . Diese völlig andersgeartete Chinonbindungsstelle erklärt die Antimycin-Insensitivität von  $b_6f$ -Komplexen [120]. Experimente mit dem Antimycin-inhibierten Enzym lieferten ursprünglich die überzeugendsten experimentellen Belege für den Q-Zyklus als Mechanismus von  $bc_1$ -Komplexen; vor diesem Hintergrund wurde die Übertragbarkeit des Mechanismus auf  $b_6f$ -Komplexe wiederholt bezweifelt [121]. Es wird vermutet, dass das zusätzliche Häm *x* eine Rolle im zyklischen Elektronentransport durch PS I spielt, über den der zelluläre Bedarf an Reduktionsäquivalenten und ATP ausbalanciert wird [122].

Die ISP-Ektodomäne ist in den Kristallstrukturen in drei verschiedenen Positionen zu sehen, die sich allerdings nur um  $\sim 4 \text{ \AA}$  unterscheiden und alle eher die „*b*-Position“ repräsentieren. Eine Beweglichkeit ist also auch hier gegeben, jedoch fällt sie vermutlich geringer aus als in *bc*<sub>1</sub>-Komplexen. Das geringere Ausmaß oder die geringere Bedeutung der Rieske-Beweglichkeit zeigte sich bereits in Mutagenesestudien: Das Enzym toleriert Änderungen in der *hinge*-Region in weit höherem Maße, als dies bei *bc*<sub>1</sub>-Komplexen der Fall ist [123]. Dies könnte sich nach den strukturellen Daten daraus erklären, dass im Falle von *b<sub>6</sub>f*-Komplexen auch eine geringere Rotation über das „Scharnier“ des ISP genügt, um das [2Fe-2S]-Zentrum in Elektronentransferdistanz zum Häm *c*<sub>1</sub> zu bringen.

Cytochrom *f* übernimmt im *b<sub>6</sub>f*-Komplex die funktionelle Rolle von Cyt *c*<sub>1</sub>. Die beiden Proteine sind jedoch evolutionär nicht verwandt und besitzen stark unterschiedliche Strukturen. Die Position des Häm-Eisens ist um  $12 \text{ \AA}$  verschoben zu der im Cyt *c*<sub>1</sub>, relativ zum Cyt *b* gesehen, und auch der Winkel des Häms zur Membranebene ist deutlich verschieden. Cyt *f* wendet dem ISP eine hydrophobe Oberfläche zu; direkt unter dieser liegt die Hämgruppe und eine hochkonservierte Kette von fünf Wassermolekülen. Die Funktion dieser Wasserkette ist unbekannt.

Mit Blick auf die Membranebene besitzt der *b<sub>6</sub>f*-Komplex ein deutlich anderes Profil von TM-Helices als der *bc*<sub>1</sub>-Komplex. Dies erklärt sich aus den vier akzessorischen UE, die keine Verwandtschaft zu den sieben bis acht zusätzlichen UE mitochondrialer *bc*<sub>1</sub>-Komplexe zeigen; die großen Untereinheiten Core 1 und 2 fehlen. Neben dem bereits genannten Häm *x* trägt der *b<sub>6</sub>f*-Komplex zwei weitere Kofaktoren unbekannter Funktion, ein Chlorophyll *a* und ein  $\beta$ -Carotin.

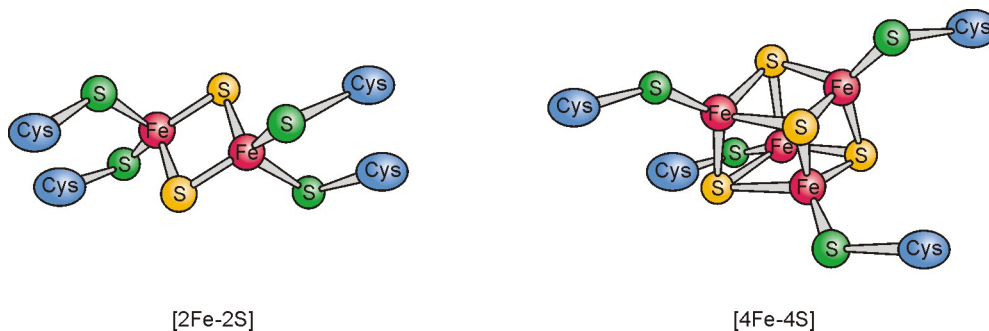
### 1.3 Eisen-Schwefel-Proteine

Eisen-Schwefel-Cluster zählen möglicherweise zu den ersten biologischen Katalysatoren auf der Erde [124,125]. Eine Reihe von Argumenten spricht für eine „Eisen-Schwefel-Welt“, die noch vor der weithin bekannten RNA-Welt anzusiedeln ist [126]. Eisen und Schwefel könnten sich in der Entwicklung des Lebens als wertvolle Elemente erwiesen haben. Eisen ist das vierthäufigste Element der Erdkruste; es kann drei verschiedene ionische Redoxzustände annehmen, bietet sich somit für Redoxreaktionen in besonderem Maße an. Schwefel bietet ein noch größeres Spektrum

an Valenzzuständen, vermag kovalente Bindungen zu knüpfen und zu lösen und kann sowohl als Elektrophil wie auch Nucleophil fungieren [127].

### 1.3.1 Struktur und Funktion von Eisen-Schwefel-Proteinen

Die relative schwache und uncharakteristische Lichtabsorption hat die Entdeckung von Fe-S-Proteinen hinausgezögert, bis differenziertere Spektroskopietechniken zur Verfügung standen. Der erste publizierte Hinweis auf biologische Fe-S-Verbindungen stammt von keinem Geringeren als Otto Warburg [128]. In der 1960er Jahren wurden Fe-S-Proteine in verschiedenen Elektronentransportketten entdeckt [129]. Es stellte sich heraus, dass diese neben Eisen und Cysteinat-Schwefel auch „anorganischen“ Schwefel enthielten. Auf chemischem Weg konnten freie Fe-S-Cluster synthetisiert werden, die in ihren physikochemischen Eigenschaften den biologischen Clustern glichen [130]. Die in der Natur verbreitetsten Typen sind binukleäre [2Fe-2S]- und kubische [4Fe-4S]-Cluster, gefolgt von mononukleären Zentren und [3Fe-4S]-Clustern [131]. Größere Einheiten wie das Molybdänzentrum (Mo-7Fe-9S) oder das P-Zentrum der Nitrogenase (8Fe-7S) sind Kombinationen kubischer oder kuboidaler Cluster [132,133].



**Abbildung 4 Häufige Typen von Fe-S-Clustern.** [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster sind die am weitesten verbreiteten Clustertypen bei Fe-S-Proteinen.

Die bekannteste Funktion von Fe-S-Clustern ist der Elektronentransfer. Das Redoxpotential von Eisen-Schwefel-Proteinen erfasst eine enorme Spannbreite von -700 bis +500 mV. Als Ferredoxine bezeichnet man kleine elektronenübertragende Proteine mit einem Fe-S-Cluster als Kofaktor. Die einfachsten Fe-S-Proteine sind sogenannte Rubredoxine mit einem mononuklearen Zentrum und ohne „anorganischen“ Schwefel [134]. Bakterien-Typ-Ferredoxine mit zwei [4Fe-4S]-Zentren sind klein ( $M_r \sim 6$  kDa) und haben ein sehr niedriges Redoxpotential von  $\sim -500$  mV [135]. Proteine mit einem [4Fe-4S]- oder [3Fe-4S]-Zentrum leiten sich vermutlich evolutionär von den Ferredoxinen mit zwei Zentren durch Verlust von Clusterliganden her. Eine

besondere Gruppe von [4Fe-4S]-Proteinen ist vor allem in photosynthetischen Bakterien zu finden. Diese ebenfalls kleinen Proteine mit 6-10 kDa zeichnen sich durch ein hohes Redoxpotential von bis zu +500 mV aus und werden deshalb als *high potential iron-sulfur proteins* (HiPIPs) bezeichnet [136]. Pflanzen-Typ-Ferredoxine besitzen ein [2Fe-2S]-Cluster mit  $E_m \sim -400$  mV und finden sich vor allem in Chloroplasten. Weitere Klassen von Fe-S-Proteinen bilden die bereits beschriebenen Rieske- und Rieske-Typ-Proteine.

Über den ET hinaus haben Fe-S-Cluster zahlreiche weitere Funktionen. Wie im Falle des Rieske-Proteins können sie einen gekoppelten  $H^+$ - und  $e^-$ -Transfer vermitteln [137]. Im Enzym Aconitase sitzt ein Fe-S-Cluster im aktiven Zentrum, eines der Eisenatome dient als Lewis-Säure, die eine Hydroxylgruppe und ein  $H^+$  vom Substrat abzieht [138]. Fe-S-Cluster fungieren als Elektronendonoren in Reaktionen, die über ein freies Radikal verlaufen, z.B. in Ribonucleotid-Reduktase [139]. Mittlerweile sind darüberhinaus zahlreiche regulatorische Rollen bekannt. Aconitase beispielsweise ist inaktiv mit cuboidalem [3Fe-4S]-Cluster und wird aktiviert durch das „Auffüllen“ zu einem kubischen Cluster [140]. Eine cytosolische Isoenzym der Aconitase stellt in seiner Apo-Form das *iron response protein* IRP-1 dar, das die Eisenaufnahme und -Speicherung reguliert, indem es an sogenannte *iron responsive elements* (IREs), *stemloop*-Strukturen auf verschiedenen mRNAs, bindet. Auf diese Weise aktiviert IRP-1 die Translation des Transferrin-Rezeptors und reprimiert die Ferritin-Expression [141]. Fe-S-Cluster können Sensoren für  $O_2$ , das Superoxid-Anion  $O_2^-$  oder NO darstellen. Beeinflusst wird dabei der Redoxzustand wie im Falle von SoxR von *E. coli* [142] oder die Dis- bzw. Reassemblierung des Clusters wie beim *E. coli*-FNR, wo das Cluster die Dimerisierung zum aktiven Regulatorprotein vermittelt [143].

### 1.3.2 Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen

Obwohl sich Fe-S-Cluster prinzipiell spontan bilden können, scheint die Biogenese dieser Kofaktoren von einer komplexen Maschinerie gesteuert, wie Arbeiten der letzten Jahre vor allem in bakteriellen Systemen und in *S. cerevisiae* zeigen. Das spontane *assembly* aus freiem  $Fe^{2+/3+}$  und  $S^{2-}$  erscheint physiologisch nicht sinnvoll, da beide Komponenten toxisch sind, zumal in den für eine rein chemische Bildung erforderlichen Konzentrationen. Ein weiteres Problem wäre die Bildung unlöslicher Eisensulfide. Interessanterweise war es kein einfaches Modellsystem, sondern einer der komplexesten bekannten Cluster, der Fe-Mo-Kofaktor der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii*, an

dem zuerst gezeigt werden konnte, dass Fe-S-Cluster in einem „molekularen Gerüst“ präassembliert, und dann erst in das betreffende Apo-Protein eingebaut werden [144]. Nitrogenase besteht aus zwei UE, die beide verschiedene Fe-S-Cluster tragen. Inaktivierung der Genloci *nifS* und *nifU* beeinträchtigt die Bildung beider UE. Da das gemeinsame Merkmal der Nitrogenase-UE die Kofaktoren sind, wurde postuliert, dass NifS und NifU an deren Biogenese beteiligt sein müssen [145]. NifS konnte biochemisch als Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym charakterisiert werden, das die Desulfurierung von Cystein katalysiert [146] (Abbildung 5). Dabei entsteht ein enzymgebundenes Persulfid, das als aktivierte - und gegenüber freiem Sulfid untoxische - Vorstufe des Schwefels für die Assemblierung von Fe-S-Clustern angesehen wird [147]. NifU scheint die Plattform für die Präassemblierung der Cluster zu bieten. Das homodimere Protein besitzt jeweils neun konservierte Cysteinreste, von denen vier ein redoxaktives, „permanentes“ Cluster tragen, und die verbleibenden drei Liganden ein instabiles, transientes Cluster darstellen, das sich *in vitro* NifS-katalysiert bilden kann [148]. Dem permanenten Cluster wird eine Redoxrolle zugeschrieben, wobei es sich um die Akquisition des Eisens, die Freisetzung des Persulfids von NifS oder die Freisetzung des fertigen Clusters handeln könnte. Ein weiteres Genprodukt aus dem *nif*-Operon,  $\text{IscA}^{\text{Nif}}$  könnte eine ähnliche oder überlappende physiologische Funktion wie NifU haben [149].

Da eine Deletion von *nifS* und *nifU* nicht zum kompletten Verlust der Nitrogenase-Aktivität führt, wurde nach homologen Genen gesucht, die möglicherweise den „Haushaltsbedarf“ für die allgemeine Fe-S-Cluster-Biosynthese decken. So konnte die *isc*-Gene identifiziert werden [150]. Der Locus codiert IscS und IscA, Proteine mit eindeutiger Homologie zu NifS und  $\text{IscA}^{\text{Nif}}$ . IscU ist stark verkürzt und ähnelt der N-terminalen Hälfte von NifU. Möglicherweise wird IscU durch Fdx komplementiert, ein [2Fe-2S]-Ferredoxin in der *isc*-Genregion, dessen Cluster biophysikalisch dem permanenten NifU-Cluster ähnelt [151]. Darüber hinaus codiert der *isc*-Locus zwei Chaperone, HscA und HscB. Ihre intrinsische ATPase-Aktivität, die Faltungsprozesse von Zielproteinen unterstützen könnte, wird durch IscU stimuliert [152]. Da keine weiteren Bindungspartner von HscA-HscB identifiziert werden konnten, geht man davon aus, dass diese eine aktive Rolle in der Fe-S-Cluster-Assemblierung am IscU-Gerüst oder beim *targeting* des präassemblierten Clusters spielen.

Entsprechende *isc*-Genloci fanden sich in fast allen bekannten Bakterienspezies. Deletionsexperimente in *E. coli* belegen ihre physiologische Relevanz in der Fe-S-Cluster-Biosynthese [153]. Die heterologe Expression verschiedener Fe-S-Proteine erzielte bei gleichzeitiger *in trans*-Überexpression der *isc*-Gene eine gesteigerte Ausbeute an Holo-Fe-S-Proteinen [154]. Auch die Koexpression von NifS alleine führte zu einer gesteigerten Ausbeute an Holo-Fe-S-Protein [155]. Bei Koexpression von Chaperonen konnten lediglich inkorrekte Fe-S-Cluster in der *inclusion body*-Fraktion gefunden werden [156]. Die Expression der *isc*-Biosynthesemaschinerie wird durch Rückkopplung reguliert. Regulatorprotein ist IscR, das selbst ein instabiles [2Fe-2S]-Cluster tragen kann [157]. Holo-IscR dient als negativer Transkriptionsregulator für die *isc*-Genregion. In *E. coli* konnte mit dem *suf*-Operon eine Maschinerie für einen weiteren alternativer Biosyntheseweg identifiziert werden [158,159]. Homologe zu IscS und IscA finden sich unter den sechs Genen des *suf*-Operons, IscU und HscA/B fehlen jedoch.

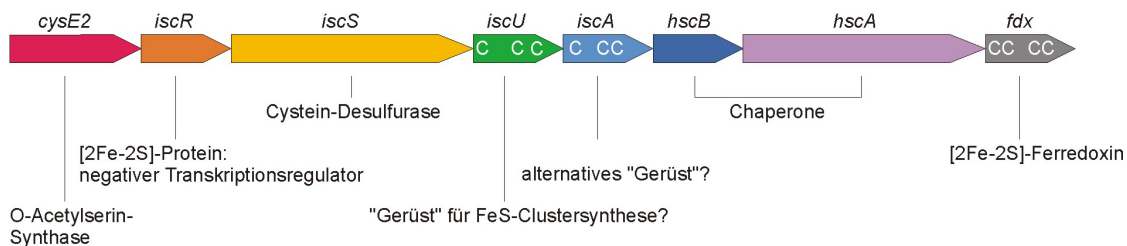
#### *suf*-Gencluster



#### *nif*-Gencluster



#### *isc*-Gencluster



**Abbildung 5 Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen.** Übersicht zu den bekannten prokaryotischen Genen, die in die Biogenese von Fe-S-Clustern involviert sind. Homologe Gene im *suf*-, *nif*-, und *isc*-Genlocus sind in der gleichen Farbe dargestellt.

In Eukaryoten sind die meisten Fe-S-Proteine mitochondrial lokalisiert, jedoch wächst die Zahl bekannter cytosolischer und sogar nukleärer Vertreter. Zu den Isc-Proteinen finden sich Homologe in höheren und niederen Eukaryoten; *S. cerevisiae* dient hier als hauptsächlicher Modellorganismus. Die Isc-Maschinerie ist mitochondrial lokalisiert; man vermutet, dass sie endosymbiontisch erworben wurde. Darüberhinaus findet sich

einen Reihe weitere Komponenten, die für das eukaryotische System spezifisch sind. Faszinierenderweise scheint die mitochondriale Maschinerie auch für die Assemblierung cytosolischer Fe-S-Proteine zuständig zu sein [160]. Am Export mitochondrial präassemblierter Cluster scheint der ABC-Transporter Atm1p beteiligt zu sein [161]. Mutanten für das entsprechende Gen akkumulieren Eisen in den Mitochondrien. Mutationen im menschlichen Homologen führen zur X-chromosomalen sideroblastischen Anämie und zerebellarer Ataxie XLSA/A [162]. Weitere für die Bildung cytosolischer Fe-S-Cluster essentielle Komponenten sind Erv1p, ein im Intermembranraum lokalisiertes Protein mit Sulfhydryl-Oxidase-Aktivität [163], und das Tripeptid Glutathion [164]. Der Weg, auf dem die Cluster vom Mitochondrium ins Cytosol gelangen, ist unbekannt. Eine unklare Rolle in der mitochondrialen Biogenese von Fe-S-Clustern spielt auch das mit der Friedreich-Ataxie assoziierte Protein Frataxin [165].

### 1.3.3 Rekonstitution und heterologe Expression von Fe-S-Proteinen

Seit langem ist bekannt, dass zuvor „gestrippte“ Fe-S-Proteine in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{S}^{2-}$  unter reduzierenden Bedingungen mit guter Ausbeute aus ihrer Apo- in die Holo-Form überführt werden können [166]. Das klassische Modellprotein hierbei ist [4Fe-4S]-Clostridien-Ferredoxin. Die erste Rekonstitution eines heterolog - in *inclusion bodies* - überexprimierten Apo-Proteins lieferte ein Ausbeute für den Einbau des [4Fe-4S]-Clusters von 60 % [167]. In einigen Fällen wurde für rekombinante Ferredoxine eine Rekonstitution direkt aus dem groben Zellysate beschrieben, in anderen Fällen musste das Apo-Protein zuerst aufgereinigt werden [168,169]. Eine enzymgestützte *in vitro*-Rekonstitution wurde erstmals für [2Fe-2S]-Ferredoxin aus Spinat beschrieben [170]. Hierbei wurde das Enzym Rhodanese verwendet, dem eine mögliche Rolle in der Fe-S-Biogenese zugeschrieben wird [171]. Die rein chemische Rekonstitution lieferte hier im Vergleich deutlich geringere Ausbeuten, möglicherweise, weil die Rückfaltung des gegenüber dem Clostridien-Protein großen Pflanzenferredoxins ein limitierender Faktor ist [172]. In jüngerer Zeit wurden verschiedene NifS-gestützte Rekonstitutionsprotokolle für [4Fe-4S]- [173,143], [2Fe-2S]- [174,148,175] und sogar [7Fe-8S]-Proteine [176] entwickelt. Ein Vergleich der Rekonstitutionen mit Rhodanese und NifS lieferte vergleichbare Ausbeuten [177]. Ähnliche Rekonstitutionen gelangen mit dem homologen IscS [178,179,180]. In einigen

Fällen wurde beschrieben, dass die Ausbeuten im Vergleich zur chemischen Rekonstitution deutlich höher ausfielen [174,181,178].

Für die Rieske-Proteine aus *Nostoc*- und *Synechocystis*-Bakterien und für das der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* wurden verschiedene chemische [156,182] und NifS- oder IscS-gestützte [183,184,185] Rekonstitutionen beschrieben. Dabei handelte es sich zum Teil um Konstrukte voller Länge (ISP), teils war der Membrananker entfernt worden (ISF). ISF-Konstrukte wurden zum Teil schlecht exprimiert [156]. Mitunter war eine vorherige Aufreinigung des Apo-Proteins und ein bestimmtes Rückfaltungsprotokoll für eine erfolgreiche Rekonstitution erforderlich [183,185]. Die Ausbeuten fielen sehr unterschiedlich aus: Während die Rekonstitution für das *Nostoc*-Protein zu 30 %, für das *Chlamydomonas*-Protein sogar bis zu 65 % Holo-Protein lieferte [156,182], konnten beim *Synechocystis*- oder Spinat-ISP lediglich Werte deutlich unter 10 % erzielt werden, sowohl mit rein chemischen als auch mit enzymgestützten Protokollen (Dirk Schneider, persönliche Mitteilung).

Als erstes rekombinantes Holo-Protein konnte in *E. coli* ein HiPIP aus *Chromatium vinosum* exprimiert werden [186]. Ein heterolog exprimiertes Hühner-Fdx konnte bei moderatem Expressionlevel als Holo-Protein gewonnen werden; ein N-terminales His-tag interferierte dabei nicht mit dem offenbar quantitativen Clustereinbau [187]. In anderen Fällen war der Anteil an Holo-Protein gering [188]. Eine systematische Untersuchung der heterologen Überexpression von Ferredoxinen lieferte unter Verwendung eines endogenen Promotors geringe Mengen an Holo-Protein, bei Überexpression hingegen große Mengen an Apo-Protein; es wurde spekuliert, dass der Clustereinbau geschwindigkeitsbestimmend ist oder das Metallzentrum früh während des Faltungsprozesses eingebaut werden muss [189]. Ein HiPIP aus *Ectothiorhodospira halophila* konnte in hoher Ausbeute exprimiert werden [190]. Die Autoren schließen daraus, dass das Cluster-assembly nicht - wie anderweitig vermutet - limitierend ist. Sie vermuten, dass aufgrund unterschiedlicher Clusterumgebungen [4Fe-4S]-Ferredoxine in geringerem Maße als Holo-Protein exprimiert werden können als [2Fe-2S]-Ferredoxine.

Im Falle von Rieske-Typ-Proteinen wurde wiederholt eine erfolgreiche heterologe Expression in der Holo-Form beschrieben [191,192,193,194,195], z.T. unter Verwendung eines N-terminalen His-tags. Bei einigen Rieske-Typ-Proteinen konnte jedoch nur die Apo-Form gewonnen werden [193]. Die rekombinante Expression eines membrangebundenen Holo-Rieske-Protein aus *Rhodobacter sphaeroides* konnte in



geringen Mengen nachgewiesen werden [76]; möglicherweise handelte es sich dabei jedoch um ein Artefakt (A. Seidler, persönliche Mitteilung). Eine erste überzeugende Holo-Rieske-Proteinexpression in *E. coli* gelang für das Protein aus dem thermoacidophilen *Sulfolobus acidocaldarius* [196]. Hier wurde vermutet, dass der Haupthinderungsgrund für eine erfolgreiche Expression mesophiler Rieske-Proteine in *E. coli* in der fehlenden Ausbildung der Disulfidbrücke liegt und thermophile Proteine die Holo-Expression durch eine generell stabilere Faltung erleichtern, die nicht auf eine Disulfidbrücke angewiesen ist. Dies würde auch die zumeist erfolgreiche Expression von Rieske-Typ-Proteinen erklären, die keine Disulfidbrücke besitzen. Ähnliches wie für das *Sulfolobus*-Protein gelang für die Rieske-Proteine aus *Pyrobaculum aerophilum* und *Thermus thermophilus* [197,70]. In beiden Fällen wurden trunke Konstrukte verwendet; die Proteine voller Länge konnten nur schlecht oder überhaupt nicht exprimiert werden. *Synechocystis* PCC6803 codiert drei verschiedene Rieske-Proteine, von denen zwei in einer kleineren Fraktion als Holo-Protein in *E. coli* exprimiert werden konnten, eines nur als Apo-Protein [184]. Dies zeigt, dass zumindest prinzipiell auch Holo-Rieske-Proteine aus mesophilen Organismen in *E. coli* exprimiert werden können, belegt aber auch, dass dies nicht generalisiert werden kann, wenn selbst bei Isoformen aus demselben Organismus unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Nachdem die Kristallstrukturen verschiedener eukaryotischer Cytochrom  $bc_1$ -Komplexe bestimmt werden konnten, soll hier auf die strukturelle Charakterisierung des  $bc_1$ -Komplexes von *P. denitrificans* hingearbeitet werden. Dieser prokaryotische Komplex eignet sich aufgrund seiner einfachen Untereinheitenzusammensetzung und der leichten genetischen Zugänglichkeit in besonderem Maße für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen. Dabei werden zwei Strategien verfolgt. Ein Ansatz verfolgt die Konstruktion und heterologe Expression eines löslichen Moduls der katalytischen Ektodomäne des Rieske-[2Fe-2S]-Proteins. Mit einem solchen Modul könnte eine NMR-Lösungsstruktur gewonnen werden. Diese würde u.a. die postulierte Konformationsdynamik des Rieske-Proteins [47] überprüfbar machen. Darüberhinaus könnte NMR-spektroskopisch die Wechselwirkung mit dem Redoxpartner Cytochrom  $c_1$ , für den bereits ein lösliches Modul vorliegt [198], präzise kartiert werden. Die heterologe Expression des Rieske-Proteins in *E. coli* stellt aufgrund des benötigten Kofaktors auch eine biotechnologische Herausforderung dar. Neben dieser Zielsetzung

soll auch die Biogenese des Rieske-Proteins in *P. denitrificans* untersucht und die Frage geklärt werden, ob es wie vermutet über das Tat-Translocon in die Membran integriert [64].

Der zweite Ansatz der Strukturaufklärung verfolgt die antikörpervermittelte Kristallisation des gesamten Membranproteinkomplexes. Nachdem in einer früheren Arbeit kein für die Kristallisation geeigneter monoklonaler Antikörper gegen den *Paracoccus*-Komplex gewonnen werden konnte [199], soll hier der umgekehrte Weg beschritten werden: Auf den  $bc_1$ -Komplex soll molekulargenetisch ein Epitop „transplantiert“ werden, welches durch das für die Kristallisation des Hefe-Komplexes erfolgreich eingesetzte  $F_v$ -Fragment erkannt wird [48].

In den Kristallstrukturen mitochondrialer Komplexe ist der  $bc_1$ -Komplex als Dimer zu sehen; im Falle von  $b_6f$ -Komplexen gibt es jedoch auch Hinweise auf Monomer-Dimer-Gleichgewichte [200]. In dieser Arbeit soll für den bakteriellen Komplex der Oligomerisationszustand und das Vorliegen etwaiger Assoziations-Gleichgewichte vor allem mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht werden. Für mitochondriale Atmungsketten konnte gezeigt werden, dass die biologische Funktionseinheit der Atmungskettenenzyme auch strukturell in Form eines „Superkomplexes“ bzw. „Respirasoms“ zusammenhängt [22,21]. So lag es nahe, in einer Zusammenarbeit mit Prof. H. Schagger über die Quartärstruktur des  $bc_1$ -Komplexes hinaus auch strukturelle Wechselwirkungen mit den anderen Komponenten der Atmungskette von *P. denitrificans* zu untersuchen. Insbesondere soll die Wechselwirkung der Einzelkomponenten eines bakteriellen Respirasoms über chemisches *crosslinking* und mittels genetischer Deletionen untersucht werden.

In weiteren Teilprojekten sollen funktionelle Eigenschaften des  $bc_1$ -Komplexes von *P. denitrificans* untersucht werden, die bedeutsam für das Verständnis des Enzymmechanismus sind. Zum einen konnte bei chemischer Modifikation eines sauren Restes im Rieske-Protein eine Entkopplung des Elektronentransfers von der Protonentranslokation im  $bc_1$ -Komplex gezeigt werden [112]. Dieser Rest soll durch gerichtete Mutagenese identifiziert werden. Zum anderen soll das Enzym mit der redoxabhängigen Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) charakterisiert werden; diese könnte die umstrittene Frage nach der Zahl spezifisch gebundener Chinonmoleküle im  $bc_1$ -Komplex klären und Aufschluss über redoxgekoppelte Protonierungs- und Deprotonierungsprozesse geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Standardchemikalien werden in *p.a.* Qualität von AppliChem, Merck, Roche, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen. H<sub>2</sub>O wird mit einer PRO 90 CN-Anlage der Firma Seral entsalzt und für molekularbiologische Zwecke autoklaviert.

Acrylamid, Bis-Acrylamid	Roth
Antimycin A	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Roth
Agarose	Merck
Aminocapronsäure	Applichem
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	Applichem
Bactotrypton	Becton-Dickinson
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck
Decylubichinon	Sigma-Aldrich
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas
Deuteriumoxid D <sub>2</sub> O 99,7 %	Roth
Digitonin	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH)	Serva
Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP)	Pierce
Dithiothreitol	Roth
DQA	Aventis Crop Science
Eisenammoniumsulfat	Fluka
Eisen-III-chlorid	Fluka
<i>enhanced chemiluminescence</i> -Reagenzien (ECL)	Amersham
Ethidiumbromid	Gibco BRL
Folin-Ciocalteu	Merck
Guanidiniumhydrochlorid	Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
Imidazol	Applichem
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	Biomol
Kanamycinsulfat	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Mineralöl für die Molekularbiologie	Biomol
Natriumascorbat	Fluka
Natriumdesoxycholat	Merck
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumsulfid	Sigma-Aldrich
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM)	Biomol

<i>newborn calf serum</i> (NCS)	Biochrom
Nicotinamadenindinucleotid (NAD <sup>+</sup> )	AppliChem
Nicotinamadenindinucleotid, reduzierte Form (NADH)	AppliChem
Nitroblautetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich
2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Biomol
2-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Biomol
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Pefabloc SC	Biomol
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Hampton
Polyoxyethylen-9-Laurylether (C <sub>12</sub> E <sub>9</sub> , „Thesit“)	Boehringer Mannheim
Ponceau S	Merck
Pyridin	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	NEB
Rifampicin	Fluka
Serva Blau G	Serva
Stigmatellin	Sigma-Aldrich
Streptomycin	Appllichem
Bernsteinsäure	Fluka
Tetracyclin	Fluka
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ)	Sigma-Aldrich
Thiaminchloridhydrochlorid	Merck
Triton X-100	Roth

### 2.1.2 Proteine

Für die zu molekularbiologischen Zwecken verwendeten Enzyme werden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt. Diese Enzyme, die Antikörper und lyophilisiertes Cytochrom *c* werden bei -20 °C gelagert, alle anderen Proteine bei -80 °C.

#### Enzyme für die Molekularbiologie

Ampligase (thermostabile DNA-Ligase)	Epicentre
<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> (CIAP)	NEB
Klenow-Polymerase	MBI
Mung Bean-Exonuclease	New England Biolabs
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Ribonuclease A (RNase)	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynucleotidkinase (PNK)	MBI Fermentas
verschiedene Restriktionsenzyme	New England Biolabs, MBI Fermentas

#### Antikörper

verschiedene Antikörper gegen Cytochrom-Reduktase, Cytochrom-Oxidase und Cytochrom <i>c</i> <sub>552</sub> von <i>P. denitrificans</i>	Prof. Ludwig
verschiedene Antikörper gegen NADH-Dehydrogenase von <i>P. denitrificans</i>	Prof. Yagi, Scripps Research Institute, La Jolla, USA
Penta-His-Antikörper	Novagen
Protein A-Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich

Ziege-anti-Maus IgG/Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus IgG/Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich
<b>Proteine der Atmungskette</b>	
<i>ba<sub>3</sub></i> -Chinioxidase von <i>P. denitrificans</i>	T. Schröter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA
Cytochrom <i>c</i> aus Pferdeherz	Sigma-Aldrich
Cytochrom-Oxidase von <i>P. denitrificans</i>	Prof. Ludwig
Cytochrom-Reduktase aus Rinderherzmitochondrien	Prof. Schägger, Universitätsklinikum Frankfurt
NADH-Dehydrogenase aus Rinderherzmitochondrien	V. Zickermann, Universitätsklinikum Frankfurt
<b>Sonstiges</b>	
Hämoglobin (Schwein)	Sigma-Aldrich
Lysozym	Biomol
Rhodanese (Rind)	Sigma-Aldrich
TEV-Protease	P. Greiner, Inst. f. Biochemie, Uni Frankfurt
Thermolysin	Sigma-Aldrich

### 2.1.3 Chromatographiematerialien

Chromatographiematerialien werden in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

UltragelAcA-34	Seprachor
Diethylaminoethyl-(DEAE)-Sephacel CL-6B	Amersham
Hydroxylapatit	BioRad
Mono Q	Amersham
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Sephadex G-25	Amersham
Superdex 75	Amersham
Superdex 200	Amersham
Superose 6	Amersham

### 2.1.4 Geräte

Analysenwaage Basic	Sartorius
analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A	Beckman
Autoklav Bioklav	Schütt
Brutschrank	Heraeus
Densitometer DMA 02	Paar
Dialyseschläuche	Roth
Eismaschine	Ziegler
Elektrophorese-Detektionssystem E.A.S.Y. 429 K	Herolab
EPR-Spektrometer ESP 300 E	Bruker
Fermenter Microferm	New Brunswick Scientific
FPLC-Anlage Pharmacia LKB	Amersham
Gefriertruhen	Heraeus
Heizblock	Bachofer
Infrarotspektrometer IFS 25	Bruker

Konzentratoren	Millipore, Sartorius
Luftbadschüttler	New Brunswick Scientific,
	Multitron
<i>magnetic beads</i>	IBA
Manton-Gaulin-Pressen	APV Schröder
Mikrowelle	Hitachi
Nitrocellulosemembran BA 85	Schleicher & Schüll
pH-Meter pH340i	WTW
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Proteinelektrophorese Mini Protean II	BIORAD
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore
Röntgenfilme	Kodak
Spannungsgeber Powerpac 300	Biomol
Spektrophotometer U-3000	Hitachi
Spektrophotometer UVIKON	Kontron
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler OmniGen	Hybaid
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Trockenschrank	Memmert
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson
Ultra-Turax-Homogenisator T25	IKA Labortechnik
Ultrazentrifuge L-70	Beckmann
UV-Tisch	UVP
Videoprinter	Mitsubishi
Vortexer Reax 2000	Heidolph
Zentrifugen Sorvall RC 5B, RC 36	Dupont

### 2.1.5 Lösungen

Lösungen für die Molekularbiologie werden autoklaviert oder sterilfiltriert. Chromatographiepuffer für FPLC-Säulen werden filtriert (ME 27, Schleicher & Schuell) und entgast.

#### Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer	0,02 % Bromphenolblau, 30 mM EDTA, 5 % Glycerin in TBE-Puffer
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris, 1 M Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O

#### Aktivitätsmessungen

Oxidase-Messpuffer	20 mM KP <sub>i</sub> pH 8, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,02 % n-Dodecyl-β-D-maltosid (DDM)
<i>bc</i> <sub>1</sub> -Enzymverdünnungspuffer	50 mM MOPS/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04 % DDM, 5 % Glycerin, 0,05 % BSA
<i>bc</i> <sub>1</sub> -Messpuffer	50 mM MOPS/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04 % DDM, 1 mM EDTA, 1 mM KCN
NADH-Dehydrogenase-Messpuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 2 mM KCN

#### Analytische Ultrazentrifugation

Puffer A	50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM NaCl, 0,02 %
----------	--

	DDM
Puffer B	50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM, 95 % D <sub>2</sub> O / 5 % H <sub>2</sub> O, x % Saccharose
<b>Aufreinigung Cytochrom <i>bc</i><sub>1</sub>-Komplex von <i>P. denitrificans</i></b>	
Solubilisierungspuffer (2x)	100 mM MES/NaOH pH 6, 600 mM Saccharose, 2,4 M NaCl
Verdünnungspuffer	50 mM MES/NaOH pH 6, 0,02 % DDM
Äquilibriumspuffer	50 mM MES/NaOH pH 6, 350 mM NaCl
Niedersalzpuffer	50 mM MES/NaOH pH 6, 350 mM NaCl, 0,02 % DDM
Hochsalzpuffer	50 mM MES/NaOH pH 6, 600 mM NaCl, 0,02 % DDM
Waschpuffer	50 mM MES/NaOH pH 6, 1 M NaCl
<b>Aufreinigung des respiratorischen Superkomplexes</b>	
Solubilisierungspuffer	150 mM Imidazol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Aminocaprinsäure, pH 7,2
Puffer A	150 mM NaP <sub>i</sub> , 0,1 % Digitonin, pH 7,2
Puffer B	150 mM NaP <sub>i</sub> , 0,05 % TX-100, pH 7,2
Puffer E	20 mM MOPS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Aminocaprinsäure, pH 7,2
<b>Aufreinigung des nativen Cytochrom <i>c</i><sub>552</sub></b>	
Puffer 1	100 mM KP <sub>i</sub> pH 8,0
Puffer 2	50 mM KP <sub>i</sub> , 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0,02 % DDM, pH 8; Gradient: 20-200 mM Imidazol
Puffer 3	50 mM KP <sub>i</sub> pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,02 % DDM; Gradient: 50-600 mM NaCl
<b>Denaturierende Aufreinigung des rekombinanten ISF</b>	
Zellysepuffer 1	50 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
Zellysepuffer 2	50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100
Solubilisierungspuffer	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris/HCl, 8 M GdHCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 100 μM Pefabloc SC, pH 8 mit NaOH
Puffer 1	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris, 6 M GdHCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8 mit NaOH
Puffer 2 - 4	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 6,3/5,5/4,5 mit HCl
<b>Native Aufreinigung des rekombinanten ISF</b>	
Lysepuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH
Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH
Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH
<b>Aufreinigung des proteolytisch gewonnenen ISF</b>	
Proteolysepuffer	20 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,02 % DDM
HA-Elutionspuffer	10 mM KP <sub>i</sub> pH 7,2, 150 mM KCl
Dialysepuffer	50 mM KP <sub>i</sub> pH 8, 10 mM KCl

### 34 Material und Methoden

Waschpuffer	50 mM $\text{KP}_i$ pH 8, 10 mM KCl, 0,1 % DDM
Gradientenpuffer	50 mM $\text{KP}_i$ pH 8, 0-300 mM KCl
<b>Coomassie-Färbung</b>	
Färbelösung	0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 10 % Essigsäure, 20 % Methanol
Entfärber	10 % Essigsäure, 20 % Methanol
<b>FTIR-Spektroskopie</b>	
Standardpuffer für FTIR-Spektren	100 mM $\text{KP}_i$ pH 7, 150 mM KCl, 0,02 % DDM
Puffer für andere pH-Werte	200 mM Cacodylat pH 5,5 / 100 mM $\text{KP}_i$ pH 6 / 200 mM Borat pH 8, 100 mM KCl, 0,02 % DDM
<b>Hämfärbung</b>	
Häm-Färbelösung I	250 mM Natriumacetat pH 5
Häm-Färbelösung II	450 mg TMBZ, 300 ml MeOH
Häm-Färbelösung III	8 ml 37 % $\text{H}_2\text{O}_2$ , MeOH ad 300 ml
Häm-Färbelösung IV	300 ml Isopropanol, Häm-Färbelösung I ad 1 l
<b>Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)</b>	
Mini I TEG-Puffer	25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose
Mini II NaOH/SDS	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Mini III KAc-Lösung	3 M Kaliumacetat, 11,5 % Eisessig, pH 5 (4 °C)
Chloroform/Isoamylalkohol	24:1 (v/v)
<b>Kompetente Zellen</b>	
TFB-I-Puffer	30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 10 mM $\text{CaCl}_2$ , 50 mM $\text{MnCl}_2$ , 100 mM RbCl, 15 % Glycerin
TFB-II-Puffer	10 mM MOPS/KOH pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM $\text{CaCl}_2$ , 15 % Glycerin
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
<b>Lowry-Assay</b>	
Lowry A	2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1 M NaOH
Lowry B1	1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Lowry B2	2 % Kalium-Natrium-Tartrat
SDS-Lösung	20 % SDS
Folin-Lösung	50 % (v/v) Folin-Ciocalteu in $\text{H}_2\text{O}$
<b>magnetic bead pull-down assay</b>	
Puffer A	50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,02 % DDM
Elutionspuffer	Puffer A, 10 mM Biotin
<b>Membranpräparation</b>	
Lysepuffer	100 mM $\text{KP}_i$ pH 8, 1 mM EDTA
Membranpuffer	20 mM $\text{KP}_i$ pH 8, 1 mM EDTA
$bc_1$ -Membranpuffer	50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM Saccharose
Membranspektrenpuffer	50 mM $\text{KP}_i$ pH 8, 0,5 % Triton X-100
<b>Mutagenese (Altered Sites)</b>	
Phagenpräzipitationslösung	3,75 M Ammoniumacetat pH 7,5, 20 % PEG 8000
Annealing-Puffer (10x)	200 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM $\text{MgCl}_2$ , 500 mM NaCl
Synthese-Puffer (10x)	100 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM dNTPs, 10 mM ATP,



20 mM DTT

**Nativelektrophorese nach Maurer**

Lösung 1	48 ml 1 M HCl, 36,6 g Tris, ad 100 ml H <sub>2</sub> O
Lösung 2	25 ml 1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 5,7 g Tris
Lösung 3	30 % Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid
Laufpuffer	6 g Tris, 28,4 g Glycin, H <sub>2</sub> O ad 1 l
Probenpuffer	300 µl 50 % Glycerin, 50 µl 1 M Bis-Tris pH 7, 0,02 % Bromphenolblau, H <sub>2</sub> O ad 1 ml

**Blau-Nativ-Gelelektrophorese**

Anodenpuffer	25 mM Imidazol/HCl pH 7
Kathodenpuffer	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02 % Serva Blau G
Gelpuffer (3x)	1,5 M Aminocaprinsäure, 75 mM Imidazol/HCl, pH 7
Acrylamid/Bis-Acrylamid- Mischung	48 g Acrylamid, 1,5 g Bis-Acrylamid, ad 100 ml

**PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

<i>Taq</i> Polymerase-Verdünnung	1 µl <i>Taq</i> Polymerase, 8 µl 50 % Glycerin, 1 µl <i>Taq</i> - Verdünnungspuffer (10x)
<i>Taq</i> -Verdünnungspuffer (10x)	100 mM Tris/HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100
<i>Taq</i> -Polymerase Reaktionspuffer (10x)	100 mM Tris/HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100, 15 mM MgCl <sub>2</sub>

**on-column-Rückfaltung**

Puffer 1	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris, 6 M GdHCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8
Puffer 2	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8
Puffer 3	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM Tris, 0-500 mM Imidazol, pH 8

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Glycin-System nach Laemmli)**

Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris/Phosphorsäure pH 6,8, 8 mM EDTA, 0,4 % SDS
Laufpuffer (5x)	30 g Tris, 142 g Glycin, 4 ml 500 mM EDTA pH 8, 50 ml 20 % SDS, H <sub>2</sub> O ad 2 l
Probenpuffer	12,5 ml Sammelgelpuffer (4x), 10 ml 20 % SDS, 2,5 ml β-Mercaptoethanol, 10 ml Glycerin, 2,5 ml 0,1 % Bromphenolblau, H <sub>2</sub> O ad 50 ml
Acrylamid-Lösung	30 % Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Ahn)**

Trenngelpuffer (2x)	150 mM Tris/HCl, 200 mM Serin, 200 mM Glycin, 200 mM Asparaginsäure, pH 7,4 mit NaOH
---------------------	---

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-System nach Schägger)**

Anodenpuffer (10x)	1 M Tris/HCl pH 8,9
Kathodenpuffer (5x)	0,5 M Tris/HCl, 0,5 M Tricin, 0,5 % SDS, pH 8,3
Acrylamidlösung	48 % Acrylamid, 1,5 % Bis-Acrylamid
Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,5, 0,3 % SDS

## 36 Material und Methoden

Probenpuffer 100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 200 mM DTT, 20 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau

### Silberfärbung

Silberentwicklungslösung 60 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 mg/l NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd

Silberfärbelösung 0,2 % AgNO<sub>3</sub>, 0,75 ml/l 37 % Formaldehyd

Silberpräinkubationslösung 50 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd

Silbervorbehandlungslösung 0,2 g/l NaS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

### Southern Blot

5x SSC 0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat, pH 7

Vorhybridisierungslösung 5x SSC, 1 % Blotto, 0,1 % Sarkosyl, 0,02 % SDS, 50 % Formamid

Hybridisierungslösung Vorhybridisierungslösung + Digoxigenin-markierte Sonde (3 µg/5 ml)

Waschlösung 1 2x SSC, 0,1 % SDS

Waschlösung 2 0,2x SSC, 0,1 % SDS

Detektionslösung 1 0,1 M Maleinsäure/NaOH pH 7,5, 0,15 M NaCl

Detektionslösung 2 1 % Blotto in Detektionslösung 1

Detektionslösung 3 (TNM) 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

Detektionslösung 4 45 µl NBT (50 mg/ml in 70 % DMF), 35 µl BCIP (25 mg/ml in DMF) in 10 ml Detektionslösung 3

### Western Blot

Transferpuffer (5x) 30 g Tris, 0,1 % SDS, 142 g Glycin, H<sub>2</sub>O ad 1 l

Transferpuffer (1x) 400 ml Transferpuffer 5x, 400 ml Methanol, H<sub>2</sub>O ad 2 l

Ponceau-Färbelösung 0,2 % Ponceau, 3 % TCA

NCS 5 % in TBS

Protein A-Alkalische Phosphatase 0,1 mg Protein A-AP, 1 mg BSA, 1 ml Glycerin, 1 ml TBS

TBS 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

TBS-Tween 0,5 % (v/v) Tween-20 in TBS

TNM 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

BCIP 25 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)

NBT 50 mg/ml in 70 % DMF

Färbe-Stopp-Lösung 50 mM EDTA pH 8

### 2.1.6 Größenstandards und Kits

Die molekularbiologischen Kits werden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

EcoRI/HindIII-geschnittene λ-DNA

Herstellung im Arbeitskreis

100 bp DNA-Leiter

New England Biolabs

Proteingrößenstandard Roti-Mark 10-150

Roth

Kalibrierungsset für die Gelfiltration

Sigma-Aldrich

Atmungskettenkomplexe aus

H. Schägger, Uniklinik Frankfurt

Rinderherzmitochondrien für BN-PAGE

Miniprep kit	Qiagen
Midiprep kit	Qiagen
Gel Extraction kit	Qiagen
PCR Purification kit	Qiagen

### 2.1.7 Verwendete Oligonucleotide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide werden von den Firmen MWG oder Biospring bezogen.

17mer-uni-fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
17mer-uni-rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
Amp-repair	5'-GTT GCC ATT GCT GCA GGC ATC GTG GTG-3'
BamHI-TorA-rev	5'-TAG GAT CCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CCT CTC GAG ATG ACA GCG TCA GTC G-3'
ctaDII-rev	5'-CGG CGT CTT GAA CTC GAT GCT G-3'
cycA-fw	5'-GAC GGC ACC GAC ATC ATC AAG G-3'
D120N/E121Q	5'-AAC CGC ACG ATG AAT CAG GCC GGC GAG-3'
D124N	5'-GTG CCG ATC GGC AAC GGC GCC GGC AAT TT-3'
D146N	5'-ATC GGC GAC GGG GCC GGC AAT TTC GGC GG-3'
E124Q	5'-ATG AAC CAG GCC GGC CAG TGG CTG GTG ATG-3'
EcoRI-TorA-hin	5'-TAG AAT TCA TTA AAG AGG AGA AAT TAA CTA TGA ACA ATA ACG ATC TCT TTC AGG C-3'
Epitop-1	5'-GAGGACGAGATCCAGGAGGCCAATTCGGTAGATCTGG GCCAGTTG-3'
Epitop-2	5'-GCGCCCGCCACCGACGCCGACCGCACCATGGACGAGG CCGGC-3'
fbfF-ΔNcoI	5'-GCC CGT GCC ATG GGT CGC ATT ACG-3'
ISFbt-hin	5'-ATA TAT CCA TGG CGA AAA TTG AAA TCA AG-3'
ISFbt-NcoI-hin	5'-GGT TAT TAC TGC CCT TGC CAC GGG TCA CAC TAT GAT GC-3'
ISFbt-NcoI-rev	5'-GCA TCA TAG TGT GAC CCG TGG CAA GGG CAG TAA TAA CC-3'
ISFbt-rev	5'-ATA TAT AAG CTT GTA GGC CTT CAA CC-3'
ISFPd-hin	5'-ATA TAT CCA TGG CCT CGA TCC AGG TCG-3'
ISFPd-rev	5'-TAT ATA AAG CTT GTG CGC CTC CTC AGC-3'
KanTN903-fw	5'-GCA GAG CAT TAC GCT GAC TT-3'
mut-yeast-1	5'-ACA TGT CGG CCC TGA AGG-3'
mut-yeast-2	5'-GAC GCC GAC CGC ACC ATG GAC GAG GCC GGC-3'
ndh2-rev	5'-GCC GCC GAC AAT CAC AAT CT-3'
nqo3-fw	5'-CCA TGA AGC TGG CCG AGA AT-3'
P111-rep	5'-AAG CCC GAC GCG CCC GCC ACC GAC G-3'
pQE30-Nco-rev	5'-CG CCC CCG TTT TCA CCG TGG GCA AAT ATT ATA CGC-3'
pQE30-Nco-seq	5'-CCT GGC CTA TTT CCC TAA AGG G-3'
pQE30-Nco-uni	5'-GC GTA TAA TAT TTG CCC ACG GTG AAA ACG GGG GCG-3'
revS-FeS	5'-GTC TTG GGC TCG TAA TG-3'
TEV-Nco-rev	5'-AAC CTA TAC TTC CAA TCC ATG GAG ATF CCG AAC GA-3'

TEV-Nco-uni	5'-TCG TTC GGC ATC TCC ATG GAT TGG AAG TAT AGG TT-3'
urf6-rev	5'-TCC AGC ATG TCG GCA GGA AT-3'
yeast-sub-fw	5'-GAC ATG TCG GCC CTG AAG GAC CCG CAG ACC GAC GCC GAC CGC ACC ATG-3'
yeast-sub-rev	5'-CAT GGT GCG GTC GGC GTC GGT CTG CGG GTC CTT CAG GGC CGA CAT GTC-3'

### 2.1.8 Plasmide

#### Bezogene Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft / Referenz
pAlter-1	Mutagenesevektor, fl <i>ori</i>	Tet, (Amp)	Promega
pBluescript	Klonierungsvektor, fl <i>ori</i> , <i>lacZ</i> $\alpha$	Amp	Stratagene
pEKMF2	Suizidvektor, pUC19-Derivat, $\Delta nqo8$ - $nqo9::ndh$ -Km <sup>r</sup>	Sm, Cm, Amp	[201]
pGJ212	pET3d-Derivat, GFP-Gen NcoI/HindIII	Amp	Novagen
pKH48	pRI2-Derivat, <i>ctaC</i> -Promotor+ <i>ctaDII</i> - Gen, C-terminales His- <i>tag</i>	Sm, Cm	Hoffmeier (am Institut)
pOR772	pRI2-Derivat, <i>ctaC</i> -Promotor+ <i>ctaDII</i> -Gen	Sm, Cm	Richter (am Institut)
pQE30	T5-Promotor, <i>lac</i> -Operator	Amp	Qiagen
pQE60	T5-Promotor, <i>lac</i> -Operator, C-terminales His- <i>tag</i>	Amp	Qiagen
pQE-Cu <sub>A</sub>	pQE-30-Derivat, insert <i>P.d.</i> -Cu <sub>A</sub> , N-terminales His- <i>tag</i> +TEV- <i>site</i>	Amp	[202]
pRI2	<i>broad host range</i> -Vektor, pBBR1MCS- Derivat	Sm, Cm	Richter (am Institut)
pRI2(436)	<i>fbc</i> -Operon HindIII/SacI in pRI2	Sm, Cm	[203]
pRI2chi	chimäres <i>fbc</i> -Operon (Rieskedomäne aus <i>B.t.</i> ) HindIII/SacI in pRI2		[203]
pRK603	$\lambda$ -Promotor, <i>tetO2</i> -Operator, TEV- Protease	Kan	[204]
pRKISC	Expressionsvektor (konstitutiv), pRK415- Derivat, <i>E. coli isc</i> -Operon	Tet	[154]
pRKNIF	Expressionsvektor für <i>A. vinelandii nif</i> - Operon	Tet	Takahashi, Universität Osaka
pRKNMC	leerer Kontrollvektor	Tet	[154]
pRKSUF	Expressionsvektor für <i>suf</i> -Operon ( <i>E. coli</i> )	Tet	Takahashi
pRvS1	Suizidvektor, <i>oriV</i> (ColE1), <i>oriT</i> (Tn1831), Tn5p, <i>lacZ</i>	Amp, Sm	[205]
pSL1180	Klonierungsvektor, superlinker, pMB1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , <i>lacZ</i> $\alpha$	Amp	Pharmacia
pTorA	Expressionsvektor für TorA (TMAO- Reduktase) aus <i>E. coli</i>	Amp	[206]

pUC18c	Klonierungsvektor, <i>lacZ<math>\alpha</math></i>	Amp	[207]
RP4-4	Helferplasmid für konjugativen Transfer, IncP1, <i>tra</i> <sup>+</sup>	Amp, Tet	[208]
Plasmide aus dieser Arbeit			
Plasmid	Beschreibung	Resistenz	
pAN1	chimäres <i>fbc</i> aus pRI2 $\chi$ HindIII/SacI in pUC18c	Amp	
pAN2	pAN1-Derivat: NcoI-Schnittstelle aus chimärem <i>fbc</i> durch Mutagenese entfernt	Amp	
pAN5	Expressionsvektor: ISF <i>P.d.</i> über <i>overlap</i> -PCR aus pRI2(436) NcoI/HindIII in pGJ212	Amp	
pAN6	Expressionsvektor: ISF <i>B.t.</i> über <i>overlap</i> -PCR aus pAN2 NcoI/HindIII in pGJ212	Amp	
pAN7	NcoI-Schnittstelle durch Mutagenese aus pQE30Cu <sub>A</sub> entfernt	Amp	
pAN8	durch Mutagenese NcoI nach TEV- <i>site</i> von pAN7 eingeführt	Amp	
pAN9	Expressionsvektor: ISF <i>P.d.</i> aus pAN5 NcoI/HindIII in pAN8	Amp	
pAN10	Expressionsvektor: ISF <i>B.t.</i> aus pAN6 NcoI/HindIII in pAN8	Amp	
pAN13	Expressionsvektor: GFP aus pGJ212 NcoI/HindIII in pAN9	Amp	
pAN14	Tat-Signalpeptid über <i>overlap</i> -PCR aus pTorA BamHI/EcoRI in pUC18c	Amp	
pAN17	ISF <i>B.t.</i> aus pAN10 BamHI/XbaI in pAN14	Amp	
pAN18	Expressionsvektor: TorA-ISF <i>B.t.</i> aus pAN17 EcoRI/XbaI in pAN10	Amp	
pAN20	Expressionsvektor: ISF <i>P.d.</i> aus pAN9 NcoI/XbaI in pAN18	Amp	
pAN21	SacI/SmaI-Fragment aus pRI2(436) in pAlter	Tet, Amp <sup>s</sup>	
pAN22	Mutagenese von pAN21: Anpassung an Hefe-Epitop	Tet, Amp <sup>r</sup>	
pAN23	Expressionsvektor: SacI/SmaI-Fragment aus pAN22 in pRI2436	Sm, Cm	
pAN24	Insertion Oligoduplex in pAN22 NcoI/BglIII/Mung Bean	Tet, Amp <sup>r</sup>	
pAN30	SacI/SmaI-Fragment aus pAN24 in pAlter	Tet, Amp <sup>s</sup>	
pAN31	Mutagenese von pAN30: Reparatur <i>mismatches</i>	Tet, Amp <sup>r</sup>	
pAN32	Expressionsvektor: SacI/SmaI-Fragment aus pAN31 in pRI2(436)	Sm, Cm	
pAN33	pRI2(436) AatII/NcoI/Klenow, Religation: Entfernen Cm-Gen und NcoI-Schnittstelle	Sm	
pAN34	SacI/SmaI-Fragment pAN33 in pUC18c	Amp	
pAN35	Suizidplasmid: Sall/Klenow 4,4 kb-Fragment aus pSEKMF2 in pRvS1 SmaI	Amp	
pAN36	Mutagenese von pAN34: Insertion NcoI-Schnittstelle im <i>fbcF</i> -Gen	Amp	
pAN38	Mutagenesevektor mit Rieske-Kassette aus pAN36 SacI/NcoI in pSL1180	Amp	
pAN39	Rieske-Mutante D120N/E121Q/D146N	Amp	
pAN40	Rieske-Mutante D120N/E121Q	Amp	
pAN41	Rieske-Mutante D146N	Amp	
pAN42	Expressionsvektor für Rieske-Mutanten: SacI/SmaI-Fragment aus pAN36 in pAN33	Sm	
pAN43	Rieske-Mutante D120N/E121Q/D146N/E124Q/D142N	Amp	
pAN44	Rieske-Mutante D120N/E121Q/D146N/E124Q	Amp	

pAN45	Rieske-Mutante D120N/E121Q/D146N/D142N	Amp
pAN46	Rieske-Mutante D120N/E121Q/E124Q/D142N	Amp
pAN47	Rieske-Mutante D120N/E121Q/E124Q	Amp
pAN48	Rieske-Mutante D120N/E121Q/D142N	Amp
pAN49	Rieske-Mutante D146N/E124Q/D142N	Amp
pAN50	Rieske-Mutante D146N/E124Q	Amp
pAN51	Rieske-Mutante D146N/D142N	Amp
pAN52	Mutagenese von pAN43: <i>mismatch</i> -Reparatur	Amp
pAN53	Expressionsvektor: NcoI/SacI-Fragment aus pAN52 in pAN42	Sm
pAN54	Expressionsvektor: ISF <i>P.d.</i> aus pAN5 NcoI/HindIII in pQE60	Amp
pAN55	Expressionsvektor: GFP aus pGJ212 NcoI/HindIII in pQE60	Amp

### 2.1.9 Verwendete Mikroorganismen und Bakteriophagen

#### *Escherichia coli* K12

Stamm	Genetische Marker / Phänotyp	Herkunft / Referenz
BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> , mB <sup>+</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi supE</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) [ <i>mutS</i> ::Tn10] [F', <i>proA</i> <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , <i>lacIqZΔM15</i> ]	[209]
C41(DE3)	BL21(DE3)-Derivat mit genotypisch uncharakterisierten Mutationen (phänotypisch selektiert nach heterologer Expression toxischer Proteine)	[210]
C43(DE3)	wie C41(DE3)	[210]
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZΔM15</i> ) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[211]
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>relA1 supE44 λ<sup>-</sup> Δ(lac-proAB)</i> [F', <i>traD36, proA</i> <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , <i>lacIqZΔM15</i> ]	[207]
M15 [pRep4]	Nal <sup>s</sup> Str <sup>s</sup> Rif <sup>s</sup> Thi <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup> Ara <sup>+</sup> Gal <sup>+</sup> Mtl <sup>-</sup> F <sup>-</sup> RecA <sup>+</sup> Uvr <sup>+</sup> Lon <sup>+</sup>	Qiagen
Origami	Δ <i>ara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvull phoR araD139 galE galK rspL</i> F' [ <i>lac<sup>-</sup> (lacI<sup>q</sup>)pro</i> ] <i>gor522::Tn10(Tc<sup>r</sup>) trxB::kan</i>	Novagen
Origami (DE3)	mit (DE3)-Prophage	Novagen
SG13009 [pRep4]	Nal <sup>s</sup> Str <sup>s</sup> Rif <sup>s</sup> Thi <sup>-</sup> Lac <sup>-</sup> Ara <sup>+</sup> Gal <sup>+</sup> Mtl <sup>-</sup> F <sup>-</sup> RecA <sup>+</sup> Uvr <sup>+</sup> Lon <sup>+</sup>	[212]
XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene
XL10 Gold	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Tn5 (Kan <sup>r</sup> ) Amy]	Stratagene

*Paracoccus denitrificans*

Stamm	Genetische Marker/ Phänotyp	Herkunft / Referenz
AT110	Pd1235-Derivat, <i>cycM::Km</i>	[213]
MK6	Pd1222-Derivat, $\Delta$ <i>fbc::Km</i>	[214]
MR31	Pd1222-Derivat, $\Delta$ <i>ctaDI::Km</i> , $\Delta$ <i>ctaDII::Tc</i>	[215]
Pd12-184 / Pd92-223	Pd9220-Derivat (?), $\Delta$ <i>nqo8-nqo9::ndh-Km</i>	Finel, unveröffentlicht, [201]
Pd1222	Rif <sup>r</sup> , Spec <sup>r</sup> , <i>enhanced conjugation frequencies</i>	[216], DSM#413
Bakteriophagen		
R 408	Helferphage zur Gewinnung von ss- Phagemid-DNA	Promega

**2.1.10 Antibiotika**

Antibiotikum	Stammlösung
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in 50 % Glycerin
Chloramphenicol (Cm)	30 mg/ml in Ethanol
Kanamycin (Km)	25 mg/ml in 50 % Glycerin
Rifampicin (Rif)	15 mg/ml in Methanol
Streptomycinsulfat (Sm)	25 mg/ml in 50 % Glycerin
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in 70 % Ethanol

Wässrige Stammlösungen werden sterilfiltriert, aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Jedes Aliquot wird nach dem Anbrechen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, und vier bis sechs Wochen verwendet. Stammlösungen von Chloramphenicol, Rifampicin und Tetracyclin werden stets frisch angesetzt. In Kultur werden Rifampicin 1:250, alle anderen Antibiotika 1:1000 verdünnt. Rifampicin und Tetracyclin sind lichtempfindlich.

**2.1.11 Nährmedien**

Luria-Bertani-Medium (LB)	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
M9-Medium	200 ml 5x M9-Salze, 2 ml 1M MgSO <sub>4</sub> , 20 ml 20 % Glucose, 0,1 ml 1M CaCl <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O ad 1 l
5x M9-Salze	64 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O, 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,5 g NaCl, 5 g NH <sub>4</sub> Cl, H <sub>2</sub> O ad 1 l
Succinatmedium [217]	50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM NH <sub>4</sub> Cl, 1 mM Citronensäure, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 40 mM Succinat, 0,2 % (v/v) Spurenelementlösung
Spurenelementlösung	100 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM CoCl <sub>2</sub> , 5 mM CuSO <sub>4</sub> , 90 mM FeCl <sub>3</sub> , 5 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 25 mM ZnCl <sub>2</sub> in 18 % HCl, pH 6,2 mit KOH
Terrific Broth (TB)	12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 2,3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 12,5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O ad 1 l

Für Agar-Platten werden den Medien vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar-Agar zugesetzt. Die Platten können bei 4 °C gelagert und so vier bis sechs Wochen benutzt werden.

### 2.1.12 Anzucht und Lagerung

#### *Escherichia coli*

Flüssigkulturen in LB-Medium werden im Luftbadschüttler bei 37 °C und 240 rpm angezogen. Kulturen auf Agarplatten werden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Platten können danach bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt werden. Für Gefrierkulturen werden 1,5 ml einer LB-Übernachkultur mit 0,5 ml 60 % Glycerin versetzt, gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gefrierkulturen werden bei -80 °C gelagert.

#### *Paracoccus denitrificans*

*P. denitrificans* wird je nach Verwendung in LB- oder Succinat-Medium im Luftbadschüttler bei 32 °C und 240 rpm angezogen. Plattenkulturen werden bei 32 °C bebrütet (Heraeus B 6120). Die Plattenkulturen können bei RT eine Woche lang aufbewahrt werden. Für Gefrierkulturen wird wie bei *E. coli*-Stämmen verfahren. Für große Anzuchten von *P. denitrificans* wird zunächst von einer Plattenkultur eine 100 ml-Vorkultur angeimpft. Nach Wachstum über Nacht wird damit eine 2 l-Vorkultur 5 %ig angeimpft. Nach 24 h werden je 2,5 L Succinat-Medium 4 %ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft. Die Ernte erfolgt nach 20-24 h bei einer OD<sub>600</sub> von 3-5.

### 2.1.13 Programme und Datenbanken

Alignment-Datenbank	<a href="http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/piraln.html">http://pir.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/piraln.html</a>
Clone Manager	Scientific & Educational Software
ClustalX v1.81	[218]
Codon Usage Database	<a href="http://www.kazusa.or.jp/codon/">http://www.kazusa.or.jp/codon/</a>
Dialign	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign</a>
ExpASy Molecular Biology Server	<a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
Genbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>
Ligplot	[219]
MAPLE	Scientific Computers
Primer Generator	<a href="http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi">http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi</a>
Program O	[220]
Protein Data Bank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>
SimFonia	Bruker-Franzen Analytik GmbH
WebLab ViewerPro 3.7	Molecular Simulations Inc.
WINEPR	Bruker-Franzen Analytik GmbH



## 2.2 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)

Die hier angewendete Methode nach Birnboim und Doly [221] basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen und anschließender Fällung der Plasmid-DNA mit Ethanol. Um Plasmid-DNA in kleinem Maßstab zu isolieren, werden 1,5 ml Zellen einer Übernachtskultur 2 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm pelletiert und in 100 µl TEG-Puffer (Mini I) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl frisch angesetzter NaOH/SDS-Lösung (Mini II), invertieren des Cups und Inkubation für 5 min auf Eis werden die Zellen lysiert. Die Lösung wird mit 150 µl Kaliumacetat-Lösung (Mini III) neutralisiert. Zelltrümmer, SDS, denaturierte chromosomale DNA und Proteine werden 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Aus dem Überstand werden die übrigen Proteine durch zweimalige Zugabe des gleichen Vol Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v), Vortexen und jeweils 10 min Zentrifugation extrahiert. Die obere wässrige Phase mit der Plasmid-DNA wird abgenommen und mit zwei Vol 100 % Ethanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach 20 min Inkubationszeit auf Eis wird die Plasmid-DNA 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird anschließend mit 70 % kaltem Ethanol - ohne Resuspendieren - gewaschen. Nach Trocknen an der Luft wird das ethanolfreie Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst. RNA-Rückstände werden durch Zugabe von 1 µl RNase A (2 mg/ml) 30 min bei 37 °C hydrolysiert. Mitunter wird für Sequenzierproben das Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Mit dem Weglassen eines Phenol-extraktionsschrittes - die Absorption des Phenols interferiert mit den Fluoreszenzfarbstoffen beim Sequenzieren - aus der oben beschriebenen Prozedur war dies nicht mehr erforderlich.

### 2.2.2 Isolierung genomischer DNA

Eine 50 ml-ÜNK von *P. denitrificans* wird auf Eis abgekühlt und in einem Falcon-Röhrchen geerntet (Megafuge, 15 min, 6000 rpm). Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 20 ml 10 mM Tris-HCl pH8, 100 mM EDTA vollständig resuspendiert. Unter Schwenken werden 2 ml 20 % SDS-Lösung zugegeben. Die Lösung wird 30 min bei 65 °C im Rollerschrank inkubiert. Unter Schütteln werden 6 ml 5 M NaClO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben und mit 7 ml Chloroform bei 45 °C im Rollerschrank vermischt, bis beide Phasen emulgiert sind. Es folgt eine Zentrifugation (Megafuge, 6000 rpm, 30 min, RT). Die wässrige Phase wird ohne die trübe Interphase abgenommen und in einem Falcon-Röhrchen mit 0,7 Vol Isopropanol überschichtet. Durch Rollen werden die

Phasen vermischt. Das sich bildende fädige DNA-Präzipitat kann mit einer Pipette in ein frisches Röhrchen überführt werden. Alternativ kann die DNA durch Zentrifugation sedimentiert werden. Die DNA wird mit 4,9 ml TE-Puffer und 0,1 ml 20 % SDS versetzt und bei 68 °C bis zur vollständigen Lösung inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung erfolgt eine RNase-Behandlung (20 µg/ml RNase, 37 °C, 20 min), eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung (300 mM Natriumacetat, 2 Vol Ethanol). Die sedimentierte DNA wird in 1 ml TE-Puffer unter sanftem Schwenken gelöst.

### **2.2.3 Restriktion von DNA**

Für einen Restriktionsansatz werden in einem Volumen von 20 µl i.d.R. 100-300 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Für die unterschiedlichen Enzymkombinationen werden gemäß den Herstellerangaben die bestmöglichen Pufferbedingungen ermittelt und die entsprechenden Verdünnungen aus den mitgelieferten 10x-Stammlösungen angesetzt. Für einen Restriktionsansatz mit DNA-Mengen unter 500 ng reichen meist 2-3 Units eines Enzyms aus, um nach 1-2 h Inkubation eine vollständigen Schnitt zu erzielen. Die Reaktionstemperatur richtet sich nach dem Optimum der verwendeten Enzyme. Eine Hitzeinaktivierung der Enzyme nach Abschluß der Reaktion ist sinnvoll, wenn sich unmittelbar an die Restriktion noch weitere Enzymreaktionen wie z.B. Dephosphorylierung anschließen sollen. Ansonsten kann die Reaktion durch Zugabe von 1/4 Vol DNA-Probenpuffer gestoppt werden. Die Proben können bei -20 °C gelagert oder unmittelbar für die elektrophoretische Auftrennung eingesetzt werden.

### **2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Auftrennung von DNA erfolgt in 0,7 bis 2 %igen Agarose-Gelen, jeweils an die relevante Fragmentgröße angepasst. Um die Gele herzustellen, wird TBE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die gesamte Agarose gelöst hat, Schlieren werden durch vorsichtiges Schwenken entfernt. Zur etwas erkalteten Lösung werden pro 100 ml Agaroselösung 5 µl Ethidiumbromidlösung gegeben und durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Die handwarme Agarose wird in eine mit Kämmen versehene Flachbettkammer gegossen. Nach etwa 30 min ist das Gel auspolymerisiert, die Kämmen für die Taschen werden vorsichtig entfernt, dann wird das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben können nun in die auf der Kathodenseite gelegenen Taschen pipettiert werden. Der Lauf

wird bei konstanter Feldstärke von 5 V/cm Kammerlänge zwischen den Polen durchgeführt. Das Gel wird auf einen UV-Tisch gelegt, die DNA-Fragmente werden mit der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids detektiert. Zu analytischen Zwecken wird UV-Licht der Wellenlänge 254 nm eingesetzt. Für präparative Zwecke wird UV-Strahlung der Wellenlänge 365 nm verwendet, um die DNA nicht zu schädigen.

### 2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Die im UV-Licht sichtbaren Banden von Interesse werden aus dem Agarose-Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorher gewogenes Eppendorf-Cup überführt. Zur DNA-Extraktion wird das Qiagen Gel Extraction Kit verwendet. Die DNA wird in 30-50 µl des mitgelieferten, 1:5 verdünnten Elutionspuffer EB eluiert.

### 2.2.6 Ligation

Für einen 20 µl-Ansatz werden 2 µl 10x Ligationpuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U), etwa äquimolare Mengen Insert und Vektor eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Für *sticky end*-Ligationen werden mindestens 25 ng, für *blunt end*-Ligationen mindestens 200 ng Vektor eingesetzt. Die Reaktion läuft typischerweise 60 min bei 22 °C, dann wird die Ligase 10 min bei 65 °C inaktiviert. Für *blunt end*-Ligationen kann der Ansatz über Nacht inkubiert werden. Um diese Ligrationsreaktionen zu unterstützen, kann hier das Volumen auf 10 µl reduziert, die Viskosität der Lösung durch Zugabe von 10 % PEG 4000 erhöht, sowie ein Ligationpuffer verwendet werden, der nur 1/10 der Standardkonzentration an ATP enthält. Um intramolekulare Reaktionen zu verhindern, können entweder Vektor oder Insert mit *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) dephosphoryliert werden.

### 2.2.7 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgt nach Hanahan [211]. Aus einer Gefrierkultur wird eine 2 ml-ÜNK in LB-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wird mit der ÜNK 0,5 %ig eine 50 ml LB-Kultur inokuliert. Diese inkubiert bei 37 °C und 240 rpm, bis eine OD<sub>550</sub> ~ 0,5 erreicht ist. Die Kultur wird 10 min auf Eis gestellt, danach abzentrifugiert (Biorad Megafuge 10 min bei 2000g und 0 °C). Der Überstand wird dekantiert, der Rest des Mediums mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wird zunächst in 1 ml eiskaltem TFB-I-Puffer vorsichtig resuspendiert. Dann werden weitere 6,5 ml eiskalter TFB-I-Puffer zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Zellen

inkubieren 1 h auf Eis. Die Suspension wird abzentrifugiert (Megafuge, 10 min, 3000 g, 0 °C). Das Pellet wird in 2 ml eiskaltem TFB-II-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf Eis zu 100 µl aliquotiert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen werden bei –80 °C gelagert.

### 2.2.8 Hitzeschocktransformation

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird 20 min auf Eis aufgetaut, dann werden 20-50 ng eines Ligationsprodukts oder 1 ng einer Plasmidpräparation hinzugegeben. Durch Rühren mit einer Pipettenspitze wird vorsichtig gemischt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird eine Minute bei 42 °C inkubiert, dann wieder kurz auf Eis gestellt. 900 µl LB-Medium werden zugegeben, anschließend inkubiert die Kultur 30 min (bei Ampicillinresistenz) bis 60 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Danach werden entweder der gesamte Ansatz oder Teilmengen (10 % und 90 %) auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

### 2.2.9 Phosphorylierung von Oligonucleotiden

Die verwendeten Oligonucleotide werden von den Firmen MWG oder Biospring bezogen. In ein Eppendorf-Cup werden für einen 20 µl-Ansatz 2 µl PNK 10x Reaktionspuffer, 4 µl 5 mM ATP-Lösung, 1 µl T4 Polynucleotidkinase, sowie 100 pmol des zu phosphorylierenden Primers gemischt und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz inkubiert 30 min bei 37 °C und wird dann 10 min bei 70 °C inaktiviert.

### 2.2.10 Gerichtete Mutagenese

#### Altered sites-Methode

Für einige Mutagenesereaktionen wird das Altered sites-System der Firma Promega den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Der Mutagenesevektor pAlter ist ein Phagemid, das mittels eines Helferphagen in der Einzelstrangform gewonnen werden kann. Dazu werden aus einer 2 ml-Vorkultur 20 ml LB/Tet 1,5 %ig angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Nach 30 min wird mit dem Helferphagen R 408 infiziert. Nach Wachstum ü.N. werden die Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren entfernt (SS34, 15 min, 10'000 rpm). Die Phagenpartikel werden mit 1/4 Vol Phagenpräzipitationslösung 30 min auf Eis gefällt. Eine Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 13'000 rpm) liefert das ssDNA-Pellet, das mit 200 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen wird. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Analyse erfolgt auf einem 1 %igen Agarosegel.

Für die Mutagenesereaktion werden ~ 100 ng ssDNA eingesetzt. In einem 20 µl-Ansatz in Annealing-Puffer werden das mutagene Oligonucleotid im molaren Verhältnis 25:1, das der Selektion dienende Ampicillin-repair-Oligonucleotid im Verhältnis 5:1 eingesetzt. Der Ansatz inkubiert 5 min bei 80 °C und wird dann langsam im Heizblock auf ~ 30 °C abgekühlt, anschließend auf Eis gestellt. Es werden für einen 30 µl-Ansatz 10x-Synthesepuffer, T4-DNA-Polymerase (10 U) und T4-DNA-Ligase (3 U) zupipettiert. Die Reaktion läuft 90 min bei 37 °C. Die Hälfte des Ansatzes wird in den reparaturdefizienten Stamm BMH 71-18 *mutS* transformiert. Die Transformanden werden unmittelbar für eine 2 ml LB/Amp-Übernackkultur eingesetzt, von der die Phagemid-DNA isoliert wird. Eine klonale Vereinzelung erfolgt durch Retransformation in kompetente JM 109-Zellen und Ausstreichen auf LB/Amp-Platten. Klone aus dieser Transformation werden angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und per Sequenzierung überprüft.

#### Modifizierte QuikChange-Methode

Mit einem an die QuikChange-Methode (Stratagene) angelehnten, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll können mit Hilfe eines oder mehrerer mutagener Primer zielgerichtet mehrere Mutationen gleichzeitig in ein Plasmid eingeführt werden. Das Reaktionsgemisch aus 2,5 µl des 10x DNA-Polymerase-Puffers, etwa 50 ng des Ausgangsplasmids, 10 µl dNTPs (2 mM), je 10 pmol der phosphorylierten mutagenen Primer, 2,5 µl einer 5 mM NAD<sup>+</sup>-Lösung, 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase, 1 µl Ampligase (thermostabile Ligase) und H<sub>2</sub>O ad 25 µl wird mit Mineralöl überschichtet und im Thermocycler auf 95 °C erhitzt. Hierbei trennt sich die parentale DNA-Duplex in zwei Einzelstränge auf. Dann wird auf 55 °C abgekühlt, wobei sich der mutagene Primer an den komplementären ssDNA-Strang anlagert. In einem 65 °C-Schritt kommt es zur Elongation des Primers durch die *Pfu*-Polymerase. Die thermostabile, NAD<sup>+</sup>-abhängige Ampligase verknüpft dann das 3'-Ende des verlängerten Stranges mit dem 5'-Ende des Primers, so dass wieder zirkuläre ds-DNA vorliegt. Diese Schritte werden in einer zyklischen Folge 30mal wiederholt. Aufschmelzen und Annealing erfolgen für je 1 min, die Syntheszeit richtet sich nach der verwendeten Polymerase und der Länge des Plasmids; für die *Pfu*-Polymerase werden 2 min pro Kilobase veranschlagt. Das Reaktionsgemisch wird mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit aufgereinigt und in 30 µl 1:5 verdünntem EB-Puffer aufgenommen. Die Ausgangsplasmid-DNA wird anschließend mit DpnI verdaut, einer Restriktionsendonuclease, die selektiv methylierte

DNA-Moleküle schneidet. Der Ansatz enthält das aufgereinigte Reaktionsgemisch (30 µl), 4 µl 10x-Puffer, 1 µl DpnI und H<sub>2</sub>O ad 40 µl und inkubiert für mindestens 2 h bei 37 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung (20 min bei 80 °C). Der Mutageneseansatz wird anschließend in DH5α- oder JM 109-Zellen transformiert. Nach Kultivierung mehrerer Einzelkolonien wird die Plasmid-DNA präpariert. Der Erfolg der Mutagenese wird zunächst - wenn möglich - über ein verändertes Restriktionsmuster überprüft und durch Sequenzierung des betreffenden Bereichs verifiziert. Um unerwünschte, durch die mäßige Genauigkeit der *Pfu*-Polymerase bedingte *second site*-Mutationen auszuschließen, wird möglichst mit Mutagenese-„Kassetten“ gearbeitet, die komplett sequenziert und anschließend in den Expressionsvektor umkloniert werden können.

### 2.2.11 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen werden von der Firma Scientific Research and Development GmbH durchgeführt. Dabei wird die Kettenabbruchmethode [222] mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren angewendet. Meist wird die betreffende DNA in Form einer Plasmid-Minipräparation zusammen mit den entsprechenden Sequenzierprimern an die Firma abgegeben. Bei großen Plasmiden war es manchmal erforderlich, den interessierenden DNA-Abschnitt per PCR zu amplifizieren und das PCR-Produkt zur Sequenzierung abzugeben.

### 2.2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) [223] wird zur DNA-Amplifikation verwendet. Ein Reaktionszyklus im Thermocycler beginnt mit einem denaturierenden Schritt bei 95 °C, wodurch die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Der folgende Schritt dient der Anlagerung kurzer Oligonucleotid-Primer an komplementäre DNA-Bereiche. Die Schmelztemperatur der Primer wird mit dem Programm Clone Manager bestimmt, die Annealingtemperatur wird als Richtlinie zehn Grad niedriger gesetzt. Im anschließenden Elongationsschritt bei 72 °C synthetisiert die thermostabile Polymerase von den angelagerten Primern ausgehend die zur Matrizen-DNA komplementären Stränge. Für die Denaturierungs- und Anlagerungsschritte reichen in der Regel 30-60 s aus. Die Länge des Elongationsschrittes hängt von der Art der eingesetzten Polymerase (*Taq* = 1000 bp/min, *Pfu* = 500 bp/min) und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereichs ab. Die Reaktionszyklen werden typischerweise 30

Mal wiederholt. Vor der zyklischen Reaktionsfolge erfolgt beim Start der PCR ein einzelner Denaturierungsschritt, der zu Beginn die vollständige Denaturierung sicherstellen soll. Am Ende der Reaktionszyklen schließt sich ein letzter Elongationsschritt an, bei dem der Polymerase Gelegenheit gegeben wird, etwaige „Lücken“ zu schließen. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA dienen 1-2 ng als Template. Für einen typischen Ansatz werden neben der Ausgangs-DNA je 10-20 pmol Primer (*forward* und *reverse*), 100 µM dNTPs, 2,5 U Polymerase, 5 µl Polymerasepuffer (10x), und H<sub>2</sub>O ad 50 µl verwendet. Das Reaktionsgemisch wird im PCR-Gefäß mit Mineralöl überschichtet. Für präparative Zwecke wird ausschließlich die Pfu-DNA-Polymerase verwendet, da diese im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonuklease) besitzt. Die Polymerase wird erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben (*hot start*); alternativ wird das komplette Reaktionsgemisch in den auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Die folgende Tabelle fasst das typische Temperatur-Zeit-Profil einer PCR zusammen.

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Aufschmelzen	3	95	1
Aufschmelzen	0,5	95	30
Anlagerung	0,5	40-70	
Elongation	x	72	
finale Elongation	5	72	1

### 2.2.13 Konjugation

*P. denitrificans* hat keine natürliche oder künstliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmiden; es kann somit keine Transformation durchgeführt werden. Zur Einschleusung von Plasmiden in *P. denitrificans* wird deshalb die parasexuelle Konjugation genutzt. Die benötigten *tra*-Gene werden im hier verwendeten *triple mating* von einem *E. coli*-„Helferstamm“ zur Verfügung gestellt. Dieser Helferstamm verfügt über ein mobiles Plasmid (RP4-4), das zunächst in den Donorstamm (DH5α) transferiert wird. Dort mobilisiert es das Zielplasmid, welches dann in den Akzeptorstamm übertragen werden kann. Für das *mating* werden die drei Stämme aus 2 ml-ÜNK abzentrifugiert (Tischzentrifuge 6000 rpm) und in 500 µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert. Anschließend werden jeweils 100 µl des *E. coli*-Donorstammes und Helferstammes mit 300 µl des *P. denitrificans*-Akzeptorstammes gemischt und abzentrifugiert. 500 µl werden abgenommen, die Zellen werden in den

übrigen 100 µl resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum aufgetropft. Die Platten werden dann 6 h bis über Nacht bei 32 °C inkubiert; hierbei kommt es zur Konjugation. Die Mischkultur wird in 1 ml LB-Medium resuspendiert und in Verdünnungen von 1:4–1:32 auf antibiotikahaltigen Platten ausgestrichen. Hierbei wird eine Antibiotikakombination verwendet, die die *E. coli*-Donorzellen und Helferzellen abtötet und die *P. denitrificans*-Zellen auf Anwesenheit des zu übertragenden Plasmids selektiert. Die Platten werden bei 32 °C für mehrere Tage inkubiert. Einzelne Kolonien werden gepickt und auf eine Erhaltungsplatte mit derselben Antibiotikakombination umgestrichen und kultiviert. Von den Erhaltungskolonien können Flüssigkulturen angeimpft werden. Mit einer DNA-Minipräparation und anschließender Restriktionsanalyse kann der erfolgreiche Plasmidtransfer überprüft werden.

#### 2.2.14 Southern Blot

1-2 µg genomische DNA von *P. denitrificans* werden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, die Fragmente werden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wird anschließend per Vakuum auf eine Nylonmembran transferiert (90 min, 40 mbar Druckdifferenz); als Transferlösung dient 0,4 N NaOH. Die Membran wird in 5x SSC äquilibriert und die Transfereffizienz unter UV-Licht überprüft. Die Membran wird in einem Falcon-Röhrchen 1-2 h bei 42 °C mit 5 ml Vorhybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierungslösung wird unmittelbar vor Verwendung 10 min aufgekocht und ersetzt dann die Vorhybridisierungslösung. Der Blot inkubiert ü.N. bei 42 °C. Die Membran wird anschließend je zweimal mit Waschlösung 1 (5 min bei RT) und 2 (20 min bei 68 °C) behandelt. Für die Detektion wird 1-2 min in Detektionslösung 1 und 30 min in Detektionslösung 2 bei RT inkubiert. Anschließend wird gegen frische Detektionslösung 2 ausgetauscht und das anti-Digoxigenin-AP-Konjugat 1:5000 zugegeben. Nach 30 min Inkubation wird zweimal 15 min mit Detektionslösung 1 gewaschen. Die Membran wird 5 min in Detektionslösung 3 äquilibriert, dann in Detektionslösung 4 solange inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen sind. Die Färbereaktion wird mit 50 mM EDTA-Lösung beendet.



## 2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

Wenn nicht anders beschrieben, werden alle Schritte bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Membran- und Proteinpräparationen werden bei -80 °C gelagert.

### 2.3.1 Proteinfällung

Für die Proteinfällung wird Trichloressigsäure (TCA) verwendet [224]. Zu 1 ml Proteinlösung werden 150 µl 100 % TCA gegeben (13 % Endkonzentration). Nach dem Mischen steht der Ansatz 5 min bei -20 °C und dann 15 min bei 4 °C. Nach einer Zentrifugation (Tischzentrifuge 15 min, 13'000 rpm) wird der Überstand abgenommen, das Pellet vorsichtig mit 90 % EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Verfärbt sich dieser aufgrund von TCA-Rückständen gelb, werden wenige µl 1 M Tris pH 8,5 zugegeben, bis sich die Probe wieder blau färbt.

### 2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Konzentrationsbestimmung nach Lowry

Für die Konzentrationsbestimmung nach Lowry [225,225] muss die Arbeitslösung frisch angesetzt werden, indem 20 ml Lowrypuffer A, 0,5 ml 20 % SDS-Lösung, sowie je 200 µl Lowrypuffer B1 und B2 gemischt werden. Die Eichreihe wird aus einer 2 mg/ml BSA-Lösung in den Verdünnungen 0/0,2/0,4/0,6/0,8/1,0/1,5 und 2,0 mg/ml hergestellt. Eichreihe und Messproben werden auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt. 850 µl der Arbeitslösung werden zu den Proben pipettiert und gevortext. Die Proben werden für 10 min dunkel gestellt. Danach werden 100 µl Folinlösung zugegeben, gevortext und nochmals für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Färbereaktion wird im Photometer bei 750 nm erfasst. Auf Basis der Eichreihe wird über eine quadratische Regression eine Eichgerade erstellt, mit der sich den Messwerten Proteinkonzentrationen zuordnen lassen.

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Für das aufgereinigte ISF wird alternativ die photometrische Konzentrationsbestimmung benutzt [226]. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon(280 \text{ nm}) = 19630 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wird aus der Sequenz mit dem Programm ProtParam (ExpASy-Server) ermittelt. Die Messung erfolgt in verschiedenen Puffern, für die dann jeweils ein Nullwert ermittelt werden muss.

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Membranprotein-Proben werden für die Elektrophorese mit 2x-Probenpuffer gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Ganzzelllysate und lösliche Proteine werden in Probenpuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert.

#### Glycin-PAGE

Für ein 12 %iges Trenngel nach Laemmli [227] werden 2,4 ml Acrylamidlösung, 1,5 ml Trenngelpuffer und 2 ml H<sub>2</sub>O gemischt und mit 10 µl TEMED und 50 µl 10 % APS die Polymerisation gestartet. Das Trenngel wird in die vorbereitete Gelapparatur gegossen und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel, bestehend aus 700 µl Acrylamidlösung, 1 ml Sammelgelpuffer und 2,4 ml H<sub>2</sub>O über das Trenngel geschichtet. Das fertig polymerisierte Gel wird in den Tank gestellt, innere und äußere Kammer werden mit Laufpuffer gefüllt. Nach dem Probenauftrag läuft das Gel 45 min bei 200 V konstanter Spannung.

#### Ahn-PAGE

Das in der Vorbereitung einfache Gelsystem nach Ahn erlaubt eine rasche Analyse von Proteingemischen [228]. Bis auf den Trenngelpuffer entsprechen alle Lösungen dem Laemmli-System. Für ein 12 %iges Gel werden in einem Falcon-Tube 4 ml Acrylamidlösung, 1 ml H<sub>2</sub>O und 5 ml 2x-Trenngelpuffer gemischt. Die Polymerisation erfolgt nach Zugabe von 18 µl TEMED und 80 µl 10 %igem APS. Die Lösung wird durch Invertieren gemischt und dann zügig in die zuvor am Boden mit Agarosegel abgedichtete Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach dem Polymerisieren des Gels wird die Gelapparatur in den mit Laufpuffer gefüllten Tank gestellt. Die Proben werden mit einer Hamilton-Spritze geladen. An das Gel werden 45 min lang 200 V konstanter Spannung angelegt.

#### Tricin-PAGE

Diese Gelsystem wurde speziell für die Auftrennung von Proteinen  $M_r < 20$  kDa entwickelt [229]. Zur Herstellung eines 10 %igen Trenngels werden 2 ml Acrylamid, 3,5 ml H<sub>2</sub>O, 3,3 ml Gelpuffer, 1 ml Glycerin, 20 µl TEMED und 100 µl APS gemischt und in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Nach der Polymerisation wird das Sammelgel, bestehend aus 0,5 ml Acrylamid-Lösung, 6 ml H<sub>2</sub>O, 1,5 ml Gelpuffer, 20 µl TEMED und 100 µl 10 % APS darüber geschichtet. Die Gelapparatur wird in den Tank

gestellt, die äußere Kammer wird mit Anodenpuffer gefüllt, die innere Kammer mit Kathodenpuffer. Nach Beladen läuft das Gel 100 min bei 100 V konstanter Spannung.

### 2.3.4 Native Proteingelelektrophorese

#### Blau-Nativ-PAGE / 2D-PAGE

Bei diesem Gelsystem wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine durch ihre native Größe und die Bindung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie-Blau geprägt; alle Proteine, die diesen Farbstoff binden, wandern bei pH 7,5 anodenwärts [230]. Als Standard dienen die bekannten, aus Rinderherzmitochondrien solubilisierten Atmungskettenkomplexe. Es werden 1,6 mm dicke Gele mit 3,5 % Sammelgel und 3,5 % → 13 % Gradiententrenngel verwendet. Die Gele werden mit einem Gradientenmischer bei 4 °C gegossen und bei RT auspolymerisiert.

	<b>3,5 % Trenngel</b>	<b>13 % Trenngel</b>	<b>3,5 % Sammelgel</b>
A/B-Mischung [ml]	4,2	13,1	1,5
Gelpuffer [ml]	20	16,7	8,3
Glycerin [g]		10	
H <sub>2</sub> O [ml]	ad 60	ad 50	ad 25
10 % APS [μl]	300	170	200
TEMED [μl]	30	17	20

Nach dem Beladen laufen die Gele zunächst bei einer Spannung von 100 V, später bei 500 V 3-4 h. Für eine zweite, denaturierende Dimension wird der interessierende Bereich in einem Streifen ausgeschnitten und auf ein Tricin-SDS-Gel (10 % Sammelgel, 16 % Trenngel) übertragen. Das zweite Gel läuft zu Beginn mit 100 V, nach dem Einlaufen der Proben bei 250 V.

#### Nativ-Elektrophorese nach Maurer

Für Maurer-Nativgele [231] wird das Mini-Protean System (Biorad) verwendet. Für ein 10 % Trenngel werden 1,9 ml Lösung 1, 5 ml Lösung 3 und 8,1 ml H<sub>2</sub>O gemischt und mit 25 μl TEMED und 110 μl 10 % APS polymerisiert. Das 3,5 % Sammelgel besteht aus 600 μl Lösung 3, 625 μl Lösung 2 und 3,7 ml H<sub>2</sub>O und wird unter gleichen Bedingungen polymerisiert. Die Proben werden in Probenpuffer ohne weitere Inkubation aufgetragen, das Gel läuft zu Beginn 30 min bei 90 V, dann etwa 45 min bei 110 V.

### 2.3.5 Gelfärbung

#### Coomassiefärbung

Zum Anfärben wird das Gel für 15 min bei 68 °C in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wird mit Coomassie-Entfärber entfernt.

#### Silberfärbung

Das Gel wird für mindestens zwei Stunden in Silberpräinkubationslösung gelegt und bei RT langsam geschüttelt. Hierauf folgen für jeweils 20 min drei Waschschritte mit 50 %igem Ethanol. Das Gel wird anschließend für 1 min in Silbergel-Vorbehandlungslösung gelegt und dann dreimal für 20 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Zugabe von Silberfärbelösung wird das Gel für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 20 s mit H<sub>2</sub>O wird die Entwicklungslösung zugegeben und so lange inkubiert, bis die gewünschte Färbung erreicht ist. Die Reaktion wird mit 50 mM EDTA pH 8 abgestoppt.

#### Hämfärbung

Für die Hämfärbung wird ein Gel unter nichtreduzierenden Bedingungen erstellt, für das die Proben in Probenpuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen werden. Das Gel wird für eine Stunde in Häm-Färbelösung II inkubiert. Danach wird gegen Häm-Färbelösung III gewechselt und für wenige Minuten im Dunkeln inkubiert. Häm-Färbelösung IV dient zum Abstoppen der Färbereaktion.

### 2.3.6 Western Blot

In einer Kunststoffwanne werden 2 l Transferpuffer vorgelegt, in die Wanne werden dann Kunststoffgitter, Schwamm, Filterpapier und das Proteingel gelegt. Auf das Gel wird luftblasenfrei eine Nitrocellulosemembran gelegt und auf diese Filterpapier, Schwamm und Kunststoffgitter. Dieses mit Gummibändern fixierte „Sandwich“ wird in die Blot-Apparatur gestellt, so dass die Nitrocellulosemembran zwischen dem Proteingel und der Anode der Apparatur zum Liegen kommt. Die Blotapparatur wird vollständig mit Transferpuffer gefüllt, dann werden für 1 h 400 mA Gleichstrom angelegt. Anschließend wird das Sandwich herausgeholt und die Membran entnommen. Die Membran wird 5 min in Ponceau S angefärbt. Mit H<sub>2</sub>O wird überschüssiger Farbstoff abgewaschen. Die Banden des Markers und die Bahnen werden mit einem Kugelschreiber markiert. Die Membran wird für mindestens 30 min in 10-20 ml NCS inkubiert. Danach wird gegen frisches NCS mit Erstantikörper (IgG-Fraktion: 1:1000-

Verdünnung; Serum: 1:100-Verdünnung) ausgetauscht und für mindestens zwei Stunden oder über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wird dreimal mit NCS für 10 min gewaschen. Dann wird der 1:1000 verdünnte Zweitantikörper in NCS zugegeben und für 2 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Membran für 10 min mit frischem NCS, für weitere 10 min mit TBS-Triton und schließlich für 5 min mit TBS gewaschen. Für die Farbreaktion wird die Membran durch fünfminütige Inkubation in TNM-Puffer auf pH 9,5 eingestellt. Der Puffer wird abgossen und die aus 10 ml TMN, 45 µl NBT und 45 µl BCIP bestehende Färbelösung für einige Minuten bis zu einer Stunde aufgegeben und im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 mM EDTA pH 8 abgestoppt.

#### Western Blot mit Chemilumineszenz-Detektion

Für eine sensitivere Detektion wird ein Chemilumineszenzverfahren genutzt. Als zweiter Antikörper wird dabei Peroxidase-konjugierter anti-Maus-IgG 1:15'000 eingesetzt. Die trockene Membran wird in der Dunkelkammer mit den *enhanced chemiluminescence*-Reagenzien ECL 1 für 5 min, mit ECL 2 für 1 min behandelt. Zum Nachweis wird die Membran 1-5 min auf einem Röntgenfilm exponiert.

#### 2.3.7 Chemisches crosslinking

Die *crosslinks* werden unter verschiedenen Pufferbedingungen durchgeführt; dabei ist darauf zu achten, dass der Puffer keine primären Amine wie z.B. Tris oder Aminocapronsäure enthält, da diese mit dem *crosslinker* reagieren. Für *crosslinking* von Einzelkomplexen oder Membranen werden 20 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,02 % DDM oder 20 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,5, 0,02 % DDM verwendet, für *crosslinking* von aufgereinigtem Superkomplex 20 mM Imidazol/HCl pH 7,3, 1 mM EDTA, 0,05 % Digitonin. Die Proteinproben werden gegebenenfalls über eine kurze Gelfiltration (Sephadex G25) im für den *crosslink* vorgesehenen Puffer äquilibriert. 10-25 mM Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP)-Stammlösungen werden in DMSO angesetzt. Die Proteinkonzentrationen im Ansatz liegen bei 2-10 mg/ml. Wenn die Proteinkonzentration über 5 mg/ml liegt, wird DSP in 10fachem molaren Überschuss eingesetzt, für Konzentrationen < 5 mg/ml in 20-50fachem Überschuss. Die Reaktion erfolgt für 2 h auf Eis. Zum Beenden werden 50 mM Tris pH 7,5 zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Danach wird der Ansatz bei -80 °C gelagert oder direkt für die PAGE-Analyse eingesetzt. Für Kontrollansätze wird DSP zunächst 30 min auf Eis mit 50 mM Tris pH 7,5 gequenchet, dann erst wird das Protein zugegeben. Die

quervernetzten Proben werden für die SDS-PAGE in Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol eingesetzt. Soll die Disulfidbrücke des *crosslinker* gespalten werden, wird die Probe in PAGE-Probenpuffer mit 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und 15 min bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.8 magnetic bead pull-down assay

Diese Messungen werden am Max-Planck-Institut für Biophysik in Zusammenarbeit mit Hildur Palsdottir vorgenommen, die dieses Protokoll ausgearbeitet hat [232]. Das verwendete  $F_v$ -Fragment 18E11, das an der schweren Kette ein Strep-*tag* I trägt, wird aus einer Periplasmapräparation mit Hilfe einer Streptavidinsäule aufgereinigt. 100  $\mu$ l einer Suspension (50 mg/ml) der magnetischen, mit Streptactin überzogenen *beads* werden mit Puffer A gewaschen. Das  $F_v$ -Fragment wird mit dem aufgereinigten  $bc_1$ -Komplex gemischt und auf Eis inkubiert. Die gewaschenen *beads* werden zugegeben und auf Eis unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die *beads* werden mit Puffer A gewaschen. Der  $bc_1$ - $F_v$ -Cokomplex wird durch Zugabe des Elutionspuffers von den Kügelchen gelöst. Die *beads* werden entfernt. An verschiedenen Punkten der Prozedur werden Proben für die Gelelektrophorese genommen.

### 2.3.9 Membranpräparation

Membranpräparation in analytischem Maßstab

Zunächst wird eine 2 ml-LB-Vorkultur des entsprechenden *P. denitrificans*-Stammes mit den entsprechenden Antibiotika bei 32 °C angezogen. Diese Vorkultur wird in einen 2 L-Kolben mit 200 ml Succinat-Medium überimpft und wächst über Nacht bei 32 °C und 250 rpm. Die Übernachtskulturen werden auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (GS3-Rotor, 20 min, 6000 rpm). Das Zellpellet wird in 5-10 ml 50 mM  $KP_i$ , 10 mM EDTA pH 7 resuspendiert. Zur Suspension wird 100  $\mu$ M Pefabloc SC gegeben. Zur Lyse der Zellen werden 0,1 mg/ml Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend sollte die Lösung aufgrund der freigesetzten genomischen DNA hochviskos sein. Zum weiteren Aufbrechen werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren. Es bilden sich Eiskristalle, die zur weiteren Zerstörung noch vorhandener Zellen und Zellteile führen. Die Proben werden bei RT wieder aufgetaut. Anschließend werden sie mit einem Ultraschallgerät (*duty cycle* 30 %, *output* 40 %) für 5-10 min auf Eis beschallt, bis die Lösung nicht mehr viskos ist. Die Lösung wird anschließend zentrifugiert (SS34-Rotor, 10 min, 10000 rpm). Der Überstand wird in ein 10 ml-

Ultrazentrifugenröhrchen überführt und erneut abzentrifugiert (Beckman Ti 70-Rotor 1h, 35000 rpm). Das die Membranen enthaltende Pellet wird mit einem Spatel aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und mit einem Teflonstempel in 200 µl Membranpuffer resuspendiert. Die Membranen werden in Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### Membranpräparation in größerem Maßstab

Typischerweise wird eine *P. denitrificans*-Kultur von 50 l wie in Abschnitt 2.1.12 beschrieben angezogen. Diese wird bei einer OD<sub>600</sub> von 3-5 auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (Sorvall RC36, 20 min, 5000 rpm). Die pelletierten Zellen werden in 100-200 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert und bei -80 °C eingefroren; sie können an diesem Punkt auch beliebig lange gelagert werden. Die Zellen werden wieder aufgetaut und mit 100 µM Pefabloc SC versetzt. Zum Aufschluss wird eine Manton-Gaulinpresse verwendet. Zunächst wird diese mit 1 l H<sub>2</sub>O, anschließend mit 1 Lysepuffer gespült. Nach dem Einfüllen der Zellen wird überschüssiger Puffer abgepumpt, anschließend wird der Pumpenkreislauf geschlossen. Die Zellen werden 5 min bei einem Druck von 400 bar aufgeschlossen. Die entstehende Wärme wird über eine Kühlschleife an ein Eisbad abgegeben. Die aufgeschlossenen Zellen werden abzentrifugiert (Sorvall RC36, 15 min, 5000 rpm); hierbei sedimentieren Speicherstoffe und große Zellfragmente. Der Überstand wird über Nacht zentrifugiert (GS3-Rotor, 8000 rpm). Das entstandene Pellet besteht aus einem harten, weißen Kern aus Speicherstoffen, und einem weichen, roten Außenbereich, der die Membranen enthält. Dieser wird mit einem Spatel abgenommen und in Membranpuffer mit Hilfe eines Ultra-Turax-Homogenisators resuspendiert; schließt sich eine Präparation des bc<sub>1</sub>-Komplexes an, wird stattdessen der bc<sub>1</sub>-Membranpuffer verwendet. Die Membranen werden erneut sedimentiert (Beckman Ti 45-Rotor, 1 h, 30'000 rpm). Aus dem entstandenen Pellet werden wiederum nur der obere Teil entnommen und der speicherstoffhaltige weiße Kern verworfen. Die so gewonnenen Membranen werden in einem möglichst geringen Vol (bc<sub>1</sub>-Membranpuffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration dieser Präparationen beträgt etwa 30 mg/ml.

#### 2.3.10 Präparation des Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplexes

Das hier beschriebene Solubilisierungsprotokoll basiert auf einem Verfahren für die Solubilisierung des mitochondrialen Komplex III [233]. Die Membranen werden aufgetaut und die Proteinkonzentration wenn möglich auf etwa 35 mg/ml mit bc<sub>1</sub>-

Membranpuffer eingestellt. Die Lösung wird mit 100  $\mu$ M Pefabloc SC versetzt. Unter Rühren wird 1 Vol Solubilisierungspuffer zugetropft, der die 1,15fache Menge an DDM (w/w) relativ zur Gesamtmembranproteinmenge enthält. Die Lösung wird 5 min bei RT gerührt. Das Solubilisat wird abzentrifugiert (Beckman Ti 45-Rotor, 1 h, 35000 rpm). Der Überstand wird mit 50 mM MES pH 6, 0,02 % DDM auf eine Salzkonzentration von 350 mM NaCl verdünnt und filtriert.

Die chromatographische Aufreinigung entspricht, mit einigen Modifikationen, einem publizierten Protokoll [78]. Die Säule (DEAE-Sepharose CL-6B, ca. 275 ml in 5x14 cm-Säule für 1-2 g solubiliertes Protein) wird vor Benutzung mit 4 Vol Äquilibrierungspuffer und 2 Vol Niedersalzpuffer äquilibriert. Das Solubilisat wird auf die Säule aufgetragen (Flussgeschwindigkeit ca. 6 cm/h). Im Anschluss wird die Säule mit 1 Vol Niedersalzpuffer gespült. Der  $bc_1$ -Komplex wird mit 6 Vol eines Salzgradienten eluiert (350-600 mM NaCl). Das Elutionsprofil wird bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet. Die Elution der rötlichen  $bc_1$ -Fraktion erfolgt bei etwa 420 mM NaCl. Die Fraktionen werden mit Redoxspektren und SDS-PAGE untersucht. Geeignete Fraktionen werden vereinigt und mit Ultrafiltratoren (Ausschlussvolumen 50-100 kDa) um den Faktor 100-200 eingeengt. Optional schließt sich hier ein Gelfiltrationsschritt (AcA34 oder Superose 6) an, nach dem die Präparation erneut wie beschrieben ankonzentriert wird. Das Protein wird aliquotiert, in flüssigem  $N_2$  eingefroren und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die DEAE-Säule wird abschließend mit 2 Vol Hochsalzpuffer gewaschen.

### 2.3.11 Aufreinigung des respiratorischen Superkomplexes

Die Aufreinigung des Superkomplexes aus Membranen von *P. denitrificans* wird in Zusammenarbeit mit Anke Stroh, Zentrum für Biologische Chemie, Uniklinikum Frankfurt durchgeführt. Die Entwicklung des Protokolls ist andernorts ausführlich beschrieben [234]. Membranen von *P. denitrificans* Pd1222 sowie verschiedener Mutanten werden wie unter 2.3.9 beschrieben präpariert. Die Membranen werden in Solubilisierungspuffer mit Digitonin (3 g/g Protein) solubilisiert. Das Solubilisat rührt 5 min auf Eis und wird anschließend zentrifugiert (Ultrazentrifuge, 30 min, 35'000 rpm). Der Überstand wird auf 150 mM  $NaP_i$  pH 7,2 eingestellt und auf eine 40 ml Hydroxylapatitsäule gegeben. Dieser Chromatographieschritt wird bei RT durchgeführt. Die Säule wird mit 2 SV Puffer A gewaschen und bei einer Flussgeschwindigkeit von 160 ml/h mit 4 SV Puffer B eluiert. Nach BN-PAGE-Analyse



geeignete Fraktionen werden vereinigt, maximal um den Faktor 6 ankonzentriert und auf eine 80 ml Sepharose CL-6B-Säule (Ausschlussgrenze 4 MDa) appliziert. Der Superkomplex wird mit einer Flussgeschwindigkeit von 6 ml/h in Puffer E eluiert.

### 2.3.12 Expression und Aufreinigung des nativen Cytochrom $c_{552}$

Das Protokoll ist der Dissertation von Victoria Drosou [235] entnommen. Die Expression des Proteins mit C-terminalem His-tag erfolgt mit einem pET22b-System in BL21(DE3)-Zellen. Die Expression wird ohne Induktion durch IPTG erzielt und die Kultur bei einer  $OD_{600} \sim 3$  geerntet. Die Zellen einer 15 l-Anzucht werden in 80 ml Puffer 1 resuspendiert, mit 1 ml Lysozym (10 mg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Einfrieren und Auftauen werden sie mit 1 Vol H<sub>2</sub>O verdünnt. Nach Ultraschallbehandlung (Stufe 4, 30 % duty, 2x4 min) werden die Membranen zentrifugiert (1 h, 40'000 rpm). Für die Solubilisierung werden die Membranen mit Puffer 2 ohne DDM auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml verdünnt und 10 min gerührt. Das Detergenz DDM wird langsam bis zu einem Verhältnis 1:1,5 (w/w Protein:Detergenz) zugegeben. Nach weiteren 10 min Rühren wird zentrifugiert (1 h 40'000 rpm) und das Pellet verworfen. Das Solubilisat wird direkt auf eine Cu-IMAC-Säule geladen und mit Puffer 2 gewaschen. Mit einem 20-200 mM Imidazolgradienten wird das Cyt  $c_{552}$  eluiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und auf eine DEAE-Sepharose CL-6B-Säule gegeben, die mit Puffer 3 äquilibriert ist. Das Protein wird mit einem 50-600 mM NaCl-Gradienten eluiert. Die geeigneten Fraktionen werden vereint, ankonzentriert (Ausschlussgrenze 10 kDa) und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.13 Aufreinigung des nativen Rieske-Fragments

Etwa 50 mg des aufgereinigten  $bc_1$ -Komplexes werden per Gelfiltration (Sephadex G25) in Proteolysepuffer äquilibriert. Die Proteinkonzentration wird auf 10 mg/ml eingestellt, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,2 % Natriumdesoxycholat werden zugegeben. Zur limitierten Proteolyse wird Thermolysin 1:100 (w/w Protease: $bc_1$ ) eingesetzt; die Reaktion inkubiert 2 h bei RT und wird mit 5 mM EDTA gestoppt. Der Ansatz wird auf eine mit HA-Säulenpuffer äquilibrierte 25 ml-Hydroxylapatitsäule gegeben. Ein Großteil von Cytochrom  $b$  und  $c_1$  verbleibt auf der Säule, während das ISF mit mehreren SV HA-Säulenpuffer eluiert werden kann. Nach einer Dialyse über Nacht wird das Protein auf eine Mono Q HR 5/5-Säule appliziert, mit mehreren SV DDM-

haltigem Puffer gewaschen, und über einen Salzgradienten bei etwa 200 mM KCl eluiert. Die Probe wird ankonzentriert (Ausschluss 3-5 kDa), auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule appliziert und im Standardpuffer für FTIR-Spektroskopie eluiert. Das aufgereinigte Protein wird erneut bis auf etwa 0,5 mM ankonzentriert und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.14 Löslichkeitsbestimmung nach heterologer Expression

Die Löslichkeitsbestimmung nach heterologer Expression wird modifiziert nach einem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt [236]. Mit einer 2 ml-ÜNK werden 50 ml LB plus entsprechende Antibiotika 1:25 angeimpft und bei 37 °C und 300 rpm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 inkubiert, dann mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3-4 h wird die Kultur abzentrifugiert. Die Zellen werden in 5 ml Nativ-Lysepuffer (Abschnitt 2.3.16) resuspendiert. Nach einem Frier/Tauzyklus wird Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird 6x für 10 s mit 10 s-Pausen beschallt (*duty cycle* 30 %, *output* 40 %). Das Lysat wird zentrifugiert (20 min, 10'000 g). Der Überstand enthält das lösliche Protein. Das Pellet mit unlöslichem Protein wird in 5 ml Lysepuffer resuspendiert. Um sicherzustellen, ob das betreffende Protein tatsächlich unlöslich ist, wird die Pelletfraktion zweimal mit 0,25 % Tween 20, 0,1 mM EDTA behandelt. An verschiedenen Punkten der Prozedur werden Proben genommen und für die SDS-PAGE-Analyse eingesetzt.

### 2.3.15 Aufreinigung der unlöslichen Fraktion des rekombinanten ISF

Die *inclusion body*-Aufreinigung orientiert sich an einem Protokoll von Sambrook und Russell [237], die Aufreinigung des solubilisierten Proteins an einem Protokoll der Firma Qiagen [236]. Ein Aliquot kompetenter M15 pRep4-Zellen wird mit dem ISF-Expressionsvektor pAN9 frisch transformiert und auf Amp/Kan-haltigen Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag werden die gewachsenen Kolonien in 4 ml LB-Medium (Amp/Kan) resuspendiert und wachsen über Tag bei 32 °C. Abends wird damit eine 200 ml LB (Amp/Kan)-Kultur inokuliert, die ü.N. bei 37 °C wächst. Mit der 200 ml-Vorkultur wird am nächsten Tag die 10 l LB (Amp/Kan)-Hauptkultur 1:50 angeimpft. Diese wächst im Fermenter (37 °C, Belüftung Stufe 5, 300 rpm) bis  $OD_{600}$  0,5-0,6 und wird dann mit 1 mM IPTG induziert. Die Ernte erfolgt 4 h nach Induktion bei  $OD_{600}$  ~ 3-4. Die Zellen werden nach Zentrifugation in Lysepuffer 1 auf 3 ml/g Feuchtgewicht resuspendiert, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Aufreinigung wird ein Aliquot á 5 g Zellen verwendet. Dieses wird mit 100 µM Pefabloc und 80 µl 10 mg/ml Lysozym versetzt und rührt 30 min auf Eis. Unter Rühren werden 4 mg/g Zellen Natriumdesoxycholat zugegeben. Der Ansatz rührt nun 30 min bei RT. Er wird danach bei 37 °C in ein Wasserbad gestellt und gelegentlich invertiert, bis das Lysat viskos erscheint. Jetzt werden 20 µl/g Zellen DNase I (1 mg/ml) zugegeben und etwa 30 min bei RT belassen, bis das Lysat nicht mehr viskos ist. Das Lysat wird anschließend zentrifugiert (SS34 mit Einsätzen, 15 min, 12'000 g, 4 °C). Das Pellet wird in 9 Pelletvolumen eiskaltem Zellysepuffer 2 resuspendiert und nach 5 min bei RT erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Das Pellet wird dann mit 9 Vol H<sub>2</sub>O gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Das gereinigte *inclusion body*-Pellet wird gewogen und kann bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Die *inclusion bodies* werden in 3 ml/g Ausgangszellmasse Solubilisierungspuffer zunächst bei RT 90 min unter leichtem Rühren, dann 30 min bei 50 °C gelöst. Unlösliche Bestandteile werden in der Ultrazentrifuge abgetrennt (Ti 60, 30 min, 30'000 rpm). Das Solubilisat kann in N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert werden.

Wurde das Solubilisat zwischenzeitlich eingefroren, wird es nach dem Auftauen 10 min bei 50 °C inkubiert. Pro 4 mg Protein wird 1 ml Ni-NTA-Agarose im *batch*-Verfahren mit Puffer 1 äquilibriert; zum Pufferwechsel kann die Säulenmatrix bei 500 g abzentrifugiert und anschließend in frischem Puffer resuspendiert werden. Das Solubilisat wird mit der Agarose gemischt, mit Puffer 1 auf das doppelte Vol der abgesetzten Agarose gebracht und 60 min bei RT gut durchmischt. Danach wird die proteinbeladene Ni-NTA-Agarose in die Säule gegossen und an die FPLC-Anlage angeschlossen. Zunächst wird mit einigen SV Puffer 1 gespült, dann mit Puffer 2 gewaschen. Mit Puffer 3 (pH 5,5) wird das Rieske-Proteinfragment eluiert. Das Eluat wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Verbleibende ISF-Aggregate oder Multimere werden mit Puffer 4 von der Säule gewaschen. Das Säulenmaterial wird anschließend nach Herstellerangaben gewaschen und gelagert.

### **2.3.16 Aufreinigung der löslichen Fraktion des rekombinanten ISF**

Dieses Aufreinigungsprotokoll ist an ein Protokoll der Firma Qiagen angelehnt [236]. Es werden dabei verschiedene Stämme und Anzuchtbedingungen verwendet (Abschnitt 3.1). Zellen aus 1 l Kultur werden in 3 ml/g Feuchtgewicht Nativ-Lysepuffer resuspendiert und mit 100 µM Pefabloc SC versetzt. Die Lyse erfolgt wie unter 2.3.14

beschrieben. Das Lysat wird mit 5 ml in Lysepuffer äquilibrierter Ni-NTA-Agarose gemischt. Unter leichtem Schütteln wird das Gemisch 1 h bei 4 °C inkubiert. Die beladene Agarose wird in eine Säule gefüllt und bei RT an die FPLC-Anlage angeschlossen. Mehrere SV Waschpuffer entfernen unspezifisch bindendes Protein. Danach wird das ISF mit 250 mM Imidazol eluiert. Um das Imidazol zu entfernen, wird das Eluat über Nacht bei 4 °C gegen 5 l 20 mM  $KP_i$  pH 7 dialysiert. Das Dialysat wird ankonzentriert (Ausschluss 5 kDa) und bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.17 Rückfaltung des rekombinanten Rieske-Proteinfragments

Die Rückfaltung des rekombinanten, aus *inclusion bodies* solubilisierten ISF wird mit verschiedenen Methoden versucht. Dabei wird entweder direkt das Solubilisat oder das weiter über Metallaffinitätschromatographie aufgereinigte ISF eingesetzt (siehe 2.3.15). Für *on-column*-Rückfaltungsversuche wird das entfaltete Protein auf einer in Puffer 1 äquilibrierten Ni-NTA-Säule gebunden. Hierbei werden pro Milliliter Säulenmaterial 3-4 mg Protein eingesetzt. Danach wird von 6 M GdHCl auf 8 M Harnstoff in Puffer 2 gewechselt. Für die Rückfaltung wird sprungartig auf den harnstofffreien Puffer 3 gewechselt. Alternativ wird dieser Schritt langsam mit einem 8 → 0 M Harnstoffgradient über 20 SV und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min vollzogen. Die nunmehr lösliche, rückgefaltete Proteinfraction wird mit einem 0 → 500 mM Imidazolgradienten in Puffer 3 eluiert. Das während des Rückfaltungsprozesses unlöslich gebliebene oder aggregierte Material wird nach *on-column*-Solubilisierung mit Puffer 1 und Wechsel auf Puffer 2 mit einem Sprung auf pH 4,5 eluiert (Abschnitt 2.3.15). Eine quantitative Auswertung des Rückfaltungsprozesses erfolgt anhand des Elutionsprofils und durch Konzentrationsbestimmung der eluierten Fraktionen.

Als weitere Methode wird die Rückfaltung per Dialyse eingesetzt. Die Ausgangsproteinkonzentration liegt hierfür bei 2 mg/ml. Das Solubilisat wird in einem Schritt bei RT über Nacht gegen 2000 Vol Puffer dialysiert; hierbei kommen verschiedene Puffer zur Anwendung. Unlösliches Protein wird am nächsten Tag abzentrifugiert (Ti60-Rotor, 30 min, 35'000 rpm). Als dritte Rückfaltungsmethode dient die schnelle Verdünnung des Solubilisats durch Tropfen in ein großes Puffervolumen, wobei auch hier mit verschiedenen Puffern gearbeitet wird. Die Ausgangskonzentration für diese Ansätze liegt bei 1-10 mg/ml. Der Puffer wird bei RT unter mäßig schnellem Rühren vorgelegt. Das Solubilisat wird möglichst langsam zugetropft. Um unlösliches Protein abzutrennen, wird der Ansatz abzentrifugiert (Ti60-Rotor, 30 min, 35'000 rpm).

Nach dem Ankonzentrieren (Ausschluss 3-5 kDa) wird noch einmal zentrifugiert, um Protein abzutrennen, das möglicherweise instabil gefaltet ist und während des Ankonzentrierens aggregiert.

### 2.3.18 Rekonstitution des rekombinanten Rieske-Proteinfragments

Die Versuche, das [2Fe-2S]-Metallzentrum des rekombinant gewonnenen, nicht-nativen Rieske-Proteinfragments zu rekonstituieren, basieren auf „klassischen“ Protokollen, bei denen die Metallzentren von Ferredoxinen in Gegenwart von Natriumsulfid, eines Eisensalzes und eines Thiolreagenzes unter reduzierenden Bedingungen hergestellt wurden [166,156]. Des Weiteren kommt ein enzymgestütztes Verfahren zum Einsatz, bei dem das Enzym Rhodanese, durch ein Apo-Proteinsubstrat aktiviert, Sulfid aus Natriumthiosulfat freisetzt [171,238].

#### Rekonstitution bei vorheriger Rückfaltung

Beim rein chemischen Verfahren wird in einigen Fällen das ISF zunächst rückgefaltet (siehe 2.3.17) und dann für die Rekonstitution eingesetzt; in anderen Versuchen wird denaturiert aufgereinigtes, ungefaltetes ISF eingesetzt und während des Rekonstitutionsprozesses durch Verdünnen rückgefaltet [156]. Im ersten Fall wird das rekonstituierte Protein in 50 mM Tris pH 8,3, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Konzentration  $\sim 1$  mg/ml vorgelegt. Die Lösung wird an der Wasserstrahlpumpe vorsichtig entgast, Schaumbildung muss vermieden werden. Anschließend wird die Lösung bei 4 °C in einem Glaszylinder mit Argon begast.  $\beta$ -Mercaptoethanol wird auf eine Konzentration von 1 % zugetropft. Nach 90 min Inkubation unter Argon wird aus entgasten Stammlösungen (je 30 mM) langsam 100  $\mu$ M  $\text{FeCl}_3$  und 100  $\mu$ M  $\text{Na}_2\text{S}$  zugetropft. Nach weiteren 90 min unter Argon wird das Protein mit 50 % Ammoniumsulfat gefällt und abzentrifugiert. Das rostbraune Pellet wird in 50 mM Tris pH 8,3, 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert und zweimal gegen 50 mM Tris pH 8,3 dialysiert. Unlösliches Material wird in der Ultrazentrifuge abgetrennt (Ti 70, 1 h, 40'000 g). Der Überstand wird auf wenige hundert Mikroliter ankonzentriert und weist eine rötlich-gelbe Färbung auf.

#### Rekonstitution mit gleichzeitiger Rückfaltung

Für die gleichzeitige Rückfaltung und Rekonstitution wird das Protein bei RT in 50 mM Tris pH 8,3, 8 M Harnstoff, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Konzentration von  $\sim 1$  mg/ml vorgelegt und in einem Messzylinder oder einer Septumflasche mit

Stickstoff oder Argon begast.  $\beta$ -Mercaptoethanol wird auf 1 % zugegeben.  $\text{FeCl}_3$  wird aus vorentgaster Stammlösung tropfenweise auf 1 mM zugegeben. Nach 30 min weiteren Begasens wird  $\text{Na}_2\text{S}$  aus entgaster Stammlösung auf 1 mM zugetropft und für weitere 30 min unter Argon inkubiert. Der Ansatz wird jetzt achtfach mit  $\text{N}_2$ -gespültem 50 mM Tris pH 8,3 verdünnt und kurz weiter mit  $\text{N}_2$  begast. Danach wird zweifach mit sauerstoffgesättigtem 50 mM Tris pH 8,3 verdünnt. Der Rekonstitutionsansatz wird jetzt zweimal gegen 10 Vol 50 mM Tris pH 8,3 bei 4 °C dialysiert, danach ankonzentriert und unlösliches Material in der Ultrazentrifuge abgetrennt. Das Verfahren wird in verschiedenen Schritten vielfach variiert, worauf unten eingegangen werden soll (Abschnitt 3.1.6).

### Rekonstitution mit Rhodanese

Für die enzymgestützte Rekonstitution [238] wird das *via* Dialyse rückgefaltete Apo-ISF in einer Ausgangskonzentration von 80  $\mu\text{M}$  (1,4 mg/ml) in 50 mM Tris pH 8,3, 1 mM DTT vorgelegt. DTT wird auf 5 mM zugegeben, danach 30 min mit Argon begast.  $\text{FeCl}_3$  wird 0,5 mM aus einer 25 mM Stammlösung zugegeben. Natriumthiosulfat wird 2 mM aus einer 100 mM Stammlösung zugegeben. Das Enzym Rhodanese wird jetzt im molaren Verhältnis 1:40 zum Apo-Protein aus einer 100  $\mu\text{M}$  Stammlösung zugefügt. Die Reaktion wird nach 2 h bei RT mit Zugabe von 1 mM EDTA gestoppt. Es folgen zwei Dialysen gegen je 5 l 50 mM Tris pH 8,3. Unlösliches Material wird in der Ultrazentrifuge abgetrennt, die Lösung wird danach ankonzentriert und bei -80 °C gelagert.

## 2.4 Biophysikalische Methoden

Die Charakterisierung von Häm-tragenden Proteinen stützt sich wesentlich auf UV/Vis-Redoxspektren. ESR-Spektren zeigen eine charakteristische Signatur für das reduzierte [2Fe-2S]-Cluster des Rieske-Proteins. Die redoxabhängige Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (Redox-FTIR) ist eine sensitive Methode, um strukturelle Änderungen und Protonierungs/Deprotonierungsschritte, die mit den Redoxreaktionen des Enzyms einhergehen, zu detektieren.

### 2.4.1 Redoxspektren

#### Hämproteine

Von aufgereinigten Membranproteinen können direkt Redoxspektren gemessen werden. Um Redoxspektren von Membranen aufzunehmen, müssen die Proteine erst

solubilisiert werden. Dazu wird die Membranprobe mit Spektrenpuffer und 25 % Triton X-100 auf eine Detergenzkonzentration von 1,25 % und eine Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml (bei einem geringen Anteil des interessierenden Proteins auch höhere Konzentrationen) eingestellt. Der Ansatz wird gründlich gevortext und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 30 min, 13000 rpm), um unlösliches Material abzutrennen. Der Überstand wird in eine Küvette gefüllt. Durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat können die Hämproteine vollständig oxidiert werden. Zur selektiven Reduktion von *c*-Typ-Cytochromen wird mit einer Spatelspitze Natriumascorbat reduziert, in allen anderen Fällen mit einer Spatelspitze Natriumdithionit. In der Regel werden im spektralen Bereich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bande zwischen 500 und 650 nm Redoxdifferenzspektren (reduziertes Spektrum minus oxidiertes Spektrum) gemessen. Aus den charakteristischen Redoxspektren kann der Häm-Gehalt der Probe unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes und der jeweiligen Extinktionskoeffizienten ermittelt werden.

Häm	Protein	$\lambda$ [nm]	$\Delta$	$\epsilon$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	Quelle
<i>a</i>	<i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase	605-630	red-ox	11,7	[239]
<i>a</i>	<i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase	424-480	ox	60,1	[239]
<i>b</i>	Cyt <i>b</i>	560-574	red-ox	28,5 / 29,3	[240]/ diese Arbeit
<i>c</i>	Cyt <i>c</i>	550	red-ox	19,4	[241]
<i>c</i>	Cyt <i>c</i>	550-535	red-ox	21,0	[242]
<i>c</i>	Cyt <i>c</i> <sub>1</sub>	553-540	red-ox	20,1 / 23,2	[243] / diese Arbeit

#### Pyridinhämochrom-Spektren

Um die Absorption der Hämkomponenten unabhängig von ihrer Proteinumgebung zu messen, werden Pyridinhämochrom-Spektren aufgenommen. Hierzu wird das Protein in 50 mM NaOH, 20 % Pyridin (v/v) denaturiert. Pyridin besetzt nach der Extraktion die fünfte und sechste Koordinationsstelle der Hämgruppen. Oxidation und Reduktion der Hämgruppen und Spektrenaufnahme erfolgen wie beschrieben. Für Pyridinhämochrome gelten die in der folgenden Tabelle angegebenen Extinktionskoeffizienten [244].

Häm	$\lambda$ [nm]	$\epsilon$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
<i>a</i>	588-620	21,01
<i>b</i>	540-560	28,32
<i>c</i>	535-550	21,84

### Rieske-Protein

Im sichtbaren und Nah-UV-Bereich zeigt das [2Fe-2S]-Rieske-Zentrum ein relativ breites, redoxabhängiges Absorptionsprofil, das weniger charakteristisch ist als das der Hämproteine. Das isolierte Protein befindet sich im überwiegend reduzierten Zustand und kann mit Kaliumhexacyanoferrat komplett oxidiert, mit Natriumascorbat vollständig reduziert werden. Beide Reagenzien müssen per Gelfiltration (Sephadex G25) entfernt werden, da ihre starke Absorption das Rieske-Spektrum überdeckt. Die folgende Tabelle gibt charakteristische Maxima und die zugehörigen Extinktionskoeffizienten für das bovine Rieske-Protein an [68].

	$\lambda$ [nm]	$\epsilon$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
oxidiert	323	15,7
	458	8,4
	579	4,3
reduziert	305	11,1
	383	4,8
	428	4,0
	520	2,7

### 2.4.2 EPR-Spektren

Die EPR-Messungen werden in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Zwicker, Arbeitsgruppe Prof. Brandt (Universitätsklinikum Frankfurt) durchgeführt. Die EPR-Spektroskopie wird in dieser Arbeit genutzt, um das [2Fe-2S]-Cluster in proteolytisch oder durch Rekonstitution gewonnenem Rieske-Proteinfragment nachzuweisen und zu quantifizieren. Das Cluster ist nur in der reduzierten Form paramagnetisch. Die Probe wird mit 5 mM Natriumascorbatlösung reduziert. Nach 1 min wird die Probe in das EPR-Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die ESR-Spektren werden im 9,46 GHz-Frequenzband gemessen. Standardmäßig liegt die Messtemperatur bei 20 K, die Mikrowellenleistung beträgt 1 mW. Das Magnetfeld wird von 3300-4000 G variiert. Bei Bedarf werden die Spektren zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses mehrfach akkumuliert. Für die Quantifizierung des Clustergehalts von rekonstituierten Proben dient das proteolytisch gewonnene ISF als Referenz. Der Vergleich erfolgt über die Amplitude des  $g_y$ -Signals.

### 2.4.3 Redox-FTIR-Spektroskopie

Die Spektren werden von Michaela Ritter aufgezeichnet und zusammen mit PD Dr. Petra Hellwig, Institut für Biophysik, Universität Frankfurt ausgewertet. Die



Proteinproben -  $bc_1$ -Komplex und ISF - werden über Gelfiltration (Sephadex G25) im Standardpuffer für FTIR-Experimente äquilibriert. H/D-Austausch (mit  $D_2O$ -Puffern) oder Wechsel auf andere pH-Bedingungen erfolgt durch mehrfaches Verdünnen in entsprechenden Puffern und Ankonzentrieren in Ultrafiltratoren (Ausschluss 100 kDa).

Als Messeinheit dient eine spektroelektrochemische Zelle [245], deren Goldelektrode mit 2 mM Cysteamin modifiziert wird. Eine Mischung von 17 Mediatoren (à 40  $\mu M$ ) soll die Redoxreaktionen beschleunigen [246]. Das Probenvolumen beträgt 7-8  $\mu l$ , die Pfadlänge < 10  $\mu M$ . Die Messungen werden bei RT durchgeführt.

In einem kombinierten Setup wird gleichzeitig ein FTIR-Spektrum im Bereich von 4000-1000  $cm^{-1}$  und ein UV/Vis-Spektrum von 400-900 nm aufgezeichnet. Nach dem Anlegen des Elektrodenpotentials (Potentialbereich von -292 bis +708 mV) kann nach mehreren Minuten Äquilibrationszeit das Spektrum gemessen werden. Für jedes Spektrum werden typischerweise 128 Interferogramme mit einer Auflösung von 4  $cm^{-1}$  addiert und Fourier-transformiert. Die Differenzspektren ergeben sich aus zwei Einzelspektren bei verschiedenem Elektrodenpotential. Die Differenzspektren werden aus acht bis zehn Einzelmessungen gemittelt. Um Unterschiede in der Probenkonzentration und der Pfadlänge zu berücksichtigen, werden die Spektren aus verschiedenen Messungen anhand des Differenzsignals der  $\alpha$ -Bande im sichtbaren Spektrum normalisiert.

#### 2.4.4 Analytische Ultrazentrifugation

Die Messung und Auswertung der Daten erfolgt in Zusammenarbeit mit Gottfried Mayer, Institut für Biophysik, Universität Frankfurt. Der Cytochrom- $bc_1$ -Komplex wird nach der unter 2.3.10 beschriebenen Aufreinigung weiter über eine Superose 6-Säule in Puffer A aufgereinigt. Cytochrom-Oxidase wird wie an anderer Stelle beschrieben aufgereinigt [247] (freundlicherweise von Hans-Werner Müller zur Verfügung gestellt) und durch Gelfiltration in Puffer A äquilibriert. Alle Experimente werden bei 4 °C in der analytischen Ultrazentrifuge mit einem An-50 Ti-Rotor durchgeführt. Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente werden unter Verwendung von 2-Kanal-Mittelstücken durchgeführt, für Gleichgewichtsläufe kommen 6-Kanal-Mittelstücke zum Einsatz. Pufferdichten werden mit einem Densitometer bestimmt. Die Probenvolumina betragen 110-140  $\mu l$ .

Bei Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten wird mit hohen Drehzahlen gearbeitet, so dass darauf geachtet werden muss, dass die 2-Kanal-Einsätze mit gleichen Volumina Probe und Referenz befüllt werden. Um Konvektion aufgrund von Temperaturdifferenzen zu vermeiden, wird zu Beginn eines Laufs mit niedriger Drehzahl (3000 rpm) zentrifugiert, bis die gewünschte Temperatur konstant bleibt. Danach wird mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die zeitliche Entwicklung des  $A(r)$ -Profils wird von Beginn bis zur weitgehend vollständigen Sedimentation im Abstand von einigen Minuten aufgenommen. Die Absorption wird in der Regel im Soret-Bereich (412 nm) erfasst, bei hohen Probenkonzentrationen alternativ bei 360 nm. Zur Datenanalyse wird die  $c(s)$ -Methode angewendet [248].

Für die Bestimmung der Schwimmdichte der DDM-Mizellen werden zu Puffer B analoge Lösungen mit 0,2 % DDM, 0,5 mg DPH/g DDM und verschiedenen Saccharosekonzentrationen Sedimentationsgleichgewichtsläufen unterzogen. Das Sedimentationsprofil wird bei 357 nm (Absorptionsmaximum DPH) gemessen. Es erfolgt ein Ein-Komponenten-Fit mit dem Programm DISCREEQ [249]. Die ermittelten Werte für die effektive Molmasse werden gegen die Saccharosekonzentration aufgetragen; der Nulldurchgang liefert die Schwimmdichte der DDM-Mizellen. Um die Menge an proteingebundenem DDM zu ermitteln, werden Sedimentationsgleichgewichtsläufe in Puffer A durchgeführt und die Sedimentationsprofile im Vergleich zu den mit Puffer B erzielten Werten analysiert.

Zur Bestimmung der effektiven Molmasse werden  $bc_1$ -Komplex bzw. Cytochrom-Oxidase durch Zugabe von Puffer A mit 50 % Saccharose auf die zur Dichtekompensation benötigte Saccharosekonzentration von  $x$  % gebracht, anschließend gegen 19 Vol Puffer B mit 100 %  $D_2O$ ,  $x$  % Saccharose dialysiert. Die Proben werden in Konzentrationen um 0,1 g/l bei 7000-20'000 rpm für die Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation eingesetzt. Nach etwa 70 h wird das Gleichgewicht erreicht. Das  $A(r)$ -Profil wird bei den jeweiligen Absorptionsmaxima aufgezeichnet ( $bc_1$ : 412 nm; COX: 425). Nach Erreichen des Gleichgewichts wird die Geschwindigkeit zur Bestimmung der Basislinie für einige Stunden auf 40'000 rpm erhöht. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm DISCREEQ unter Verwendung von Ein- und Mehrkomponenten-Fits für eine Linearkombination von Boltzmann-Funktionen. Das partielle spezifische Volumen  $\bar{v}$  des  $bc_1$ -Komplexes wird aus der Aminosäuresequenz und der Pigmentzusammensetzung errechnet [250]. Das partielle spezifische Volumen

der Cytochrom-Oxidase wird einer früheren Arbeit entnommen [251] und unter den hier angewendeten Pufferbedingungen neu ermittelt, um einen Korrekturterm für  $\bar{v}$  des  $bc_1$ -Komplexes zu erhalten.

#### 2.4.5 Messung von Enzymaktivitäten

Alle Messungen erfolgen bei RT im Spektrophotometer U-3000 (Hitachi).

##### NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase

Für die Bestimmung der Komplex I-Aktivität werden n-Decylchinon und NADH als Substrate eingesetzt. Die Oxidation von NADH wird bei 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) verfolgt. 200  $\mu\text{M}$  NADH und 60  $\mu\text{M}$  DQ werden in 1 ml Messpuffer vorgelegt, die Reaktion wird mit Enzym gestartet. Die Reaktion kann mit dem Substratanalogon DQA inhibiert werden.

##### Cytochrom c-Oxidase

Die Oxidase-Aktivität wird über die Absorptionsabnahme bei 550 nm während der Oxidation von Cyt *c* verfolgt. Als Substrat wird reduziertes Cytochrom *c* aus Pferdeherz verwendet. 1 ml einer 0,5 mM Stammlösung wird mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert. Das überschüssige Dithionit wird mit einer kurzen, mit Messpuffer äquilibrierten Gelfiltrationssäule (Sephadex G25) entfernt. Die Konzentration des Cyt *c* wird mit einem Redoxspektrum bestimmt; durch Nachreduzieren mit Natriumdithionit wird überprüft, ob das Protein vollständig reduziert vorliegt. In einer Küvette werden 20  $\mu\text{M}$  Cyt  $c_{\text{red}}$  in Messpuffer ad 350  $\mu\text{l}$  vorgelegt. Wenn die Basislinie stabil ist, wird das Enzym in geeigneter Verdünnung zugegeben. Die Anfangssteigung wird über 10 s gemittelt. Inhibition erfolgt mit 1 mM KCN.

##### Cytochrom $bc_1$ -Komplex (Ubihydrochinon: Cytochrom c-Oxidoreduktase)

Die Aktivität wird über die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 550 nm während der Reduktion von Cyt *c* bestimmt. Anstelle des physiologischen Elektronenakzeptors - vermutlich Cyt  $c_{552}$  [39] - wird Pferdeherz-Cytochrom *c* verwendet. n-Decylhydrochinon wird als Analogon zum natürlichen Substrat Ubihydrochinon eingesetzt.

Für die Darstellung des reduzierten Substrats werden 25 mg Decylchinon in 1,5 ml Ethanol gelöst. Es werden 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 50  $\mu\text{l}$  1 M HCl zugegeben. Mit wenigen Körnchen  $\text{KBH}_4$  wird Decylchinon reduziert, die zuvor gelbe Lösung erscheint jetzt

farblos. In 10  $\mu\text{l}$ -Schritten wird 1 M HCl zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Der pH-Wert wird mit Indikatorpapier überprüft und muss unter pH 4 liegen. Nach Zugabe von 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  wird die Lösung dreimal mit je 2,5 ml Cyclohexan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden noch 2x mit je 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  ausgeschüttelt. Aliquots von je 150  $\mu\text{l}$  werden in 500  $\mu\text{l}$ -Eppendorf-Gefäße gefüllt. Das Lösungsmittel wird in der Speed Vac in 5-10 min bis zur Trockne abgezogen. Die Aliquots werden mit  $\text{N}_2$  überschichtet und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Reduziertes Decylubihydrochinon wird in Ethanol/100  $\mu\text{M}$  HCl aufgenommen. Bei den hier angegebenen Mengen ergibt sich nach Aufnehmen in 20  $\mu\text{l}$  eine etwa 50 mM Lösung. Die Konzentration kann spektroskopisch bestimmt werden. Nach Aufnahme eines Spektrums (in  $10^2$ - $10^3$ -facher Verdünnung) wird das Decylubihydrochinon mit wenigen Mikroliter frischer 1 M NaOH-Lösung oxidiert und erneut vermessen. Im Differenzspektrum lässt sich anhand des Absorptionsmaximums bei 275 nm ( $\epsilon_{275, \text{ox-red}} = 12,5\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) die Konzentration an Decylubihydrochinon bestimmen [252,253].

Von aufgereinigtem Enzym oder Membranen werden im Verdünnungspuffer verschiedene Verdünnungen vorbereitet ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ). In eine Kunststoffküvette wird 1 ml des Messpuffers pipettiert, 10  $\mu\text{l}$  einer 2,5 mM Pferdeherz-Cytochrom *c*- Lösung, und 1-2  $\mu\text{l}$  der oben erwähnten Decylubihydrochinonlösung ( $\sim 80\text{ }\mu\text{M}$ ). Wenn das Spektrometer eine stabile Basislinie zeigt, werden aufgereinigtes Enzym oder Membranen in einer Konzentration zugegeben, die eine Absorptionsänderung von 40-80  $\text{mOD}\cdot\text{min}^{-1}$  ergibt. Die Anfangssteigung wird über 10 s gemittelt. Das Enzym kann mit 10  $\mu\text{M}$  Stigmatellin (Stammlösung in Ethanol) oder 10  $\mu\text{M}$  Myxothiazol (in DMSO) inhibiert werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression eines Rieske-Proteinfragments

Ziel dieses Teilprojekts war die heterologe Überexpression der hydrophilen Domäne der Rieske-Untereinheit (*iron-sulfur protein fragment*, ISF). Es sollte ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll erarbeitet werden, das dieses *bc<sub>1</sub>-*„Modul“ in für die biophysikalische Charakterisierung ausreichenden Mengen liefert.

#### 3.1.1 Klonierung des Rieske-Proteinfragments

Für die heterologe Überexpression der hydrophilen Domäne der Rieske-Proteine von Rind und *P. denitrificans* im Wirt *Escherichia coli* wurden drei verschiedene Strategien versucht: (i) das reine Strukturgen wurde auf einem Expressionsplasmid eingebracht; (ii) dem Strukturgen wurde ein N-terminales His-tag angefügt; dieses soll für spätere strukturelle Untersuchungen abtrennbar sein, ist daher von einer Erkennungssequenz für die *tobacco etch virus* (TEV)-Protease flankiert [254]; (iii) dem Konstrukt wurde N-terminal des His-tags noch ein Exportsignal angefügt. Die N-terminale Region des Rieske-Proteins von *Paracoccus* kann als Exportsignal für den *twin arginine translocation pathway* (Tat-Weg) dienen, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde (Abschnitt 3.1.8). Da es jedoch gleichzeitig als Membrananker fungiert und nicht abgespalten wird, bietet es sich nicht für die Gewinnung eines löslichen Moduls an. Stattdessen wurde daher das gut charakterisierte Tat-Signalpeptid der TMAO-Reduktase von *E. coli* (TorA) gewählt, das nach dem Export in das Periplasma abgespalten werden sollte [255]. Die Motivation für dieses Konstrukt besteht darin, die biologische Situation weitgehend zu simulieren, und so möglicherweise die Ausbildung des Holo-Proteins zu begünstigen. Cytosolische Proteine bilden aufgrund des reduzierenden Milieus typischerweise keine Disulfidbrücken aus, die aber für die Stabilisierung der Clusterbindedomäne des Rieske-Proteins notwendig sind [67]. Von daher drängt sich der Export des überexprimierten Proteins in das Periplasma auf.

Die Wahl des zu klonierenden Rieske-Fragments (ISF) orientierte sich an dem durch limitierte Proteolyse gewonnenen und strukturell charakterisierten homologen Rinder-ISF [67]. Die definierte Elektronendichte beginnt hier mit <sup>Bt</sup>Ala70, die eigentliche Sekundärstruktur ( $\beta$ 1) mit <sup>Bt</sup>Ile74. An Position 71 findet sich in der bovinen Sequenz ein Methionin. Es bot sich daher an, im klonierten ISF von *P. denitrificans* an der

äquivalenten Position das Start-Methionin zu setzen, auch wenn sich in der nativen *Paracoccus*-Sequenz hier ein Leucinrest findet.

#### Expression eines Minimalkonstrukts in pET3d

Das chimäre *fbc*-Operon wurde über die flankierenden Schnittstellen SacI und HindIII aus dem Expressionsvektor pRI2 $\chi$  in pUC18c umklont. Mit dem resultierenden Plasmid pAN1 wurde eine Mutagenese nach der QuikChange-Methode durchgeführt, um eine NcoI-Schnittstelle codonneutral aus dem Rieske-Genlocus zu entfernen. Als Primer dienten hierbei bt-Nco-hin und bt-Nco-rev (Abschnitt 2.1.7). Das Produkt pAN2 wird per Restriktion überprüft. Der das bovine Rieske-Proteinfragment codierende Bereich von pAN2 wird über eine *overlap*-PCR mit den Primern ISFbt-hin und ISFbt-rev amplifiziert und über die angefügten flankierenden Schnittstellen NcoI und HindIII in den Expressionsvektor pET3d kloniert. Im resultierenden Konstrukt pAN6 wurde die codierende Region durch Sequenzierung überprüft.

Der codierende Bereich für das *Paracoccus*-Rieske-Proteinfragment wurde über *overlap*-PCR mit den Primern ISF-Pd-hin und ISF-Pd-rev aus dem Vektor pRI2(436) amplifiziert und mittels der angefügten Schnittstellen NcoI und HindIII in pET3d eingefügt. Der resultierende Expressionsvektor pAN5 wurde durch Sequenzierung des codierenden Bereichs überprüft.

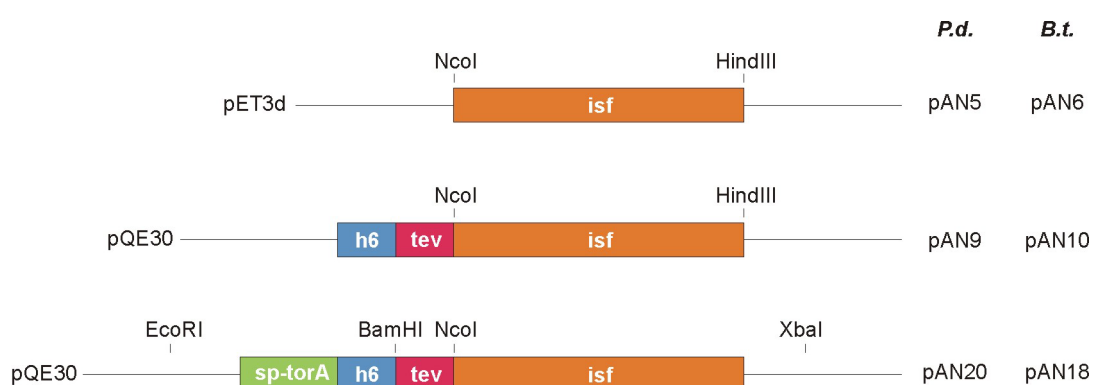
#### Expression in pQE30 mit N-terminalem His-tag

Als Ausgangsvektor diente pQE30-Cu<sub>A</sub> [202], der ein N-terminales His-tag, gefolgt von einer *tobacco etch virus* (TEV)-Schnittstelle codiert. Um die in pET-Vektoren klonierten, NcoI/HindIII-flankierten Einschübe auch hier benutzen zu können, wurde zunächst eine NcoI-Schnittstelle aus dem Vektorbereich von pQE30-Cu<sub>A</sub> entfernt. Dies geschah mittels QuikChange-Mutagenese mit den Primern pQE30-Nco-uni und pQE30-Nco-rev. Im resultierenden Plasmid pAN7 wurde *via* erneuter QuikChange-Mutagenese eine NcoI-Schnittstelle hinter das letzte Aminosäurecodon der TEV-Sequenz eingefügt (Primer: TEV-Nco-uni, TEV-Nco-rev). Das resultierende Plasmid pAN8 ist ein generell verwendbarer Expressionsvektor mit abspaltbarem N-terminalem His-tag. Eine Sequenzierung bestätigte die Richtigkeit des Konstrukts, mit Ausnahme einer Mutation in einem der drei Stopp-Codons des Vektors. Von daher sollte bei Verwendung dieses Vektors der klonierte Einschub ein eigenes Stopp-Codon mitbringen. Durch Umklonieren der NcoI/HindIII-Einschübe aus pAN5 und pAN6 wurden die Expressionsvektoren für das bakterielle (pAN9) bzw. bovine (pAN10) Rieske-

Proteinfragment mit N-terminalem His-*tag* gewonnen. Als Kontrollsystem für die Expression wurde das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) NcoI/HindIII aus pGJ212 in pAN8 kloniert; es resultiert pAN13.

### Expression mit Tat-Exportsequenz

Das Tat-Exportsignal der Trimethylamin-Oxidase von *E. coli* wurde aus dem Plasmid pTorA [206] per *overlap*-PCR (Primer: EcoRI-TorA-hin, BamHI-TorA-rev) amplifiziert und über die angefügten Schnittstellen BamHI und EcoRI in pUC18c kloniert. In das resultierende Plasmid pAN14 wurde der das bovine Rieske-Proteinfragment codierende Einschub aus pAN10 über die Schnittstellen BamHI und XbaI umklontiert. Aus dem Produkt pAN17 wurde der EcoRI/XbaI-Einschub isoliert und mit dem EcoRI/XbaI-Vektorfragment von pAN10 zum Expressionsvektor pAN18 ligiert. Der gesamte codierende Bereich von pAN18 wurde per Sequenzierung überprüft. Das *Paracoccus*-Rieske-Proteinfragment wurde NcoI/XbaI aus pAN9 in den entsprechend geöffneten Vektoranteil von pAN18 kloniert und ergibt den Expressionsvektor pAN20. Eine Übersicht zu den verschiedenen Konstrukten gibt Abbildung 6.



**Abbildung 6. Schematische Übersicht zu den verschiedenen Expressionsvektoren für das bovine bzw. *Paracoccus*-ISF.** Es wurden folgende Expressionvektoren kloniert: (i) das reine Strukturgen; (ii) das Strukturgen mit N-terminalem His-*tag*, das über eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease abspaltbar sein soll; (iii) ein Konstrukt wie unter (ii), jedoch zusätzlich mit dem Tat-Exportsignal der TMAO-Reduktase aus *E. coli*. Die gezeigten Konstrukte wurden sowohl für das bovine wie das bakterielle Rieske-Protein kloniert; die jeweiligen Namen sind rechts angegeben. Die gezeigten Schnittstellen fanden während der Klonierung Verwendung.

### 3.1.2 Expression der ISF-Konstrukte

Die Expression der pET-basierten „Minimalkonstrukte“ - d.h. der Konstrukte mit dem unmodifizierten Strukturgen - wurde zunächst in BL21(DE3)-Zellen versucht. Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG bei  $OD_{600} = 0,8$  und Wachstum für weitere 3 h wurden die Zellen geerntet und direkt in PAGE-Probenpuffer lysiert. Im SDS-PAGE der Zelllysate

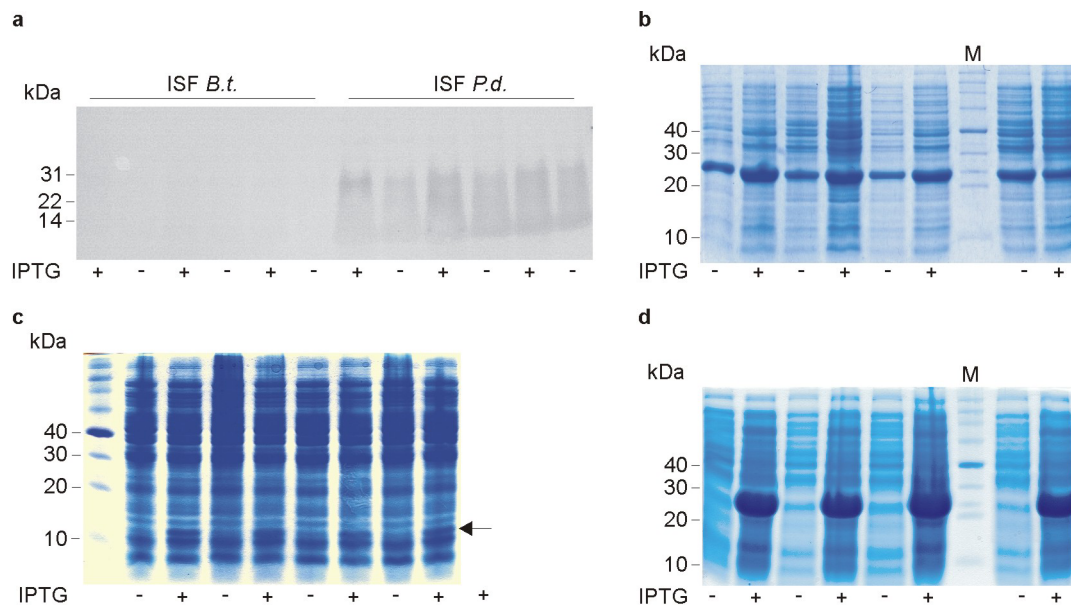
vor und nach Induktion ist kein Unterschied in Form einer prominenten Induktionsbande sichtbar. Im Western Blot sieht man im Falle des *Paracoccus*-ISF (Antikörper „AD“) nach 20 min Entwicklung ein schwaches Signal auf der richtigen Höhe, das sich jedoch breit zu höheren Molekulargewichten hin erstreckt, möglicherweise durch Aggregate und/oder ein dimeres Assoziat bedingt (Abbildung 7a). Für das bovine ISF (Antikörper „DA“) ist selbst nach dieser langen Entwicklungszeit keine Bande zu sehen. Das *Paracoccus*-Minimalkonstrukt wird demnach schwach, das bovine Minimalkonstrukt nicht nachweislich exprimiert. Ein Induktionseffekt ist beim *P.d.*-Konstrukt nicht auszumachen: Die Bandenintensität der Proben vor und nach Induktion unterscheidet sich nicht.

Um die Expression des *Paracoccus*-Proteins zu steigern, wurden verschiedene Parameter variiert. Eine Verringerung der Anzuchttemperatur auf RT hatte keinen Einfluss, ebensowenig die Wahl verschiedener Wirtszellen. Anstelle von BL21(DE3) pLysS wurden BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3) [210] und Origami(DE3) (Novagen) getestet. Die C41/C43-Zellen wurden im Labor von John Walker entwickelt und sollen bessere Bedingungen für die Expression von Proteinen liefern, die in den üblichen BL21-Zellen nicht oder nur schlecht exprimiert werden können. Die Origami-Zellen tragen Mutationen in den Genen für die Thioredoxin- und Glutathion-Reduktasen und sollen die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytosol ermöglichen. Bei keinem dieser Stämme konnte nach dreistündiger Induktion eine prominente Bande im Ganzzelllysat ausgemacht werden (nicht gezeigt). Ein Kontrollkonstrukt mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), das auf gleiche Weise in pET3d kloniert wurde, wurde hingegen überexprimiert (Abbildung 7b). Die GFP-Expression erfolgt allerdings nicht stringent kontrolliert, bereits vor IPTG-Zugabe zeigt sich eine deutliche Überexpression.

Um zu überprüfen, ob das Expressionssystem die Ursache für die schwache Expression des *P.d.*-Konstrukts darstellt, wurde das Strukturgen in analoger Weise in einen pQE60-Vektor kloniert und dabei das plasmideigene, C-terminale His-tag ausgespart, so dass es sich hierbei um ein Minimalkonstrukt für das pQE-Expressionssystem handelt. Als Kontrolle wurde das GFP auf dieselbe Weise kloniert. Auch hier kommt es nur zu einer schwachen Expression des ISF-Strukturgens, während die GFP-Kontrolle starke Überexpression zeigt (Abbildung 7c,d). Demnach ist die schwache Expression des



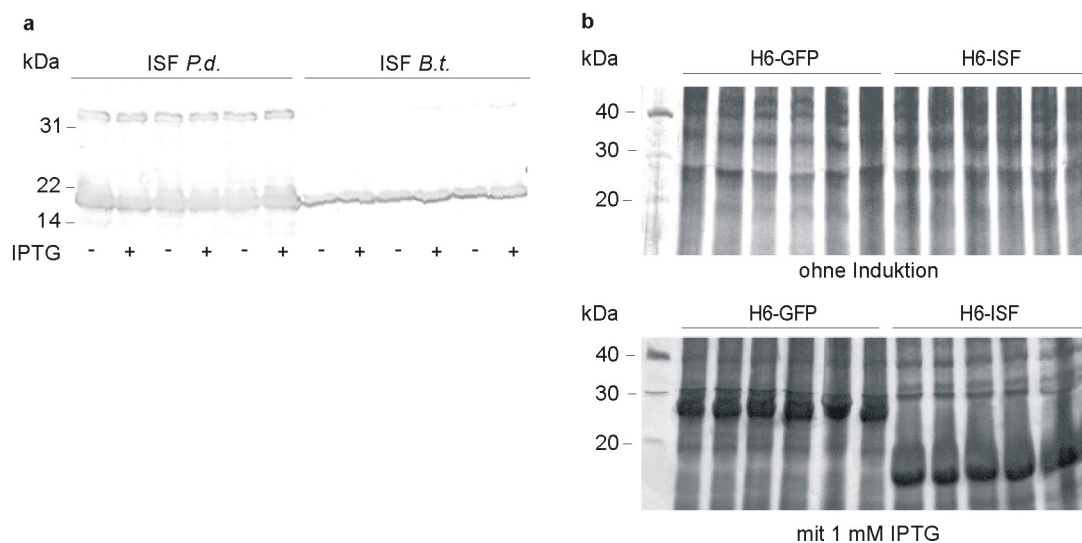
Minimalkonstrukts nicht durch das Expressionssystem bedingt. Die Ursache könnte in der Instabilität des Transkripts oder des Translationsproduktes liegen.



**Abbildung 7 Expression des ISF-Minimalkonstrukts im pET- und pQE-System.** **a** Western-Blot (Laemmli-Gel, 10 %) von Ganzzelllysaten der Expressionstämme BL21 pAN5 (*Paracoccus*-ISF in pET3d) und BL21 pAN6 (bovines ISF). Von je drei Klonen wurden 2 ml-Kulturen inkubiert, vor IPTG-Zugabe wurde die Hälfte der Kulturen als nicht-induzierte Kontrolle abgenommen und parallel weiter inkubiert. Die Zellen wurden nach der Ernte in PAGE-Probenpuffer resuspendiert. **b** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (Laemmli-Gel, 10 %) der Kontrolle eines NcoI/HindIII in pET3d klonierten GFP-Gens. Die Expression erfolgte wie unter (a) beschrieben. **c + d** Expression derselben Strukturgene wie in a bzw. b im pQE60-Expressionsvektor (pAN54 *P.d.*-ISF und pAN55 GFP). Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm M15 (pRep4).

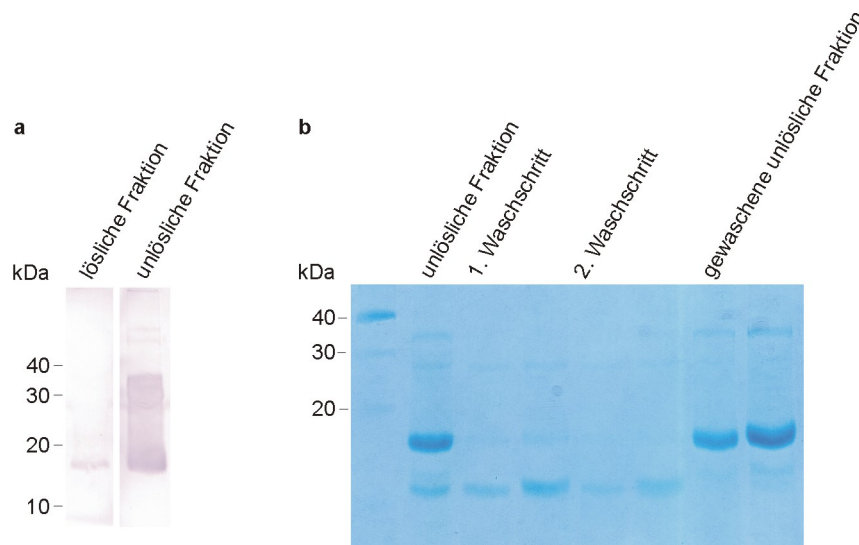
Die Konstrukte mit N-terminalem His-tag (H6-ISF) wurden zunächst in JM 109 exprimiert. Die Induktion und anschließende Analyse erfolgte wie oben für die Minimalkonstrukte beschrieben. Im SDS-PAGE ist auch hier kein Unterschied zwischen nicht-induzierten und induzierten Proben zu sehen, jedoch findet sich knapp unterhalb von 20 kDa eine prominente Bande, die sich im Western-Blot als das bovine bzw. bakterielle ISF identifizieren lässt (Abbildung 8a). Beide Proteine laufen zum erwarteten apparenten Molekulargewicht, das *Paracoccus*-Protein zeigt zusätzlich eine Bande, wobei es sich augenscheinlich um das Dimer handelt, das trotz denaturierender SDS-PAGE relativ prominent auftritt. Die Expression beider Proteine erscheint in diesem Experiment konstitutiv, da sich nicht-induzierte und induzierte Probe nicht merklich unterscheiden. In der Folge wurden als weitere Expressionswirte die *E. coli*-Stämme SG13009 (pRep4) und M15 (pRep4) versucht, die beide das *low-copy*-Plasmid pRep4 tragen, von dem aus das *lac*-Repressor-Protein exprimiert wird, die damit eine stringenter Kontrolle des T5-Promotors ausüben als Stämme mit einem

chromosomalen *lacI*-Gen. Hier kommt es zu einer starken und kontrollierten Expression der H6-ISF-Gene (Abbildung 8b).



**Abbildung 8. Expression des ISF mit His-tag (H6-ISF) im pQE-System.** **a** Western Blot (Tricin-Gel, 10 %) von Ganzzelllysaten nach Expression von pAN9 (*P.d.*) und pAN10 (*B.t.*) in JM 109. Eingesetzt wurden Antikörper gegen das *Paracoccus*- und das Rinder-ISF („AD“ und „DA“, 1:1000). **b** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) von Zelllysaten nach Expression von pAN9 (*P.d.*-Rieske) sowie des Kontrollkonstrukts pAN13 (GFP) in M15 pRep4. Das obere Gel zeigt die nicht-induzierte Kontrolle, das untere Gel die Induktion mit 1 mM IPTG.

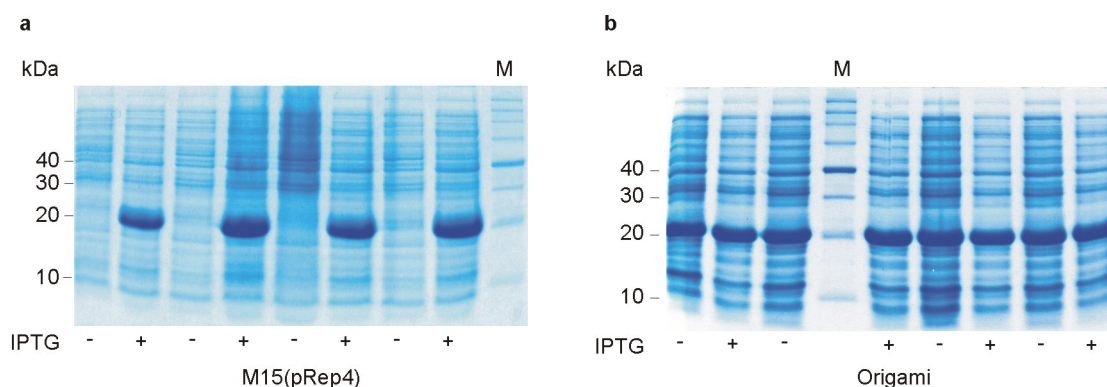
Ausgehend von 50 ml-Anzuchten wurde untersucht, ob sich die H6-ISF-Proteine in der löslichen oder unlöslichen Fraktion finden (Abschnitt 2.3.14). Nach Fraktionierung und anschließender SDS-PAGE-Analyse finden sich die Zielproteine fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion. Mehrfaches Waschen dieser Fraktion mit Tween/EDTA bestätigte den Befund, dass das rekombinante Rieske-Protein überwiegend in unlöslicher Form vorliegt. Nur bei starker Beladung des SDS-PAGE oder im Western Blot sieht eine geringe Menge - in der Größenordnung von 1 % - des Proteins in der löslichen Fraktion (Abbildung 9). Eine Variation der Anzuchtbedingungen - Anzuchttemperatur 37/32/25/18 °C, Zugabe von 1 M Sorbitol zum Anzuchtmedium, Verwendung der *E. coli*-Wirtszellen JM109, SG13009 oder eines Origami-Stammes (Novagen), bei dem Veränderungen im zellulären Redoxhaushalt die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytosol ermöglichen sollen - konnte diese Verteilung nicht merklich zugunsten der löslichen Fraktion verschieben (nicht gezeigt).



**Abbildung 9 Löslichkeitsbestimmung von H6-ISF (nur für das *P.d.*-Konstrukt gezeigt).** **a** Western-Blot (Tricin-Gel, 10 %) der löslichen und unlöslichen Fraktion aus M15 pAN9 (*P.d.*); Antikörper „AD“. **b** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach zweifachem Waschen der unlöslichen Fraktion mit Tween/EDTA.

Die Expression des Konstrukts mit Tat-Exportsignal wurde zunächst in JM109 versucht. Schon während der Klonierung fiel auf, dass die Zellkulturen schlecht anwachsen. Nach Induktion mit IPTG stellten sie ihr Wachstum komplett ein, es kam zum Absterben und Ausflocken der Zellen. Weder im SDS-PAGE noch immunologisch konnte das Rieske-Protein nachgewiesen werden. Eine erneute Plasmidisolierung und Sequenzierung des codierenden Bereichs und seiner Flanken zeigt, dass es zu einer ~ 30 bp-Deletion im Promoterbereich gekommen war. Das Genprodukt ist möglicherweise toxisch für die Zellen, und eine (induzierte) Expression kann zu einer Selektion von Zellen führen, bei denen die Expression unterbunden ist. Nach Neuklonierung des bovinen und des bakteriellen Konstrukts gelang die Anzucht und Expression in M15 (pRep4) und Origami-Zellen (Abbildung 10a,b). In beiden Fällen kommt es zu einer starken Anreicherung des Proteins; im Origami-Wirt erscheint die Expression konstitutiv. Wie an der Laufhöhe bereits zu erkennen, handelt es sich jedoch um das nicht-prozessierte Protein, das seine Tat-Exportsequenz weiterhin trägt. Auch immunologisch kann ein Produkt niedrigeren Molekulargewichts nicht detektiert werden. Die Löslichkeitsanalyse zeigt, dass auch das Konstrukt mit Tat-Exportsignal wie schon das H6-ISF in der unlöslichen Fraktion vorliegt. Zellfraktionierung mit Abtrennung von Cytosol, Membran und Periplasma bestätigt, dass die Fusionsproteine aus TorA-Signalpeptid und ISF nicht exportiert werden und - vermutlich in Form von *inclusion*

*bodies* - im Cytosol vorliegen (nicht gezeigt). Es gelang also nicht, ein chimäres Rieske-Protein mit dem Exportsignal der TMAO-Reduktase auf dem Tat-Weg zu exportieren.



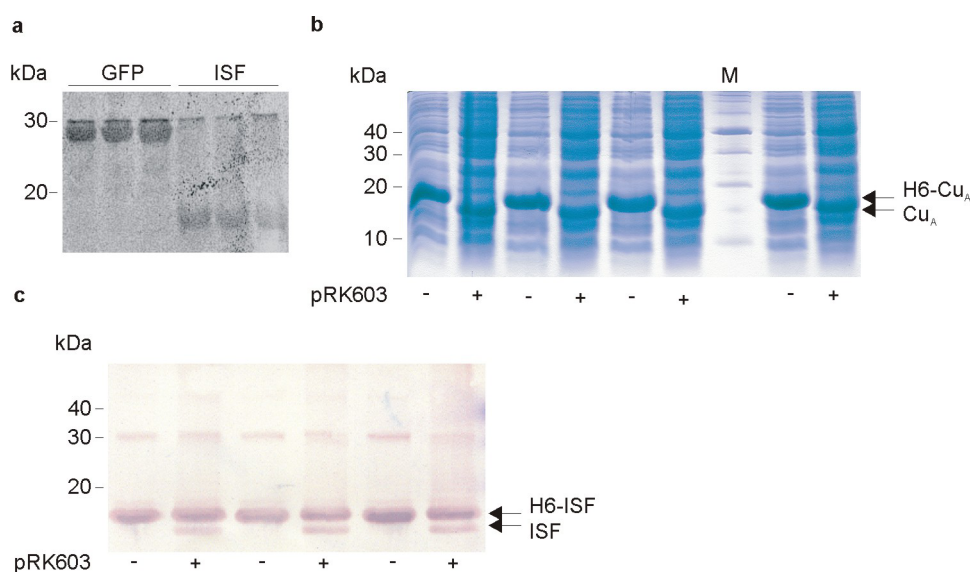
**Abbildung 10. Expression des *P.d.*-ISF mit N-terminalem Tat-Exportsignal.** **a** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) von Lysaten induzierter und nicht-induzierter Zellen (M15 pAN20 *P.d.*-ISF; Ergebnisse für *B.t.*-ISF nicht gezeigt). **b** Expression von pAN20 in Origami-Zellen.

### 3.1.3 Nachweis und proteolytische Entfernung des His-tags

Der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen wurde auf das bakterielle H6-ISF-Konstrukt gelegt. Zunächst konnte das N-terminale His-*tag* für H6-ISF wie für das Kontrollkonstrukt H6-GFP immunologisch nachgewiesen werden (Abbildung 11a). In beiden Blots ist daneben noch eine Bande bei ~ 30 kDa zu sehen, bekanntermaßen ein *E. coli*-eigenes Protein, das mit dem Antikörper kreuzreagiert. Anschließend wurde untersucht, ob sich das *tag*, wie für spätere strukturelle Untersuchungen wünschenswert, durch spezifische Proteolyse mit der TEV-Protease abspalten lässt. Dies wurde zunächst *in vivo* versucht, wie von Kapust und Waugh [204] beschrieben. Dabei wurde die TEV-Protease auf dem Plasmid pRK603 konstitutiv koexprimiert. Da dieses Plasmid ein Kanamycin-Resistenzgen trägt, konnte die Expression nur in JM109 und nicht in M15 (pRep4) erfolgen, der bereits eine Kanamycinresistenz *in trans* trägt. Zum Vergleich wurde vor einem analogen Plasmid- und Stammhintergrund das Cu<sub>A</sub>-Fragment der aa<sub>3</sub>-Oxidase von *P. denitrificans* exprimiert [202].

Nach Induktion wurden die Zellen nach 3 h geerntet, in Probenpuffer lysiert und für die SDS-PAGE eingesetzt. Es zeigt sich, dass die TEV-Protease das His-*tag* von H6-ISF äusserst ineffizient abspaltet, während die Reaktion beim Kontrollprotein nahezu quantitativ abläuft (Abbildung 11b,c). Möglicherweise wird das H6-ISF so schnell in *inclusion bodies* abgelagert, dass es für die TEV-Protease nicht zugänglich ist. Es wurden verschiedene Versuchsbedingungen variiert, um die Ausbeute der Proteolyse-reaktion zu verbessern (mit/ohne Induktion; Induktion bei OD<sub>600</sub> 0,6/1,9;

Induktion mit 0,4/1,0 mM IPTG; Wachstum für 4 h oder ü.N.; Wachstum bei 37 °C/RT/15 °C; LB/M9/Fermentermedium). Der einzige Parameter, mit dem die Proteolyseeffizienz beeinflusst werden konnte, war die Wachstumstemperatur. Wachstum bei RT führte zu einer deutlich verbesserten Ausbeute, bei 15 °C kommt es zu einer annähernden Gleichverteilung von ungeschnittener und prozessierter Form, jedoch auf Kosten einer insgesamt stark herabgesetzten Expression. Die *in vivo*-Proteolyse wurde auch mit dem längeren Exportkonstrukt versucht; die Ausbeute an prozessiertem Protein fällt dabei vergleichbar aus (nicht gezeigt).

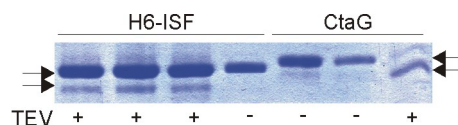


**Abbildung 11 Nachweis des His-tags und Test auf proteolytische Prozessierbarkeit. a** Western Blot (Tricin-Gel, 10 %). Aufgetragen sind Ganzzelllysate von M15 pAN9 (*P.d.*) und M15 pAN13 (H6-GFP-Kontrollkonstrukt); anti-His-Antikörper. **b** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 15 %) von Ganzzelllysaten aus M15 pQCu<sub>A</sub> (Cu<sub>A</sub>-Domäne der Cytochrom-Oxidase mit His-tag und TEV-Schnittstelle) mit und ohne Koexpression von pRK603 (TEV-Protease). **c** Western Blot (Tricin-Gel, 15 %) von Ganzzelllysaten aus M15 pAN9 (H6-ISF *P.d.*) mit und ohne Koexpression von pRK 603; Antikörper „AD“ (anti-ISF), 1:1000.

Die Abspaltung des tags wurde des Weiteren *in vitro* mit dem aufgereinigten und rückgefalteten H6-ISF (siehe unten) versucht. Die isolierte TEV-Protease und das Kontrollprotein CtaG wurden freundlicherweise von Peter Greiner (am Institut) zur Verfügung gestellt. Das CtaG-Protein wird von einem Plasmid exprimiert, das sich von dem in dieser Arbeit entwickelten Expressionsvektor mit N-terminalem His-tag und anschließender TEV-Schnittstelle ableitet und bietet sich deshalb als Vergleich an. Die Proteolysereaktion liefert ein ähnliches Bild wie der *in vivo*-Ansatz: Das H6-ISF wird nur zu einem Bruchteil, das Vergleichsprotein hingegen nahezu vollständig prozessiert (Abbildung 12). Auch eine Variation der Versuchbedingungen (Proteolyse für 18 h, Zusatz von 1/10/100 mM Dithiothreitol) konnte die Ausbeute nicht steigern.



Zusammenfassend scheint es so, dass die TEV-Schnittstelle innerhalb des Fusionsproteins schlecht zugänglich ist; möglicherweise ist der Abstand zur kompakten und stabilen Tertiärstruktur des ISF zu gering.



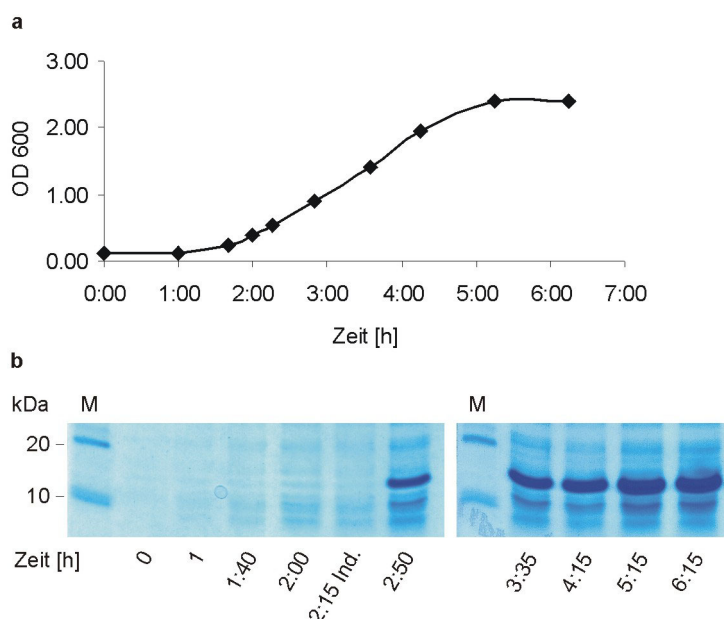
**Abbildung 12. In-vitro-Prozessierung des His-tags des aufgereinigten H6-ISF mit der TEV-Protease.** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 15 %) von aufgereinigtem H6-ISF bzw. H6-CtaG mit und ohne vorherige Inkubation mit der TEV-Protease. Die Pfeile zeigen die prozessierte und unprozessierte Form des ISF bzw. CtaG an.

### 3.1.4 Aufreinigung des H6-ISF-Proteins

Um ausreichend Ausgangsmaterial für die Aufreinigung des unlöslichen H6-ISF-Proteins zu erhalten, wurde eine 10 l-Anzucht des Stammes M15 (pRep4) pAN9 im Fermenter durchgeführt. Die Fermenterkultur in LB (Amp/Kan) wurde aus einer ÜN-Vorkultur 1:50 angeimpft und wuchs bei 37 °C, 300 rpm, Belüftung Stufe 5 in etwa 2 h bis  $OD_{600} = 0,6$ . Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Anzucht noch 4 h fortgesetzt. Es zeigt sich, dass die Zellen nach Induktion über 4 h gut weiterwachsen und noch mindestens zwei Teilungszyklen durchlaufen. Danach gehen sie in eine Plateauphase über, wie bereits Vorversuche im 500 ml-Maßstab in 5 l-Kolben zeigten (Abbildung 13a). Die Ausbeute, gemessen an der Intensität der Induktionsbande, erreicht jedoch bereits nach 3 h ihr Maximum (Abbildung 13b). Die erreichte optische Dichte liegt im Fermenter mit  $OD_{600} = 3,5$  etwa eine OD-Einheit höher als bei der Kolbenanzucht, die Ausbeute an Zell-Feuchtgewicht liegt bei ~ 6 g/l.

Für die Aufreinigung der *inclusion bodies* (Abschnitt 2.3.15) wurden zwei verschiedene Protokolle versucht. Beim ersten Verfahren (von Werner Müller, am selben Institut) werden die Zellen durch Kombination von osmotischem Schock und Beschallen aufgeschlossen. Das Ergebnis war nicht befriedigend: Das Pellet ist dunkelbraun, und es zeigt sich keine klare Schichtung von äußerer Membran und Peptidoglycan als oberer Schicht, den *inclusion bodies* als mittlerer Schicht und nicht-aufgeschlossener Zellen als unterster Schicht, wie es bei einer gelungenen Aufreinigung von *inclusion bodies* zu erwarten wäre [256]. Alternativ wurde ein Verfahren nach Sambrook und Russell [237] angewandt, bei dem der Zellaufschluss durch Lysozymbehandlung und anschließende Inkubation mit Desoxycholat erfolgt. Die erzielten Pellets zeigen hierbei zwei klar

getrennte Schichten mit einer hellbeigen *inclusion body*-Schicht und einer darüberliegenden dünnen, weißen Peptidoglycanschicht.

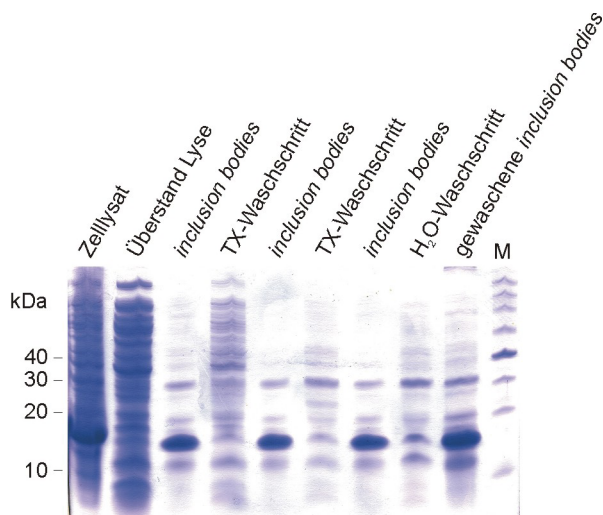


**Abbildung 13 Präparative Anzucht von M15 (pRep4) pAN9. a** Wachstumskurve: OD 600 von Kulturproben bzw. einem günstigen Messbereich entsprechender Verdünnungen **b** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) von Ganzzelllysaten zu verschiedenen Zeitpunkten der Anzucht.

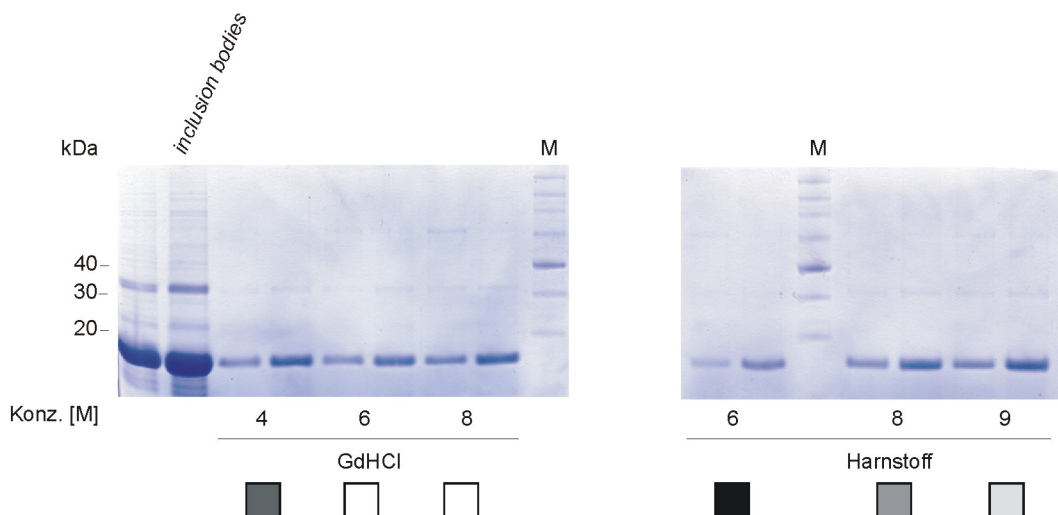
Diese konnte durch zweimaliges Waschen mit Triton-haltigem Puffer und einmaliges Waschen mit Wasser vollständig entfernt werden. Ein Pellet von nicht-aufgeschlossenen Zellen ist nicht vorhanden. Die Ausbeute liegt reproduzierbar bei ~ 1,0 g gewaschener *inclusion bodies* pro 5 g Zellen (Feuchtgewicht). Wie im SDS-PAGE zu sehen, liegt H6-ISF in stark angereicherter Form vor (Abbildung 14). Anstelle der Triton-Waschschritte wurde auch eine Reinigung der *inclusion bodies* mit nicht-solubilisierenden Konzentrationen von Harnstoff versucht. Dieses Verfahren liefert jedoch bis 2 M Harnstoff kein besseres Ergebnis als das Waschen mit Triton, und ab einer Konzentration von 3 M Harnstoff kommt es bereits zu einer deutlichen Solubilisierung des Zielproteins (nicht gezeigt).

Um günstige Solubilisierungsbedingungen zu bestimmen, wurden Harnstoff in 6/8/9 M und Guanidiniumhydrochlorid in 4/6/8 M Endkonzentration zum Lösen der *inclusion bodies* in 50 mM Tris pH 7, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 100  $\mu$ M Pefabloc SC eingesetzt. Gleiche Aliquots gewaschener *inclusion bodies* (~ 50 mg) wurden mit je 1 ml Puffer 30 min bei RT solubilisiert. Die Effizienz der Solubilisierung war bereits am Trübungsgrad der Lösung zu erkennen. Nach Abzentrifugieren (Ti70, 15 min,

30'000 rpm) wurden die Überstände mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt und für die SDS-PAGE eingesetzt. Bei Verwendung von Harnstoff als Chaotrop sieht man klar eine verbesserte Solubilisierungsausbeute mit steigender Konzentration, für GdHCl scheinen nach SDS-PAGE alle getesteten Konzentrationen gleich effizient. Allerdings erscheinen vor dem Ankonzentrieren nur die Solubilisate mit 6 und 8 M GdHCl völlig klar, während alle anderen eine mehr oder wenig starke Trübung aufweisen (Abbildung 15). Für eine vollständige Solubilisierung sind demnach relativ harsche Bedingungen nötig.



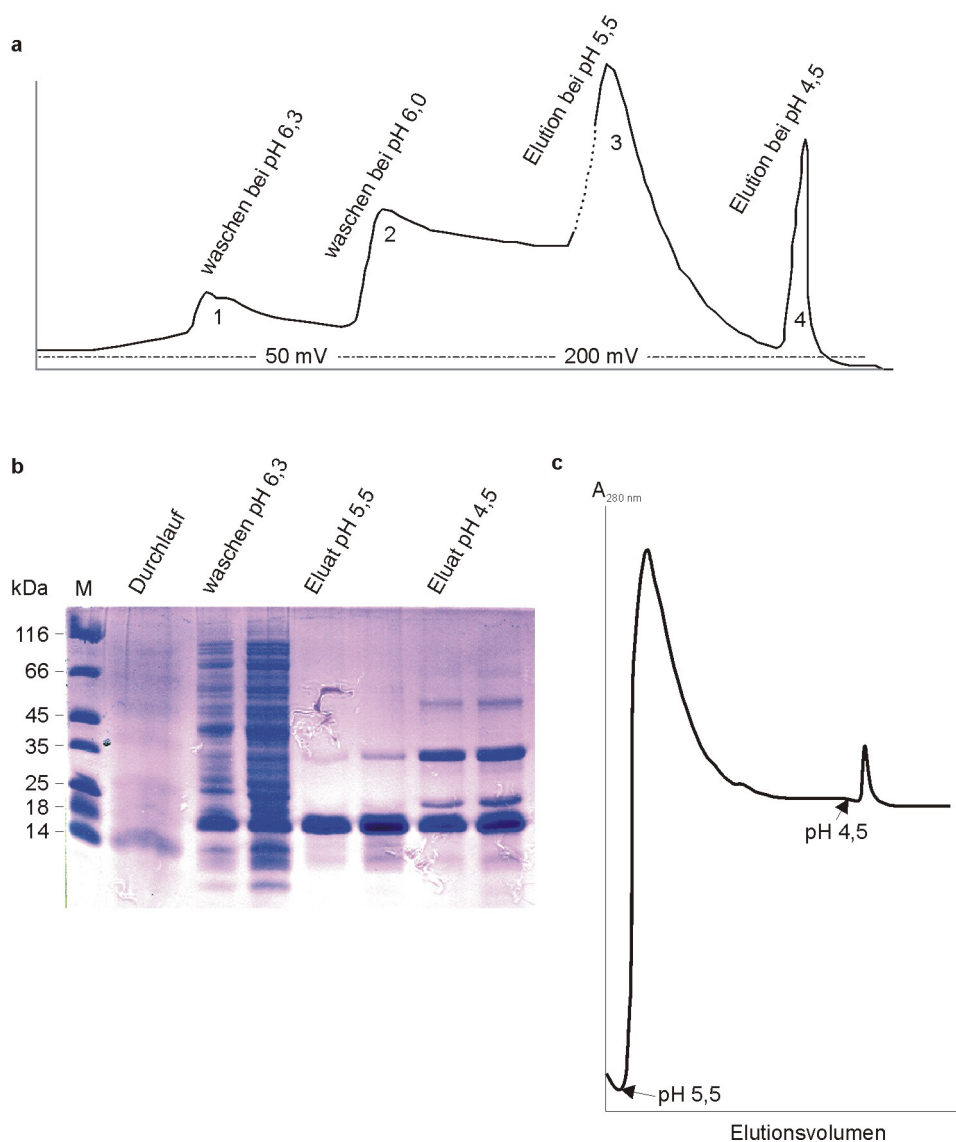
**Abbildung 14** Isolierung und Waschen der *inclusion bodies* von H6-ISF aus M15 (pRep4) pAN9. SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) der verschiedenen Fraktionen.



**Abbildung 15** Testen der Solubilisierungsbedingungen für die *inclusion bodies* des *P.d.-H6-ISF*. SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) mit Ausgangsmaterial (gewaschene *inclusion bodies* aus M15 pAN9) und den unterschiedlichen Solubilisierungsproben; es sind je zwei unterschiedliche Volumina aufgetragen. Die Kästchen in verschiedenen Graustufen unterhalb der Gele sollen den Trübungsgrad des Solubilisats vor dem Abzentrifugieren unlöslichen Materials angeben.



Für eine weitere Aufreinigung des Solubilisats wurde eine Ni-NTA-Säule eingesetzt. Das Solubilisat wurde bei pH 8 aufgetragen. Anschließend wurde auf 8 M Harnstoff umgepuffert, da sich die Rückfaltung ausgehend von diesem Chaotrop oft einfacher gestaltet als bei GdHCl [256]. Unspezifisch gebundenes Protein wird durch einen Wechsel auf pH 6,3 von der Säule gewaschen. H6-tragendes, monomeres Protein soll bei pH 5,5 eluieren, während Aggregate erst bei pH 4,5 von der Säule gewaschen werden [236]. Das wie oben beschrieben mit 6 M GdHCl solubilierte Protein zeigt im Elutionsprofil eine beträchtliche Fraktion, die erst bei pH 4,5 eluiert. Im SDS-PAGE zeigen sich für die pH 4,5-Fraktion eine Reihe von Banden bei höherem Molekulargewicht, die sich immunologisch als Multimere des H6-ISF identifizieren lassen und anscheinend selbst in der SDS-PAGE fest miteinander verbunden bleiben (Abbildung 16a,b). Die pH 5,5-Fraktion hingegen liefert in der Silberfärbung ein weitgehend reines, monomeres Rieske-Protein, mit Spuren des Dimers. Demnach lieferte die Solubilisierung noch kein monodisperses Material. Aus diesem Grund wurden die Solubilisierungsbedingungen weiter verschärft: mit 8 M GdHCl wurde erst 90 min bei RT, dann weitere 30 min bei 50 °C solubiliert, wie für schwer zu solubilisierende Proteine empfohlen [256]. Wie das Ni-NTA-Elutionsprofil nach Aufreinigung dieses Solubilisats zeigt, eluiert das H6-ISF jetzt fast vollständig und homogen bei pH 5,5 (Abbildung 16c). Auf diese Weise präpariertes Material wird für die folgenden Rückfaltungs- und Rekonstitutionsexperimente eingesetzt. Eine Übersicht über typische Ausbeuten bei Anzucht, Isolierung der *inclusion bodies*, Solubilisierung und Aufreinigung liefert Tabelle 1.



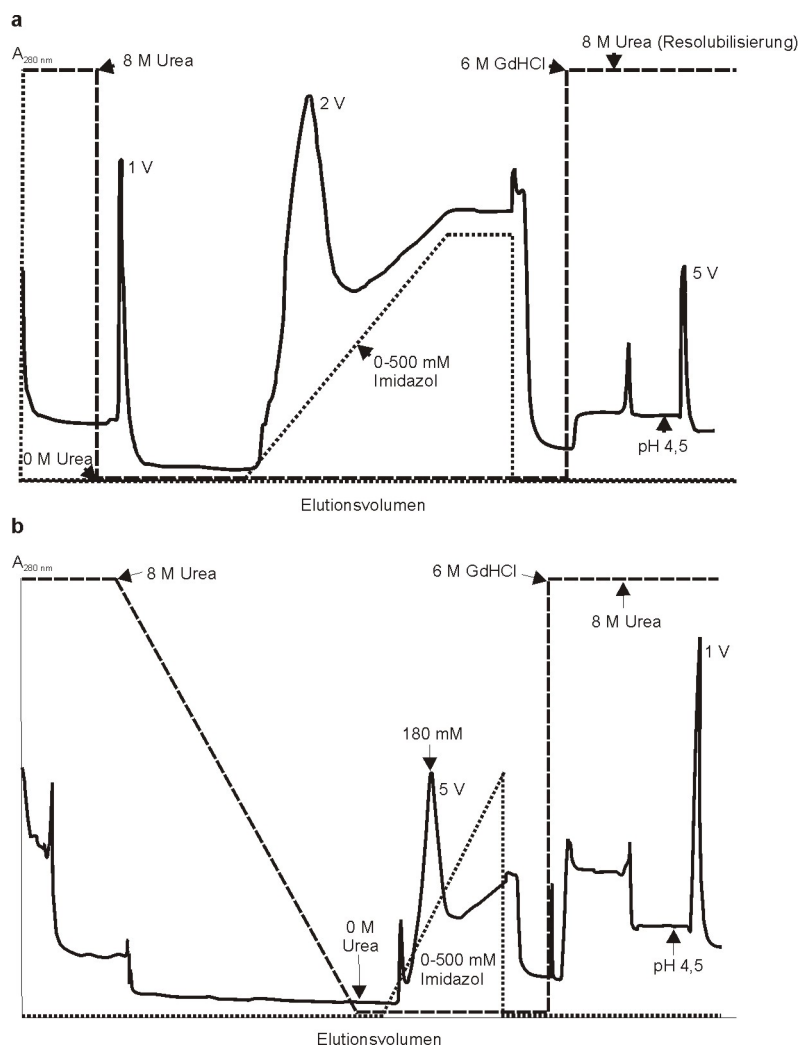
**Abbildung 16. Chromatographische Aufreinigung von *P.d.*-H6-ISF nach Solubilisierung mit 6 M oder 8 M GdHCl.** **a** Elutionsprofil (Ni-NTA-Säule) des 6 M GdHCl-Solubilisats. Verfolgt wurde die Absorption bei 280 nm. *Peaks* 3 und 4 sind bei 4fach verringerter Schreiberempfindlichkeit aufgezeichnet, angezeigt durch die Spannungsangaben. **b** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) der Aufreinigungsschritte aus (a). **c** Elutionsprofil nach harscherer Solubilisierung (8 M GdHCl, 90 min RT, 30 min 50 °C). Gezeigt sind nur die beiden Elutionspeaks.

Schritt	Ausbeute [mg/l Kultur]
Feuchtgewicht Zellen	5600
gewaschene <i>inclusion bodies</i>	1000
Solubilisat	200
Eluat Ni-NTA	110

**Tabelle 1. Übersicht zu den Ausbeuten der Aufreinigungsschritte für *P.d.*-H6-ISF.** Angegeben sind die typischen Ausbeuten der einzelnen Präparationsschritte Expression, Isolierung und Waschen der *inclusion bodies*, sowie Solubilisierung und Aufreinigung über Ni-NTA-Chromatographie.

### 3.1.5 Rückfaltungsexperimente

Für die Rückfaltung des GdHCl-solubilisierten, aufgereinigten H6-ISF wurden verschiedene Verfahren getestet: *on-column*-Rückfaltung, Dialyse und Verdünnung. Die Rückfaltung unmittelbar auf der Ni-NTA-Säule ist ein relativ neuartiges Verfahren [257], das mehrere Vorteile mit sich bringt: (i) die Rückfaltung kann gleichzeitig mit der Aufreinigung verfolgt werden; (ii) die Bindung an die Säulenmatrix verhindert Proteinaggregation, ein Faktor, der sonst maßgeblich für Ausbeuteverluste verantwortlich ist; (iii) die Pufferbedingungen für die Rückfaltung können sehr leicht kontrolliert und variiert werden; (iv) die Ausbeuten sind über die Elutionsprofile leicht zu quantifizieren. Für die *on-column*-Rückfaltung wurden zwei Varianten ausgetestet: In der ersten Variante wird das Protein in Gegenwart des Chaotrops an die Säule gebunden und gewaschen; danach wird abrupt auf einen chaotroptfreien Puffer gewechselt. Das rückgefaltete Protein kann jetzt über einen Imidazolgradienten unter nativen Bedingungen eluiert werden; die nicht rückgefaltete Fraktion verbleibt in aggregierter Form auf der Säule und kann nach erneuter Solubilisierung und anschließendem Wechsel auf pH 4,5 eluiert werden. Die zweite Variante gleicht der ersten bis auf den Umstand, dass das Chaotrop in einem Gradienten über 20 Säulenvolumen langsam entfernt wird (Abbildung 17a,b). Für die Rückfaltung per Dialyse wurde in einem Schritt über Nacht gegen das 2000fache Probenvolumen dialysiert und am nächsten Tag das unlöslich gebliebene bzw. aggregierte Material in der Ultrazentrifuge abgetrennt. Die Ausbeute an löslichem, rückgefaltetem Protein wurde bei den *on-column*-Verfahren über eine Lowry-Proteinbestimmung der nativ und denaturiert eluierten Fraktionen erreicht, und zusätzlich über das Verhältnis der Elutionspeaks, bei der Dialyse über die Bestimmung der löslichen Proteinmenge nach dem Zentrifugationsschritt. Die Ausbeuten sind in Tabelle 2 angegeben; sie betragen durchgängig rund 2/3 der Ausgangsproteinmenge. Die verschiedenen Verfahren scheinen also gleichwertige Ergebnisse zu liefern.

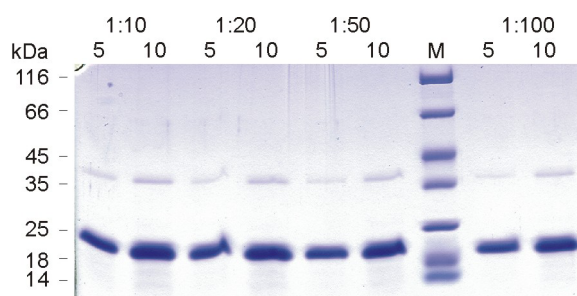


**Abbildung 17. Elutionsprofile bei on-column-Rückfaltung von *P.d.*-H6-ISF.** Ni-NTA-Säule; die Voltangaben beziehen sich auf die Schreiberempfindlichkeit (höhere Werte entsprechen geringerer Empfindlichkeit). **a** Rückfaltung über plötzliches Entfernen von Harnstoff. **b** Rückfaltung über Harnstoff-Gradienten.

Rückfaltungsmethode	Vol [ml]	Konzentration Lowry [mg/ml]	Proteinmenge [mg]	% von 20 mg Ausgangsmenge
Harnstoff-Sprung auf Ni-NTA	17,5	0,74	13	65
Harnstoff-Gradient auf Ni-NTA	27,5	0,54	15	74
Dialyse	15	0,87	13	65

**Tabelle 2. Ausbeuten an löslichem H6-ISF bei verschiedenen Rückfaltungsverfahren.** Die Ausgangsmenge bei den verschiedenen Versuchen betrug jeweils 20 mg.

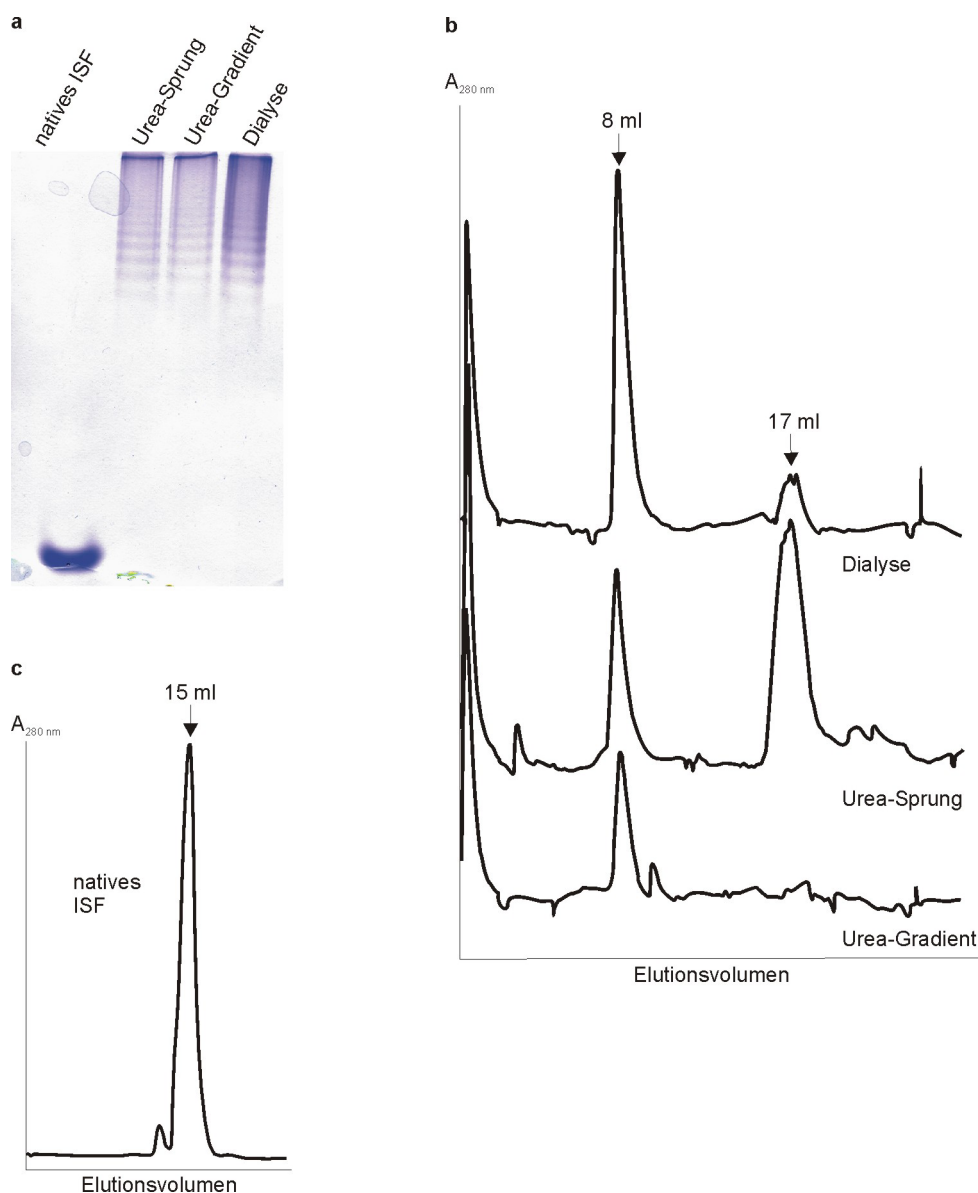
In einem weiterem Rückfaltungsversuch wurden im 1 ml-Maßstab verschiedene Verdünnungen durch langsames Zutropfen des Solubilisats in den Rückfaltungspuffer erzielt. Das in der unlöslichen Fraktion verbliebene Protein wurde danach abzentrifugiert und die unterschiedlich verdünnten Lösungen so ankonzentriert, dass sich bei gleicher Ausbeute des Rückfaltungsprozesses die gleiche Endkonzentration ergibt. Abschließend wurde erneut ultrazentrifugiert, um Protein, das während des Ankonzentrierens aggregiert, zu entfernen. Die Ausbeute wurde hier nur anhand der Intensität der Gelbande von Ausgangsmaterial und zurückgefalteten Proben abgeschätzt. Nach der weitgehend gleichen Bandenintensität zu urteilen, erhält man auch bei der Rückfaltung durch Verdünnen eine sehr gute Ausbeute an löslichem Protein (Abbildung 18). Auch der Verdünnungsfaktor, der häufig als kritischer Parameter beschrieben wird [258], scheint hier keine ausschlaggebende Rolle zu spielen, so dass bei einer 1:10-Verdünnung vergleichbare Ausbeuten erzielt werden wie bei der 1:100-Verdünnung.



**Abbildung 18. Rückfalten von *P.d.*-H6-ISF durch Verdünnung.** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) der durch unterschiedliche Verdünnungsschritte rückgefalteten Proben. Auftrag: je 5 und 10 µl nach Ankonzentrieren um den jeweiligen Verdünnungsfaktor und Entfernen des unlöslichen Proteins. Über dem Gel sind die jeweiligen Verdünnungen der Rückfaltungsprozedur angegeben.

Gelfiltration (Superdex 70) und native Gelelektrophorese (nach Maurer) wurden eingesetzt, um die rückgefalteten Proben weitergehend zu analysieren. Für alle Proben zeigte die native PAGE eine „Leiter“ von Banden im oberen Teil des Gels. Die Vergleichskontrolle, das durch limitierte Proteolyse des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes gewonnene native *P.d.*-ISF (Abschnitt 3.6.1), läuft hingegen homogen als eine einzelne Bande hoher elektrophoretischer Mobilität (Abbildung 19a). Die erste Vermutung war, dass es sich bei dem Leitermuster um in unterschiedlichem Ausmaß Disulfid-verbrückte Monomere handelt. Weitere Nativgele unter reduzierenden Bedingungen (10 mM β-Mercaptoethanol oder DTT im Trenngel, bis zu 100 mM DTT im Probenpuffer) zeigen jedoch ein unverändertes Bandenmuster und sprechen gegen diese Annahme (nicht gezeigt). Möglicherweise ist das Bandenmuster indikativ für eine mobile und/oder

partiell ungefaltete Konformation, wie verschiedentlich in der Literatur beschrieben (Abschnitt 4.1.1). In der analytischen Gelfiltration eluiert die Referenzprobe - das native ISF - homogen bei einem Elutionsvolumen von 15 ml. Die rückgefalteten Proben zeigten hier unterschiedliche Elutionsmuster. Die durch Dialyse rückgefaltete Probe eluierte zum größten Teil bei 8 ml, also mit einem apparent sehr hohen Molekulargewicht; eine kleinere Fraktion eluierte bei 17 ml, also in etwa vergleichbar mit der Referenzprobe. Diese beiden *peaks* zeigten sich auch nach der *on-column*-Rückfaltung bei unvermitteltem Pufferwechsel; hier überwiegt sogar der 17 ml-*peak*. Die graduelle Rückfaltung auf der Ni-NTA-Säule lieferte hingegen nur den 8 ml-*peak* (Abbildung 19b,c). Auch hier konnte durch Äquilibrierung der Säule auf bis zu 100 mM DTT weitgehend ausgeschlossen werden, dass die hochmolekulare Fraktion durch Disulfidverbrückung entsteht. Die durch Verdünnen rückgefalteten Proben wurden nicht *via* Gelfiltration untersucht, da hier nur in mikroanalytischem Maßstab gearbeitet wurde und für die Chromatographie nicht genügend Protein zur Verfügung stand; es sollte sich ein ähnliches Bild ergeben wie bei dem vergleichbaren Verfahren der sprungartigen Rückfaltung auf der Säule. Zusammengefasst liefert die Gelfiltration somit ein differenzierteres Bild als die PAGE-Analyse. Es scheint, als würde bei rascher Rückfaltung eine größere Proteinfraktion eine dem Referenzprotein ähnliche Konformation annehmen, als dies bei graduellen Entfernen des Chaotrops der Fall ist.



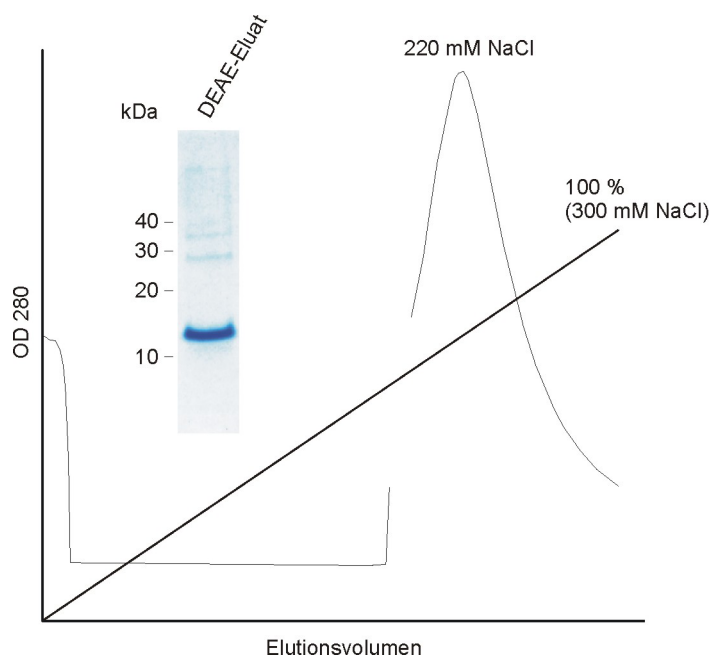
**Abbildung 19** Analyse der rückgefalteten Proben mit Nativgelen und Gelfiltration. **a** Nativgel (nach Maurer, 10 %) von nativem ISF und rückgefaltetem H6-ISF. **b** Elutionsprofil Superdex 70 (24 ml); die Elutionsprofile der einzelnen Läufe sind maßstabgetreu übereinandergelegt. **c** Elutionsprofil Superdex 70 des proteolytisch hergestellten ISF.

### 3.1.6 Rekonstitution des [2Fe-2S]-Zentrums

Erste Rekonstitutionsversuche orientierten sich an Publikationen, in denen eine erfolgreiche Rekonstitution eines in *inclusion bodies* vorliegenden pflanzlichen Rieske-Proteins direkt aus dem unaufgereinigten Zelllysat beschrieben wurde [156,182]. Im ersten Experiment wurde ebenfalls unmittelbar das Zelllysat eingesetzt, in einem weiteren Versuch wurde stattdessen eine grob angereicherte *inclusion body*-Fraktion verwendet. Das Harnstoff-Solubilisat wurde entgast, für die Dauer der Reaktion mit Stickstoff durchspült, und unter reduzierenden Bedingungen ( $\beta$ -Mercaptoethanol) mit

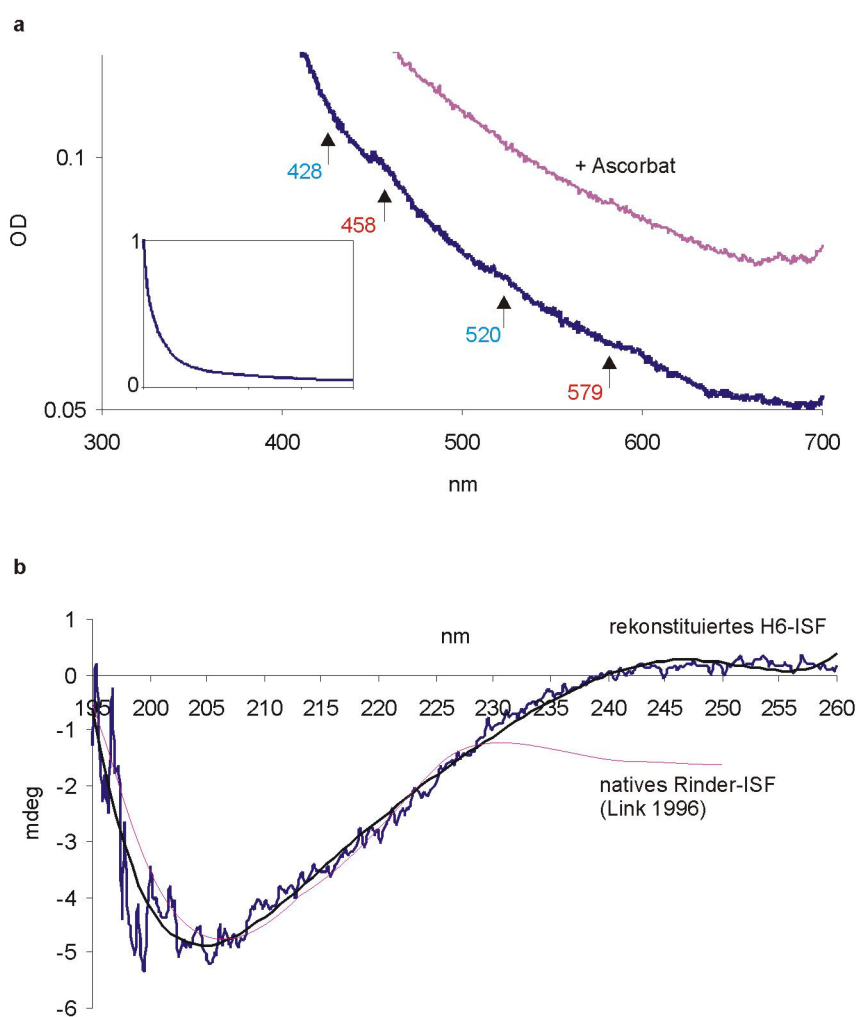
Eisen-III-chlorid und Natriumsulfid versetzt. In dieser Lösung sollen sich die Metallzentren spontan bilden. In späteren Versuchen wurde Argon anstelle von Stickstoff verwendet, da sich die Lösung aufgrund der hohen Dichte des Gases damit einfach beschichten ließ, während das Durchsprudeln der Lösung mit N<sub>2</sub> immer mit dem Problem starker Schaumbildung - „Ausschäumen“ des Proteins - verbunden war. Auffällig war hier wie in späteren Reaktionen eine intensive Verfärbung der Lösung bei der Zugabe der Salze. Die Lösung färbte sich nach Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und FeCl<sub>3</sub> rosa, nach Na<sub>2</sub>S-Zugabe dann zunächst gelb und nach halbstündiger Inkubation tiefschwarz. Die schwarze Farbe - offensichtlich unlösliche Eisensulfid-Salze - lässt sich zum großen Teil durch Zentrifugation entfernen, ein Teil der Färbung verbleibt jedoch stets in der Proteinfraction. Das Protein wurde anschließend durch Verdünnung auf das achtfache Puffervolumen rückgefaltet, durch weiteres zweifaches Verdünnen mit sauerstoffgesättigtem Puffer sollten sich die Disulfidbrücken schließen können. Das Protein wurde entweder über eine Ni-NTA (Imidazolgradient) oder eine DEAE-Sepharose CL6B-Säule angereichert und nach Ankonzentrieren für die spektroskopische Analyse eingesetzt. Mit beiden Aufreinigungsmethoden ließ sich das H6-ISF sehr gut anreichern und erscheint in der Coomassie-Färbung als weitgehend homogene Präparation, wie für den Fall der DEAE-Aufreinigung gezeigt. Von der DEAE-Säule eluiert das Protein bei der gleichen Ionenstärke wie das durch limitierte Proteolyse gewonnene ISF (Abbildung 20) (Abschnitt 3.6.1). Auch die aufgereinigten Proben zeigen eine schwarz-braune Färbung, die unlöslichen Eisensalzen zugeordnet wird. Diese Färbung ließ sich auch durch Gelfiltration, Filtrieren durch 0,2  $\mu$ M-Porenfilter, extensive Ultrazentrifugation, mehrtägiges Dialysieren mit bis zu 5 mM EDTA, und sogar durch TCA-Fällung nicht vom Protein abtrennen. Es bleibt unklar, ob es sich um Eisenverbindungen handelt, die (i) unspezifisch am Protein adsorbiert sind, (ii) anstelle eines korrekten [2Fe-2S]-Clusters die Cystein- und Histidinliganden besetzen oder (iii) fest an das Hexahistidin-Tag gebunden bleiben.





**Abbildung 20. Aufreinigung von H6-ISF über DEAE-Chromatographie nach der Rekonstitution aus dem Zelllysat.** Elutionsprofil der DEAE-Säule (DEAE-Sepharose CL6-B, 50 ml) und SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) des ankonzentrierten Elutionspeaks.

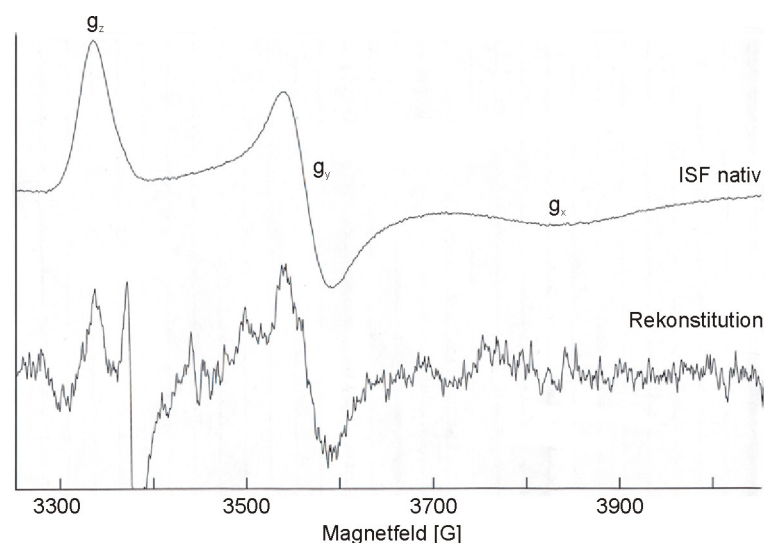
Im Redoxspektrum der Proben waren die für das Rieske-Zentrum charakteristischen Maxima nicht zu erkennen. Die Absorption steigt jedoch insbesondere unterhalb von 400 nm sehr stark an, vermutlich ein Streueffekt der verunreinigenden schwarzen Färbung (Abbildung 21a). Angesichts der relativ schwach ausgeprägten Maxima der Absorption des Rieske-Metallzentrums ist die Möglichkeit gegeben, dass diese *peaks*, selbst wenn sie vorhanden sein sollten, durch die Streueffekte überdeckt werden. Auch in späteren Versuchen war kein charakteristisches UV/Vis-Spektrum nachzuweisen, sondern immer nur ein starker und unspezifischer Anstieg im kurzwelligen Bereich, so dass diese Spektroskopiemethode nicht als Nachweisverfahren für den Erfolg der Rekonstitution dienen konnte. Das CD-Spektrum einer Probe wies im relevanten Bereich (300-700 nm) kein charakteristisches Signal auf (nicht gezeigt), allerdings war die Probenkonzentration nicht sehr hoch (~ 5 mg/ml), und auch hier gilt wie im UV/Vis-Spektrum, dass das [2Fe-2S]-Zentrum nur ein relativ schwaches Signal liefert. In dem die Sekundärstruktur des Proteins anzeigenden Bereich liefert die Rekonstitutionsprobe ein Spektrum, das dem für Rieske-Proteine publizierten Spektrum [259] ähnelt und eine *random coil*-Struktur ausschließt (Abbildung 21b).



**Abbildung 21 UV/Vis- und CD-Spektren einer Rekonstitutionsprobe von H6-ISF.** **a** UV/Vis-Spektrum von 300-700 nm. Große Abbildung: vergrößerter Ausschnitt bei niedrigen Absorptionswerten; Einschub: Gesamtspektrum. Blaue Kurve: unbehandelte Probe in 50 mM  $\text{NaP}_i$  pH 7,5; rote Kurve: Ascorbat-reduzierte Probe. Mit blauen/roten Pfeilen sind die Wellenlängenpositionen markiert, bei der das oxidierte/reduzierte Rieske-Spektrum Absorptionsmaxima erwarten lässt. **b** CD-Spektrum von 190-260 nm der unbehandelten Probe in 50 mM  $\text{NaP}_i$  pH 7,5. Zum Vergleich ist das Spektrum des durch limitierte Proteolyse gewonnenen Rinder-ISF [259] gezeigt.

EPR-Spektren wurden nach Reduktion der Proben mit 1 mM Natriumascorbat aufgenommen (in Zusammenarbeit mit Klaus Zwicker, Uniklinikum Frankfurt). Zum Vergleich wurde das durch limitierte Proteolyse aus dem  $bc_1$ -Komplex gewonnene native ISF vermessen. Diese Probe liefert ein charakteristisches Signal, die drei g-Werte entsprechen den für verschiedene Rieske-Proteine publizierten Werten. Die Rekonstitutionsproben zeigen nach mehrfacher Akkumulation bei sättigender Mikrowellenleistung ein schwaches, aber erkennbares Rieske-Signal (Abbildung 22). Geht man für das Referenzprotein von einer vollständigen Belegung des

Metallzentrums aus, kann man eine relative Rekonstitutionsausbeute bezogen auf die Proteinkonzentration ermitteln. Sie bewegt sich bei diesen ersten Rekonstitutionsexperimenten im Bereich weniger Promille; auf eine exakte Ermittlung wurde verzichtet, da die Rekonstitutionsprobe wegen des sehr schwachen Signals mit anderen EPR-Parametern vermessen werden musste und somit keinen direkten Vergleich zulässt. Zusammengefasst gelingt die Rekonstitution direkt aus dem Zellysate oder einer nicht weiter aufgereinigten *inclusion body*-Fraktion nur in sehr begrenztem Umfang, das Holo-Protein ist nur in Spuren nachweisbar.

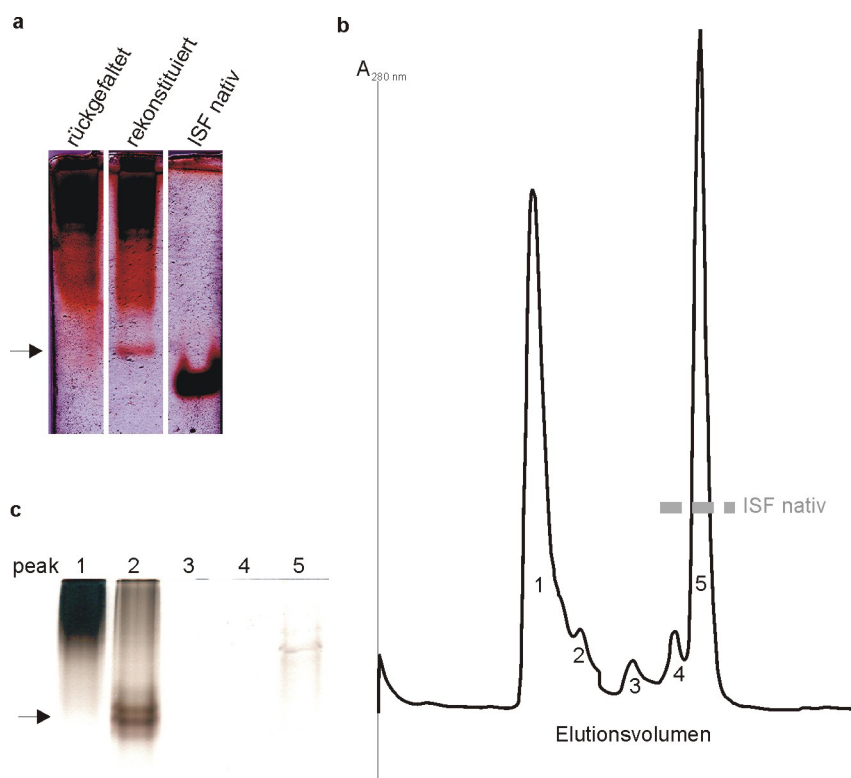


**Abbildung 22 EPR-Spektrum eines anfänglichen Rekonstitutionsversuchs des [2Fe-2S]-Zentrums in H6-ISF.** Die Probe wurde vor der Messung mit 1 mM Natriumascorbat reduziert. Zum Vergleich wurde das native *Paracoccus*-ISF gemessen. Messparameter: Abschnitt 2.4.2.

Um bessere Ausbeuten zu erzielen, wurden die Einzelschritte Aufreinigung - Rückfaltung - Rekonstitution getrennt angegangen, statt wie in den initialen Rekonstitutionsversuchen alle Schritte in einer Prozedur zu verbinden. Wie oben beschrieben, wurden gewaschene *inclusion bodies* präpariert und weiter aufgereinigt, um ein definiertes Ausgangsmaterial für die Rückfaltung und anschließende Rekonstitution zu erhalten. Die mit verschiedenen Methoden zurückgefalteten Apo-Proteine wurden für die Rekonstitution eingesetzt, angelehnt an ein Protokoll von Holton *et. al.* [156]. Hierbei wurden die gleichen Reagenzien für die Rekonstitution verwendet wie bereits beschrieben,  $\text{FeCl}_3$  und  $\text{Na}_2\text{S}$  jedoch nur in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  eingesetzt, da der Verdünnungsschritt zur Rückfaltung wegfällt. Alternativ wurde eine enzymatische Rekonstitutionsprozedur versucht, wie sie für Ferredoxine erfolgreich eingesetzt wurde [170]. Das Enzym Rhodanese soll hierbei  $\text{S}^0$  aus Thiosulfat freisetzen und dabei durch die Gegenwart von Apo-Fe-S-Proteinen aktiviert werden.

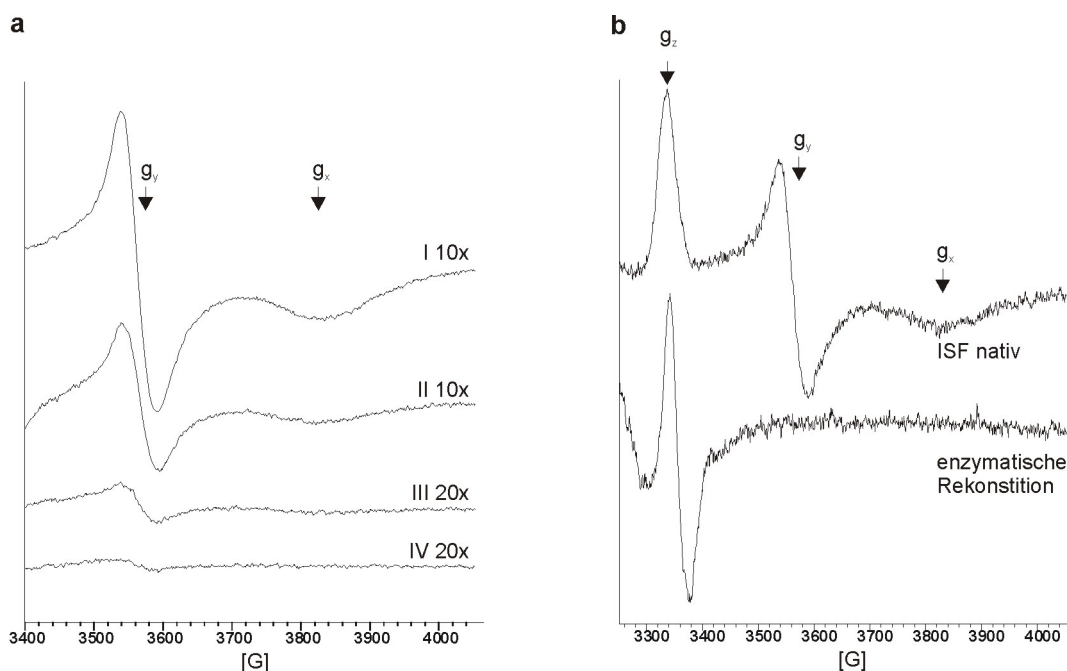
Das Reduktionsmittel DTT setzt den Sulfan-Schwefel anschließend in  $S^{2-}$  um, das mit dem von  $FeCl_3$  bereitgestellten Eisen die gewünschten Cluster ausbilden soll. Ein Vorteil könnte hierbei die von der Anwesenheit von Apo-Protein kontrollierte Freisetzung des Schwefels sein, was möglicherweise unerwünschte Nebenprodukte (Eisensulfide) vermindert. Des Weiteren wurde die bereits versuchte Strategie der Rückfaltung durch Verdünnung bei gleichzeitiger Rekonstitution erneut versucht, mit dem Unterschied, dass jetzt aufgereinigtes H6-ISF anstelle des Zelllysats bzw. der *inclusion body*-Fraktion zum Einsatz kam.

Bei der Analyse der verschiedenen Rekonstitutionsversuche fand sich ein weiteres - wenn auch nicht absolut sicheres - Kriterium neben den EPR-Spektren, das die Bildung des Holo-Proteins anzeigt: Im Maurer-Nativgel zeigen die rekonstituierten Proben neben der schon bekannten und oben beschriebenen „Leiter“ im oberen Teil des Gels eine distinkte Bande in der unteren Hälfte (Abbildung 23a). Diese läuft nicht ganz so weit zur Kathode wie das native Referenz-ISF, was sich aber durch die zusätzlichen positiven Ladungen des Hexahistidyl-*tags* sehr gut erklären lässt. Anhand dieses Kriteriums könnte also eine Trennung von Apo- und Holo-Form detektierbar sein. Dies scheint prinzipiell mit einer Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75) zu gelingen, mit der die beiden Laufformen in einem analytischen Ansatz teilweise getrennt werden konnten (Abbildung 23b,c). Jedoch eluiert diese Proteinfraction weiterhin deutlich früher von der Säule, als dies für das native Referenz-ISF der Fall ist. Bei diesem Elutionsvolumen findet sich ein prominenter *peak*, der jedoch dem silbergefärbten Gel zufolge kein Protein enthält; möglicherweise handelt es sich dabei um Ascorbat, das in der Probe aufgrund einer vorherigen EPR-Messung vorhanden war. Der endgültige Nachweis, dass bei der Gelfiltration tatsächlich das Holo-Protein angereichert wird, steht noch aus.



**Abbildung 23 Unterschiedliche Laufformen von Apo- und Holo-ISF nach Rückfaltung bzw. Rekonstitution.** **a** Nativgel (nach Maurer, 10 %; Silberfärbung) einer rekonstituierten Probe. Zum Vergleich ist eine rückgefaltete Probe und das proteolytische ISF aufgetragen. **b** Elutionsprofil Superdex 75 (24 ml); das zu erwartende Elutionsvolumen für das native ISF ist angedeutet. **c** den Fraktionen aus (b) zugeordnetes Nativgel (10 % Maurer, Silberfärbung).

Die EPR-Spektren und Ausbeuten ausgewählter Rekonstitutionsansätze sind in Abbildung 24a bzw. Tabelle 3 wiedergegeben. Die Ansätze zeigen alle klare EPR-Spektren und liefern um mindestens eine Größenordnung bessere Ausbeuten als die initialen Versuche. Die beste Ausbeute (1,4 %) konnte mit gleichzeitiger Rekonstitution und Rückfaltung durch Verdünnen erzielt werden. Wenngleich dieser Wert eine deutliche Steigerung gegenüber den ersten Versuchen darstellt, ist die Ausbeute weiterhin unbefriedigend. Ein eher kuriose Ergebnis lieferte die enzymgestützte Rekonstitution mit Rhodanese: Hier wurde der EPR-Signatur nach zu urteilen ein [3Fe 4S]-Zentrum in das Rieske-Apo-Protein eingebaut (Abbildung 24b).



**Abbildung 24 EPR-Spektren verschiedener Rekonstitutionsansätze.** **a** Spektren mit erfolgreich rekonstituiertem [2Fe-2S]-Zentrum. I: homologes ISF; II: Rekonstitution bei gleichzeitiger Rückfaltung durch Verdünnen; III: *on-column*-Rückfaltung (Harnstoff-Gradient) mit anschließender Rekonstitution; IV Rückfaltung durch Verdünnung mit anschließender Rekonstitution. Die Proben wurden für die Messung mit 1 mM Natriumascorbat reduziert. Gezeigt ist nur der Spektralbereich mit g<sub>x</sub>- und g<sub>y</sub>-peaks; der g<sub>z</sub>-peak ist durch ein starkes Radikalsignal (vermutlich Ascorbylradikal) überlagert. Neben den Spektren ist die Zahl der Akkumulationen - bei ansonsten gleichen Messbedingungen - angegeben. **b** EPR-Spektrum nach enzymatischer Rekonstitution mit Rhodanese. Probenbehandlung wie in a; zum Vergleich ist das Spektrum des proteolytischen ISF gezeigt.

Rekonstitution	Verhältnis Konzentrationen (Lowry)	Verhältnis EPR-Intensität	% Rekonstitution
Referenz: ISF homolog bei <i>gleichzeitiger</i> Rückfaltung durch Verdünnen	1	1,00	≡ 100,0
<i>nach</i> Rückfaltung über Harnstoff-Gradient	32	0,45	1,4
<i>nach</i> Rückfaltung durch Verdünnen	16	0,09	0,6
	21	0,03	0,1

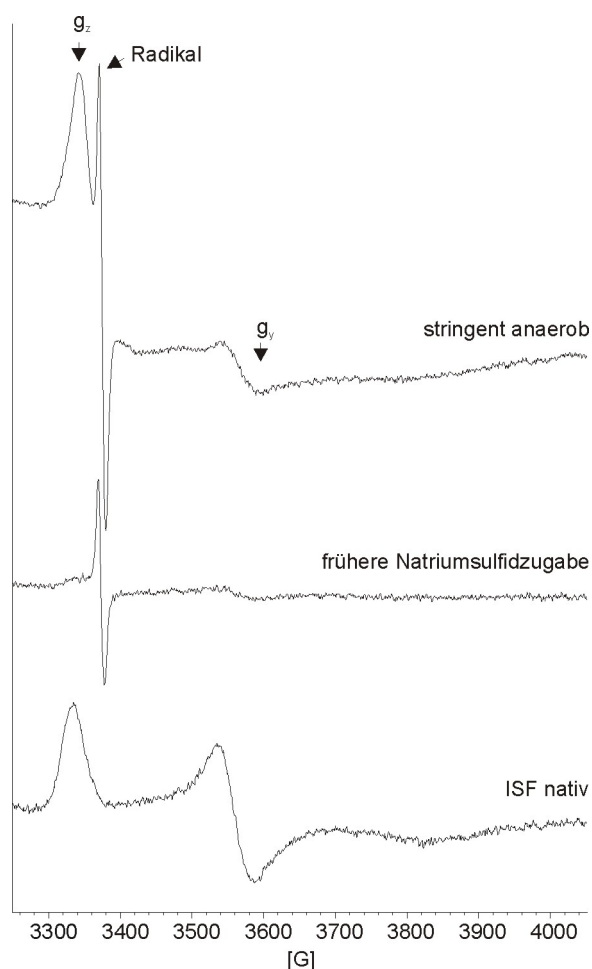
**Tabelle 3 Ausbeuten an Holo-ISF in verschiedenen Rekonstitutionsansätzen.** Das Verhältnis der EPR-Signalintensität wurde aus der Amplitude des g<sub>y</sub>-peaks bestimmt.

Ausgehend von dem bislang besten Ergebnis sollte die Prozedur der Rückfaltung mit gleichzeitiger Rekonstitution weiter optimiert werden. Ein möglicher Schwachpunkt der bisherigen Prozedur wurde in der ungenügenden Anaerobiose gesehen, da frei in der Lösung vorliegende Cluster sehr labil gegenüber molekularem Sauerstoff sind [260]. Die Reaktion wurde daher unter stringent anaeroben Bedingungen durchgeführt; dies

geschah in Zusammenarbeit mit Monika Haberecht, Institut für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Wagner. Die verschiedenen Lösungen wurden in Schlenkkolben gefüllt, mehrfach hintereinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Hochvakuum entgast. Das Zutropfen der Reagenzien erfolgte mit Spritzen unter ständigem  $N_2$ -Gasfluss, der Verdünnungsschritt zur Rückfaltung erfolgte über ein Verbindungsstück in einen größeren, entgasten Schlenkkolben. Ein anderer möglicherweise kritischer Punkt war die auffällige Schwarzfärbung des Reaktionsgemisches wenige Minuten nach Zugabe von  $Na_2S$ . Es scheint, dass große Teile der Reagenzien als unerwünschte Nebenprodukte unlösliche Eisensalze bilden. Um dies zu unterdrücken, wurden die Parameter der Rekonstitution in Abwesenheit von Protein, gewissermaßen in „Dummy-Rekonstitutionen“, vielfach variiert. Temperatur (RT/ 4 °C), pH (6,8 - 8,8) und mehr oder weniger stringente Anaerobiose (vorheriges extensives Entgasen und anschließendes Spülen mit Argon / nur Spülen mit Argon) hatten im getesteten Bereich keinen Einfluß, genausowenig wie der komplette Austausch der bisher verwendeten Reagenzien gegen frische - insbesondere  $\beta$ -Mercaptoethanol könnte nach längerer Lagerung bei RT z.T. in oxidiertem Form vorgelegen haben.

Als entscheidender Punkt hinsichtlich der Bildung unlöslicher Eisensalze stellte sich hingegen die Wartezeit nach Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und  $FeCl_3$  bis zur Zugabe von  $Na_2S$  heraus. Während die Lösung direkt nach Zugabe der ersten beiden Reagenzien noch eine intensive Rotfärbung aufweist, verblasst diese innerhalb von 10-15 min. Wurde das Natriumsulfid zugegeben, solange die Lösung noch rot war, entwickelte sich eine intensive rot-braune Färbung, wie sie auch bei einer hochkonzentrierten Probe des Rieske-Proteins zu erwarten wäre. Bei einer späteren Zugabe - das Protokoll von Holton *et. al.* [156] sieht eine 30minütige Wartezeit vor - kommt es hingegen zu der bislang beobachteten intensiven Schwarzfärbung. Mit diesen neu erarbeiteten Parametern - stringente Anaerobiosis und Vermeiden der Bildung unlöslicher Salze - wurden neue Rekonstitutionsversuche mit gleichzeitiger Rückfaltung des H6-ISF unternommen. Jedoch konnte hier keine höhere Ausbeute erzielt werden als die oben genannten 1,4 %. Vielmehr zeigte sich ein weiterer Schwachpunkt der Rekonstitutionsprozedur: Die Spektren wiesen z.T. unproportional hohe  $g_z$ -Signale relativ zu den  $g_y$ -Signalen auf (Abbildung 25). Dies deutet auf eine heterogene Population hin. Damit entstehen also neben den gewünschten  $[2Fe-2S]$ -Clustern auch andere Clustertypen. Ein weiter „sweep“ des EPR-Spektrums zeigt bis auf ein Signal

von freiem Eisen ( $g \sim 4,3$ ) keine weiteren Signale, wie bei einem [4Fe-4S]-Cluster zu erwarten, so dass es sich vermutlich um ein [3Fe-4S]-Cluster handelt. Zusammengefasst scheinen mit dem *Paracoccus*-H6-ISF nur geringe Rekonstitutionsausbeuten zu erzielen. Mit den in Tabelle 1 gegebenen Ausbeuten für die Proteinpräparation und einer Rekonstitutionsausbeute von  $\sim 1\%$  erhält man aus einem Liter Kultur somit etwa 1 mg Holo-Rieske-Proteinfragment.



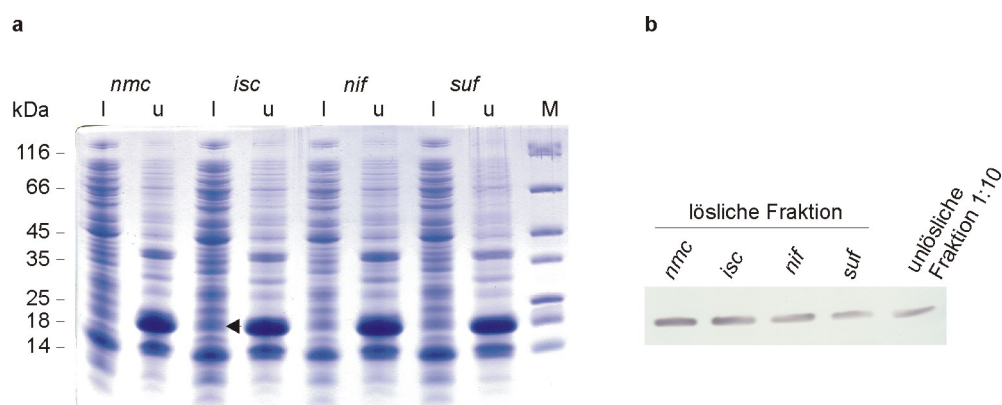
**Abbildung 25 EPR-Spektren nach Rekonstitution von *P.d.*-H6-ISF mit gleichzeitiger Rückfaltung: Variation verschiedener Versuchsparameter.** Das obere Spektrum stammt von einer Probe, die unter stringent anaeroben Bedingungen rekonstituiert wurde. Das mittlere Spektrum zeigt eine Rekonstitution, bei der  $\text{Na}_2\text{S}$  früher zugegeben wurde, um die Bildung von Eisensulfiden zu minimieren. Das untere Referenzspektrum ist das native *P.d.*-ISF. Die Proben wurden mit 1 mM Natriumascorbat reduziert.

### 3.1.7 Untersuchung der löslichen Fraktion des H6-ISF

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, findet sich ein geringer Teil des H6-ISF in der löslichen Fraktion des Zelllysats. Nachdem die Versuche mit der unlöslichen Fraktion nicht die erhofften Ausbeuten an Holo-Protein lieferten, wurde diese lösliche Fraktion weitergehend untersucht. Die Versuche, durch Variation der Anzuchtbedingungen und



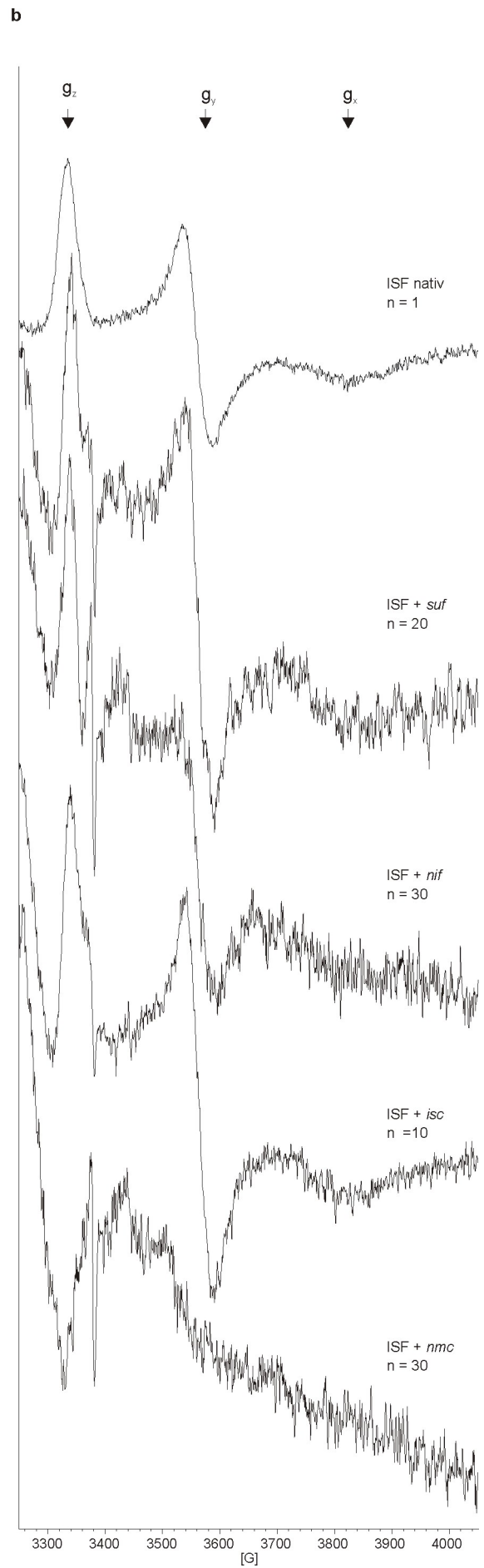
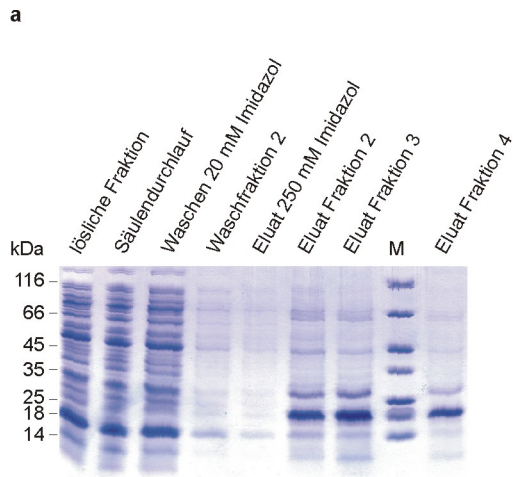
des Stammhintergrunds die Ausbeute der löslichen Fraktion zu steigern, waren wie bereits beschrieben ohne Erfolg. Als nächstes wurde untersucht, wie sich die Koexpression verschiedener Gencluster auswirkt, denen man eine Rolle in der Biogenese von Fe-S-Zentren zuschreibt. Für verschiedene Ferredoxine wurde bereits beschrieben, dass eine Koexpression dieser putativen Biogenese-Gene die Ausbeute an Holo-Protein steigert [154]. In der vorliegenden Arbeit wurden das *isc*-Operon von *E. coli*, das *nif*-Operon von *Azotobacter vinelandii* und das *suf*-Operon (*E. coli*) mit H6-ISF koexprimiert. Die genannten Gencluster wurden dabei auf einem zweiten Plasmid (pRKNMC) im Stamm M15 pRep4 angeboten und standen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Yasuhiro Takahashi, Universität Osaka, Japan zur Verfügung gestellt. Die Koexpression erfolgte in Terrific Broth (TB)-Medium unter Zugabe von 0,1 mg/ml Eisenammoniumcitrat; induziert wurde bei  $OD_{600} \sim 0,5$  mit 1 mM IPTG, die Kulturen wuchsen danach für 18 h bei RT. Als Kontrolle diente die Koexpression des leeren Vektors pRKNMC. In allen Stämmen ist die Expression von H6-ISF stark induzierbar; in den löslichen Fraktionen ist im SDS-PAGE ebenfalls schwach eine Bande auf derselben Höhe zu erkennen (Abbildung 26). Der Anteil der löslichen Fraktion liegt dem Western Blot nach zu urteilen etwa eine Größenordnung unter der *inclusion body*-Fraktion. Hier, wie auch bereits im SDS-PAGE, ist deutlich zu sehen, dass die Koexpression der Fe-S-Biogenese-Gencluster nicht zu einer gesteigerten Löslichkeit von H6-ISF führen: Der Kontrollstamm lieferte die gleiche Verteilung zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion.



**Abbildung 26 Koexpression von Fe-S-Biogenese-Genclustern mit H6-ISF.** **a** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) von löslichen und unlöslichen Fraktionen der Zellysate. Gelauftrag: Je 5  $\mu$ l der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion. Der Pfeil zeigt die dem löslichen H6-ISF zugeordnete Bande. **b** Western Blot (Tricin-Gel, 10 %) von löslichen und unlöslichen Fraktionen. Antikörper „AD“ (anti-ISF *P.d.*). Gelauftrag: Je 5  $\mu$ l der löslichen und 0,5  $\mu$ l einer unlöslichen Fraktion.

Von den löslichen Fraktionen einer präparativen Anzucht im 1 l-Maßstab ausgehend, wurde versucht, das H6-ISF über eine Ni-NTA-Säule (Imidazolgradient) unter nativen Bedingungen aufzureinigen. Abbildung 27a zeigt, dass eine deutliche Anreicherung möglich ist, die Eluate jedoch noch eine Reihe anderer Proteine enthalten. Die native Aufreinigung über die Ni-NTA-Säule liefert also bei weitem nicht denselben Reinheitsgrad, wie es bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen der Fall ist. Die Identität der vermeintlichen H6-ISF-Bande wurde über immunologischen Nachweis bestätigt (nicht gezeigt). Von den angereicherten Fraktionen wurden EPR-Spektren aufgenommen (Abbildung 27b). Diese zeigen im Falle der Koexpression der Fe-S-Biogenesecluster *isc*, *nif* oder *suf* ein deutliches Rieske-Signal; im Kontrollstamm - Kotransformation von pRKNMC - ist dieses Signal nicht gegeben. Dies zeigt, dass durch die Koexpression genannter Gencluster auch die Bildung von Rieske-Fe-S-Zentren katalysiert werden kann.

Somit erscheint also durch diese genetische Modifikation die Expression des Holo-Proteins im Wirt *E. coli* zumindest prinzipiell möglich. Die Ausbeute an Holo-ISF wurde wiederum auf die Proteinkonzentration bezogen, wobei das proteolytisch gewonnene ISF als Referenz dient (Tabelle 4). Die Ausbeute liegt bei 2-10 %; die Aussage dieser Werte ist jedoch begrenzt, wenn man berücksichtigt, dass das ISF lediglich angereichert ist und ein beträchtlicher Teil der Probe aus anderen Proteinen besteht. Nach Abschätzung des Anteils der Rieske-Bande im Coomassie-Gel ist es plausibel, von einer tatsächlich weit höheren Ausbeute an Holo-Protein auszugehen. Dies soll durch weitere Aufreinigung des Proteins und erneute EPR-Messungen bestätigt werden; ersteres gelang bereits mit einem weiteren Anionenaustauscherschritt (Mono Q, nicht gezeigt). Der Prozess der *in-vivo*-Clusterinsertion ist also für das *Paracoccus*-ISF weit effizienter als die chemische Rekonstitution. Der Flaschenhals liegt hier jedoch in der unbefriedigenden Ausbeute für die lösliche ISF-Fraktion nach der induzierten Expression. Aus einer 1 l-Kultur erhält man etwa im Falle der *suf*-Koexpression rund 1 mg Protein in der über Ni-NTA angereicherten Fraktion. Entsprechen davon 10 % dem Holo-Rieske-Proteinfragment, beläuft sich die Ausbeute damit auf 0,1 mg/l Kulturmedium.



**Abbildung 27** (siehe vorhergehende Seite) **Analyse der löslichen Fraktionen nach Koexpression von Fe-S-Biogenese-Genclustern.** **a** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) der Fraktionen nach Anreicherung der löslichen Fraktion über eine Ni-NTA-Säule (1 ml), exemplarisch gezeigt für die Koexpression des *isc*-Genclusters. Gelauftrag: lösliche Fraktion 5  $\mu$ l (von gesamt 5 ml löslicher Fraktion aus einer 50 ml-Kultur), Säulendurchlauf 5  $\mu$ l (von gesamt 1 Säulenvolumen), Waschen mit 20 mM Imidazol 15  $\mu$ l (von 2x 4 SV), Eluatfraktionen je 15  $\mu$ l (von 2x 0,5 SV). **b** EPR-Spektren der angereicherten Fraktionen. Protein aus je einer 1 l-Koexpressionskultur, angereichert über eine Ni-NTA-Säule (5 ml). Die Proben wurden für die Messung mit 1 mM Natriumascorbat reduziert. n gibt die Zahl der Akkumulationen an.

Koexpression von	Konzentration Lowry [mg/ml]	Verhältnis Konzentrationen	Verhältnis EPR-Intensitäten	% Holo-Protein
Referenz: ISF nativ	1,1	1	1	$\equiv$ 100,0
<i>isc</i>	2,6	2	0,18	7,6
<i>nif</i>	2	2	0,04	2,2
<i>suf</i>	1,1	1	0,09	9,0

**Tabelle 4 Ausbeute an Holo-ISF bei Koexpression von Fe-S-Biogenese-Genclustern.** Die Intensität des EPR-Signals, gemessen an der Amplitude des  $g_{\gamma}$ -peaks, wurde mit der Proteinkonzentration der Probe ins Verhältnis gesetzt. Als Referenz dient das native ISF.

### 3.1.8 Homologe Expression des Rieske-Proteinfragments

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Projekt betreut, in dem die homologe Expression eines Rieske-Proteinfragments in *P. denitrificans* sowie Details der Biogenese und des Einbaus in die Cytoplasmamembran des *full-length*-Proteins untersucht wurden. Hier soll eine kurze Zusammenfassung gegeben werden; die detaillierten Ergebnisse finden sich in der Diplomarbeit von Julie Bachmann [261]. Für die Expression eines Rieske-Proteinfragments wurde über verschachtelte PCRs (*splicing by overlap extension*, SOEing) der für den Membrananker und die *hinge*-Region codierende Bereich deletiert; das ursprüngliche Startcodon blieb dabei erhalten. Die Expression erfolgte im Plasmid pRI2(436) mit dem natürlichen Promoter des *fbc*-Operons. Nach Konjugation des Konstrukts in *P. denitrificans*, Anzucht und Zellfraktionierung wurden Western-Blots angefertigt. Jedoch konnte unter Einsatz von bis zu 100  $\mu$ g Gesamtprotein kein ISF in Ganzzelllysate, Cytosol, Membran oder Periplasma nachgewiesen werden. Es wurde nicht weiter untersucht, ob die Expression bereits auf der Transkriptions- oder erst auf der Translationsebene fehlschlug, oder ob es zu einem raschen posttranslationalen Abbau des Proteins kommt. Somit fällt die Option der Produktion eines Rieske-Proteinfragments im homologen Wirt aus.

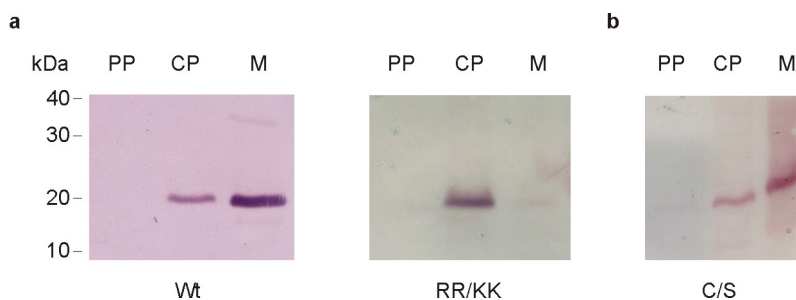
Basierend auf einer Beobachtung von [64], der das Rieske-Protein von *P. denitrificans* als potentiell Substrat des *twin arginine translocation pathway* (Tat) ausmacht, wurde

ein Alignment der N-terminalen Region dieser und anderer Rieske-Proteinsequenzen erstellt. Es zeigte sich, dass bakterielle *bc<sub>1</sub>*- und *b<sub>6f</sub>*-Komplexe tatsächlich ein Tat-Konsensusmotiv aufweisen. Neben den beiden invarianten Argininresten finden sich auch die meisten anderen Reste des Konsensus (S/T-R-R-x-F-L-K) wieder. Eine interessante Beobachtung war, dass der Lysinrest in der letzten Position des Konsensus, den 70 % aller anderen Tat-Substrate aufweisen, in keiner der untersuchten Rieske-Sequenzen zu finden ist. Möglicherweise ist dieser Austausch von Bedeutung für die „Doppelrolle“ der N-terminalen Region als Exportsignal und TM-Helix. Diese Vermutung bestätigte der TM-Helix-Vorhersage-Algorithmus TMAP (Karolinska-Institut, Schweden): Für die nativen Rieske-Sequenzen wird korrekterweise eine TM-Helix vorhergesagt; dies ist nicht der Fall, wenn *in silico* der „kanonische“ Konsensus mit einem Lysinrest erzeugt wurde.

Die beiden invarianten Arginine wurden im *Paracoccus*-ISP gegen Lysinreste ersetzt und nach Zellfraktionierung - deren Erfolg über kompartimentspezifische Markerproteine nachgewiesen wurde - die Lokalisierung der Mutante untersucht. Es zeigt sich, dass die RR/KK-Mutante im Cytosol akkumuliert und nur in Spuren in der Membranfraktion nachzuweisen ist (Abbildung 28a). In der Cytosolfraktion lässt sich darüber hinaus das charakteristische Rieske-EPR-Spektrum nachweisen. Diese Befunde zeigen, dass (i) das Rieske-Protein tatsächlich über den Tat-Weg exportiert wird; (ii) der Kofaktoreinbau, wie für Tat-Substrate postuliert (Berks 1996), bereits im Cytosol erfolgt.

Um die Abhängigkeit des Exports vom Kofaktoreinbau, also eine „Korrekturlesefunktion“, die für das Tat-System von mehreren Autoren [262,263] postuliert wird, näher zu untersuchen, wurde in einer weiteren Mutante einer der Cysteinliganden des [2Fe-2S]-Zentrums gegen ein Serin ausgetauscht. Dieses Protein findet sich etwa in gleichen Mengen in Membran und Cytosol wieder (Abbildung 28b). Der Export ist also eingeschränkt, aber keineswegs blockiert wie im Falle der RR/KK-Mutante. In den Membranen der C/S-Mutante ist kein EPR-Signal nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass beim Export keine stringente Kontrolle der Anwesenheit des Kofaktors erfolgt. In Weiterführung der beschriebenen Experimente [261] wurden Einzelmutationen an den Positionen der beiden „invarianten“ Argininreste eingeführt. Es zeigt sich, dass in einer KR-Mutante der Export nur geringfügig beeinträchtigt ist, während sich eine RK-Mutation wie die Doppelmutation auswirkt (nicht gezeigt).

Offensichtlich ist - zumindest im Falle des Rieske-Proteins - das zweite Arginin der für den Export maßgebliche Rest.



**Abbildung 28 Exportmutanten des Rieske-Proteins.** **a** Western Blot (Tricin-Gel, 10 %) von *P. denitrificans*-Zellfraktionen der Mutante RR/KK (Austausch der Tat-Konsensus-Argininreste gegen zwei Lysinreste). Aufgetragen sind je 15 µg Gesamtprotein (nach Lowry). Antikörper „AD“ (anti-ISF *P.d.*). PP = Periplasma, CP = Cytoplasma, M = Membranfraktion. Zum Vergleich sind die Zellfraktionen des *in trans* exprimierten Wildtyps gezeigt. **b** Zellfraktionen der C/S-Mutante (Austausch des Clusterliganden Cys152 gegen Serin). Experimentelle Bedingungen wie unter (a).

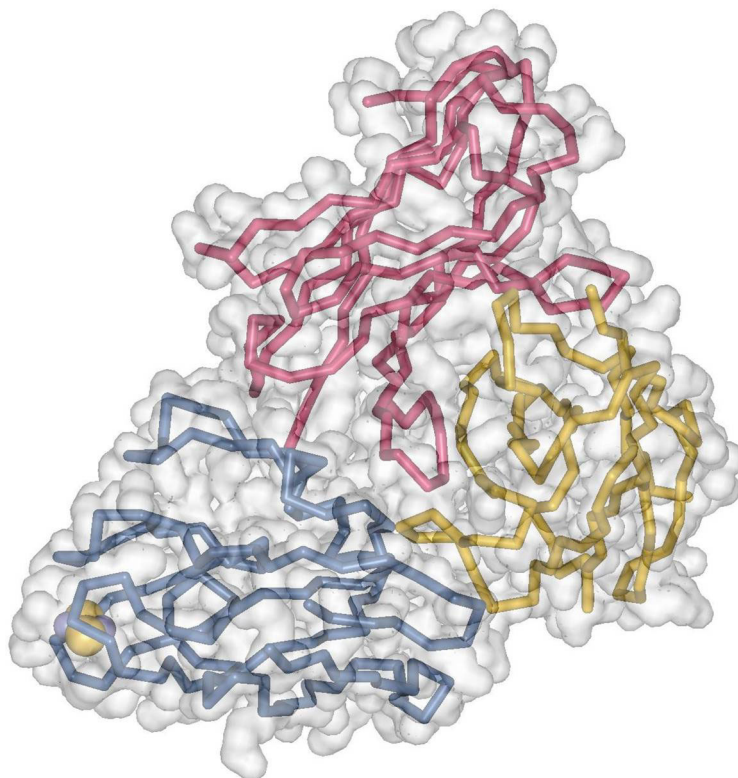
## 3.2 Transplantation eines Epitops des Rieske-Proteins

In diesem Projekt soll der bakterielle  $bc_1$ -Komplex für die Kristallisation zugänglich gemacht werden, indem eine Bindungsstelle für ein monoklonales  $F_v$ -Fragment, das erfolgreich für die Kristallisation des homologen Hefeenzym eingesetzt wurde, auf den *Paracoccus*-Komplex transplantiert wird. Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Hildur Palsdottir aus der Arbeitsgruppe von Carola Hunte, Max-Planck-Institut für Biophysik durchgeführt. Mit ihrer Unterstützung wurde die Antikörperbindungsstelle in der Kristallstruktur untersucht; des Weiteren hat sie die Bedingungen für den *pull-down assay* optimiert. Im Rahmen dieses Projekts wurde auch die Diplomarbeit von Thomas Kleinschroth betreut, der die Klonierung, Expression und Charakterisierung der dritten Epitopanpassung und der Chimären leistete.

### 3.2.1 Analyse der Epitopregion in der Kristallstruktur

Die Planung der ersten Konstrukte stützt sich wesentlich auf die veröffentlichte Analyse der  $F_v$ -Bindung [48]; eigene Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Hildur Palsdottir bestätigten zunächst diese Analyse. Die Kontakte zwischen  $F_v$ -Fragment und  $bc_1$ -Komplex wurden an der Elektronendichte der Kristallstruktur PDB 1EZV mit Hilfe des Programms 'O' [220] untersucht. Wie zu erkennen, bindet das  $F_v$  18E11 an die extrinsische Domäne des ISP (Abbildung 29). Der Kontakt wird hauptsächlich durch die hypervariablen Regionen 1 und 3 der schweren Kette vermittelt. Es finden sich überwiegend polare Wechselwirkungen mit dem ISP. Das  $F_v$ -Fragment erkennt dabei

keine lineare Aminosäureabfolge, sondern ein diskontinuierliches Epitop, das sich aus zwei Teilssegmenten der Primärsequenz, <sup>Sc</sup>Ile126-Asn130 (erstes Subepitop) und <sup>Sc</sup>Ala144 (zweites Subepitop) zusammensetzt. (Der den Aminosäurepositionen vorgestellte Index zeigt den Sequenzkontext - hier *S. cerevisiae* - an.)



**Abbildung 29 Übersicht zur Antikörper-Kontaktregion im Hefe-*bc*<sub>1</sub>-Komplex.** Kristallstruktur PDB 1EZV. Gezeigt ist das Rückgrat und die Van-der-Waals-Oberfläche der schweren Kette (dunkelrot), der leichten Kette (gelb) und der Rieske-UE (blau). Für das ISP ist zusätzlich das Metallzentrum dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm WebLab Viewer erstellt.

Nachdem eine punktuelle Anpassung dieses Bereichs nicht das erhoffte Ergebnis brachte (siehe unten), wurde die F<sub>v</sub>-ISP-Bindung vertiefend analysiert. Die Ergebnisse der detaillierten Zuordnung sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass über die in der ersten Untersuchung ausgemachten Epitopregionen noch weitere Reste polare Wechselwirkungen vermitteln. Eine Berechnung mit dem Programm Naccess ergab, dass 38 % der Kontaktfläche polarer Natur ist, woran 12 definierte H-Brücken einen entscheidenden Anteil haben. Ein Teil dieser polaren Bindungen wird über strukturelle Wassermoleküle vermittelt. In verschiedenen Datensätzen konnten an definierten Positionen Wassermoleküle ausgemacht werden. Das Molekül Wat279 bildet einerseits H-Brücken zu den Seitenketten Asp110(F<sub>v</sub>H) und Glu100(F<sub>v</sub>H), andererseits ist es zur Seitenkette von Asn130(ISP) verbrückt. Wat 5 bindet die

Hydroxylgruppe von Tyr33(F<sub>v</sub>H) sowie das Stickstoff des Peptidrückgrats bei Asp143(ISP).

F <sub>v</sub> schwere Kette	Wechselwirkung	ISP	F <sub>v</sub> leichte Kette	Wechselwirkung	ISP
Tyr111	hydrophob	Gln127	Ala56	hydrophob	Pro123
Arg98	SK-RG	Asn130	Leu54	hydrophob	Pro123
Arg98	RG-SK	Asn130	His55	hydrophob	Pro123
Tyr102	SK-SK	Asn130	Gly57	hydrophob	His124
Glu100	SK-SK	Asn130	Tyr49	hydrophob	Ile126
Tyr111	SK-SK	Ser131	Ala56	hydrophob	Gln127
Tyr27	hydrophob	Val132	His55	hydrophob	Gln127
Ser31	SK-SK	Asp133	<b>Arg53</b>	<b>SK-SK</b>	<b>Asp149</b>
Ser28	RG-SK	Asp133	Arg53	SK-SK	Gln151
Ser28	SK-SK	Asp133			
Ser31	SK-RG	Met134			
Ser31	hydrophob	Thr142			
Tyr33	hydrophob	Thr142			
Tyr102	SK-SK	Asp143			
Tyr33	SK-RG	Ala144			
Tyr102	hydrophob	Val147			
Ser103	SK-RG	Lys148			
Val104	SK-RG	Lys148			
Tyr102	hydrophob	Pro150			
Thr105	hydrophob	Pro150			

**Tabelle 5 Detaillierte Analyse der Kontakte zwischen F<sub>v</sub>-Fragment und ISP des Hefe-bc<sub>1</sub>-Komplexes.** Die in der Ko-Kristallstruktur identifizierten Wechselwirkungen sind sortiert nach Kontakten zur schweren und Kontakten zur leichten Kette. Innerhalb der beiden Gruppen sind die jeweiligen Partner nach der Sequenzposition des ISP sortiert. Als Kategorien wurden hydrophobe und polare Wechselwirkungen unterschieden; für letztere wurde weiter zwischen der Wechselwirkung von Rückgrat und/oder Seitenkette differenziert. Die einzelne Salzbrücke ist fett markiert. Die Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Hildur Palsdottir.

Ein wichtiger Befund dieser weitergehenden Untersuchung war, dass auch die leichte Kette des F<sub>v</sub> an der Bindung beteiligt ist. Die wenigen Antigenkontakte zur leichten Kette beschränken sich auf deren hypervariable Region 2; trotz der kleinen Kontaktfläche kommt dieser Wechselwirkung möglicherweise entscheidende Bedeutung zu, da sich hier die einzige Salzbrücke in der Antikörper-Antigen-Bindung findet: Arg53(F<sub>v</sub>L)-Asp149(ISP). Schließlich scheinen auch unpolare Wechselwirkungen eine Rolle zu spielen. Insbesondere drei Tyrosine Tyr33, Tyr102, Tyr111 protrudieren aus der Oberfläche der schweren Kette und „verzahnen“ sie mit der komplementären Oberfläche des ISP. Das Epitop wird von einer die β-Stränge 3 und 4 verbindenden Helix-loop-Region gebildet, die aus der ansonsten recht kompakten hydrophilen Domäne des Rieske-Proteins heraussteht, vermutlich mit ein Grund für ihre

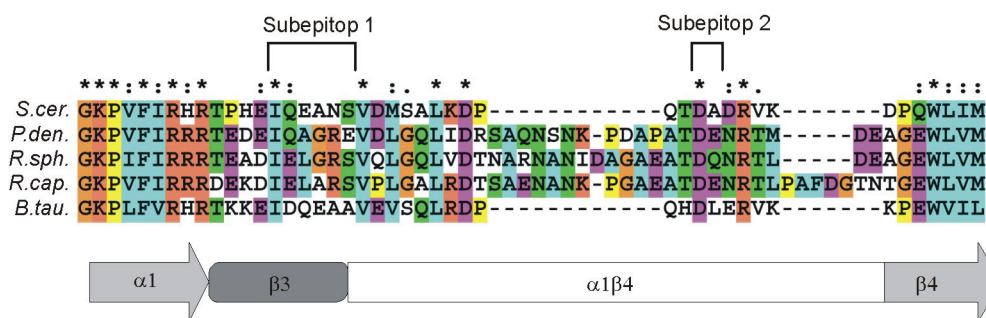


Immunogenität. Dieser Bereich wird von zwei Prolinresten Pro123(ISP) und Pro150(ISP) flankiert, die scheinbar jeweils einen „Richtungswechsel“ im Peptidrückgrat einleiten. Die Schleife wird wesentlich durch Wechselwirkung mit Arg190(ISP) in ihrer Position gehalten.

Zusammenfassend zeigt die weiterführende Analyse der Epitopregion, dass der ursprünglich versuchte punktuelle Austausch tatsächlich nur geringe Aussicht auf Erfolg hat, da weitere polare Wechselwirkungen, die ionische Bindung zur leichten Kette und die durch die bemerkenswerte Komplementarität der Oberflächen möglichen hydrophoben Kontakte außer acht gelassen wurden. Ferner könnten auch die flankierenden Proline von Bedeutung für die Ausrichtung des gesamten Epitops sein. Auf dieser Grundlage wurde eine Anpassung des zum gesamten Kontaktbereich <sup>Sc</sup>Pro123 bis <sup>Sc</sup>Gln151 homologen Abschnitts im *Paracoccus*-Protein versucht. Als „radikalster“ Ansatz wurden darüberhinaus zwei chimäre *bc*<sub>1</sub>-Komplexe kloniert, bei denen die gesamte extrinsische Domäne des *Paracoccus*-ISP gegen das Hefe-Äquivalent ersetzt ist. In einer Variante wurde die Gelenkregion des ISP in der *Paracoccus*-Sequenz belassen, in der zweiten Variante wurde auch diese mit ausgetauscht („*P.d.*-hinge bzw. „*S.c.*-hinge“).

### 3.2.2 Identifikation der homologen Region im *Paracoccus*-*bc*<sub>1</sub>-Komplex

Nachdem in der Kristallstruktur die für die F<sub>v</sub>-Bindung relevanten Aminosäurereste ausgemacht wurden, mussten im nächsten Schritt die homologen Positionen im *Paracoccus*-ISP identifiziert werden. Dies geschah zunächst nur im Hinblick auf die beiden in der ersten Analyse der Kristallstruktur klar definierten Subepitope. Als erstes wurde ein aus der *Protein Alignment Database* stammendes Alignment von sieben ISP-Sequenzen herangezogen (Eintrag PIRALN SA2280). Wie das Sequenzalignment zeigt, ist der das diskontinuierliche Epitop ausbildende *Helix-loop*-Abschnitt nur gering konserviert (Abbildung 30). Dies steht im Gegensatz zur restlichen hydrophilen Domäne, die eine hohe Sequenzidentität zwischen den verschiedenen Spezies aufweist. Das *Helix-loop*-Segment in *Paracoccus* trägt eine Insertion von 12 Aminosäuren im Vergleich zu den mitochondrialen Sequenzen; in diesem Bereich liegt die zweite Epitophälfte. Um eine sichere Zuordnung der Reste für die Mutagenese treffen zu können, war also eine gründliche Überprüfung des Alignments notwendig.



**Abbildung 30 Anfängliches Alignment der Epitopregion im ISP.** Das Alignment wurde der *Protein Alignment Database*, Eintrag SA2280 entnommen. Das Alignment wurde zur weiteren Verarbeitung in Clustal X eingelesen; an das bestehende Alignment wurde zusätzlich die *Paracoccus*- und die *Rhodobacter sphaeroides*-ISP-Sequenz angepasst. Der Übersichtlichkeit halber ist nur der Teil des Alignments mit den Sequenzen von *Bos taurus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* und *Paracoccus denitrificans* gezeigt, und davon nur die relevante Epitopregion. Das Epitop ist - wie in Hunte *et. al.* [48] definiert - oberhalb der Hefesequenz angedeutet. Unter dem Alignment ist symbolisch die Sekundärstruktur angegeben, die sich aus der Struktur des Rinder-ISF [67] ergibt.

Für ein sorgfältiges Alignment musste zunächst eine Auswahl der Sequenzen erfolgen. Mit der Meta-Datenbank SRS6 wurde dafür eine verknüpfte Suche nach der Rieske-Signatur in verschiedenen Motiv-Datenbanken (PFAM, PROSITE, BLOCKS) einerseits und den diese Signatur tragenden, bekannten oder putativen Proteinen in der SwissProt-Datenbank (SWALL) andererseits durchgeführt. Diese Suche lieferte 344 Sequenzen. Nach Löschen einiger Duplikate konnten 335 Sequenzen mit Clustal X angepasst werden. Daraus wurden Sequenzen entfernt, die nicht beide Rieske-Signaturen aufwiesen. Die verbleibenden 301 Sequenzen wurden in Rieske- (83 Sequenzen) und Rieske-Typ-Proteine unterteilt. Von der ersten Gruppe wurde wiederum ein Alignment und daraus ein phylogenetischer Baum mit Clustal X erstellt. Sequenzen, die zu divergent oder überrepräsentiert schienen, wie z.B. fünf verschiedene Tabak-ISP-Sequenzen, wurden entfernt. Bei den verbleibenden 27 Sequenzen, mit denen die verschiedenen *Phyla* etwa gleich stark repräsentiert waren, wurde für die Alignments der gering konservierte N-Terminus entfernt. Zwei Qualitätskriterien wurden für die verschiedenen Alignments bewertet: (i) die korrekte Zuordnung der bekannten konservierten und funktionell-strukturell relevanten Reste [67,68]; (ii) der von Clustal X generierte *score*.

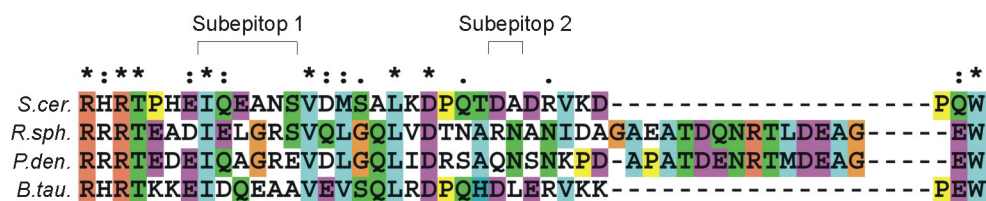
Mit den Standardeinstellungen von Clustal X ergab sich in Bezug auf die interessierende Region ein ähnliches Alignment wie im vorgefertigten Datenbank-Alignment PIRALN SA2280 beobachtet: Das zweite Subepitop im  $\alpha 1\beta 4$ -loop liegt auf

einer „Insel“ von acht Aminosäuren, die von zwei Indels (Insertionen/Deletionen) umgeben ist. Wurden die *gap penalty*-Parameter auf 30 erhöht, änderte sich das Alignment deutlich: Es findet sich nur noch ein Indel, die zuvor beobachtete Insel schließt unmittelbar an die N-terminal liegende Sequenz an (Abbildung 31a). Dieses Alignment liefert jedoch einen deutlich schlechteren *score*; für die ISP-Struktur relevante Reste (<sup>Bt</sup>Gly151, <sup>Bt</sup>Asp123, <sup>Bt</sup>Arg126) sind nur teilweise oder nicht mehr konserviert. Somit erscheint dieses Alignment unplausibler als das Alignment mit zwei Indels.

Dieses wird auch durch weitere Analysen gestützt, die zumindest für die Aminosäurereste der beiden Subepitope übereinstimmende Ergebnisse lieferten: (i) Profil-Alignment in Clustal X: ein zuvor erstelltes Alignment wird mit einer Sekundärstrukturmaske verglichen, die anhand der Sekundärstruktur des bovinen ISF (PDB 1RIE) erstellt wurde. Hierbei erhöhen sich die *gap penalties* in definierten Sekundärstrukturregionen; (ii) Homologie-Modellierung der *Paracoccus*-ISP-Struktur (Swiss-Model-Server). Die Strukturen des Rinder-ISF und des modellierten *Paracoccus*-ISF sind weitgehend deckungsgleich, mit Ausnahme des  $\alpha 1\beta 4$ -Segments (Abbildung 31b). Die Insertion im bakteriellen Protein scheint teilweise eine helikale Konformation anzunehmen, wie auch von anderen Autoren vorhergesagt [264]; diese Helix schließt jedoch nicht unmittelbar an die  $\alpha 1$ -Helix an. Die beiden Subepitope nehmen jedoch annähernd gleiche Positionen ein, mit geringfügigen Abweichung im zweiten Subepitop. Mit dem Programm Swiss Pdb Viewer konnte ein strukturbasiertes Alignment erstellt werden, das gleichfalls die Variante mit zwei Indels stützt. Basierend auf diesen Untersuchungen sollten die in Abbildung 30 als Äquivalent zum diskontinuierlichen Epitop des Hefe-ISP zugeordneten Aminosäurepositionen an dessen Sequenz angepasst werden. Zusätzlich sollte jeweils ein stromabwärts gelegener Rest, der in beiden Fälle stark divergierte, substituiert werden. In einer weitergehenden Anpassung sollte auch der Bereich zwischen den Subepitopen ausgetauscht werden.

Nachdem die auf Basis dieser Analyse erstellten Mutanten jedoch nur eine geringfügige Bindung an das F<sub>v</sub>-Fragment zeigten (siehe unten), wurde das Alignment kritisch revidiert. Anstelle der phylogenetisch sehr breiten Auswahl von Rieskesequenzen wurde eine spezifischere Gruppe von zehn mitochondrialen und bakteriellen Sequenzen zusammengestellt; die Auswahl orientierte sich an einer phylogenetischen Analyse von Rieske - und Rieske-Typ-Proteinen [63].

a



b

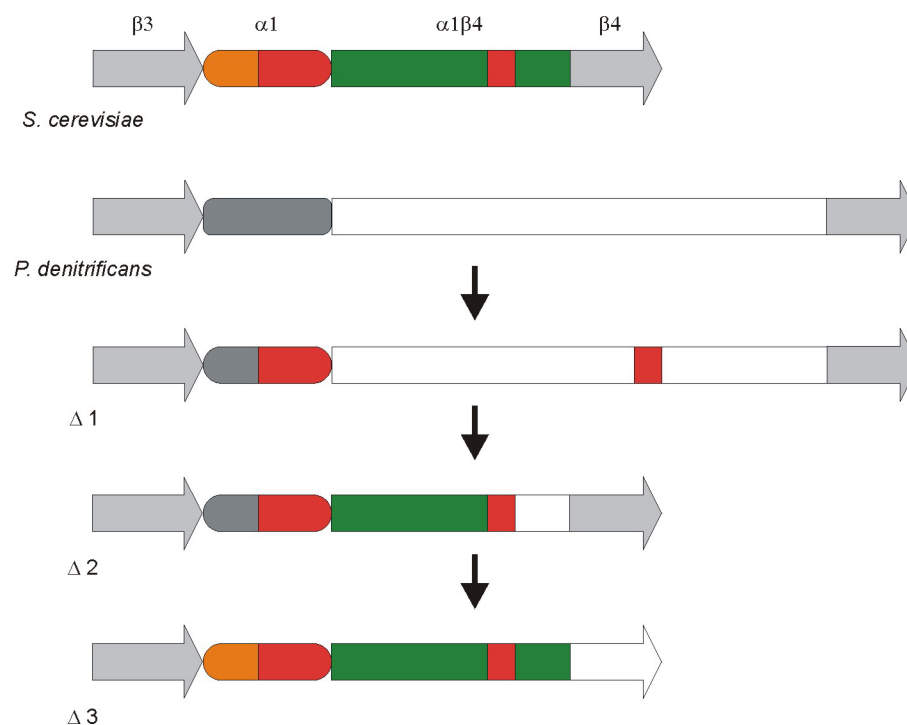


**Abbildung 31 Weiterführende Analyse der ISP-Sequenzalignments.** **a** Alternative Alignment-Variante bei veränderten Parametern. Gezeigt ist nur eine Auswahl der insgesamt 27 Sequenzen und hiervon lediglich die Epitopregion. **b** Homologiemodellierung des *Paracoccus*-ISF, basierend auf der Struktur des Rinder-ISF (Ausschnitt). Hellgrau: Rinder-ISF-Struktur IRIE; dunkelgrau: modellierte *Paracoccus*-Struktur; gelb: zu den Subepitopen homologe Bereiche im Rinder-ISF; rot: entsprechende Reste in der modellierten *Paracoccus*-ISP-Struktur.

Die N-terminale Sequenz wurde bis zum Beginn augenscheinlicher Sequenzähnlichkeiten in der Gelenkregion entfernt. Das Alignment wurde zunächst wieder mit den Standardeinstellungen von Clustal X durchgeführt (gap opening penalty = 10; gap separation distance = 4; Gewichtungsmatrix Gonnet) und lieferte ein ähnliches Bild wie die ursprüngliche Analyse, d.h. zwei Indels, in deren Mitte Subepitop 2 zum Liegen kommt. Anschließend wurde das Alignment mit den von Schmidt und Shaw [63] verwendeten Parametern (gap opening penalty = 15; gap separation distance = 12; Gewichtungsmatrix Blosum) durchgeführt; diese Parameter sind an die vermutete evolutionäre Distanz zwischen Mitochondrien und  $\alpha$ -Proteobakterien angepasst. Mit diesen Einstellungen ergibt sich die bereits zuvor beobachtete Alignment-Variante mit einem Indel, jedoch mit dem großen Unterschied, dass dieses Alignment keinen schlechteren *score* besitzt und die funktionell-strukturell relevanten Reste diesmal genauso gut konserviert erscheinen wie in der Alignment-Variante mit zwei Indels. Diese Diskrepanz muss sich aus der unterschiedlichen, engeren Auswahl an Sequenzen ergeben. Als alternative Möglichkeit, den Epitopbereich, der offensichtlich einen anderen Konservierungsgrad besitzt als das

übrige Protein, optimal anzupassen, wurde ein Alignment der Sequenzen mit DIALIGN versucht. Im Gegensatz zum Alignment mit Clustal X, welches ein über die gesamte Sequenzlänge optimiertes Alignment versucht und so auch nicht-homologe Bereiche fälschlicherweise anpasst, wurde dieser Algorithmus für lokal optimierte Alignments entwickelt und strebt nicht zwangsläufig ein globales Alignment an [265]. Auch dieser Algorithmus favorisiert die Variante mit einem Indel und erfüllt ebenfalls das Kriterium, bekanntermaßen wichtige Reste korrekt anzupassen.

Zusammenfassend ergibt sich, dass für die Zuordnung von Aminosäure-Positionen zum zweiten Subepitop zwei Möglichkeiten bestehen, die beide etwa gleichermaßen plausibel erscheinen. Eine eindeutige Zuordnung homologer Reste erscheint aufgrund des niedrigen Konservierungsgrad nicht möglich bzw. sinnvoll. Somit ist die zunächst versuchte punktuelle Anpassung des Epitops im *Paracoccus*-Protein nicht nur aus der Perspektive der weitergehenden strukturellen Analyse heraus fragwürdig, sondern auch auf Basis des Sequenzvergleichs. Abbildung 32 gibt einen Überblick über die zunächst auf Basis der anfänglichen Analyse geplanten Konstrukte, sowie über die weitergehenden Anpassung, die sich aus der kritischen Revision der ursprünglichen Annahmen ergab.



**Abbildung 32 Übersicht zu den geplanten Epitopanpassungen.** In rot sind die beiden in der ursprünglichen Analyse identifizierten Epitop-elemente angezeigt; orange kennzeichnet die stromaufwärts des Epitops gelegene Hefesequenz der α1-Helix, grün die Hefesequenz des α1β4-loop.

### 3.2.3 Klonierung der Epitopanpassungen und Chimären

Für die erste, minimale Epitopanpassung wurde ein das Rieske-Protein codierendes, etwa 1,6 kb großes SacI/SmaI-Fragment aus pRI2(436) in pAlter kloniert. Das Produkt pAN21 wurde einer gerichteten Mutagenese unterzogen. Wegen der Größe des Fragments wurde hier die Altered Sites-Mutagenesemethode verwendet. In einer Doppelmutagenese wurden gleichzeitig beide in der Kristallstruktur beobachteten Kontaktregionen angepasst. Über die Anpassung der codierenden Sequenz hinaus wurden in der Epitopregion 1 codonneutral eine BglII-Schnittstelle, in Region 2 eine NcoI-Schnittstelle eingefügt. Aus dem Mutageneseprodukt pAN23 wurde das SacI/SmaI-Fragment wieder in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor pRI2(436) ligiert. Um den resultierenden Expressionsvektor pAN23 zu überprüfen, wurde ein mit den Primern ISF-Pd-hin und ISF-Pd-rev gewonnenes PCR-Amplifikat sequenziert.

Für die zweite, weitergehende Epitopanpassung wurde der Bereich zwischen den unmittelbaren, in pAN23 bereits angepassten Kontaktregionen gegen die homologe Hefesequenz ersetzt. Das entsprechende DNA-Fragment wurde durch Hybridisierung zweier synthetischer Oligonucleotide gewonnen. Die Sequenz orientierte sich dabei am *Paracoccus*-Codongebrauch (Codon Usage Database). Der Vektor pAN22 wurde an den zuvor eingeführten NcoI/BglII-Schnittstellen geöffnet; die anschließende Behandlung mit Mung Bean-Exonuclease erzeugte glatte Enden, in die die phosphorylierte Oligonucleotid-Duplex zum Produkt pAN24 ligiert wurde. Dessen SacI/SmaI-Einschub wurde schließlich in das Vektorfragment von pRI2(436) kloniert. Der relevante Teil des resultierende Plasmids wurde *via* PCR (Primer ISF-Pd-hin und ISF-Pd-rev) sequenziert und wies mehrere *second site*-Mutationen auf. Daher wurde das SacI/SmaI-Fragment aus pAN24 in einen „frischen“, ampicillinsensitiven pAlter kloniert (Produkt: pAN30) und einer Doppelmutagenese (Primer mut-yeast-1, mut-yeast-2) unterzogen. Ein PCR-Fragment des Produktplasmids pAN31 wurde sequenziert und wies die gewünschte Sequenz auf. Eine erneute Umklonierung in pRI2(436) *via* SacI/SmaI lieferte den Expressionsvektor pAN32.

Als Ausgangsvektor für die dritte Epitopanpassung diente pAN31. Im Anschluss an die bereits ausgetauschten 22 AS im Helix-*loop*-Bereich sollten C-terminal davon noch sieben weitere AS der Originalsequenz gegen fünf AS der homologen Hefesequenz ausgetauscht werden (<sup>Pd</sup>Thr118-Glu124 gegen <sup>Sc</sup>Val147-Gln151), so dass sich die

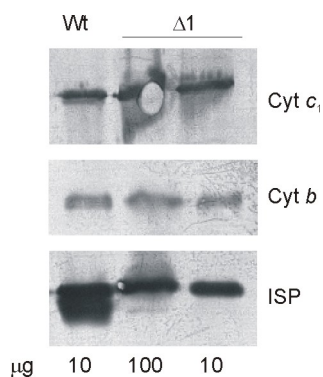
Epitopanpassung bis zu den Kontakten mit der leichten Kette des F<sub>v</sub>-Fragments erstreckt. Dieser Austausch wurde mit einer PCR-basierten Mutagenesemethode erreicht, dem sogenannten *splicing by overlap extension* (SOEing). Hierfür wurden zwei Primer entworfen, die in ihrer 5'-Region die einzufügende Hefesequenz tragen und im 3'-Bereich an die flankierende *template*-DNA binden. Mit diesen Primern wurden zwei separate PCRs durchgeführt; als jeweils zweiter Primer dienten die Universalprimer M13-21 bzw. M13 RP2. Die Produkte wurden vereinigt und eine dritte PCR mit beiden Universalprimern durchgeführt. Das Produkt dieser PCR wurde über *SacI/SmaI* in pUC18 kloniert. In zwei aufeinanderfolgenden Runden gerichteter Mutagenese wurde nun noch <sup>Pd</sup>Glu83 gegen das in der Hefestruktur den Beginn der  $\alpha$ 1-Helix markierende <sup>Sc</sup>Pro123 ausgetauscht und das für <sup>Sc</sup>Val132 codierende GTA gegen GTC ausgetauscht, da GTA ein von *Paracoccus* selten verwendetes Codon ist. Nach Sequenzierung wurde der relevante DNA-Abschnitt mit *SacI/SmaI* in den Expressionsvektor pRI2(436) kloniert, das Produkt ist das Plasmid pTK11.

Bei den chimären Konstrukten wurde der komplette katalytische Kopf des ISP gegen das Hefe-Homologe ausgetauscht. Dies erfolgte in zwei Varianten: Einmal wurde die Gelenkregion - wie andernorts [266] definiert [48] - in der *Paracoccus*-Sequenz belassen („*P.d.-hinge*“), das andere Mal wurde hierfür die homologe Hefesequenz übernommen („*Sc-hinge*“). Die entsprechenden Abschnitte des Hefe-ISP wurden per PCR aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert, an den angefügten *AatII*- und *StuI*-Überhängen geschnitten und in das entsprechend geschnittene Plasmid pBS*fbcAatII/StuI* [267] kloniert, das über passende Schnittstellen am Beginn und Ende des für die funktionelle Domäne codierenden Bereichs verfügt. Nach Sequenzierung des chimären Bereichs wurde das gesamte chimäre *fbc*-Operon mit *SacI/HindIII* in den Expressionsvektor pRI2 umklontiert.

### 3.2.4 Biochemische Charakterisierung der Epitop-Mutanten

Die Expressionsvektoren wurden per Konjugation in den *Paracoccus*-Stamm MK6 (*bc*<sub>1</sub>-Deletionsstamm) eingebracht und durch anschließende Plasmidpräparation und Kontrollrestriktion nachgewiesen. Nach Anzucht in Succinatmedium wurden Membranen präpariert. Im Western-Blot wurde die Anwesenheit der drei UE nachgewiesen (Abbildung 33). In den Epitopmutanten finden sich die Cytochrome *b* und *c*<sub>1</sub> in vergleichbaren Mengen wie in den Membranen des Wildtyp-(Wt)-Überexpressionsstamms; der Anteil des ISP (nachgewiesen mit dem polyklonalen

Antikörper „AD“ ist jedoch deutlich - zwischen ein und zwei Größenordnungen - verringert (Abbildung 33). Im Falle der chimären Konstrukte wurde der monoklonale Antikörper 7D3 [199] eingesetzt, der das C-terminale Ende der TM-Helix des *Paracoccus*-ISP bindet. Auch die chimären ISP-Proteine ließen sich mit diesem Antikörper nachweisen, jedoch fällt hier das Signal recht schwach aus (nicht gezeigt).



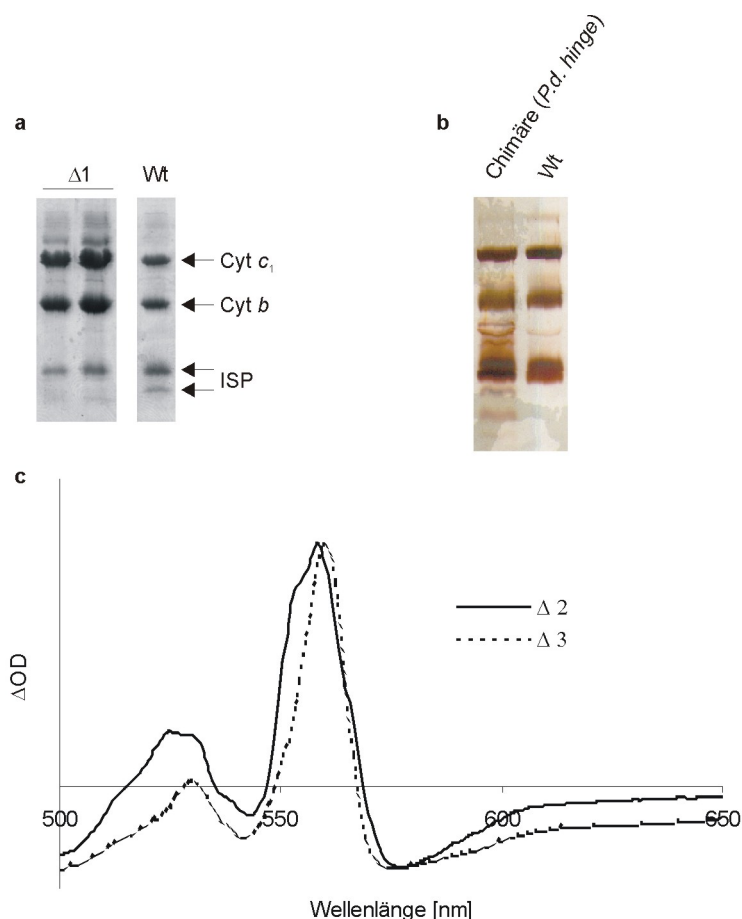
**Abbildung 33 Western Blot der Membranen der *bc*<sub>1</sub>-Epitopmutante 1.** Laemmli-Gel, 10 %. Die Antikörper gegen die drei *bc*<sub>1</sub>-UE wurden 1:1000 verdünnt eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Membranen des Wt-Überexprimierers MK6 pRI2(436).

Die solubilisierten Membranen zeigen im Falle der Epitopmutanten ein Spektrum, das dem Wildtyp-Überexpressionsstamm weitgehend gleicht. Diese Mutanten scheinen also mit guter Ausbeute exprimierbar. Die Chimären zeigen jedoch einen deutlich verringerten Gehalt an *b*- und *c*-Typ-Cytochromen, was auf eine verminderte Expression hinweist. Dafür verantwortlich könnte der Codongebrauch in der Hefe-DNA-Sequenz des chimären ISP sein. Die spezifischen und molaren (bezogen auf die Absorption zweier Häm *b*) Aktivitäten in der Membran liegen im Falle der ersten und zweiten Epitopmutante jeweils bei 10 bzw. 5 % des überexprimierten Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass diese Mutanten etwa wie der Wildtyp exprimiert werden, aber eine um eine Größenordnung niedrigere intrinsische Aktivität besitzen. Die dritte Epitopmutante erreicht spezifisch wie molar nur etwa 1 % der Referenzaktivität. Die Chimären zeigen auf molarer Basis 5-10 % des Wildtypniveaus, die spezifische Aktivität liegt jedoch nur bei 1-3 %, übereinstimmend mit der im Redoxspektrum beobachteten geringen Expression.

Die Aufreinigung aller Mutanten verlief unproblematisch nach dem für das Wt-Protein beschriebene Protokoll (Abschnitt 2.3.10). Der erzielte Reinheitsgrad ist mit dem Wt-Enzym vergleichbar; neben den drei UE zeigen sich selbst in der Silberfärbung nur geringe Verunreinigungen. Das Intensitätsverhältnis der Cytochrom-Banden erscheint normal. Alle Mutanten zeigen jedoch einen substöchiometrischen ISP-Gehalt; bei den



Epitopmutanten ist die Minderung ausgeprägter als im Falle der Chimären (Abbildung 34a,b). Für die dritte Epitopmutante und die Chimären wurden EPR-Spektren aufgenommen, die den verminderten Gehalt an Rieske-Fe-S-Zentren bestätigten und diesen mit 10 % Restgehalt im Falle der Chimären bzw. 1 % im Falle der Epitopmutante beziffern. Für die ersten beiden Epitopmutanten und die Hefe-*hinge*-Chimäre ergeben sich  $bc_1$ -charakteristische Redoxspektren; die anderen beiden Konstrukte zeigen einen deutlichen Verlust des Cytochrom  $c_1$  (Abbildung 34c).



**Abbildung 34 Chromatographische Aufreinigung der  $bc_1$ -Epitopmutanten und Chimären.** **a** Laemmli-Gel, 10 %, Coomassiefärbung von aufgereinigter Epitopmutante 1 und dem Wildtypprotein. **b** Laemmli-Gel, 10 %, Silberfärbung von aufgereinigter Chimäre (*P.d.-hinge*) und Wt. **c** Redoxdifferenzspektren (Natriumdithionit-reduziert minus Kaliumhexacyanoferrat-oxidiert) der aufgereinigten Epitopmutanten 1 und 3. Die Spektren sind auf die Amplitude des Cyt *b*-peaks normiert.

Dies bestätigen Spektren und Hämfarbungen des Säulendurchlaufs (nicht gezeigt). Zumindest teilweise kommt es bei der Aufreinigung also zum Zerfall des Enzyms; wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Population, die kein Rieske-Protein trägt. Dafür spricht auch, dass sich in den Säulendurchläufen kein signifikanter Anteil des ISP nachweisen lässt. Aktivitätsmessungen zeigten für alle Mutanten molare Aktivitäten, die

mit den in Membranen gemessenen Umsätzen vergleichbar sind. Dies zeigt, dass die Proteine eine intrinsisch geringe Aktivität besitzen, die aber stabil isolierbar ist. Die Aktivitäten sind durch Stigmatellin inhibierbar und damit spezifischer Natur. Eine Übersicht über die gemessenen Parameter gibt Tabelle 6.

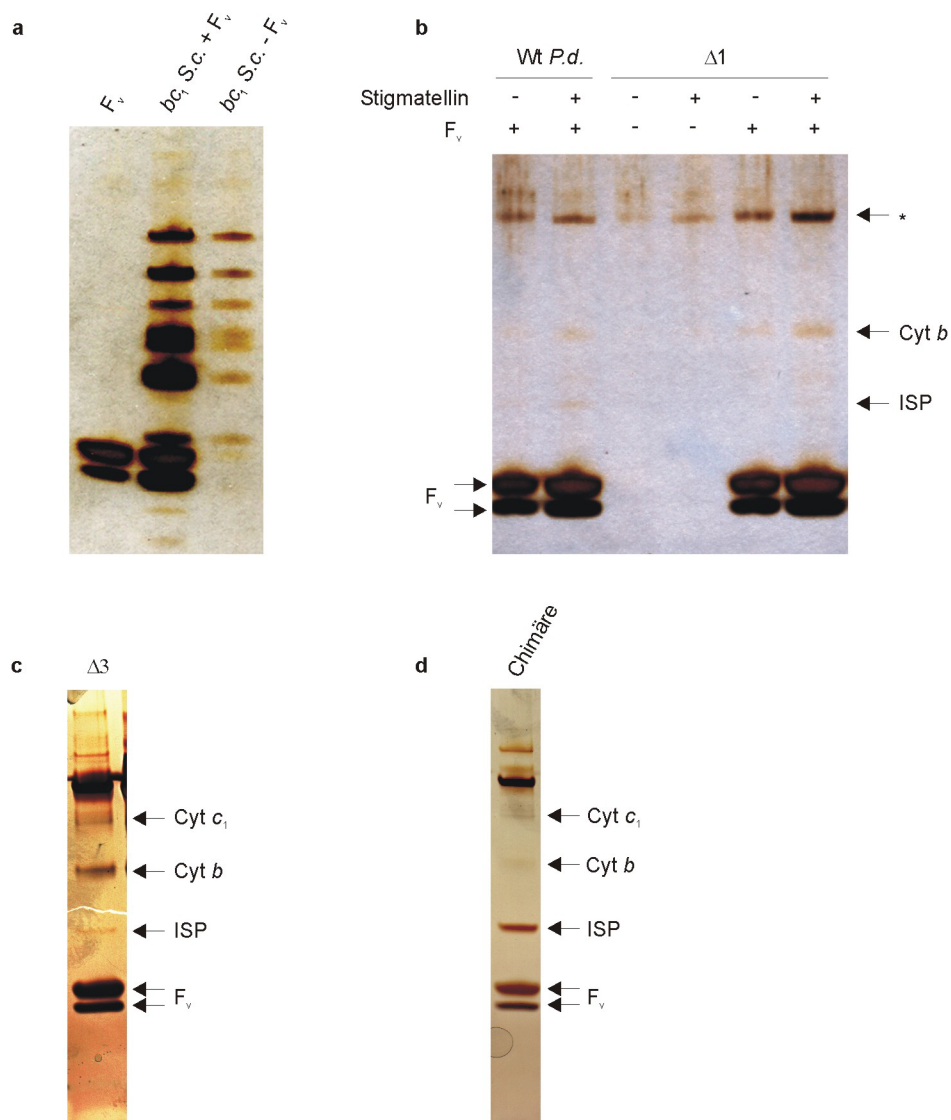
<i>bc</i> <sub>1</sub> -Variante	Membran			aufgereinigtes Protein	
	Häm <i>b</i> : Protein [μmol/g]	spezifische Aktivität [nmol/(mg·min)]	molare Aktivität [s <sup>-1</sup> ] pro Monomer	Ausbeute [mg] aus 50 l Kultur	molare Aktivität [s <sup>-1</sup> ] pro Monomer
überexprimierter Wildtyp	0,7	2300	160	84	150
Epitopanpassung 1	0,7	278	14	23	26
Epitopanpassung 2	1,0	491	16	37	13
Epitopanpassung 3	0,7	20	1,1	40	0,6
Chimäre <i>S.c.-hinge</i>	0,2	39	8	13	5,6

**Tabelle 6 Übersicht über Präparation und Enzymaktivitäten der *bc*<sub>1</sub>-Epitopmutanten und einer Chimäre.** Zum Vergleich sind die Werte für eine Präparation des überexprimierten Wildtyps angegeben.

### 3.2.5 Analyse der Antikörperbindung

Für die Analyse der Bindung der *bc*<sub>1</sub>-Varianten an das F<sub>v</sub>-Fragment wurde ein *magnetic bead pull-down assay* verwendet. Der *bc*<sub>1</sub>-Komplex wurde dafür mit dem aufgereinigten F<sub>v</sub>-Fragment inkubiert, anschließend wurden mit Streptavidin beschichtete *magnetic beads* zugegeben. Die potentiellen Ko-Komplexe wurden mit den *beads* aus der Lösung gezogen, gewaschen, mit Biotin eluiert und für die SDS-PAGE eingesetzt. In Abbildung 35a ist der Kontrollversuch mit dem Hefeenzym wiedergegeben. Für die erste Epitopanpassung zeigt sich, dass das Enzym in geringen Mengen zusammen mit dem F<sub>v</sub>-Fragment aus der Lösung gezogen werden kann (Abbildung 35b). Dies gilt jedoch in ähnlichem Maße bereits für das Wt-Enzym; beide zeigen eine erheblich geringere Affinität zum F<sub>v</sub>-Fragment als das als Positivkontrolle eingesetzte Hefeenzym. Der Effekt ist jedoch spezifisch, wie die Kontrollen in Abwesenheit des Antikörpers zeigen. Die Zugabe von Stigmatellin verbessert geringfügig die Effizienz des *pull-down*; Stigmatellin arretiert das ISP in einer Position und stabilisiert auf diese Weise möglicherweise die Antikörper-Antigen-Bindung. Auffällig ist ferner die relativ prominente hochmolekulare Bande. Zuerst wurde angenommen, dass dies Cyt *c*<sub>1</sub> sei. Es handelt sich jedoch vielmehr um eine Verunreinigung, die von den *magnetic beads* herrührt, vermutlich BSA. Zusammengefasst hat also die minimale Anpassung der

Epitopregion keinen merklichen Effekt auf die Bindungsaffinität. Das gleiche gilt für die zweite Epitopanpassung (nicht gezeigt). Die dritte Epitopanpassung zeigt jedoch eine signifikant verbesserte Bindung: Selbst unter stringenten Waschbedingungen, bei denen das Wt-Enzym nicht mehr im *pull-down* nachweisbar ist, zeigt diese Mutante einen deutlichen Ko-Komplex mit dem  $F_v$  (Abbildung 35c). Alle drei UE sind augenscheinlich stöchiometrisch vertreten. Jedoch ist die Effizienz des *pull-down* im Vergleich zum Hefeenzym immer noch gering. Es zeigt sich somit, dass die „Transplantation“ des Epitops im Falle der weitestgehenden Anpassung der Kontaktregion zumindest prinzipiell möglich ist, aber immer noch kein optimales Bindungsverhalten liefert.



**Abbildung 35** *Magnetic bead pull-down* der  $bc_1$ -Epitopmutanten und Chimären. SDS-PAGE (Bis-Tris-Gel [Novagen], 4-12 %), silbergefärbt. **a** *Pull-down* des Hefe-Wildtyps **b** Wildtyp und erste Epitopmutante **c** dritte Epitopanpassung **d** Chimäre „*P.d.-hinge*“.

Die Chimären zeigten beide eine um Größenordnungen bessere Bindung des ISP an das F<sub>v</sub>-Fragment als die Epitopmutanten (Abbildung 35d). Dies war auch zu erwarten, da die Kopfgruppe des ISP mit der Hefestruktur identisch sein sollte. Jedoch konnte hier kein stöchiometrischer Komplex eluiert werden: die Cytochrom-UE sind bestenfalls in Spuren nachweisbar. Möglicherweise sind die chimären Enzyme also vermindert stabil, oder zumindest nicht kompatibel mit den relativ harschen Bedingungen des *pull-down assay*.

### 3.3 Assoziationszustand des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes

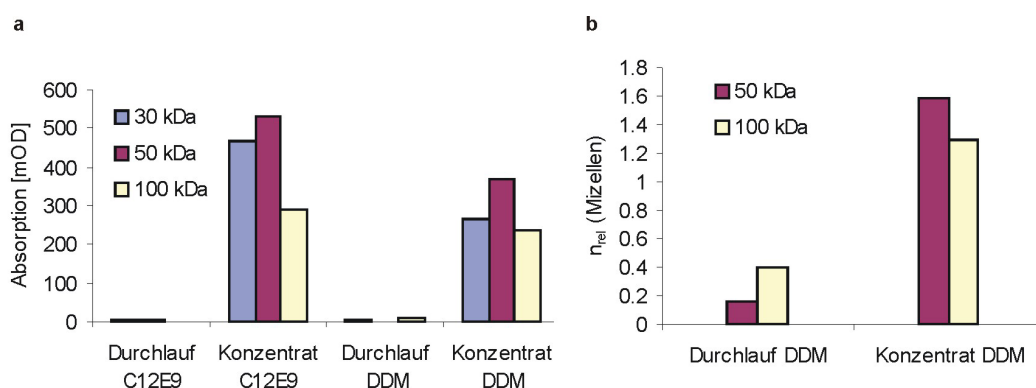
Dieses Teilprojekt befasst sich mit der Analyse des Assoziationszustandes des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes aus *P. denitrificans*. Ein großer Teil dieser Untersuchungen erfolgte mit der Methode der analytischen Ultrazentrifugation. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Gottfried Mayer (AK Schubert, Institut für Biophysik), der die Auswertung der Sedimentationsdaten leistete.

#### 3.3.1 Gewinnung eines homogenen und stabilen Präparats

Um über die analytische Ultrazentrifugation eine Aussage zum Assoziationszustand des aufgereinigten Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes treffen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass das Präparat die Anforderungen der Methode erfüllt. Das Präparat musste über den Zeitraum von wenigstens 24 h - der Zeit für einen Gleichgewichtszentrifugationslauf - stabil sein. Das Ausgangsmaterial für die Ultrazentrifugation sollte zu Gunsten von Aussagekraft und Interpretierbarkeit der gewonnenen Daten möglichst homogen sein. Drittens war es wünschenswert, ein Detergenz möglichst geringer Dichte wie etwa C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> (Thesit) zu verwenden: Die Pufferdichte sollte an die Dichte der freien Detergenzmizellen angepasst werden, um das Detergenz im Zentrifugalfeld „unsichtbar“ zu machen (Abschnitt 3.3.3). Bei hohen Detergenzdichten müssen entsprechend dichte Puffer verwendet werden, was wiederum zu Nichtidealitäten wie der Veränderung des partialspezifischen Volumens der Detergenz-Protein-Komplexe führt. Die Methode der Gelfiltration diente in diesem Zusammenhang mehreren Zwecken: (1) Wechsel des Detergenz; (2) Überprüfung der Stabilität anhand des Elutionsprofils; (3) Gewinnung eines möglichst homogenen Ausgangsmaterials für die UZ-Experimente; (4) in analytischer Anwendung sollte durch Vergleich mit verschiedenen Referenzproteinen eine Abschätzung des Molekulargewichts und damit des Assoziationszustandes des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes möglich sein.

### Bestimmung der Mizellengröße

Um definierte Ausgangsbedingungen für die UZ-Experimente sicherzustellen, wurde zunächst untersucht, inwieweit die Detergenzmizellen Ultrafiltrationsmembranen passieren können oder durch diese ankonzentriert werden. Die Detergenzien C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> und DDM wurden dazu mit Diphenylhexatrien (DPH) vermischt (0,5 mg DPH pro g Detergenz). DPH ist stark hydrophob und kann in wässriger Lösung nicht die Detergenzmizellen verlassen; sein Absorptionsmaximum bei 357 nm dient der Detektion und Quantifizierung der Mizellen. Die derart markierten Detergenzien wurden zu 0,1 % (C<sub>12</sub>E<sub>9</sub>) bzw. 0,2 % (DDM) in Puffer gelöst und mit 30 kDa, 50 kDa (beide Centriprep) und 100 kDa-Konzentratoren (Centrisart) untersucht (10 min, 2800 rpm für Centriprep, 3700 rpm für Centrisart, 4 °C). Der Vergleich der Absorptionen von Durchlauf und Konzentrat zeigte, dass die Mizellen quantitativ ankonzentriert werden (Abbildung 36).



**Abbildung 36 Ankonzentrierung der Detergenzien DDM und C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> durch Ultrafiltration. a** Nachweis DPH-markierter Mizellen. Die Quantifizierung erfolgte über die DPH-Absorption bei 357 nm. Aufgetragen ist die auf die Ausgangslösung A bezogene relative Mizellenzahl  $n_{rel}$ ; K: Konzentrat, F: Filtrat. **b** Quantifizierung der Mizellen mittels dynamischer Lichtstreuung. Diese Messmethode erfasst auch Mizellen, die sich im Filtrat aus freien Detergenzmolekülen neu bilden.

Obwohl der Durchlauf praktisch keine Absorption zeigte, bildete sich beim Schütteln Schaum, so dass man annehmen kann, dass zwar keine Mizellen, jedoch freie Detergenzmoleküle die Membranen passieren. Für DDM wurde dieses Ergebnis durch Messung der dynamischen Lichtstreuung (durchgeführt von Dr. Horst Ruf, MPI für Biophysik, Frankfurt) bestätigt. Hierbei konnten unmarkierte Mizellen eingesetzt werden, so dass hier auch ein artifizieller Effekt des DPH ausgeschlossen wurde. Hier bestätigte sich, dass das Detergenz ankonzentriert wird, jedoch ein gewisser Teil - vermutlich einzelne Detergenzmoleküle - die Filtratoren passieren kann und im Durchlauf Mizellen zu bilden vermag. Als „Nebenprodukt“ der Lichtstreuung

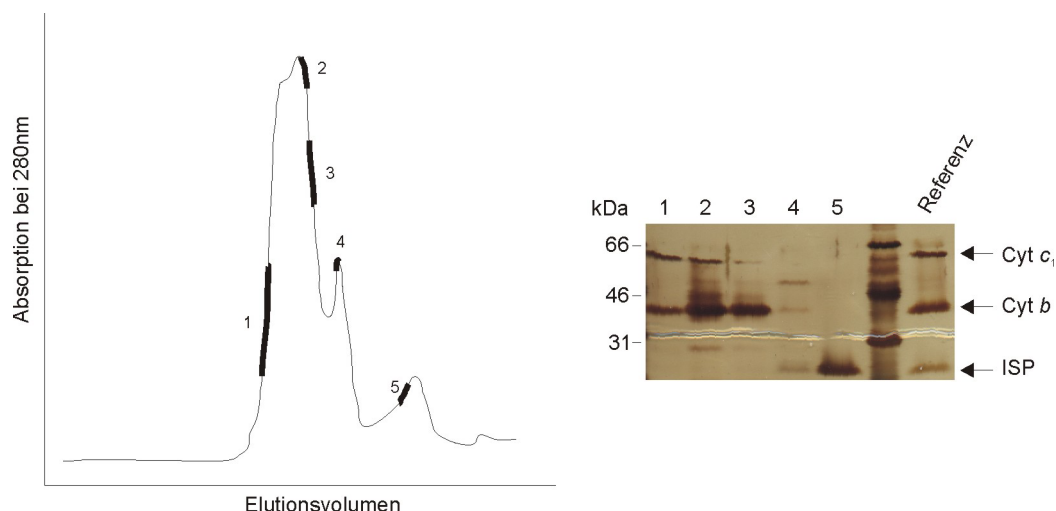
konnte ein mittlerer Durchmesser für DDM-Mizellen von 7,5 nm bestimmt werden. Zusammenfassend ergab sich aus den Messungen, dass der  $bc_1$ -Komplex nach abschließender Gelfiltration für die Ultrazentrifugationsversuche nicht mehr ankonzentriert werden darf, um eine definierte Detergenzkonzentration zu gewährleisten.

#### Wechsel auf das Detergenz $C_{12}E_9$

Als Ausgangsmaterial für die folgenden Experimente diente der mit Dodecylmaltosid solubilisierter und über eine DEAE-Sepharosesäule aufgereinigter  $bc_1$ -Komplex (Abschnitt 2.3.10). Dieser zeigte ein symmetrisches Elutionsprofil, eine nach SDS-PAGE vollständige UE-Zusammensetzung sowie einen bereits relativ hohen Reinheitsgrad. Auch Vis-Redoxspektroskopie und Messung der Enzymaktivität wiesen die Qualität des Ausgangsmaterials aus (Daten nicht gezeigt). Das Präparat wurde bei  $-80\text{ °C}$  gelagert und in Aliquots für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

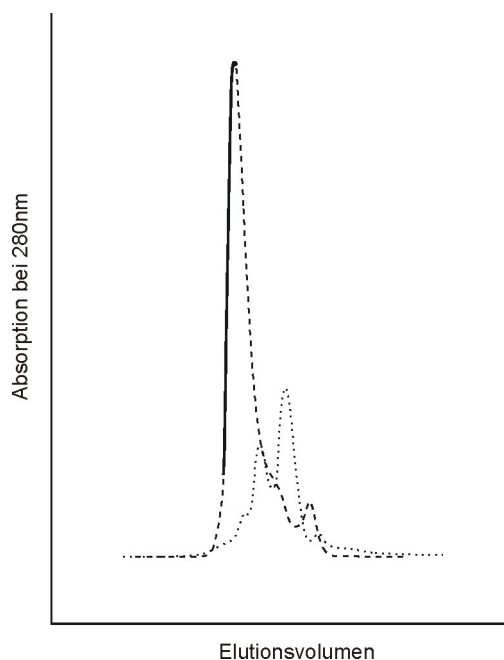
Zunächst wurde der Wechsel auf das Detergenz  $C_{12}E_9$  (0,1 %) mit einem erneuten DEAE-Chromatographieschritt versucht. Dieser war im Elutionsprofil durch einen verbreiterten Hauptpeak und einem deutlichen Folgepeak charakterisiert. Die SDS-PAGE zeigte, dass im Hauptpeak die Cytochrome  $b$  und  $c_1$  koeluierten, während der Folgepeak das Rieske-Protein enthält (nicht gezeigt). Offenkundig führte diese Chromatographie zum Zerfall des Enzymkomplexes.

In der Folge wurde der Detergenzwechsel auf einer mit 0,1 %  $C_{12}E_9$ -haltigem Puffer äquilibrierten Gelfiltrationssäule (Superdex 200 HR 10/30) versucht, was möglicherweise schonender ist, da sich der Wechsel gradueller gestaltet und das Protein nicht mit großen Puffervolumina wie bei der DEAE-Chromatographie gewaschen wird. Es kam jedoch dem Elutionsprofil und der SDS-PAGE-Analyse nach zu urteilen zu einem ähnlichen Zerfallsprozess wie auf der DEAE-Säule (Abbildung 37). Wiederum wurde das Enzym in die Cytochrome  $b$  und  $c_1$  einerseits, das Rieske-Protein andererseits aufgetrennt.



**Abbildung 37 Zerfall des  $bc_1$ -Komplexes in 0,1 %  $C_{12}E_9$ .** Die Gelfiltration wurde mit einer Flussrate von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  in 20 mM MES/NaOH pH 6, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5,5 % Saccharose, 0,1 %  $C_{12}E_9$  durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ ; Schreibervorschub 0,5 cm/ml. Das silbergefärbte SDS-PAGE zeigt die den entsprechenden Nummern im Elutionsprofil zugeordneten Fraktionen.

Nachdem festgestellt wurde, dass der  $bc_1$ -Komplex bereits im Ausschlussvolumen (Bestimmung mit Blaudextran) der Superdex 200-Säule läuft, wurde in der Folge eine Superose 6-Säule eingesetzt, die nach Herstellerangaben Proteine bis 5 MDa fraktioniert. Es wurden jetzt geringere Konzentrationen von  $C_{12}E_9$  eingesetzt, die sich nur noch knapp oberhalb der CMC ( $\sim 0,005\%$ ) bewegten. Mit 0,01 %  $C_{12}E_9$  im Puffer war das Enzym nach einer Gelfiltration scheinbar stabil. Um die für die UZ-Experimente benötigte mittelfristige Stabilität zu testen, wurde nach dieser ersten Gelfiltration eine Probe für 24 h bei 4 °C aufbewahrt und danach - ohne ankonzentrieren - erneut gelfiltrierte (Abbildung 38). Hier zeigte sich, dass auch diese Probe instabil ist und das Enzym zerfällt, was Aktivitätsmessungen bestätigten. Den Zerfall unter Einwirkung von  $C_{12}E_9$  zeigten auch analytische UZ-Experimente (nicht gezeigt). Die Gleichgewichtsprofile ließen sich nur unter Annahme einer erheblichen Heterogenität modellieren, wobei der überwiegende Teil der sedimentierenden Partikel ein Molekulargewicht von  $< 100$  kDa hatte. Wurden nur 0,005 %  $C_{12}E_9$  verwendet, eluierte das Material bei der ersten Gelfiltration bereits im Ausschlussvolumen der Superose 6-Säule: Anscheinend kam es zur vollständigen Aggregation des Enzyms. Dieser Befund wurde auch in Sedimentationsgeschwindigkeits- sowie Sedimentationsgleichgewichtsläufen in der UZ bestätigt. Ferner wurden Mischungen der Detergenzien  $C_{12}E_9$  und LDAO eingesetzt, doch führten auch diese zum Zerfall des Proteinkomplexes (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 38 Zerfall des  $bc_1$ -Komplexes nach wiederholter Gelfiltration in 0,01 %  $C_{12}E_9$ .** Die gestrichelte Linie zeigt das Profil der ersten Gelfiltration. Die vordere Flanke des Hauptpeaks wurde gesammelt (durchgezogene Linie) und nach 24 h bei 4 °C erneut filtriert (punktirierte Linie). Experimentelle Bedingungen: Ausgangsmaterial 20  $\mu$ l  $bc_1$ -Komplex (12 mg/ml); Säulenpuffer 50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM NaCl, 0,01 %  $C_{12}E_9$ ; Flussrate 50  $\mu$ l/min; Schreibervorschub 0,5 cm/ml.

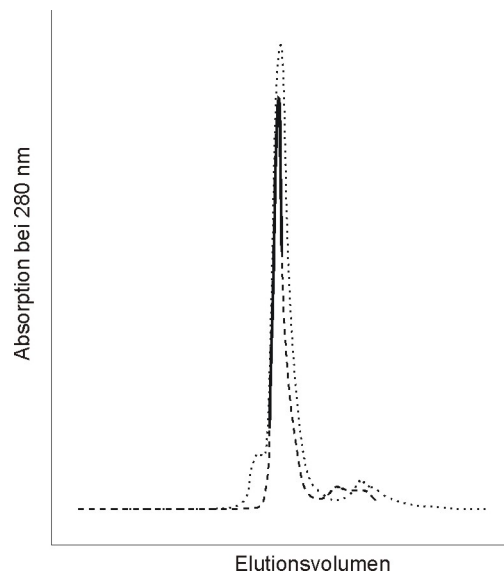
#### Gelfiltration mit Dodecylmaltosid

Nachdem sich der Wechsel auf ein anderes nichtionisches Detergenz als nicht praktikabel erwies, wurde der  $bc_1$ -Komplex hinsichtlich Homogenität und Stabilität in Dodecylmaltosid untersucht. Die Gelfiltration mit 0,1 % DDM lieferte einen nach rechts etwas auslaufenden, jedoch noch akzeptablen *peak* und in geringem Maße Zerfallsprodukte. Nach 24 h bei 4 °C und erneuter Gelfiltration zeigte die Probe jedoch deutliche Zerfallserscheinungen, wenn auch nicht so ausgeprägt wie im Falle von  $C_{12}E_9$ . Mit einer Konzentration von 0,02 % bei mittlerer Ionenstärke und leicht alkalischem pH (20 mM  $KP_i$  pH 8, 150 mM NaCl) kam es gleichfalls zum Zerfall nach zweifacher Gelfiltration (nicht gezeigt).

Als praktikable Pufferbedingung erwies sich jedoch 50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM. Hier wies das Präparat nach wiederholter Gelfiltration annähernd das gleiche Elutionsprofil auf, mit geringfügiger Verbreiterung des *peak* und kleinen Anteilen von aggregiertem sowie zerfallenem Protein (Abbildung 39). SDS-PAGE zeigte die Reinheit und vollständige Untereinheitszusammensetzung der Enzympräparation (nicht gezeigt). Das Enzym war voll aktiv und erlitt auch nach 48 h bei 4 °C nur geringe Aktivitätsverluste. Das Protein wurde folglich unter diesen



Pufferbedingungen für die Analyse des Assoziationszustandes eingesetzt. Hierfür wurde stets nur der zentrale Teil des Elutionspeaks gesammelt, um einerseits eine möglichst hohe Konzentration zu erzielen, andererseits sicherzustellen, dass das Präparat möglichst homogen ist.



**Abbildung 39 Stabilität der Probe nach wiederholter Gelfiltration in 0,02 % DDM.** Die gestrichelte Linie zeigt das Profil der ersten Gelfiltration. Die vordere Flanke des Hauptpeaks wurde gesammelt (durchgezogene Linie) und nach 24 h bei 4 °C erneut filtriert (punktierte Linie). Experimentelle Bedingungen: Ausgangsmaterial 20  $\mu$ l  $bc_1$ -Komplex (12 mg/ml); Säulenpuffer 50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM; Flussrate 50  $\mu$ l/min; Schreibervorschub 0,5 cm/ml.

### 3.3.2 Analytische Gelfiltration und Blau-Nativ-Gelelektrophorese

Um eine Abschätzung des Molekulargewichts und damit eine Aussage über den Assoziationszustand des  $bc_1$ -Komplexes treffen zu können, wurden mit der analytischen Gelfiltration und der Blau-Nativ-Gelelektrophorese (BN-PAGE) zwei hydrodynamische Verfahren eingesetzt.

#### Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde an einer FPLC-Anlage (Pharmacia LKB) mit einer Superose 6 HR 10/30-Säule durchgeführt. Das Ausschlussvolumen  $v_0$  wurde mit Blau-Dextran bestimmt und betrug 7,7 ml. Das Gesamt-Flüssigkeitsvolumen wurde nach Injektion einer NaCl-Lösung über die Veränderung der Leitfähigkeit des Eluats bestimmt und betrug 21,4 ml. Als Massenstandards erschienen die gängigen löslichen Proteine nicht sinnvoll, da sie keinen Detergenz-„Gürtel“ haben und damit zu apparent niedrigeren Molekulargewichten laufen würden als Membranproteine gleichen tatsächlichen Molekulargewichts. Zur Eichung wurden demnach verschiedene

Membranproteine eingesetzt, die freundlicherweise für diese Versuche zur Verfügung gestellt wurden (2.1.2; Tabelle 7).

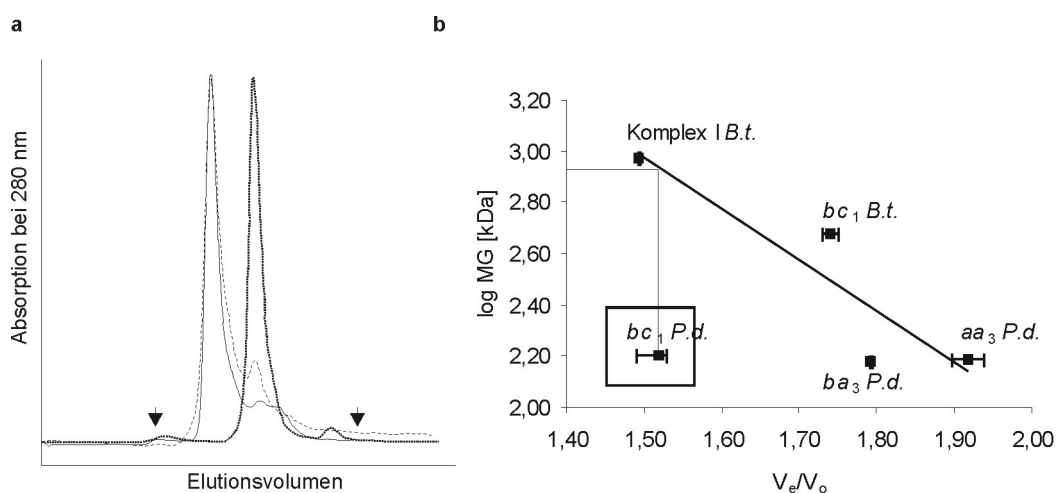
Protein	MG [kDa]	Kommentar
<i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase <i>P. denitrificans</i>	153	Monomer [251]; im Komplex mit monoklonalem F <sub>v</sub> -Fragment [268]
<i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase <i>P. denitrificans</i>	150	Monomer; heterolog als <i>bo</i> <sub>3</sub> in <i>E. coli</i> exprimiert
<i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex <i>B. taurus</i>	480	Dimer [47]; zur Stabilisierung mit 1 mM Antimycin
Komplex I <i>B. taurus</i>	944	Monomer

**Tabelle 7 Referenzproteine für die analytische Gelfiltration.** Die Molekulargewichtsangabe bezieht sich auf den - bekannten oder vermuteten - Assoziationszustand.

Jedes dieser Referenzproteine wurde mindestens zweimal gelfiltrierte. Alle Proben erschienen hinsichtlich des Elutionsverhaltens homogen und stabil; die jeweiligen Elutionsvolumina waren in hohem Maße reproduzierbar (Abbildung 40a). Die Gelfiltrationen wurden alle in 0,1 % DDM-haltigem Puffer durchgeführt. Der *bc*<sub>1</sub>-Komplex aus *P. denitrificans* ist bei dieser Detergenzkonzentration zwar nicht dauerhaft stabil (3.3.1); das charakteristische Elutionsvolumen ist bei einmaliger Gelfiltration davon jedoch nicht betroffen und gleicht dem Elutionsvolumen in Gegenwart von 0,02 % DDM. Die höhere Detergenzkonzentration sollte sicherstellen, dass auch die Referenzproteine solubilisiert bleiben und nicht durch etwaigen Detergenzverlust aggregieren - die für den *bc*<sub>1</sub>-Komplex aus *P. denitrificans* günstigen 0,02 % DDM liegen nur knapp oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration und gewährleiten dies womöglich nicht.

Die Analyse der Elutionsvolumina der Referenzproteine zeigt eine ungefähre Korrelation mit dem Molekulargewicht (Abbildung 40b). Eine genaue exponentielle Beziehung wie im Fall von löslichen Proteinstandards besteht aber nicht. Auffällig ist die Diskrepanz im Laufverhalten von *ba*<sub>3</sub>-Oxidase und *aa*<sub>3</sub>-Oxidase bei annähernd gleichem Molekulargewicht. Hierfür könnten Formunterschiede und insbesondere die Menge an gebundenem Detergenz, die das hydrodynamische Volumen maßgeblich mitbestimmt, verantwortlich sein. Das Untersuchungsobjekt, der *bc*<sub>1</sub>-Komplex aus *P. denitrificans*, zeigt annähernd dasselbe Elutionsvolumen wie der bovine Komplex I. Legt man die Eichgerade zugrunde, ergibt sich für den *bc*<sub>1</sub>-Komplex eine apparente Masse von 800-1000 kDa. Dies entspräche bei einer Monomerenmasse von 117 kDa etwa einem Oktamer. Dies erscheint als biologischer Assoziationszustand des *bc*<sub>1</sub>-

Komplexes wenig plausibel. Dass es sich hierbei um das Resultat einer unspezifischen Aggregation handelt, erscheint aber auch unwahrscheinlich, angesichts der relativ hohen Detergenzkonzentration und des symmetrischen Elutionspeaks. Es scheint vielmehr, dass die analytische Gelfiltration in Anwendung auf Membranproteine nur begrenzte Aussagekraft besitzt und das Elutionsvolumen in hohem Maße von Formparametern oder der Detergenzbindung abhängt.

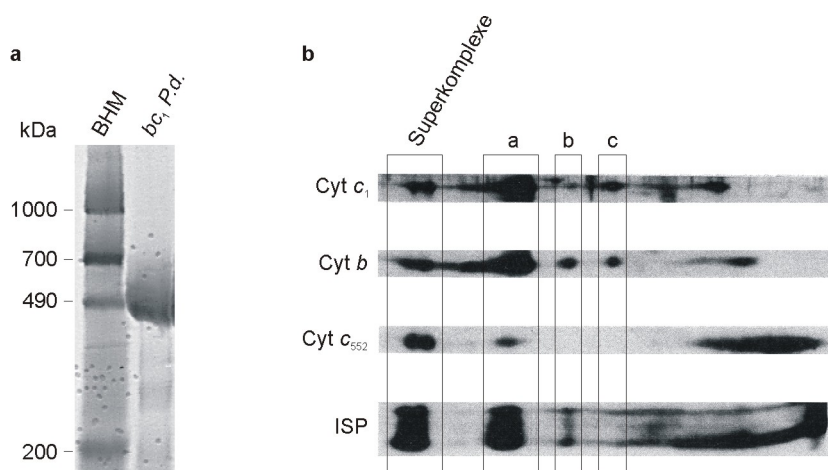


**Abbildung 40 Analytische Gelfiltration von Membranproteinen.** **a** Exemplarische Auswahl an Elutionsprofilen: *aa*<sub>3</sub> *P.d.* (punktierte Linie), *bc*<sub>1</sub> *P.d.* (durchgezogen) und Komplex I *B.t.* (gestrichelt). Experimentelle Bedingungen: Proteinkonzentrationen 5-10 mg/ml, Probenvolumen je 50 µl, Puffer 50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM NaCl, 0,1 % DDM, Flussrate 0,1 ml/min, Schreibervorschub 0,5 cm/ml. Die Peakhöhen sind nicht vergleichbar, da die Schreiberempfindlichkeit unterschiedlich eingestellt war. **b** Auftragung Logarithmus des (bekannten) Molekulargewichts der Eichproteine gegen das relative Elutionsvolumen  $V_e/V_0$ . Die Messpunkte geben das durchschnittliche Elutionsvolumen an, die Fehlerbalken den jeweils maximalen und minimalen Messwert. Die Gerade zeigt die lineare Regression der Messpunkte. Das Elutionsvolumen des *Paracoccus-bc*<sub>1</sub>-Komplexes ist in beliebiger Ordinatenhöhe eingezeichnet, die gepunktete Linie zeigt die Extrapolation auf die Eichgerade.

### Blau-Nativ-Gelelektrophorese

Als Vergleichsmethode wurde die BN-PAGE angewendet (2.3.4; in Zusammenarbeit mit H. Schägger, Universitätsklinikum Frankfurt). Es wurde aufgereinigter *bc*<sub>1</sub>-Komplex mit 0,02 % DDM eingesetzt, sowie solubilisierter *Paracoccus*-Membranproben des Stammes MK6 pRI2(436) (*bc*<sub>1</sub>-Überexpression; solubilisiert mit 2 g DDM/ g Membranprotein). Als Standard dienten die Atmungskettenkomplexe aus Rinderherzmitochondrien (Abbildung 41a). Die Laufweite des *Paracoccus-bc*<sub>1</sub>-Komplexes in aufgereinigter Form wie im Membransolubilisat gleicht in etwa der des rinderherzmitochondrialen *bc*<sub>1</sub>-Komplexes (Molekulargewicht des Dimers 480 kDa). Das apparente Molekulargewicht deutet demnach auf einen tetrameren Assoziationszustand hin. Im Membransolubilisat ist dieses putative *bc*<sub>1</sub>-Tetramer darüberhinaus mit

substöchiometrischen Mengen von Cytochrom  $c_{552}$  assoziiert (Bande a, Abbildung 41b). Zu größerem Molekulargewicht hin zeigt sich auch ein supramolekulares Assoziat mit der Cytochrom-Oxidase und Komplex I; dieser Superkomplex wurde in einem separaten Projekt eingehend untersucht (Abschnitt 3.4). In geringerer Menge zeigt sich bei der immunologischen Analyse in zweiter, denaturierender Geldimension auch  $bc_1$ -Komplex bei niedrigerer apparenter Masse (Banden b und c in Abbildung 41b). Bande c enthält augenscheinlich substöchiometrische Anteile des Rieske-Proteins. Der apparenten Masse nach ließe sich Bande c einem dimeren Komplex zuordnen. Bande b zeigt dafür eine zu hohe apparente Masse; andererseits ist die Differenz zwischen Banden a und b zu groß, um dafür alleine das Cytochrom  $c_{552}$  verantwortlich zu machen. Von daher könnte es sich bei Bande b also um das Dimer handeln, Bande c wäre ein Monomer. Hierfür spricht der Verlust des ISP in Bande c; wie von den Strukturen der homologen mitochondrialen Komplexe her zu erwarten, müsste ein Cytochrom  $bc_1$ -Monomer nur instabil mit dem Rieske-Protein assoziiert sein. In jedem Fall finden sich also mehrere Assoziationsformen; das Tetramer könnte die dominierende Form sein. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Ultrazentrifugationsanalyse (siehe unten). Wie schon bei der analytischen Gelfiltration kann bei der BN-PAGE die Gültigkeit der Eichung in Frage gestellt werden. Möglicherweise verfälschen Formparameter und Detergenzbindung auch hier das Laufverhalten hin zu scheinbar höheren Molekulargewichten.



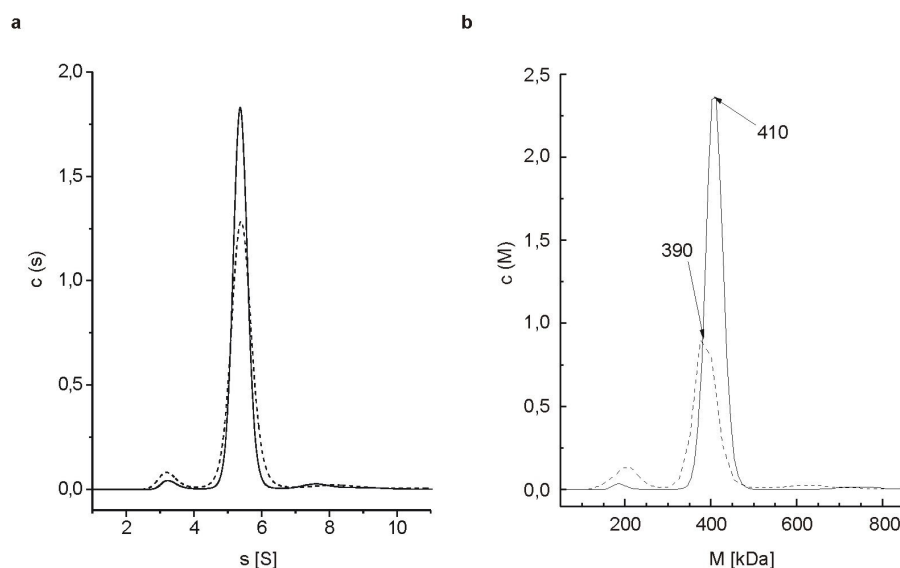
**Abbildung 41 BN-PAGE von aufgereinigtem  $bc_1$ -Komplex und solubilierten Membranen.** **a** BN-PAGE wurde wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben durchgeführt. Als Standard dienen solubilierte Rinderherzmitochondrien (BHM). **b** Membransolubilisat von MK6 pRI2(436); BN-PAGE mit anschließender SDS-PAGE und separater Immundetektion nach Zerschneiden des Blots.

### 3.3.3 Analytische Ultrazentrifugationsexperimente

Die Ultrazentrifugationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Gottfried Mayer, Institut für Biophysik, durchgeführt und ausgewertet.

#### Stabilität des Komplexes

Um sicherzustellen, dass das Präparat für die Dauer der Ultrazentrifugationsversuche stabil und ausreichend homogen ist, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Präparation wie unter 2.4.4 beschrieben Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe durchgeführt. Die Analyse dieser Läufe zeigt eine dominierende Hauptkomponente, daneben in deutlich geringerem Maße eine kleinere und eine größere Komponente (Abbildung 42). Die Hauptkomponente hat einen Anteil  $> 95\%$  an der Gesamtabsorption der sedimentierenden Partikel. Worum es sich bei den Nebenkomponten handelt, konnte nicht sicher geklärt werden. Die Probe liefert zwei Tage nach Präparation eine nahezu identische  $s$ -Wert-Verteilung wie unmittelbar nach Präparation. Es kommt zu einer leichten Verbreiterung des Hauptpeaks und einer geringen Zunahme der kleineren Komponente, wobei es sich demnach um ein Abbauprodukt handeln könnte. Bei  $s$ -Läufen nach deutlich längerer Lagerung nimmt diese Komponente weiter zu und das Maximum der Hauptkomponente verschiebt sich geringfügig zu niedrigeren Werten (Abbildung 42b).

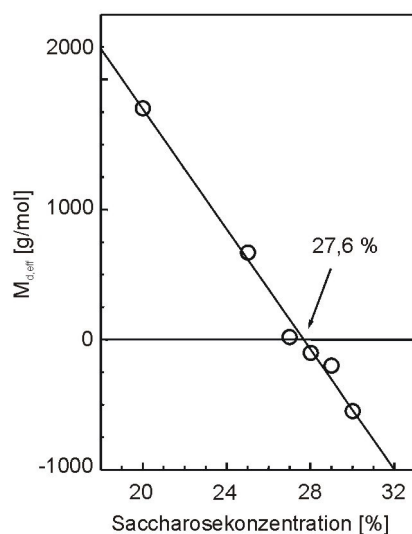


**Abbildung 42**  $s$ -Wert-Verteilungen des  $bc_1$ -Präparats in Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen. **a** Stabilitäts-Untersuchung in dem für GG-Zentrifugationsläufe benötigten Zeitrahmen. Die Probenkonzentration betrug  $0,34\text{ mg/ml}$ , die Messwellenlänge war  $412\text{ nm}$ . Die Geschwindigkeitsläufe fanden  $4\text{ h}$  und  $47\text{ h}$  nach der Proteinpräparation statt. **b** Vergleich einer Probe  $4\text{ h}$  (durchgezogene Linie) bzw.  $190\text{ h}$  nach Aufreinigung (gepunktete Linie).

Die *s*-Wert-Läufe zeigen, dass die Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Präparationen bei zügiger Verwendung für eine Gleichgewichtszentrifugationsanalyse geeignet sind.

### Dichtekompensation

Um experimentell den Beitrag des Detergenz Dodecylmaltosid (DDM) zur effektiven Molmasse des Protein-Detergenz-Komplexes zu eliminieren, wurden Pufferbedingungen bestimmt, die eine Dichtekompensation bewirken: Die Dichte des Puffers wird der - im Falle von DDM relativ hohen - Dichte der Detergenzmizellen angeglichen, so dass das Detergenz im Zentrifugalfeld „unsichtbar“ wird und „schwebt“. Zur Dichtekompensation wurde Saccharose in Puffern auf D<sub>2</sub>O-Basis eingesetzt. In einer Reihe von Gleichgewichtsläufen mit DPH-markierten DDM-Mizellen wurde die Saccharosekonzentration im Puffer variiert (Abschnitt 2.4.4). Die effektive - um den Auftriebsterm korrigierte - Molmasse  $M_{d,eff}$  wurde gegen die Saccharosekonzentration aufgetragen (Abbildung 43). Am Nulldurchgang lässt sich die benötigte Saccharosekonzentration von 27,6 % ablesen, was einer Pufferdichte von 1,207 g/ml entspricht.



**Abbildung 43 Bestimmung der zur Dichtekompensation von Dodecylmaltosid benötigten Saccharosekonzentration.** Aufgetragen ist die Abhängigkeit der in Gleichgewichtsläufen bestimmten effektiven Molmasse der DPH-markierten Detergenzmizellen von der Saccharosekonzentration im Puffer.

### Referenzmessungen mit der Cytochrom-Oxidase

Die hohe Saccharosekonzentration, die für die Dichtekompensation der Detergenzmizellen benötigt wird, beeinflusst das partialspezifische Volumen  $\bar{v}$  des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes, was zu einem nicht zu vernachlässigenden Fehler für die

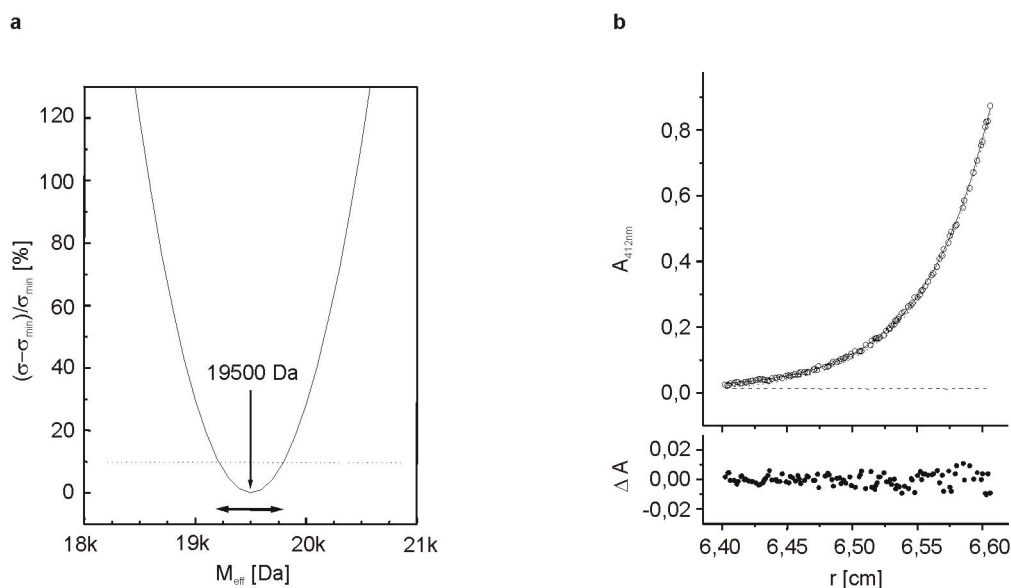
Molmassenbestimmung des  $bc_1$ -Komplexes führen würde. Für Standardbedingungen ( $H_2O$ , 25 °C) lässt sich  $\bar{v}_{bc_1,cal} = 0,738$  ml/g aus der Aminosäure- und Pigmentzusammensetzung errechnen [250]. Um einen Korrekturterm für  $\bar{v}_{bc_1,cal}$  zu ermitteln, wurde als Referenzprotein Cytochrom  $c$ -Oxidase unter den für die Dichtekompensation ermittelten Pufferbedingungen für Gleichgewichtszentrifugationsläufe eingesetzt (2.4.4; Daten nicht gezeigt). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass dieses Protein unter den gegebenen Bedingungen in monomerer Form vorliegt [251]. Damit lässt sich aus der hier bestimmten effektiven Molmasse unter Kenntnis der tatsächlichen monomeren Molmasse ein experimenteller Wert  $\bar{v}_{COX} = 0,782$  ml/g ermitteln. Dieser überschreitet den für die Cytochrom-Oxidase rechnerisch ermittelten Wert (0,753 ml/g) um  $\Delta\bar{v} = 0,029$  ml/g. Der für das Referenzprotein ermittelte Korrekturterm wurde nun auf  $\bar{v}_{bc_1}$  übertragen, es ergibt sich somit  $\bar{v}_{bc_1} = \bar{v}_{bc_1,cal} + \Delta\bar{v} = 0,767$  ml/g.

#### Gleichgewichtsläufe mit dem $bc_1$ -Komplex

Unter den für die Dichtekompensation ermittelten Pufferbedingungen wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe mit dem Cytochrom  $bc_1$ -Komplex durchgeführt (2.4.4). Als beste Anpassung aus einem Ein-Komponenten-Fit der experimentellen Daten ergibt sich für die effektive Molmasse  $M_{eff} = 19'600$  g/mol (Abbildung 44a). Der ermittelte  $M_{eff}$ -Wert liefert einen ausgezeichneten  $fit$  für die  $A(r)$ -Messwerte, wie auch die Verteilung der Residuen zeigt (Abbildung 44b). Die Anpassung konnte durch versuchsweise Berücksichtigung weiterer hypothetischer Komponenten nicht verbessert werden. Dies zeigt, dass die  $bc_1$ -Probe einen homogenen Assoziationszustand besitzt. Wiederholungen des Experiments mit jeweils neuen  $bc_1$ -Präparaten lieferten praktisch identische Ergebnisse. Um den Einfluss von H-D-Austausch auf die Masse zu berücksichtigen, wurde der Korrekturterm  $k$  [269] unter der Annahme bestimmt, dass nur  $\sim 50\%$  der potenziell austauschenden Gruppen im  $bc_1$ -Komplex tatsächlich austauschen (M. Ritter, persönliche Mitteilung). Die tatsächliche Molmasse ergibt sich gemäß  $M_{eff} = M(k - \bar{v}\rho)$ :

$$M = 240'000 \text{ g/mol}$$

Der maximale Fehler beträgt  $\pm 30'000$  g/mol oder 12,5 %. Die kalkulierte Molmasse ist das  $(2,05 \pm 0,26)$ fache der Monomerenmasse. Dies zeigt, dass der aufgereinigte  $bc_1$ -Komplex von *P. denitrificans* unter den gegebenen Bedingungen als stabiles Dimer vorliegt.



**Abbildung 44 Sedimentationsgleichgewichts-Daten für den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex.** **a** Der Datensatz wurde mit der effektiven Molmasse als Variablen angepasst. Die auf die minimale Fehlerquadratsumme  $\sigma_{\min}$  bezogene prozentuale Erhöhung von  $\sigma$  wurde gegen  $M_{\text{eff}}$  aufgetragen. Doppelpfeil und punktierte Linie verdeutlichen den statistischen Fehlerbereich. **b** Die Gleichgewichts- $A(r)$ -Daten ( $\circ$ ) wurden mit der ermittelten optimalen  $M_{\text{eff}}$  bei freier Basislinie (---) angepasst ( $\cdots$ ). Im unteren Teil der Abbildung sind die Residuen der Anpassung gezeigt. Experimentelle Bedingungen: Probenkonzentration 0,13 mg/ml, Rotorgeschwindigkeit 18'000 rpm, Temperatur 4 °C, Messwellenlänge 412 nm.

### Bestimmung des proteingebundenen Detergenz

Um das Verhältnis von Membranprotein zu gebundenem Detergenz zu bestimmen, wurden Gleichgewichtsläufe für den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex in Puffer A, also ohne Kompensation der Detergenzdichte durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die effektive Molmasse  $M_{\text{eff}} = (91'000 \pm 5'000)$  g/mol lieferte eine gute Anpassung an die  $A(r)$ -Daten. Für  $M_{\text{eff}}$  des Protein-Detergenz-Komplexes gilt:

$$M_{\text{eff}} = M_P(1 - \bar{v}_P \rho) + M_D(1 - \bar{v}_D \rho) \quad \text{Gleichung 2}$$

(Index P: Protein, Index D: Detergenz). Die eingesetzten Werte sind  $\rho = 1,014$  g/ml,  $\bar{v}_D = 0,814$  [270] und  $\bar{v}_P = 0,749$  ml/g. Der Wert für das partialspezifische Volumen des Proteins wurde auf analoge Weise wie oben beschrieben ermittelt: Aus Gleichgewichtsläufen mit dem Referenzprotein Cytochrom-Oxidase in Puffer A ergibt sich ein Korrekturterm für das rechnerische partialspezifische Volumen von  $\Delta \bar{v} = +0,011$  ml/g (Daten nicht gezeigt). Dieses Inkrement wird zu dem für den  $bc_1$ -Komplex unter Standardbedingungen berechneten Wert ( $\bar{v}_{bc_1, \text{cal}} = 0,738$  ml/g) addiert.



Mit Auflösen von Gleichung 2 nach  $M_D$  ergibt sich für das Detergenz-Protein-Verhältnis:

$$M_D/M_P = 0,85 \pm 0,12 \text{ (w/w)}$$

Dieser Wert befindet sich in dem Bereich der für andere Membranproteine bestimmten Detergenz/Protein-Verhältnisse [271,270,249,272].

### 3.4 Untersuchungen am respiratorischen Superkomplex

Die Untersuchung der Wechselwirkung von Einzelkomplexen innerhalb des respiratorischen Superkomplexes erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Hermann Schägger (Universitätsklinikum Frankfurt). Einen wesentlichen Anteil an diesem Projekt hatte Anke Stroh; sie etablierte die chromatographische Isolierung des Superkomplexes und untersuchte die Stöchiometrie der Einzelkomplexe.

#### 3.4.1 Versuche zur Quervernetzung des Superkomplexes

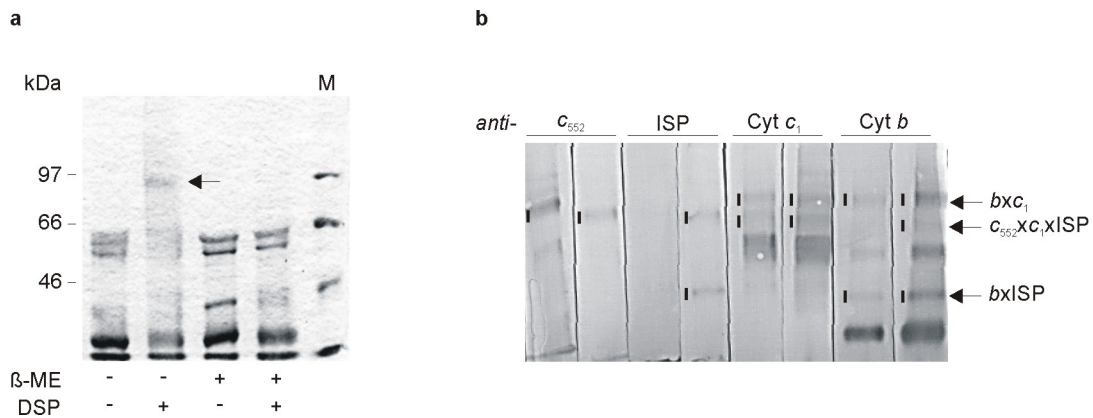
Ziel dieser Versuche war es, benachbarte UE innerhalb des Superkomplexes quervernetzen, um auf diese Weise erste strukturelle Aussagen über den Aufbau des Respirasoms treffen zu können. Als *crosslinker* wurde Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) ausgewählt: 1) Es handelt sich um einen der gängigsten und in vielen Studien auch an Membranproteinen bewährten *crosslinker* [273]; 2) DSP ist ein amphiphiles Molekül, mit dem potenziell sowohl hydrophobe wie hydrophile Kontaktbereiche der Atmungskettenkomplexe erfasst werden können; 3) die Spaltbarkeit des disulfidverbrückten DSP stellt ein wichtiges Werkzeug zur Analyse und Validierung der *crosslink*-Ergebnisse dar; 4) der Abstand zwischen zwei quervernetzten Gruppen beträgt 12 Å, was einen guten Kompromiss zwischen Selektivität und „Promiskuität“ bei der Quervernetzung darstellt.

#### Vorversuche mit isolierten Komponenten

Zunächst sollte das *crosslinking* mit einem einfacheren System erprobt werden. Deshalb wurde getestet, ob die aufgereinigten, isolierten Atmungskettenenzyme  $bc_1$ -Komplex und  $aa_3$ -Oxidase sowie Cytochrom  $c_{552}$  einzeln und in Kombination miteinander *crosslink*-Produkte liefern ( $aa_3$ -Oxidase wurde freundlicherweise von Hans-Werner Müller zur Verfügung gestellt; Aufreinigung  $bc_1$ -Komplex und Cyt  $c_{552}$ : Abschnitte 2.3.10 und 2.3.12). Für das *crosslinking* wurden verschiedene Proteinkonzentrationen (2-10 mg/ml) ausgetestet; bei hoher Proteinkonzentration wurde DSP in bis zu

10fachem molaren Überschuss eingesetzt, bei niedrigen Proteinkonzentrationen in bis zu 50fachem Überschuss. Die einzelnen Proteinkomponenten wurden auf moderate Ionenstärke und eine geringe Detergenzkonzentration eingestellt (20 mM Phosphat, 150 mM NaCl, 0,02 % DDM), mit DSP behandelt, auf einem 8 %igen Laemmligel aufgetrennt und nach Coomassiefärbung oder immunologischer Detektion analysiert (Abschnitt 2.3.7). Für die *aa*<sub>3</sub>-Oxidase konnte weder allein noch in Kombination mit den anderen Komponenten ein *crosslink*-Produkt gefunden werden. Cytochrom *c*<sub>552</sub> alleine lieferte ebenfalls keine sichtbare Quervernetzung. Der *bc*<sub>1</sub>-Komplex hingegen konnte sowohl mit sich selbst (Abbildung 45a) als auch mit Cytochrom *c*<sub>552</sub> vernetzt werden: Es zeigten sich spezifisch nach Zugabe von DSP zusätzliche Banden. Wurde DSP vor Zugabe durch Inkubation mit Tris inaktiviert, erschienen diese Banden nicht, ebenso wie nach Reduktion der Gelprobe mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (Spaltung von DSP). Die Ausbeute war in beiden Fällen gering, gemessen an der Intensität der regulären Banden, ein generelles Problem beim chemischen *crosslinking*. Der *bc*<sub>1</sub>-*c*<sub>552</sub>-*crosslink* konnte nur immunologisch detektiert werden. Die Zuordnung der Quervernetzungsprodukte zu konkreten Untereinheiten wurde versucht, indem mehrere gleiche Proben geblottet und der Blot danach in Streifen zerschnitten wurde, die jeweils mit einem anderen Antikörper inkubiert und nach der Entwicklung der Blots wieder nebeneinandergelegt wurden (Abbildung 45b).

Die Analyse gestaltete sich schwierig: Aufgrund der niedrigen *crosslink*-Ausbeute mussten die Blots lange Zeit entwickelt und somit ein starker Hintergrund bei schwachen Signalen in Kauf genommen werden. Die geringe Gelkonzentration führte ferner zu breiten Banden, so dass bei geringen Laufstreckenunterschieden keine klare Zuordnung möglich war. Es konnten folgende *crosslinks* ausgemacht werden: Cytochrom *b* mit Cytochrom *c*<sub>1</sub>, Cytochrom *b* mit dem Rieske-Protein, sowie einen ternären Komplex aus Cytochrom *c*<sub>552</sub>, Cytochrom *c*<sub>1</sub> und dem Rieske-Protein. In der Folge wurde untersucht, ob die Ionenstärke einen Einfluss auf das *crosslinking* hat. Die genannten Proben wurden dafür auf niedrige Ionenstärke (20 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5, 0,02 % DDM) umgepuffert. Die *crosslinks* mit diesen Proben glichen quantitativ und qualitativ den zuvor bei höherer Ionenstärke beobachteten Produkten. Zusammengefasst zeigen die Vorversuche mit isolierten Komponenten, dass das *crosslinking* mit DSP überprüfbar und spezifisch funktioniert, wenn auch mit geringer Ausbeute der Quervernetzungsprodukte.



**Abbildung 45 Chemische crosslinks am isolierten  $bc_1$ -Komplex.** **a** Coomassiefärbung eines Laemmli-Gels, 8 % nach *crosslink* von aufgereinigtem  $bc_1$ -Komplex (2 mg/ml). Aufgetragen sind pro Bahn 15  $\mu$ g  $bc_1$ -Komplex. +/- DSP: Die Quervernetzung erfolgte mit 1 mM DSP / es wurde nur DMSO zugegeben; +/-  $\beta$ -ME: Die Proben wurden für das Gel in Probenpuffer mit / ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert. Der Pfeil markiert die *crosslink*-Bande. **b** Nach dem Blot wurde die Nitrocellulosemembran in Streifen geschnitten, die separat mit Antikörpern gegen Cyt  $b$ , Cyt  $c_1$ , ISP und Cyt  $c_{552}$  inkubiert wurden (je zwei Streifen mit unterschiedlicher Proteinmenge). Die den angesprochenen *crosslinks* zugeordneten Banden sind mit Strichen markiert.

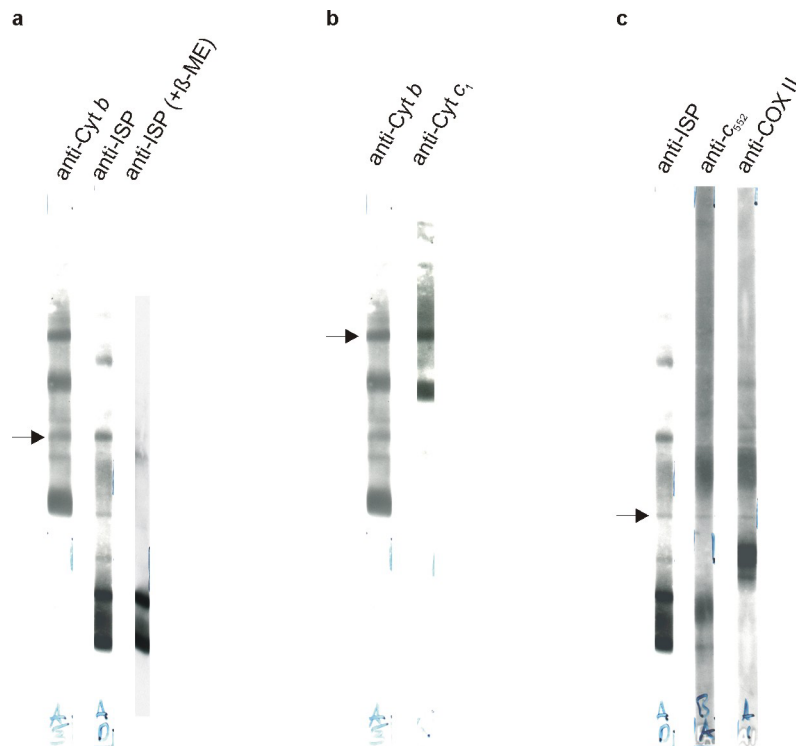
#### Vorversuche mit Membranen

*Crosslinking* an Membranen wurde zunächst in der Hoffnung durchgeführt, dass sich die Superkomplexe *in situ* nachweisen ließen, und womöglich auch die Wechselwirkung definierter UE. Die Membran des in Methylamin-Medium angezogenen *Paracoccus*-Stammes Pd1222 wurden ohne Detergenz in 100 mM  $KP_i$  pH8 in unterschiedlicher Proteinkonzentration (2-10 mg/ml), bei variabler Ionenstärke (0-150 mM NaCl) und verschiedenen DSP-Konzentrationen (0,25-3 mM) für die Reaktion eingesetzt. Weder in der SDS-PAGE mit Coomassiefärbung noch nach anschließender immunologischer Detektion (beispielsweise mit einem Antikörper gegen Cytochrom  $c_{552}$ ) konnten diskrete Banden ausgemacht werden. In beiden Fällen zeigte sich eine weitflächige Anfärbung im Bereich  $> 60$  kDa, die vermutlich auf extensives und unspezifisches *crosslinking* hinweist. Diese Quervernetzung war wie in den Versuchen mit isolierten Komponenten von der Ionenstärke unabhängig, wurde aber durch höhere DSP-Konzentrationen und niedrige Proteinkonzentrationen begünstigt (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass der *crosslinker* zwar auch an nichtsolubilierten Membranen prinzipiell funktioniert, aber keine spezifischen Produkte liefert, zumindest nicht in ausreichender Menge.

### Versuche am aufgereinigten Superkomplex

Der mit Digitonin solubilisierter respiratorischer Superkomplex wurde über eine Hydroxylapatitsäule mit anschließender Gelfiltration aufgereinigt (in Zusammenarbeit mit Anke Stroh, Universitätsklinikum Frankfurt; Abschnitt 2.3.11). Für das *crosslinking* wurde das Protein in einer Endkonzentration von 1 mg/ml mit 1,25 mM DSP eingesetzt. Die Probe wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf ein 10 %iges Tricin-Gel ohne Taschen aufgetragen, so dass sie über die ganze Breite des Gels einheitlich lief, geblottet und in schmale Streifen geschnitten (~ 5 µg Protein pro Bahn), die anschließend separat mit 15 verschiedenen Antikörpern (gegen alle *bc*<sub>1</sub>-UE, Cyt *c*<sub>552</sub>, *aa*<sub>3</sub>-Oxidase UE 1 und 2, sowie gegen die Komplex I-Untereinheiten 1-9) inkubiert wurden. Die ECL-Detektion erfolgte auf Röntgenfilmen. Als Kontrollen wurden analog zwei weitere Blots (à 15 Streifen) erstellt: 1) Die quervernetzten Proben wurden vor dem Gelauftrag mit β-Mercaptoethanol inkubiert (+DSP/+β-ME); 2) Zugabe von DMSO ohne DSP zum Ansatz (-DSP/-β-ME). Bei einigen Blots ergab sich ein starker Hintergrund, möglicherweise bedingt durch die Qualität der jeweiligen Antikörper/Antiseren oder der nicht optimal angepassten Konzentration und Entwicklungszeit.

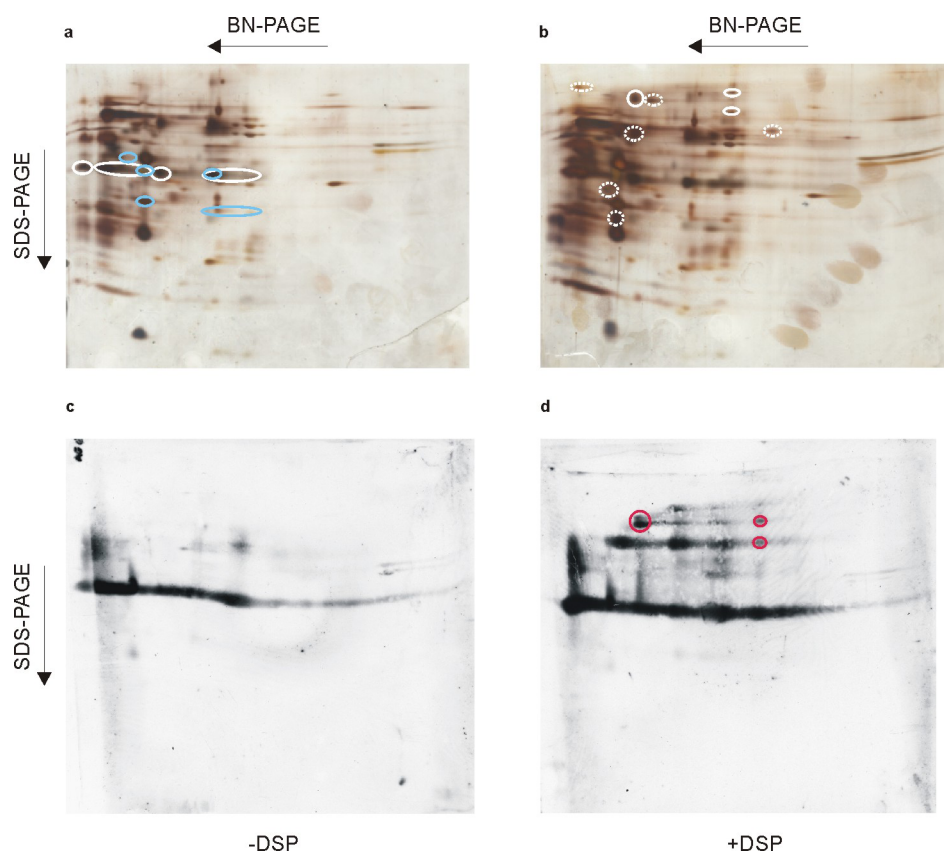
Die 85 Banden, die die Blots mit quervernetztem Protein (+DSP/-β-ME) zeigten, wurden durchnummeriert und nach gleicher Laufweite im Gel gruppiert. Nach Aussortieren der (nicht quervernetzten) Hauptbanden für die jeweiligen Untereinheiten konnten weitere ~ 15 Banden durch Vergleich mit dem (-DSP/-β-ME)-Ansatz als Falschpositive eliminiert werden. Nach Prüfung auf Reversibilität (+DSP/+β-ME-Ansatz) blieben 38 Banden in 15 potenziellen *crosslinks*. Für einen plausiblen *crosslink* wurde nun noch vorausgesetzt, dass die jeweiligen Banden eine ähnliche Form aufwiesen. Als letztes Kriterium wurde das apparente Molekulargewicht mit dem erwarteten rechnerischen Molekulargewicht des putativen *crosslink*-Produkts verglichen. Durch dieses Raster fielen die meisten Kandidaten, so dass am Ende nur die bereits in den Vorversuchen identifizierten *crosslinks* zwischen Cytochrom *b* und dem Rieske-Protein sowie zwischen Cytochrom *b* und Cytochrom *c*<sub>1</sub> als halbwegs gesicherte Ergebnisse blieben (Abbildung 46). Eine um ~ 20 kDa zu geringe apparente Masse wies ein putativer ternärer Komplex aus dem Rieske-Protein, Cyt *c*<sub>552</sub> und Cytochrom-Oxidase-UE 2 auf; andererseits handelt es sich um sehr charakteristische, scharfe Banden, so dass dieser *crosslink* gleichfalls plausibel erscheint.



**Abbildung 46 Chemische crosslinks am aufgereinigten Superkomplex.** Blots von Tricin-Gelen (10 %) nach immunologischer ECL-Detektion. Das jeweils detektierte Protein ist angegeben; die zugeordneten *crosslink*-Banden sind mit einem Pfeil markiert. **a** *Crosslink* zwischen Cyt *b* und ISP. Exemplarisch ist für das ISP ein Kontrollblot (+DSP/+β-ME) gezeigt, der die Reversibilität der *crosslink*-Bande demonstriert. **b** *Crosslink* zwischen Cyt *b* und Cyt *c*<sub>1</sub> **c** ternärer Komplex zwischen ISP, Cyt *c*<sub>552</sub> und COX II.

Nachdem dieser Ansatz nicht die erwarteten Verbindungen zwischen den einzelnen Atmungskettenkomplexen aufzeigen konnte, wurde eine andere Strategie verfolgt. Der quervernetzte Superkomplex - und die Kontrolle ohne DSP - wurden zunächst mit 1,5 % DDM und 2,5 % Serva Blau GS behandelt und danach auf einem Blau-Nativgel (Acrylamidgradient 3,5 → 13 %) aufgetrennt. Die Vorbehandlung zerlegt den Superkomplex weitestgehend in die Einzelkomplexbestandteile, wie Vorversuche zeigten. Wenn die *crosslinks* jedoch größere Verbände zu stabilisieren vermögen, fänden sich weiterhin Banden im hochmolekularen Bereich. In diesen wären die relevanten *crosslink*-Produkte stark angereichert, was deren Detektion in der zweiten, denaturierenden (jedoch nicht-reduzierenden!) Geldimension erheblich erleichtern würde. In der Praxis zeigte sich jedoch in der nativen Geldimension kein signifikanter Unterschied zwischen *crosslink* und Kontrolle (nicht gezeigt). Die silbergefärbten 2D-Gele zeigen zwar einige *crosslink*-spezifischen Banden; jedoch finden sich diese komplett im niedermolekularen Bereich, bezogen auf die erste Geldimension (Abbildung 47a,b). Es gelang demnach nicht nachweislich, den Superkomplex oder zumindestens größere Ko-Komplexe über Quervernetzung zu stabilisieren. Zur

Zuordnung der gefundenen *crosslink*-Produkte wurden auf beschriebenen Weg weitere Gele angefertigt, geblottet und nacheinander mit verschiedenen Antikörpern inkubiert, um auf diese Weise die Kolokalisation von zwei oder mehr UE in einem Gelspot nachzuweisen. Dieses Vorhaben scheiterte: 1) an der nicht exakten Reproduzierbarkeit der 2D-Gele; 2) am äußerst unvollständigen *stripping* der Antikörper aus der ersten Detektionsrunde; 3) an den in der Regel relativ zum Hintergrund oder der unerwünschten Kreuzreaktivität kaum sichtbaren *crosslink*-Produkten in den 2D-Blots. Lediglich für Cytochrom *b* konnte eine Reihe von *crosslink*-Spots nachgewiesen werden, jedoch konnte der jeweilige Partner nicht identifiziert werden (Abbildung 47c,d). Dieses extensive *crosslinking* weist auf eine zentrale Position von Cyt *b* innerhalb des Superkomplexes hin. Ein weiterer interessanter Fund war die Kolokalisation von Cytochrom *b* und der Komplex I-UE NQO8 in zwei Spots (Abbildung 47a).



**Abbildung 47 2D-PAGE-Analyse von chemischen *crosslinks* im Superkomplex.** Die Auftrennung erfolgte über BN-PAGE mit anschließender SDS-Tricin-PAGE. Einige der 2D-Gele wurde silbergefärbt (a + b), andere auf PVDF-Membranen geblottet (c + d). **a** Silbergefärbtes Kontrollgel ohne *crosslink*. Die weiß umrandeten Gelbänder wurden immunologisch Cyt *b* zugeordnet, die blau umrandeten NQO8. **b** Gel mit DSP-*crosslink*. Auffällige Quervernetzungs-Produkte sind weiß gestrichelt hervorgehoben; die geschlossenen Kreise zeigen die auf immunologischem Weg Cyt *b* zugeordneten *crosslink*-Bänder an. **c** Autoradiogramm ohne *crosslink*. Nach Blotting wurde Cyt *b* immunologisch über ECL-Detektion nachgewiesen; Exposition des Röntgenfilms 2 min. **d** Autoradiogramm mit *crosslink*. Experimentelle Bedingungen wie unter (c). Die in (b) Cyt *b* zugeordneten *crosslink*-Spots sind mit roten Kreisen hervorgehoben.

Die überlagernde Zuordnung der beiden Blots war dadurch möglich, dass sich in beiden Fällen eine unspezifische Kreuzreaktionsbande von charakteristischer Form findet, die man auch auf den silbergefärbten Gelen leicht zuordnen kann. In beiden Fällen handelt es sich jedoch nicht um Quervernetzungsprodukte, sondern um auch in der Kontrolle auftretende, „reguläre“ Spots. Hierbei kann es sich also auch um rein zufällige Komigration - die Molekulargewichte sind vergleichbar - handeln, zumal sich das Cyt *b*-Signal über eine weite Strecke in der ersten Dimension erstreckt.

### 3.4.2 Untersuchung von Deletionsstämmen

Nachdem die chemischen *crosslink*-Versuche nicht die erhofften Informationen zur Topologie des Superkomplexes lieferten, wurde alternativ ein genetischer Ansatz gewählt. Grundlegende strukturelle Zusammenhänge im Superkomplex sollten durch die Charakterisierung verschiedener Deletionsstämmen untersucht werden. Dies sollte Aufschluss darüber geben, welche Subkomplexe möglich sind, ob bestimmte Untereinheiten essentiell für den Zusammenhalt des gesamten Superkomplexes sind und inwiefern sich Einzelkomplexe wechselseitig stabilisieren.

#### Gewinnung und Charakterisierung der Deletionsstämmen

Untersucht werden sollten Stämme, in denen jeweils ein einzelner Atmungskettenkomplex oder das membranständige Elektronenüberträgerprotein Cytochrom *c*<sub>552</sub> deletiert wurde. Diese Stämme existierten bereits in der institutseigenen Stammsammlung; die genauen Stammbezeichnungen und genetischen Phänotypen sind in Abschnitt 2.1.9 angegeben. Die Stämme werden hier der Einfachheit halber nur als  $\Delta c_{552}$ ,  $\Delta KIII$  und  $\Delta KIV$  bezeichnet. Nur bei  $\Delta KIII$  handelt es sich im engen Sinne um einen Deletionsstamm, da hier alle drei UE entfernt wurden; in  $\Delta c_{552}$  ist das *cycM*-Gen durch Insertion eines Resistenzgens inaktiviert, bei  $\Delta KIV$  ist mit UE 1 nur die größte der vier UE deletiert. Die Identität dieser Stämme wurde durch Antibiotikaselektion, Vis-Spektren, Enzymtests und Western Blots gegen die entsprechenden UE überprüft (nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass auch in Abwesenheit der UE 1 immer noch die UE 2 der Cytochrom-Oxidase in der Membran nachzuweisen ist, wenn auch in verringerter Konzentration.

In den Stämmen Pd12-184 und Pd92-223 (Moshe Finel, unveröffentlichte Ergebnisse / [201]) sollten vor einem Wildtyp-Hintergrund die Komplex I-Gene *nqo8* und *nqo9* durch eine Kanamycin-Resistenz und die alternative NADH-Dehydrogenase NDH-2 aus

*E. coli* ersetzt sein. Letztere stellt kein integrales Membranprotein dar und transloziert dementsprechend auch keine Protonen; sie wird allerdings zur Regenerierung von  $\text{NAD}^+$  benötigt, um einen lebensfähigen Komplex I-Deletionsstamm zu erhalten [201]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei diesen Stämmen vielmehr um Komplex I-Deletionen vor dem Hintergrund eines Komplex IV-Deletionsstammes handelt. Dies belegt der fehlende Häm *a-peak* im Vis-Spektrum, der negativ ausfallende Western Blot gegen COX-UE 1, sowie die genetische Analyse des *cycA/ctaDII*-Locus über den Vergleich von Größe und Restriktionsmuster des PCR-Produkts mit dem des Wildtyp-Stammes (Primer *cycA*hin, *ctaD2*rev; Daten nicht gezeigt). In einer persönlichen Mitteilung räumte Moshe Finel auch ein, dass er sich über den Stammhintergrund nicht zweifelsfrei klar war.

Aus diesem Grund wurde versucht, mit Hilfe des von Moshe Finel zur Verfügung gestellten Deletionskonstrukts pSEKMF2 einen Deletionsstamm vor Wildtyp-Hintergrund zu gewinnen. Das Plasmid wurde anhand von Resistenzen (Sm, Cm, Amp) und Restriktionskartierung (Sall, EcoRI, PstI) überprüft. Zur Umklonierung in den Suizidvektor pRvS, der im Gegensatz zu pSEKMF2 eine Blau/Weiß-Selektion ermöglicht, wurde das Sall-Fragment aus pSEKMF2 mit Klenow-Polymerase an den Enden aufgefüllt und in den mit SmaI geöffneten pRvS kloniert (Produkt: pAN35). Mit beiden Plasmiden wurde wiederholte Male nach konjugativem Transfer auf doppelt homologe Rekombination analysiert. Es konnten mehrere Klone isoliert werden, die die Selektions- und Screeningkriterien erfüllten. Die immunologische Analyse von insgesamt sieben Klonen nach Anzucht und Membranpräparation zeigten jedoch, dass diese stets noch über die zu deletierenden UE NQO8 und NQO9 verfügten. Auch Vereinzelungsversuche, falls es sich um Mischkolonien gehandelt hätte, lieferten keine anderes Ergebnis. Möglicherweise besteht ein hoher Selektionsdruck gegen die Inaktivierung von Komplex I, so dass es in den analysierten Kolonien zu einer nichthomologen Rekombination des Plasmids an anderer Stelle im Genom kam.

Nachdem die Deletion von Komplex I im Wildtypstamm wiederholte Male fehlschlug, wurde ein alternativer Ansatz gewählt und der  $\Delta\text{KI/KIV}$ -Doppeldelentionsstamm Pd12-184 bzw. Pd92-223 mit der COX UE 1 *in trans* komplementiert. Dazu dienten das wildtypische Konstrukt pOR772 bzw. das mit einem C-terminalen His-tag versehene Konstrukt pKH48 (freundlicherweise von Oliver Richter und Klaus Hoffmeier zur Verfügung gestellt). Zur Kontrolle wurden diese Plasmide in den COX UE 1-



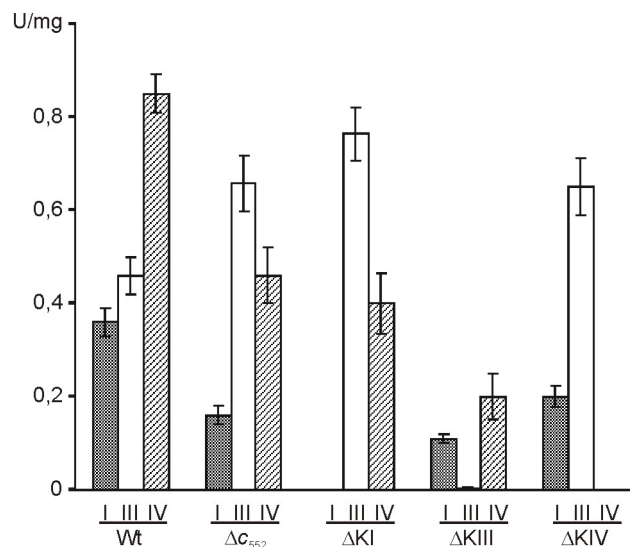
Deletionsstamm MR31 transferiert. In den komplementierten Stämmen konnten nach Membranpräparation von jeweils zwei Klonen immunologisch die COX UE 1 nachgewiesen werden. Enzymmessungen und Vis-Spektren bestätigten die funktionelle Wiederherstellung der Cytochrom-Oxidase. Die spezifischen Aktivitäten lagen bei  $1\text{-}2\ \mu\text{Mol Cyt } c \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$  und die Cytochrom  $aa_3$ -Gehalte bei durchschnittlich  $150\ \text{nmol/g}$  Membranprotein, beides in derselben Größenordnung wie der zum Vergleich vermessene Wildtyp Pd1222. Es waren keine systematischen Unterschiede abhängig vom Stammhintergrund (Pd12-184/Pd92-223/MR31) oder der UE 1-Variante (mit/ohne His-tag) zu erkennen; die Differenzen zwischen den Stämmen lagen innerhalb der Streubreite von zwei Klonen desselben Stammes.

Die von den Doppeldeletionsstämmen durch Komplementation gewonnenen  $\Delta\text{KI}$ -Stämme können demnach für die Analyse des Superkomplexes hinzugezogen werden. Mit den Komplementationstämmen, die ein Histidin-Affinitätstag an der COX UE 1 tragen, wurden außerdem erste Versuche unternommen, ein rascheres und effektiveres Aufreinigungsprotokoll für den Superkomplex über eine IMAC-Säule zu etablieren, was prinzipiell zu funktionieren scheint (nicht gezeigt). Eine sehr interessante Möglichkeit besteht ferner darin, im His-getaggten Superkomplex über sekundäre Goldmarkierung elektronenmikroskopisch Komplex IV zu lokalisieren.

#### Enzymatische Messungen

Um den wechselseitigen Einfluss der Einzelkomplexe zu untersuchen, wurden die individuellen Enzymaktivitäten in Digitonin-solubilisierten Membranen von Wildtyp und Mutanten gemessen (Abschnitt 2.4.5; Abbildung 48). Es zeigt sich, dass die spezifische Komplex III-Aktivität weitgehend unbeeinflusst vom Stammhintergrund (Wt,  $\Delta\text{KI}$ ,  $\Delta c_{552}$  und  $\Delta\text{KIV}$ ) ist. Die Deletion von Komplex III führt ihrerseits aber zu einem starken Abfall der Aktivitäten von Komplex I und Komplex IV. Dies weist darauf hin, dass der  $bc_1$ -Komplex für die Assemblierung und/oder Stabilität der beiden anderen Enzymkomplexe bedeutsam ist. In einem Kontrollversuch stellte die Komplementation von  $\Delta\text{KIII}$  mit dem  $bc_1$ -kodierenden *fbc*-Operon *in trans* die Komplex I- und IV-Aktivitäten auf Wildtyp-Niveau wieder her (nicht gezeigt). Der Stamm  $\Delta c_{552}$  zeigt einen moderateren Abfall der Komplex I- und Komplex IV-Aktivitäten, so dass auch dieses Elektronenüberträgerprotein in geringerem Maße eine stabilisierende/assemblierende Rolle für die beiden Enzyme zu spielen scheint. Auch

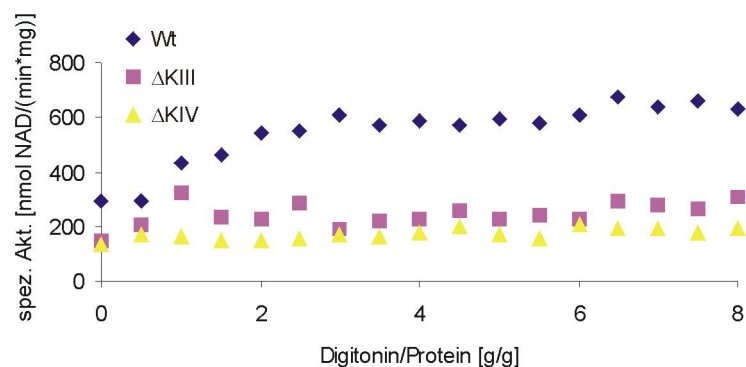
wechselseitig üben die Komplexe I und IV einen Einfluss aufeinander aus: die Aktivität des einen Komplexes ist abgesenkt, wenn der andere inaktiviert wird.



**Abbildung 48 Enzymaktivitäten Digitonin-solubilisierter Atmungskettenkomplexe von Wildtyp und Deletionsstämmen.** I: NADH:DBQ-Oxidoreduktase; III: DBH:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase; IV: Cytochrom *c*-Oxidase. Die Membranen wurden mit 3 g Digitonin/g Membranprotein solubilisiert. Mittelwerte von je vier Einzelmessungen. Nicht gezeigt: Der ΔKI-Stamm zeigt eine hohe NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivität ( $\sim 5 \mu\text{Mol NAD}^+ \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), die sich jedoch nicht durch den Komplex I-Inhibitor DQA unterdrücken lässt; es handelt sich demnach um die Aktivität der komplementierten alternativen *E. coli* NADH-Dehydrogenase NDH-2.

Einschränkend muss man jedoch einräumen, dass hier nur spezifische Aktivitäten gemessen wurden, so dass nicht sicher gesagt werden kann, ob der Aktivitätsabfall für die Komplexe I und IV durch verringerte Konzentrationen der Enzyme hervorgerufen wird oder aber durch eine herabgesetzte intrinsische Aktivität; diese könnte von einer gesteigerten Instabilität der Enzyme herrühren. Ferner müssen nicht zwangsläufig strukturell stabilisierende Faktoren der Grund für eine verminderte Enzymkonzentration sein; es könnte sich auch um physiologisch-regulatorische Effekte, etwa auf Transkriptionsebene handeln. Aus diesem Grund wurde die Komplex I-Aktivität weitergehend untersucht. Steigerung des Detergenz/Protein-Verhältnisses von 3 g Digitonin/g Protein auf bis zu 8 g/g hatte keinen nachteiligen Effekt auf die NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivität; diese steigt bis zu einem Verhältnis von etwa 2 g/g in Wildtypmembranen an und erreicht dann ein Plateau (Abbildung 49). Der initiale Anstieg ergibt sich möglicherweise durch verbesserte Zugänglichkeit zum zugegebenen Substrat. Im Falle der ΔKIII und ΔKIV-Stämme ist dieser Anstieg nicht oder kaum zu beobachten, so dass das in den Membranen vorliegende UQ hier möglicherweise ausreicht, um das Enzym zu sättigen. Auch hier ist aber kein Abfall der

Aktivität bei höheren Digitoninkonzentrationen zu beobachten. Des Weiteren wurde die Komplex I-Aktivität nach Solubilisierung mit 3 g Digitonin/g Protein über den Zeitraum einer Stunde hin wiederholt gemessen und zeigt in keiner der Stämme einen Abfall (nicht gezeigt). Die beiden Experimente weisen darauf hin, dass in den Mutanten-Membranen intakter und stabiler Komplex I in verringerter Konzentration vorliegt.



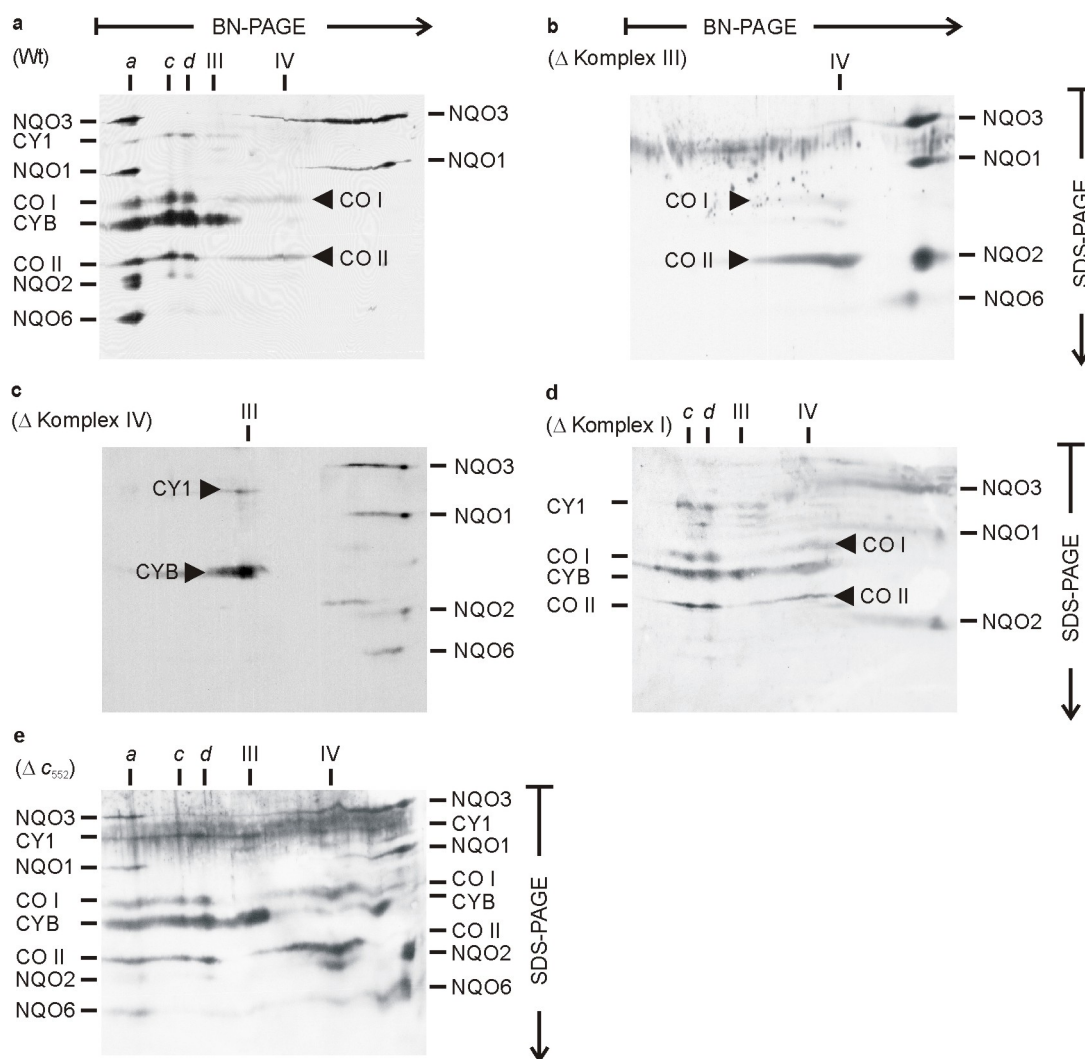
**Abbildung 49** NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivität in Abhängigkeit vom Digitonin/Protein-Verhältnis bei der Solubilisierung. Jeder Messpunkt gibt den Mittelwert von drei Einzelmessungen an.

#### Chromatographische und elektrophoretische Charakterisierung

Zur weiteren Charakterisierung wurde eine chromatographische Aufreinigung von Komplex I aus den Stämmen  $\Delta KIII$  und  $\Delta KIV$  nach dem gleichen Protokoll wie für die Aufreinigung des Superkomplexes aus dem Parentalstamm versucht (2.3.11; Experiment durchgeführt von Anke Stroh). Diese Versuche führten zum vollständigen Verlust der NADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivität, selbst wenn die Hydroxylapatitsäule ausgelassen wurde und als einziger Chromatographieschritt eine Gelfiltration erfolgte. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Komplex I in den Mutantenmembranen zwar hinreichend stabil für eine Solubilisierung mit Digitonin ist, bei einer darauf folgenden Chromatographie jedoch zerfällt. Nur die Assemblierung in einen Superkomplex zusammen mit Komplex III und IV wie im Falle des Parentalstammes stabilisiert demnach den ansonsten labilen Komplex I.

Diesen Befund bestätigt die Blau-Nativ-Gelelektrophorese von Digitonin-solubilierten Membranen. Im Anschluss an die BN-PAGE wurden in einer zweiten SDS-PAGE-Dimension die Proteinkomplexe denaturierend aufgetrennt, geblottet und verschiedene UE immunologisch nachgewiesen. Im Wildtyp (Abbildung 50a) lassen sich der Superkomplex a ( $I_1III_4IV_4$ ), die Subkomplexe b und c ( $III_4IV_4$  und  $III_4IV_2$ ) sowie die

Einzelkomplexe III und IV ausmachen. Individueller Komplex I ist nicht zu beobachten, lediglich die UE NQO1 und NQO3 finden sich an der Lauffront des BN-PAGE (rechts); sie haben sich möglicherweise partiell von Superkomplex a abgelöst. Im Stamm  $\Delta$ KIII (Abbildung 50b) sind weder Superkomplexe noch individueller Komplex I zu finden, sondern nur einzelner Komplex IV in intakter Form; die Komplex I-UE laufen zur Gelfront.



**Abbildung 50** Immunnachweis verschiedener Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen nach BN/SDS-PAGE von solubilisierten Wildtyp- und Mutantenmembranen. Die Solubilisierung erfolgte mit 3 g Digitonin/g Protein. Es wurde eine Mischung von Antikörpern gegen Untereinheiten von Komplex I, III und IV eingesetzt (NQO 1/2/3/6; Cyt *b/c*<sub>1</sub>; COX UE 1/2); die Detektion auf der PVDF-Membran erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Verfahren. a-e: Immunoblots der Digitonin-solubilisierten Membranen von Wt und Deletionsstämmen.

Dies belegt, dass Komplex I im  $\Delta$ KIII-Mutantenstamm, der wie oben gezeigt in solubilisierter Form noch aktiv ist, unter den Bedingungen der BN-PAGE zerfällt. Analoges wird beim  $\Delta$ KIV-Stamm beobachtet (Abbildung 50c): Komplex I wird nur durch die Gegenwart von Komplex III *und* Komplex IV stabilisiert. Umgekehrt bilden

sich jedoch die Subkomplexe b und c aus  $bc_1$ -Komplex und Cytochrom-Oxidase auch in Abwesenheit von Komplex I, wie die entsprechende Mutantenmembran zeigt (Abbildung 50d): Hierbei könnte es sich demnach um Assemblierungsintermediate für den Superkomplex handeln. Cytochrom  $c_{552}$  wurde zunächst als guter Kandidat angesehen, um die strukturelle Wechselwirkung der Komplexe III und IV im Superkomplex zu vermitteln: BN-PAGE und Quervernetzungsexperimente (Abschnitt 3.4.1) zeigen, dass das Cyt  $c_{552}$  mit beiden Komplexen stabil zu assoziieren vermag. Die Analyse des  $\Delta c_{552}$ -Stammes zeigt jedoch, dass das Elektronenüberträgerprotein nicht essentiell für die Superkomplex-Bildung und damit auch nicht für die Wechselwirkung von Komplex III und IV ist; jedoch vermag es die Superkomplexe zu stabilisieren, wie der verringerte Superkomplex-Gehalt und die gesteigerte Menge an dissoziierten Komplex I-UE in der Mutantenmembran zeigt (Abbildung 50e).

### 3.5 Gerichtete Mutagenese an sauren Resten des ISP

In diesem Projekt sollten Mutanten der sauren Reste innerhalb des von Cocco *et al.* [112] bestimmten Proteinabschnittes erstellt werden, um den Aminosäurerest identifizieren zu können, dessen chemische Modifikation mit der teilweisen Entkopplung der Protonentranslokation einhergeht. Die aufgereinigten, mutierten  $bc_1$ -Komplexe sollten für Markierungs- und Protonenpump-Experimente in rekonstituierten Vesikeln eingesetzt werden, die in der Arbeitsgruppe von Tiziana Cocco (Universität Bari, Italien) durchgeführt werden.

#### 3.5.1 Planung der Mutanten

Zunächst wurde die Sequenz des durch Trypsinierung entstandenen Fragments in einem Sequenzalignment mit anderen Rieske-Proteinen verglichen (Abbildung 51a). Es finden sich in diesem Bereich der *Paracoccus*-Sequenz sechs saure Reste. Davon erscheint nach dem Alignment einzig Asp160 als invarianter Rest. Die Positionen 120 und 121 sind in den meisten anderen Sequenzen überhaupt nicht vorhanden; Glu124 ist zum Teil konservativ durch das Säureamid ersetzt; in den Positionen 142 und 146 findet sich eine Reihe verschiedener Reste. Von daher erscheint es plausibel, einzig Asp160 eine wichtige funktionelle Rolle zuzuschreiben. Die Lokalisierung der verschiedenen Reste in der Proteinstruktur wurde am homologen Rinder-ISF untersucht - mit Ausnahme von Asp120/Glu121, für die keine homologen Reste zu finden sind. Es zeigt sich, dass Asp160 der einzige dieser Reste ist, der nicht an der Proteinoberfläche, sondern im



„Kandidat“ für eine sinnvolle Mutagenese nicht zugänglich scheint, die anderen fünf sauren Reste im Bereich des Trypsinfragments andererseits nicht hochgradig konserviert sind, wurde die Strategie gewählt, alle sauren Reste außer Asp160 gegen die entsprechenden Säureamide zu ersetzen. Sollte es sich bei Asp160 tatsächlich um den für die Entkopplung verantwortlichen Rest handeln, müsste diese nach chemischer Modifikation der Fünffach-Mutante weiterhin möglich sein. Diese Mutante sollte auf einem Weg konstruiert werden, der die verschiedenen Einzelmutationen in allen Kombinationen als Zwischenstufen beinhaltet. Diese Mutanten können untersucht werden, wenn sich herausstellt, dass Asp160 nicht der für die Entkopplung relevante Rest ist.

### 3.5.2 Etablierung eines neuen Mutagenesesystems

Für die Einführung von fünf kombinierten Mutationen im *fbcF*-Gen wurde das kommerzielle Mutagenesesystem QuikChange (Stratagene) in mehrfacher Hinsicht modifiziert: (i) Mit der erweiterten Methode kann an mehreren Stellen des Plasmids mit verschiedenen mutagenen Oligonucleotiden gleichzeitig eine Mutagenese durchgeführt werden; (ii) pro Mutagenese wird anstelle von zwei Oligonucleotiden nur ein einziger benötigt; (iii) die Ausbeute der Reaktion ist deutlich höher als mit dem bisher verwendeten QuikChange-System, so dass auf „ultrakompetente“ Zellen oder Transformation *via* Elektroporation verzichtet werden kann. Maßgebliche Teile der Entwicklung dieser Methode wurden von Thomas Kleinschroth im Rahmen eines Laborpraktikums geleistet. Die prinzipielle Änderung gegenüber dem herkömmlichen Verfahren besteht darin, im Thermocycler nach Hitzedenaturierung und Anlagerung eines oder mehrerer mutagener Primer an denselben Matrizenstrang für die Elongationsphase neben der Polymerase noch eine thermostabile Ligase einzusetzen. Hier wurde die „Ampligase“ (Firma Epicentre) verwendet, eine  $\text{NAD}^+$ -abhängige Ligase, deren Aktivität bei 65 °C eine Halbwertszeit von 48 h aufweist. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu-Polymerase (MBI Fermentas) ausgewählt, die über eine *proofreading*-Aktivität verfügt. Es sollte betont werden, dass es sich hier nicht - genauso wenig wie bei der konventionellen QuikChange-Methode - um ein Verfahren mit exponentieller Produktamplifizierung handelt. Pro gewünschter Mutation wird nur ein Oligonucleotid eingesetzt; als Matrize dient in jedem Reaktionszyklus immer nur das ursprüngliche Ausgangsmaterial. Der detaillierte Reaktionsansatz ist in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Die Reaktion wurde mit den für das konventionelle QuikChange-

System angegebenen Mengen an *template*-DNA, Primer und Nucleotiden durchgeführt. Um günstige Reaktionsbedingungen sowohl für die Polymerase wie die Ligase zu finden, wurde die Mutagenesereaktion sowohl im mitgelieferten Puffer des einen wie des anderen Enzyms versucht. Im Falle des DNA-Polymerasepuffers musste der Ansatz mit 0,5 mM NAD<sup>+</sup> supplementiert werden. In beiden Puffern lieferte die testhalber versuchte Mutagenesereaktion etwa gleich viele Kolonien. Da der Ligasepuffer jedoch 10 mM MgSO<sub>4</sub>, der Polymerasepuffer hingegen nur 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Endkonzentration) enthält und die Genauigkeit der Polymerase mit steigender Magnesiumionenkonzentration abfällt, wurde für das Mutagenesesystem fortan der Polymerasepuffer verwendet. Die Ausbeuten nach Transformation in konventionelle, Rubidiumchlorid- oder Calciumchlorid-kompetente Zellen liegt durchgängig um eine Größenordnung über den mit dem konventionellen QuikChange-System erzielten Werten. Anstelle einiger weniger Klone finden sich in der Regel mehrere Dutzend Kolonien nach Transformation von nur 25 % des Mutageneseansatzes. Bei sorgfältiger Durchführung des DpnI-Verdau, der die parentale DNA vor der Transformation entfernen soll, kommt es nur selten - erfahrungsgemäß bei etwa 20 % der Kolonien - zu falschpositiven Ereignissen. Die Häufigkeit unerwünschter *second site*-Mutationen im Vergleich zur konventionellen QuikChange-Mutagenese wurde nicht systematisch untersucht, es zeigte sich jedoch in mehreren Dutzend Mutagenesen, die bisher mit dem modifizierten Verfahren durchgeführt wurden, keine auffällige Häufung sekundärer Mutationen.

### 3.5.3 Konstruktion einer Mutagenesekassette und eines Expressionsvektors

Da hier eine extensivere Mutagenese durchgeführt werden sollte, wurde zunächst ein geeigneter Mutagenesevektor konstruiert, der nur einen kleinen Bereich („Kassette“) des gesamten *fbc*-Operons enthält und mit einem einfachen Sequenzierlauf vollständig überprüft werden kann. Dazu wurde der *bc*<sub>1</sub>-Expressionsvektor pRI2(436) mit AatII und NcoI geschnitten und nach Klenowbehandlung religiert. Im resultierenden Plasmid pAN33 ist der größte Teil des Chloramphenicol-Resistenzgens sowie eine darin enthaltene NcoI-Schnittstelle entfernt. Das SacI/SmaI-Fragment aus pAN33 wird in pUC18c umkloniert und ergibt pAN34. Mit der oben beschriebenen modifizierten QuikChange-Mutagenese wurde im hinteren Drittel des *fbcF*-Gens codonneutral eine NcoI-Schnittstelle eingefügt (Primer *fbcF*-ΔNcoI). Aus dem Mutageneseprodukt pAN36 wird ein ~ 900 bp großes SacI/NcoI-Fragment in den Vektor pSL1180 umkloniert. Das



daraus entstandene Plasmid pAN38 dient in der Folge als Mutagenesevektor. Um einen entsprechenden Expressionsvektor zu gewinnen, wird das *SacI/SmaI*-Fragment aus pAN36 in pAN33 kloniert; das Produkt ist pAN42. Eine Übersicht über das Klonierungsschema gibt Abbildung 52. Dieses so entwickelte Kassettensystem konnte auch in weiteren Mutageneseprojekten an der Rieske-UE erfolgreich eingesetzt werden.

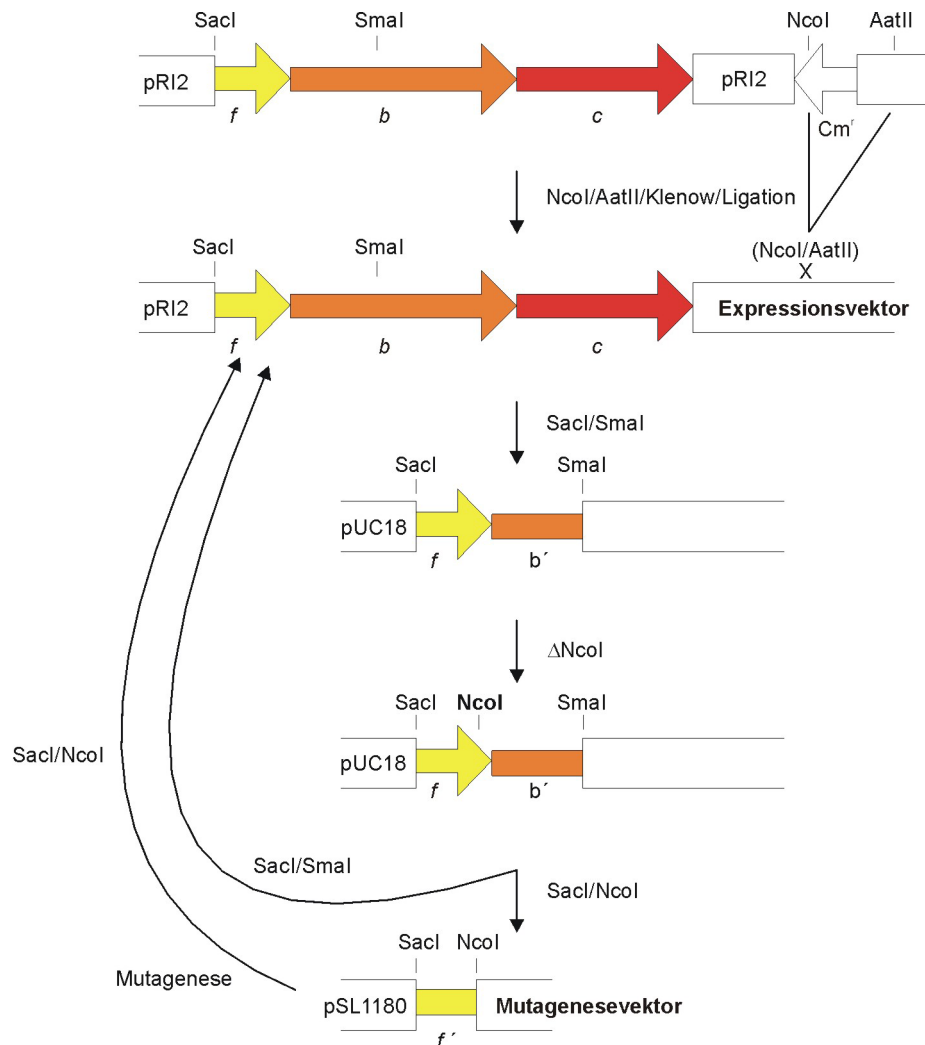


Abbildung 52 Entwicklung einer Mutagenesekassette für das *fbcF*-Gen. Details, siehe Text.

### 3.5.4 Mutagenese der sauren Reste des ISP

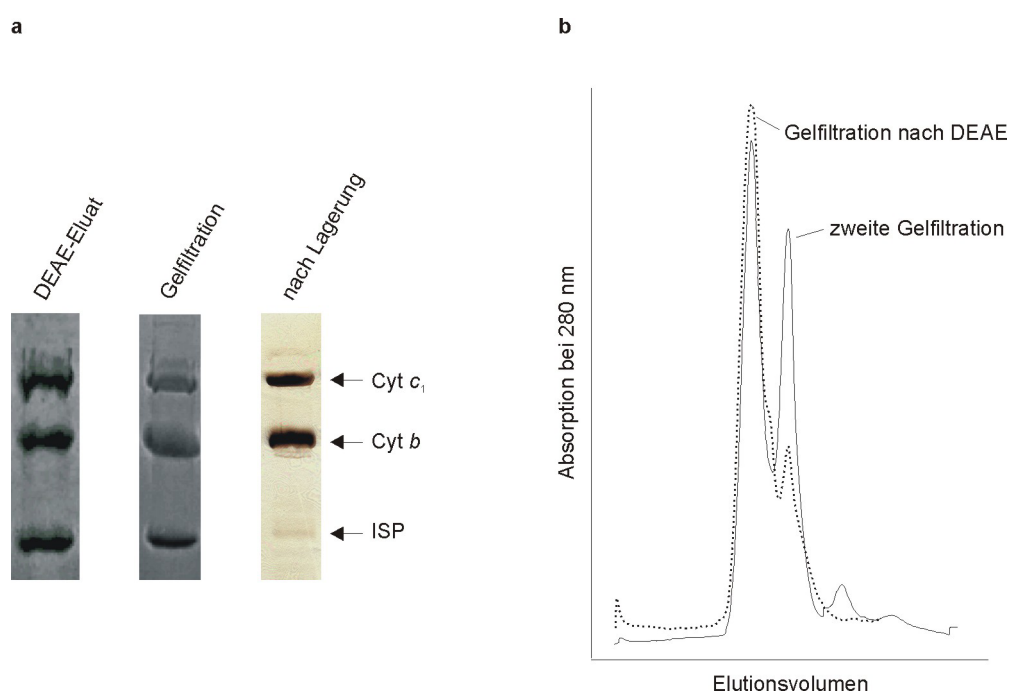
Es sollten folgende fünf Mutationen eingeführt werden: D120N/E121Q, E124Q, D142N, D146N. Da dies nicht in einer einzelnen Mutageneserunde zu erreichen sein dürfte, wurden zwei Runden durchgeführt. Dabei sollten *en passant* sämtliche Einzel- und Mehrfachkombinationen dieser Einzelmutationen erzeugt werden, mit Ausnahme der benachbarten Positionen 120 und 121, für die ein gemeinsamer Mutageneseprimer verwendet wurde. In der ersten Mutageneserunde wurden in drei Ansätzen die Primer

D120N/E121Q und D146N einzeln und in Kombination verwendet. Die resultierenden Plasmide pAN39, pAN40 und pAN41 konnten anhand eingeführter oder entfernter Schnittstellen (TfiI und KasI) überprüft werden. Sie dienten als Ausgangsvektoren für die zweite Mutageneserunde, in der in neun separaten Ansätzen die Mutationen E124Q und/oder D142N eingeführt wurden. Die entsprechenden Produkte sind pAN43 bis pAN51 (Abschnitt 2.1.8). Bei pAN43 handelt es sich um die komplette Fünffach-Mutante. Diese wies eine einzelne *second site*-Mutation auf, die über eine weitere Mutageneserunde mit dem Primer P111-rep entfernt wurde. Das Produkt pAN52 wurde per Sequenzierung überprüft und die Rieske-Kassette in den Expressionsvektor pAN42 NcoI/SacI umkloniert, woraus das Endprodukt pAN53 resultiert.

### 3.5.5 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der Fünffach-Mutante

Das Plasmid pAN53 wurde *via* Konjugation in den *P. denitrificans*-Stamm MK6 (*bc*<sub>1</sub>-Deletionsstamm) eingebracht. Davon wurden in analytischem Maßstab Membranen präpariert, von denen Redoxspektren und Western Blots gegen die drei *bc*<sub>1</sub>-UE angefertigt wurden. Das Redoxspektrum weist ein ähnliches Profil der  $\alpha$ -Bande auf wie der Wildtyp-(Wt)-Überexpressionsstamm MK6 pRI2(436) (nicht gezeigt); das Häm *b* zu Protein-Verhältnis bewegt sich mit 0,7  $\mu$ Mol/g ebenfalls im gleichen Bereich, so dass man von einer guten Expression der Cytochrom-UE ausgehen kann. Alle drei UE lassen sich auch immunologisch nachweisen; das ISP zeigt jedoch ein deutlich schwächeres Signal als der zum Vergleich aufgetragene Wildtyp. In der Folge wurde das mutierte Protein wiederholte Male aufgereinigt, wobei die Präparation jeweils von einer 50 l-Kultur ausging. Die Aufreinigung über Anionenaustauscher (DEAE CL6-B-Sepharose) und anschließende Gelfiltration (AcA 34 oder Superdex 200) gelang wie im Fall des Wt-Proteins. Im SDS-Gel zeigte sich allerdings ein uneinheitliches Bild: Während bei der ersten Aufreinigung ein augenscheinlich stöchiometrisch zusammengesetzter Komplex sowohl von der Anionenaustauschersäule als auch der Gelfiltration eluierte (Abbildung 53a), konnte in zwei weiteren Aufreinigungen das Rieske-Protein immer nur in stark unterrepräsentiertem Anteil beobachtet werden (nicht gezeigt). Ebenso erstaunlich war die Tatsache, dass das aufgereinigte Protein der ersten Präparation nach einigen Monaten der Lagerung bei -80 °C ebenfalls eine deutlich verringerte Rieske-Bande zeigte (Abbildung 53a). Ein Effekt der unterschiedlichen Anfärbbarkeit in der Coomassie- oder Silberfärbung konnte ausgeschlossen werden,

beide Methoden lieferten für die gelagerte Probe das gleiche Bild. Im Western Blot ließ sich das ISP auch nicht an anderer Stelle im Gel, etwa in Form von Aggregaten oder proteolytischer Fragmente nachweisen. Entweder es handelt sich bei der in der ersten Aufreinigung anfänglich beobachteten intensiven Rieske-Bande um ein Artefakt, wofür die ansonsten durchgängig niedrigen Anteile dieses Proteins am Western Blot auf Membranebene und bei späteren Aufreinigungen sprechen, oder das ISP dieser Mutante ist ausgesprochen proteasesensitiv und konnte in der ersten Aufreinigung aufgrund schnellerer oder schonenderer Verarbeitung zunächst noch beobachtet werden.



**Abbildung 53 Aufreinigung der ISP-Fünffach-Mutante.** **a** SDS-PAGE (Tricin-Gel, 10 %) nach der DEAE-Chromatographie, nach Gelfiltration (beide Coomassie-gefärbt) und nach mehrmonatiger Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (silbergefärbt). **b** Analytische Gelfiltration (Superose 6) der aufgereinigten Mutante. Gepunktete Linie: Gelfiltration nach DEAE-Säule; durchgezogene Linie: erneute Gelfiltration.

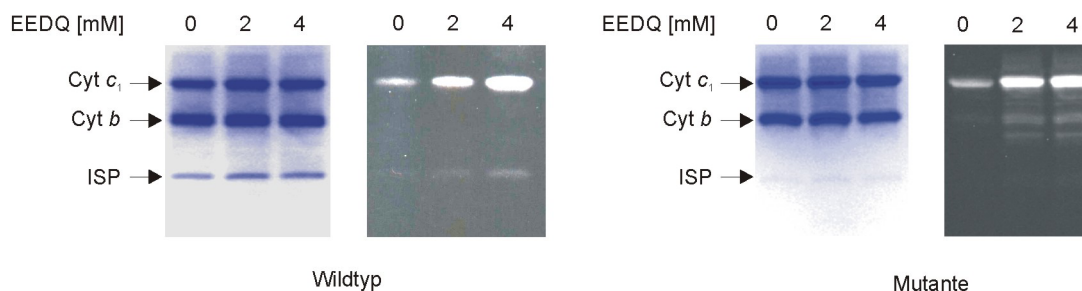
Die molaren Aktivitäten des aufgereinigten Proteins lagen in den verschiedenen Präparationen bei  $10\text{-}25\text{ s}^{-1}$  (Cyt *b*-Monomer-Basis), also bei weniger als 10 % der typischen Wildtyp-Aktivität. Die Aktivität war allerdings weiterhin durch Stigmatellin inhibierbar, also spezifischer Natur. Möglicherweise liegt die intrinsische Aktivität weit höher, wenn man den geringen Anteil an voll assembliertem Komplex berücksichtigt. Ein Hinweis auf die geringe Stabilität der Mutante liefert der starke Verlust an Gesamtaktivität während der Präparation: Definiert man den Membranwert als 100 %, liegt die Gesamtaktivität nach der DEAE-Säule noch bei 54 %, nach der Gelfiltration nur noch bei 16 %. Einen weiteren Hinweis auf raschen Zerfall des Komplexes liefert eine analytische Gelfiltration des ankonzentrierten Enzyms; während bei der

präparativen Gelfiltration noch ein weitgehend homogener *peak* zu beobachten war, zeigt sich im darauffolgenden analytischen Lauf ein deutlicher Zerfall (Abbildung 53b).

Trotz der offenkundigen Defekte der Fünffach-Mutante wurde versucht, diese mit EEDQ zu modifizieren und nach Rekonstitution in Phospholipid-Vesikel Protonenpumpaktivitäten zu messen (Experimente von Tiziana Cocco). Die EEDQ-Modifikation des zur Kontrolle präparierten Wt-Enzyms funktioniert wie beschrieben [112], es kommt also zu einer Bindung an Cytochrom  $c_1$  und das ISP, die sich nach weiterer Behandlung mit 4'-[(amino-acetamido)methyl]fluorescein (AMF) anhand der Fluoreszenz nachweisen lässt (Abbildung 54). In der Mutante ist jedoch keine Fluoreszenzmarkierung des ISP nachweisbar. Dies könnte bedeuten, dass der durch EEDQ modifizierbare Aminosäurerest durch die Mutagenese entfernt wurde. Eine alternative Erklärung wäre, dass es zwar zu einer Modifikation kommt, diese sich aber aufgrund des substöchiometrischen Anteils des Rieske-Proteins nicht nachweisen lässt. Auffällig ist, dass bei der Mutante auch das Cytochrom *b* fluoresziert, ebenso wie eine knapp unterhalb von Cyt *b* laufende Bande, die in der Coomassiefärbung nicht zu sehen ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann nicht gegeben werden, da gleiche EEDQ/Protein-Verhältnisse wie für die Modifikation des Wildtyps eingesetzt wurden, und auch das SDS-PAGE auf gleiche Weise beladen und unter UV-Licht aufgenommen wurde.

Nach Vesikelrekonstitution ließ sich keine Protonentranslokation bestimmen. Die Aktivität der Mutante ist offenbar zu gering für diese Messungen. Neben der niedrigen Aktivität bestand ein weiteres Problem in der falschen Orientierung, mit der die Mutante in die Vesikel eingebaut wird: Während sich für das Wildtyp-Enzym zu 90 % die „physiologische“ Orientierung ergibt, findet sich bei der Mutante reproduzierbar eine Gleichverteilung der beiden möglichen Orientierungen. Die Orientierung wurde bestimmt, indem das in Vesikel eingebaute Enzym zunächst durch Zugabe von Ubihydrochinon reduziert wurde; die Enzymfraktion, deren Cyt  $c_1$  sich daraufhin durch Zugabe von Cyanoferrat reoxidieren lässt, besitzt die „richtige“ Orientierung, da hier das Cytochrom  $c_1$  nach außen gerichtet ist. Möglicherweise weist das mutierte Protein stärkere strukturelle Unterschiede zum Wt auf, die dieses Verhalten erklären. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Experimente mit der Fünffach-Mutante nicht die erhoffte Aussage erbringen können. Die Analyse der anderen Mutanten könnte

möglicherweise sinnvolle Ergebnisse liefern, konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr weiter verfolgt werden.



**Abbildung 54 EEDQ-Modifikation von  $bc_1$ -Wildtyp und Fünffach-Mutante.** SDS-PAGE der mit unterschiedlichen EEDQ-Konzentrationen behandelten Proben. Die Coomassiefärbung ist jeweils einer Aufnahme des AMF-behandelten Gels auf einer dunklen Unterlage unter UV-Licht gegenübergestellt.

### 3.6 FTIR-spektroskopische Untersuchungen am $bc_1$ -Komplex

Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren zeigen die strukturellen Veränderungen auf, die an die Redoxreaktion des  $bc_1$ -Komplexes gekoppelt sind. Die Signale im Differenzspektrum können den Kofaktoren oder dem Chinonsubstrat ebenso wie Veränderungen im Proteinerückgrat oder einzelnen Aminosäureseitenketten zugeschrieben werden. Es wurden definierte Potentialschritte ausgewählt, um die verschiedenen Kofaktoren selektiv anzusprechen und so die Signale im Gesamtspektrum zuordnen zu können. Diese Zuordnung wurde unterstützt, indem lösliche Fragmente des Rieske-Proteins und Cytochrom  $c_1$  und auch das freie Chinon vermessen wurden. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Michaela Ritter und Petra Hellwig am Institut für Biophysik, Universität Frankfurt durchgeführt, die die Aufnahme und detaillierte Zuordnung der Spektren leisteten. Eine ausführlichere Besprechung der Ergebnisse dieser Studie findet sich andernorts [274,275].

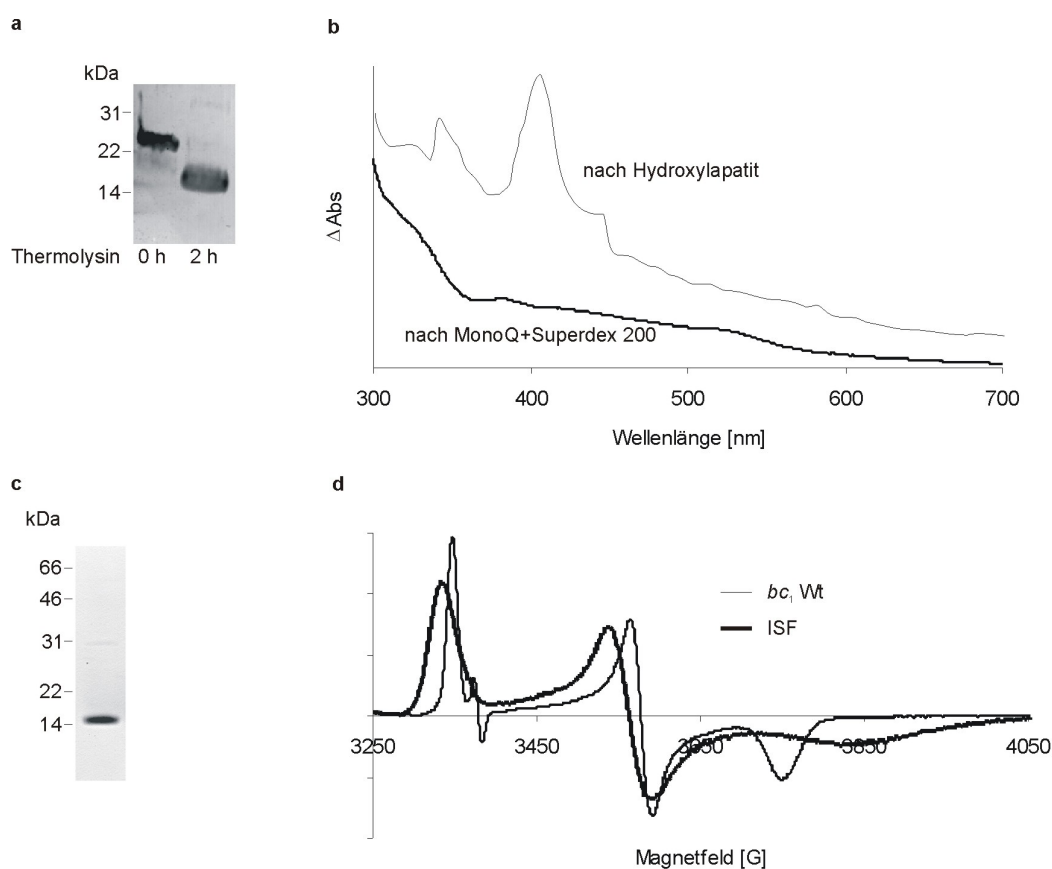
#### 3.6.1 Aufreinigung des $bc_1$ -Komplexes und löslicher Fragmente

Der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex wurde nach der beschriebenen Methode isoliert (Abschnitt 2.3.10) und über eine anschließende Gelfiltration im Standardpuffer für die FTIR-Experimente (100 mM  $KP_i$  pH 7, 150 mM KCl, 0,02 % DDM) äquilibriert. H/D-Austausch, das Einstellen verschiedener pH-Werte und die differentielle Extraktion von Chinon wurden durch wiederholtes Verdünnen im gewünschten Puffer und Ankonzentrieren in Ultrafiltratoren erreicht (Abschnitt 2.4.3). Das lösliche Fragment des Cytochrom  $c_1$ , wie andernorts dargestellt präpariert [198], wurde freundlicherweise von Anna Eichhorn zur Verfügung gestellt.

Um ein lösliches Fragment des Rieske-Proteins (ISF) zu gewinnen, musste ein entsprechendes Aufreinigungsprotokoll etabliert werden, wie im Detail in Abschnitt 2.3.13 dargestellt. Die hier verwendete Aufreinigung orientiert sich an publizierten Protokollen [259,276]. Kurz zusammengefasst, wurde das ISF durch limitierte Proteolyse mit Thermolysin aus dem aufgereinigten Gesamtkomplex freigesetzt. Wie der Western-Blot gegen die Rieske-UE zeigt, erfolgt dieser Schnitt innerhalb von 2 h praktisch quantitativ (Abbildung 55a). Ein Großteil des hydrophoben Restkomplexes konnte an eine Hydroxylapatitsäule gebunden werden, während das ISF im Auftragspuffer eluierte. Wie von Link *et. al.* [259] beschrieben, führt dieser einzelne Chromatographieschritt im Falle des Rinder-ISF bereits zu einem reinen Präparat. Dies war hier nicht der Fall: Im Eluat ist das ISF zwar stark angereichert, das Cyt  $c_1$  stellt aber eine im SDS-PAGE noch sichtbare Verunreinigung dar, die das Vis-Spektrum der Probe aufgrund des deutlich höheren Extinktionskoeffizienten dominiert (Abbildung 55b). Auch eine anschließende Gelfiltration (Superdex 200 oder Superdex 75) alleine führte nicht zur Abtrennung des Cyt  $c_1$ . Aus diesem Grund wurde auf die Hydroxylapatitchromatographie folgend eine MONO Q-Anionenaustauschersäule angeschlossen. Diese dient de Vries *et. al.* [276] als alleiniges Aufreinigungsprinzip, was ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit versucht wurde, wobei aber keine ausreichende Probenreinheit erzielt werden konnte.

Die Kombination beider Trennprinzipien, zusammen mit einer abschließenden Gelfiltration, die vor allem dazu diente, die gewünschte Pufferbedingung einzustellen, lieferte hingegen ein zufriedenstellendes Präparat. Es weist in der Coomassie-Färbung keine Nebenbanden auf (Abbildung 55c), zeigt im UV/Vis-Spektrum das charakteristische Profil für das reduzierte Rieske-Protein, und die Soret-Bande, die die Kontamination durch das Cytochrom anzeigt, ist nicht mehr zu sehen (Abbildung 55b). EPR-spektroskopisch konnte ein intaktes [2Fe-2S]-Cluster nachgewiesen werden; das Spektrum des isolierten Fragments zeigt charakteristische Unterschiede zum Wildtyp-Spektrum im Gesamtkomplex und gleicht eher den Spektren, wie sie nach Zugabe von Stigmatellin zu beobachten sind (Abbildung 55d). Es zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem publizierten ISF-Spektrum [276], aber auch mit den Spektren für Rieskefragmente aus anderen Organismen [259]. Die Ausbeute, ausgehend von 50 mg aufgereinigtem  $bc_1$ -Komplex beträgt 2-3 mg. Mit der theoretisch zu erzielenden Maximalausbeute von 6,3 mg (bei einer errechneten Molekulargewicht des

ISF von 14,6 kDa) ergibt sich somit eine tatsächliche Ausbeute von 30-45 %. Das so gewonnene ISF wurde in einer Konzentration von  $\sim 0,5$  mM für die FTIR-Messungen eingesetzt.

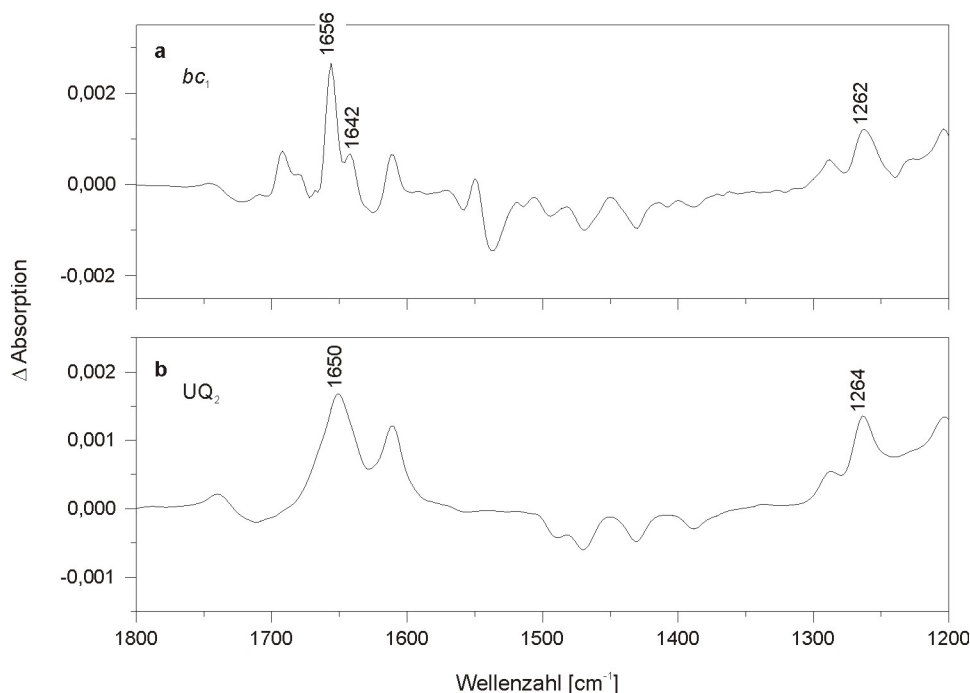


**Abbildung 55** Präparation des löslichen Rieske-Proteinfragments durch limitierte Proteolyse des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes. **a** Western Blot mit einem Antikörper gegen das Rieske-Protein. Linke Bahn: aufgereinigter *bc<sub>1</sub>*-Komplex, rechte Bahn: nach 2 h limitierter Proteolyse mit Thermolysin. **b** UV/Vis-Spektrum der Probe nach Hydroxylapatitchromatographie (dünne Linie) bzw. nach Reinigung über drei Säulen (HPT, Mono Q, Superdex 200; fette Linie). Die Proben wurden ohne vorherige Reduktion oder Oxidation vermessen. **c** SDS-Tricin-PAGE des aufgereinigten ISF nach Coomassiefärbung. **d** ESR-Spektrum des ISF (fette Linie) im Vergleich zum ISP-Spektrum im Gesamtkomplex (dünne Linie). Probenkonzentration je  $\sim 100$   $\mu$ M, Reduktion mit 5 mM Natriumascorbat.

### 3.6.2 Bestimmung der Chinonstöchiometrie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben. Das elektrochemisch induzierte (oxidiert minus reduziert)-Differenzspektrum des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes wurde für einen Potentialsprung von -292 bis 708 mV (bezüglich der Normalwasserstoffelektrode) aufgenommen. Positive Signale im Differenzspektrum sind mit dem oxidierten Zustand des Proteins assoziiert, negative Signale mit dem reduzierten Zustand. Auffallenderweise wird das Spektrum durch die Signale des

Substratmoleküls Chinon dominiert. Die Zuordnung ist über den Vergleich mit isoliertem Chinon in Lösung möglich (Abbildung 56).



**Abbildung 56** Oxidiert-minus-reduziert FTIR-Differenzspektren des  $bc_1$ -Komplexes für einen Potentialsprung von  $-292$  bis  $+708$  mV. **a**  $bc_1$ -Komplex; **b** freies  $UQ_2$  in wässriger Lösung.

#### Bestimmung der Extinktionskoeffizienten für Chinon und Enzym

Das Chinon sollte über die Absorption der Methoxy-Seitenkette bei  $1262\text{ cm}^{-1}$  quantifiziert werden; dieses Signal ist weitgehend davon unbeeinflusst, ob es sich um freies oder proteingebundenes Chinon handelt. Zur Quantifizierung musste ein Extinktionskoeffizient für diese Schwingung ermittelt werden. Dazu wurde die Absorption verschiedener  $UQ_{10}$ -Lösungen bekannter Konzentration gemessen - aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit in Tetrahydrofuran. Über das Lambert-Beersche-Gesetz konnte aus der Steigung der Messgeraden ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 0,4\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt werden (nicht gezeigt). Denselben Wert lieferten kurzkettige Chinone in wässriger Lösung, ein Beleg für die Insensitivität der Methoxy-Schwingung hinsichtlich der Molekülumgebung.

Um aus den so bestimmaren Chinonkonzentrationen eine Bindungsstöchiometrie zu erhalten, müssen sie mit der molaren Enzymkonzentration ins Verhältnis gesetzt werden. Diese wird üblicherweise über die Absorption der  $\alpha$ -Bande im Redox-Differenzspektrum bestimmt. Jedoch waren aus der Literatur keine Extinktionskoeffizienten für den  $bc_1$ -Komplex von *P. denitrificans* bekannt, so dass



auch hierfür Werte bestimmt werden mussten. Prinzipiell ist dies sehr einfach möglich, indem man zunächst von einem Aliquot einer Proteinprobe ein Pyridinhämochrom-Spektrum misst. Unter diesen denaturierenden Bedingungen sind die Häm-Absorptionen von der Proteinumgebung unabhängig. Anhand bekannter Extinktionskoeffizienten für die Pyridinhämochrome lässt sich die Konzentration der Probe über das Lambert-Beersche Gesetz ermitteln. Anschließend wird ein zweites Aliquot des Proteins unter nativen Bedingungen vermessen. Da nun die Konzentration bekannt ist, lassen sich hier Extinktionskoeffizienten für die nativen Cytochrome ermitteln. Das Problem im Falle des  $bc_1$ -Komplexes besteht in der weitgehenden Überlagerung der Pyridinspektren von Häm  $b$  und Häm  $c$  mit den jeweiligen Maxima bei 556,4 bzw. 549,9 nm. Zur Lösung dieses Problems wurde nach einer von Berry und Trumpower [244] vorgeschlagenen Methode vorgegangen. Das Pyridinspektrum des  $bc_1$ -Komplexes wurde bei 11 ausgewählten Wellenlängen durch eine Linearkombination der Pyridinspektren der Einzelkomponenten gemäß dem Gauss-Markov-Theorem simuliert:

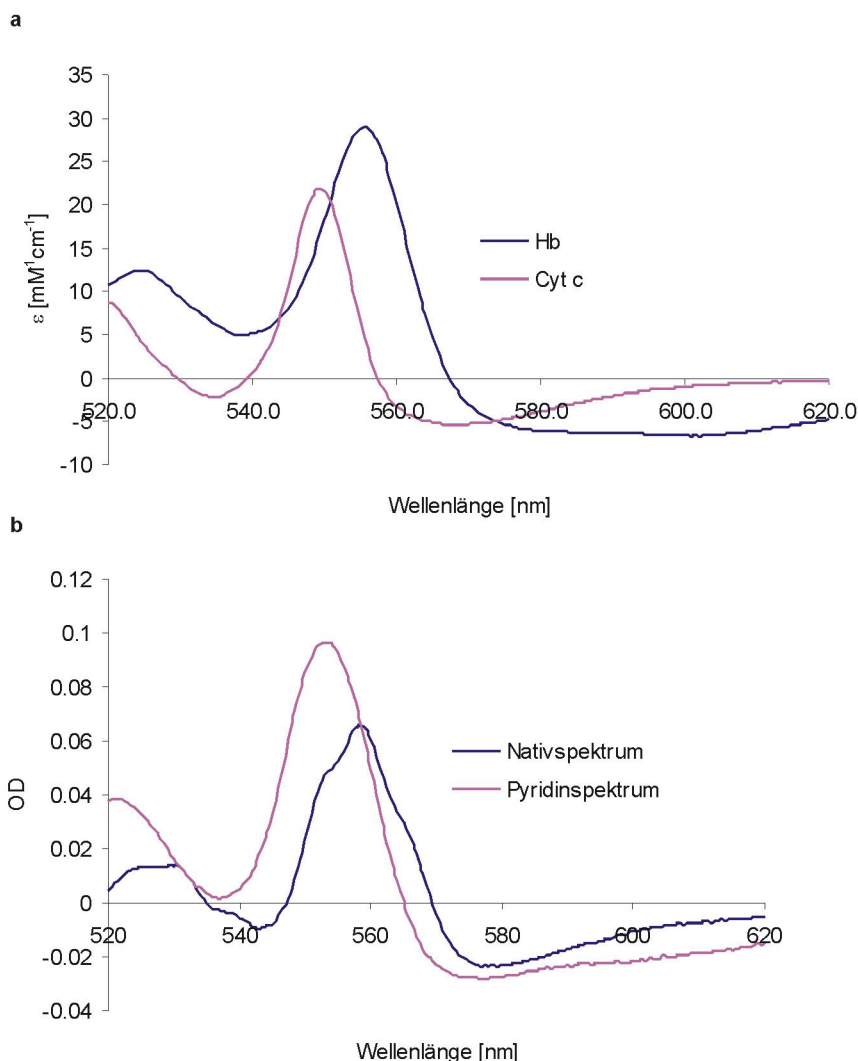
$$C_{bf} = [(M^T M)^{-1} M^T] A$$

$C_{bf}$ : Vektor |  $c_1$   $c_2$  | der „best fit“-Konzentrationen der beiden Einzelkomponenten

M: Matrix  $\begin{vmatrix} \varepsilon_{1,1} & \dots & \varepsilon_{1,11} \\ \varepsilon_{2,1} & \dots & \varepsilon_{2,11} \end{vmatrix}$  der Extinktionskoeffizienten

A: Vektor |  $A_1$  ...  $A_{11}$  | der Absorptionwerte

Zur Lösung dieses Gleichungssystems wurde die Software Maple benutzt. Für die benötigten Referenzspektren wurden Pyridin-Hämochrome von Pferde-Cytochrom  $c$  (für Häm  $c$ ) und Rinder-Hämoglobin (für Häm  $b$ ) vermessen (Abbildung 57a). Für den  $bc_1$ -Komplex wurden von zwei verschiedenen Präparationen jeweils Pyridin- und Nativspektren gemessen (Abbildung 57b).



**Abbildung 57 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten für den  $bc_1$ -Komplex anhand von Pyridinhämochrom-Spektren.** **a** Normierte Pyridinhämochrom-red-minus-ox-Differenzspektren für die isolierten Referenzkomponenten Häm  $b$  und  $c$ . Es wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 5 mg/ml Hämoglobin bzw. einer 0,5 mM Cyt  $c$  Stammlösung auf 3 ml 50 mM NaOH, 20 % Pyridin eingesetzt. **b** Pyridinhämochrom- und native red-minus-ox-Differenzspektren für den  $bc_1$ -Komplex. Eine konzentrierte Enzymprobe wurde 1:10 in 20 mM  $\text{KP}_i$ , 400 mM NaCl, 0,02 % DDM, pH 8 verdünnt. Von der Verdünnung wurden für die Nativspektren 100  $\mu\text{l}$  in 0,9 ml des gleichen Puffers aufgenommen, für die denaturierenden Spektren in 0,9 ml des Pyridinspektren-Puffers.

Für den Extinktionskoeffizient von Häm  $b$  im nativen *Paracoccus*- $bc_1$ -Komplex ergibt sich aus diesen Messungen  $\epsilon_{b(560-574 \text{ nm})} = 29,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; für Häm  $c$  im Cytochrom  $c_1$   $\epsilon_{c(553-540 \text{ nm})} = 23,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . (Man beachte, dass ein Cytochrom  $b$  zwei  $b$ -Häme enthält, sich bezogen auf das Cytochrom  $b$  hier also ein Extinktionskoeffizient von  $58,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ergibt; dieser Punkt sorgt gelegentlich für Verwirrung.) Der Wert für Häm  $b$  liegt im Bereich der für  $bc_1$ -Komplexe anderer Organismen publizierten Werte, wenn auch eher am oberen Limit (Berden *et. al.* 1970:  $25,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Rieske *et. al.*

1962/Vanneste *et. al.* 1966:  $28,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Der Häm *c*-Wert überschreitet bisher publizierte Werte um etwa 10 %, wobei auch hier eine gewisse Varianz zu verzeichnen ist (Yu *et. al.* 1974:  $17,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Berden *et. al.* 1970:  $20,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Es zeigt sich zusammenfassend, dass die für das *Paracoccus*-Enzym ermittelten Extinktionskoeffizienten in etwa den bekannten Werten für eukaryotische Komplexe entsprechen.

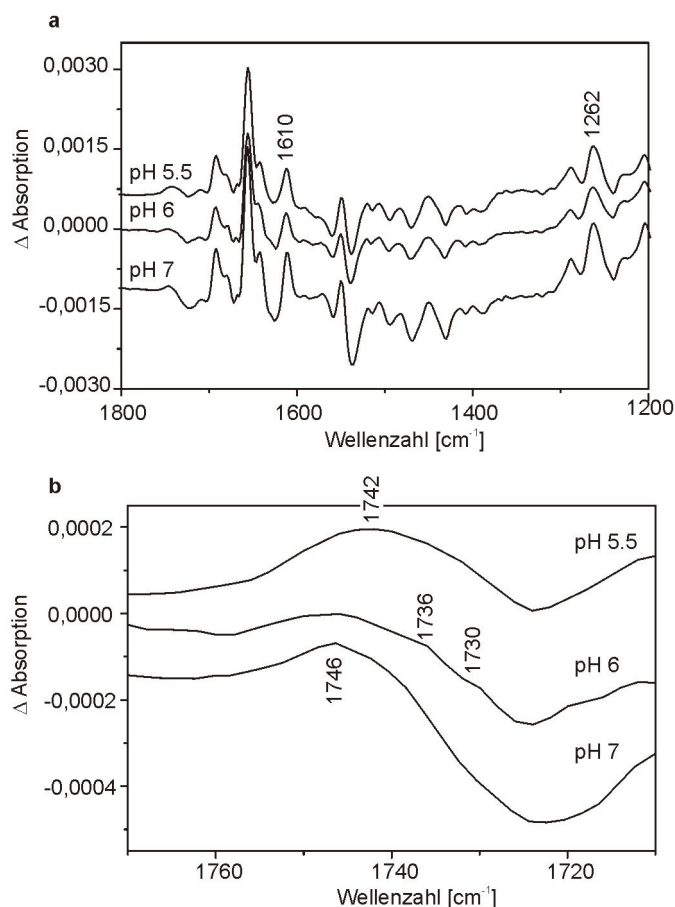
#### Ermittlung der Chinonstöchiometrie

Unter Anwendung der ermittelten Extinktionskoeffizienten ergibt sich auf der Basis der Absorption bei  $1262 \text{ cm}^{-1}$  und normiert auf die molare  $bc_1$ -Konzentration für verschiedene Proben eine Chinon-Bindungsstöchiometrie von 2,6 bis 3,3 Molekülen pro Monomer. Der untere Wert wird bei Extraktion von Chinon durch extensives Umpuffern und Ankonzentrieren erreicht, der obere Wert entspricht dem Gehalt nach Präparation über DEAE-Säule, Gelfiltration und einmaligen Ankonzentrieren. Die Aufspaltung der C=O-Vibration auf zwei Banden bei  $1656$  und  $1642 \text{ cm}^{-1}$  ist indikativ für spezifisch gebundenes Chinon, ebenso wie die im Vergleich zu freiem Chinon schärferen Banden (Abbildung 56), so dass größere Anteile von unspezifisch gebundenem Chinon ausgeschlossen werden können. Die beobachtete Stöchiometrie stützt damit das *double occupancy*-Modell, demzufolge zwei Chinonspezies am  $Q_o$ -Zentrum binden sollen [87]. Dieses Modell postuliert, dass eines dieser beiden Chinone schwach bindet und leicht entfernt werden kann. Die am *Paracoccus*-Enzym beobachtete Extrahierbarkeit von  $\sim 1$  Chinonmolekül stützt auch diese Annahme.

#### 3.6.3 Protonierung von Aminosäureseitenketten in Abhängigkeit von der Chinonbindung

Oberhalb von  $1710 \text{ cm}^{-1}$  werden im FTIR-Spektrum ausschließlich Beiträge der Aminosäureseitenketten von Glutaminsäure oder Asparaginsäure erwartet. Verschiedene Signale in dieser Region des Redoxdifferenzspektrums belegen, dass solche Reste an der Enzymreaktion beteiligt sind. Messungen bei verschiedenen pH-Werten sollten hierüber zusätzliche Informationen liefern (Abbildung 58). Wie eine Vergrößerung dieses spektralen Bereichs zeigt, kommt es abhängig vom pH-Wert zu einem veränderten Protonierungsmuster (Abbildung 58b): Bei pH 7 repräsentiert ein *peak* bei  $1746 \text{ cm}^{-1}$  eine protonierte Gruppe; bei pH 6 wird diese Bande breiter und zwei Schultern bei  $1736$  und  $1730 \text{ cm}^{-1}$  treten auf; bei pH 5,5 schließlich ist das Maximum der weiter verbreiterten Bande zu  $1742 \text{ cm}^{-1}$  mit einer Schulter bei  $1734 \text{ cm}^{-1}$

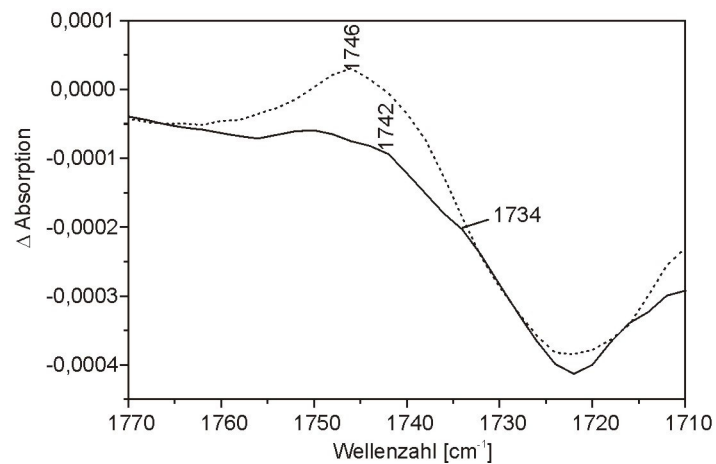
verschoben. Interessanterweise korrelieren diese Veränderungen mit einem verringerten Chinongehalt, erkennbar z.B. an der Signalabnahme bei 1610 und 1262  $\text{cm}^{-1}$ .



**Abbildung 58 pH-Abhängigkeit der FTIR-Spektren des  $bc_1$ -Komplexes.** Oxidiert-minus-reduziert FTIR-Differenzspektren für einen Potentialsprung von -292 bis +708 mV in Phosphatpuffer (pH 6 und 7) und Cacodylatpuffer (pH 5,5). Das Fenster zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Spektralbereichs von 1770-1710  $\text{cm}^{-1}$ . Die Spektren wurden anhand der  $\alpha$ -Bande im sichtbaren Bereich normalisiert.

Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurden Proben mit unterschiedlichem Chinongehalt bei gleichem pH untersucht (Abbildung 59). Proben mit hohem Chinongehalt zeigen ein Signal bei 1746  $\text{cm}^{-1}$ . Bei Proben, aus denen das Chinon partiell extrahiert wurde, verschwindet dieses Signal und zwei *peaks* bei 1742 und 1734  $\text{cm}^{-1}$  treten auf. Das Bild entspricht den Veränderungen, die beim Wechsel von pH 7 auf pH 5,5 zu beobachten waren. Dies lässt folgende Schlüsse zu: (i) bei der Bindung an das Enzym beeinflusst das Chinon eine oder mehrere saure Seitenketten. (ii) das Signal bei 1746  $\text{cm}^{-1}$  ist indikativ für einen hohen Chinongehalt, die Signale bei 1742 und 1734  $\text{cm}^{-1}$  treten erst auf, wenn  $\sim 1$  Chinon pro  $bc_1$ -Monomer extrahiert wurde. (iii) die Chinonbindung ist pH-abhängig; saure pH-Werte verringern den Chinongehalt der Probe. Diese Beobachtungen sind insofern von großem Interesse, als

die Kristallstrukturen eukaryotischer Komplexe zeigen, dass an beiden Zentren saure Reste an der Bindung von Substrat (an  $Q_i$ ) oder zumindest Inhibitor ( $Q_o$ ) beteiligt sind [48].



**Abbildung 59 FTIR-Spektren vor und nach Chinonextraktion aus dem  $bc_1$ -Komplex.** Oxidiert-minus-reduziert FTIR-Differenzspektren für einen Potentialsprung von -292 bis +708 mV bei pH 7. Die gepunktete Linie repräsentiert die Probe mit hohem Chinongehalt, die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum nach Chinonextraktion. Gezeigt ist nur der für saure Aminosäurereste indikative Spektralbereich in starker Vergrößerung. Die Spektren wurden anhand der  $\alpha$ -Bande im sichtbaren Bereich normalisiert.



## 4 Diskussion

Der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex wird als zentrales Glied der „kanonischen“ mitochondrialen Atmungskette seit über drei Jahrzehnten intensiv untersucht; derzeit liegen über 1500 publizierte Arbeiten zu diesem Enzym vor (NML Medline). Die Motivation, den  $bc_1$ -Komplex zu erforschen, liegt zum einen darin, den faszinierenden Mechanismus der energetischen Kopplung von Elektronentransport und Protonentranslokation über die innere Mitochondrienmembran zu verstehen. Zum anderen ergeben sich für den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex eine Reihe relevanter Anwendungsbezüge: als Angriffspunkt für Fungizide [32]; als Malariatarget [33,34]; als vermutete Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [113]. Als prinzipieller Reaktionsmechanismus ist der sogenannte Q-Zyklus [83] allgemein anerkannt. Wichtige Details dieses Mechanismus sind jedoch weiterhin nicht verstanden, insbesondere das zentrale Ereignis der Chinoxidation am  $Q_o$ -Zentrum, bei dem die beiden Substratelektronen scheinbar entgegen thermodynamischer „Erwartungen“ obligat getrennte Wege einschlagen. Schon alleine die Zahl der an  $Q_o$  gebundenen Substratmoleküle ist Gegenstand lebhafter Kontroversen [97]. Ein weiterer ungeklärter Aspekt ist der Weg der Protonenaufnahme und -abgabe an den beiden Chinonbindungszentren.

Ende der 90er Jahre konnten die Strukturen mitochondrialer  $bc_1$ -Komplexe mit röntgenkristallographischen Mitteln aufgeklärt werden (z.B. [47]). Seit kurzem sind auch zwei Strukturen des homologen  $b_6f$ -Komplexes bekannt [53,52]. Die Struktur eines bakteriellen  $bc_1$ -Komplexes steht jedoch weiterhin aus. Diese „Minimalkomplexe“, die typischerweise nur aus den drei katalytischen UE bestehen, sind besonders interessant, da ihre einfache genetische Zugänglichkeit in besonderem Maße die Untersuchung von Struktur/Funktionsbeziehungen ermöglichen würde. Als Modell bietet sich der Komplex von *P. denitrificans* an, einem Organismus, der als möglicher evolutionärer Vorläufer heutiger Mitochondrien angesehen wird [8]. In dieser Arbeit sollten deshalb Ansätze gefunden werden, um an strukturelle Informationen über das *Paracoccus*-Enzym zu gelangen. Im Zuge dieser Arbeiten wurde auch der Mechanismus der Membranintegration der Rieske-Untereinheit untersucht. Des Weiteren wurden in Kooperationsprojekten die funktionelle Aspekte der Chinonbindung und der Protonentranslokation bearbeitet.

Ein aktuell vielbeachtetes Thema ist die strukturell-funktionelle Kompartimentalisierung innerhalb biologischer Membranen [277]. Auch für mitochondriale Atmungskettenkomplexe wurde die Ausbildung eines Superkomplexes beobachtet [22]. Angeregt durch diese Erkenntnisse wurde daher in dieser Arbeit die Assoziation des *Paracoccus-bc<sub>1</sub>*-Komplexes mit anderen Komponenten der bakteriellen Atmungskette untersucht.

#### 4.1 Wege zur Strukturaufklärung: Rieske-Modul und Ko-Komplex von F<sub>v</sub>-Fragment und Cytochrom bc<sub>1</sub>

Eine Strategie, an strukturelle (Teil-)Informationen über Membranproteine zu gelangen, ist die Klonierung, Expression und Charakterisierung löslicher Module. Diese Strategie wurde beispielsweise erfolgreich im Fall der hydrophilen Ektodomäne der Cytochrom-Oxidase UE 2 angewandt [278]. Vorteile sind in der Regel eine höhere Ausbeute und eine einfachere Handhabung gegenüber den integralen Membranproteinen. Die strukturelle und kinetische Untersuchung der Wechselwirkungen solcher Module ist mittels NMR-Spektroskopie bzw. *stopped-flow*-Methoden praktikabel [279,280]. Störende Effekte von Detergenzien, die z.B. mit der Interaktion zweier Proteine interferieren könnten, sind ausgeschlossen. Für den *Paracoccus-bc<sub>1</sub>*-Komplex wurde eine Charakterisierung der hydrophilen Domäne der Cyt c<sub>1</sub>-UE bereits unternommen [198]. In der vorliegenden Arbeit wurde die katalytische Domäne des Rieske-Proteins (*iron sulfur protein fragment*, ISF) kloniert und exprimiert. Ein bereits vorher abzusehende Schwierigkeit bestand im Einbau des [2Fe-2S]-Zentrums im heterologen Wirt *E. coli*, der physiologischerweise keine Rieske-Metallzentren produziert. Eine Strategie bestand deshalb in der Aufreinigung des Apo-Proteins, seiner Rückfaltung und Rekonstitution. Ein alternativer Ansatz war die biotechnologische Modifikation der Wirtszellen, um so die *in vivo*-Assemblierung des Metallzentrums zu erreichen. Außerdem wurde die homologe Überexpression in *P. denitrificans* versucht, sowohl mit dem Protein voller Länge als auch mit löslichen Fragmenten. Dies geschah nicht zuletzt mit der Zielsetzung, den vermuteten biologischen Weg der Membranintegration über den *twin arginine translocation pathway* (Tat-Weg) zu überprüfen.

Die Alternative zur Charakterisierung löslicher Module besteht in der Kristallisation und röntgenkristallographischen Untersuchung des gesamten Membranproteins. Die hauptsächliche Schwierigkeit liegt dabei in der überwiegend hydrophoben Oberfläche



von Membranproteinen und ihres Detergenzgürtels, was der Ausbildung von Kristallkontakten im Weg steht. Eine Strategie, diese Limitierung zu überwinden, besteht in der Kokristallisation mit monoklonalen Antikörperfragmenten, die native Epitope des Membranproteins erkennen und durch ihre hydrophile Natur Kristallkontakte vermitteln [268]. Frühere Versuche, für die Kokristallisation mit dem Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex von *P. denitrificans* geeignete monoklonale Antikörper zu gewinnen, waren ohne Erfolg [199]. Ebenso wenig gelang die konventionelle Kristallisation ohne Unterstützung eines Antikörpers, vermutlich nicht zuletzt bedingt durch einen partiellen Verlust der Rieske-UE und ein somit inhomogenes Ausgangsmaterial (Carola Hunte, persönliche Mitteilung). Dahingegen gelang es im Falle des Hefekomplexes, ein geeignetes F<sub>v</sub>-Fragment zu gewinnen, mit dem das Enzym kristallisiert und seine Struktur bis zu einer Auflösung von 2,3 Å bestimmt werden konnte [48]. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, das Hefe-Antikörperfragment auch für die Kristallisation des *Paracoccus*-Enzyms nutzbar zu machen. Dafür sollte die Antikörper-Antigen-Bindung im Hefe-Kokristall genau charakterisiert werden, anschließend die homologen Bereiche im bakteriellen Protein identifiziert und die Epitopregion durch geeignete Aminosäureaustausche „transplantiert“ werden.

#### 4.1.1 Rekonstitution des Rieske-Holo-Proteins

Für die Expression des Rieske-Moduls in *E. coli* wurden für das bovine wie das bakterielle Protein drei Konstruktvarianten erzeugt. Das reine Strukturgen konnte nicht überexprimiert werden und ließ sich nur im Falle des *Paracoccus*-Proteins immunologisch nachweisen. Die Expression konnte auch durch die Wahl eines anderen Vektorsystems nicht verbessert werden. Das zur Kontrolle auf analoge Weise klonierte grün fluoreszierende Protein (GFP) lieferte hingegen eine deutliche Überexpressionsbande im SDS-PAGE. Unklar ist, ob die schwache Expression des ISF auf eine Instabilität des Transkripts zurückzuführen ist oder ob das Translationsprodukt bzw. das Apo-Protein rasch abgebaut werden. Das durch limitierte Proteolyse gewonnene Rieske-Fragment entspricht in seiner Primärsequenz dem Überexpressionskonstrukt bis auf wenige N-terminale Aminosäure und erweist sich als sehr stabiles, gegenüber Proteasen unempfindliches Protein [259]. Würde das heterolog exprimierte ISF die Stufe des Holo-Proteins erreichen, sollte es sich daher auch um ein stabiles Protein handeln. Andererseits ist bekannt, dass die N-terminalen Reste

determinierend für die Lebensdauer eines Proteins sein können [281] und dass hier möglicherweise eine unglückliche Wahl in der Auswahl der N-terminalen Flanke getroffen wurde. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Holton *et. al.* das Rieske-Protein von *Nostoc sp.* in voller Länge überexprimieren konnten, für ein N-terminal trunkiertes Konstrukt jedoch auch nur minimale Expression beobachteten [156].

Die beiden anderen Konstruktvarianten lieferten für das bakterielle wie für das Rinderprotein eine starke Überexpression (Abbildung 8, Abbildung 10); von der Bandenintensität im SDS-PAGE sind mehr als 100 mg der überexprimierten Proteine pro Liter Kulturenmedium abzuschätzen. Die Löslichkeitsanalyse und Zellfraktionierung zeigte, dass es sich dabei zu > 95 % um unlösliches Protein handelt, das sich im Cytosol in Form von *inclusion bodies* ablagert. Für das Fusionsprotein mit dem TorA-Signalpeptid ist im SDS-PAGE und immunologisch nur eine Bande nachweisbar, die anhand der Laufhöhe eindeutig das nicht prozessierte Protein darstellt. Der Export über das Tat-System schlägt also fehl. Zahlreiche Arbeiten - auch mit dem TorA-Signalpeptid - demonstrieren, dass ein Fusionsansatz prinzipiell praktikabel ist und verschiedene Proteine wie etwa GFP als Chimäre über das Tat-System exportiert werden können [255]. Andererseits sind Beispiele bekannt, in denen Tat-Signalpeptide nicht beliebig austauschbar sind, wo also eine Spezifität für das zu transportierende Protein besteht [282]. Vielleicht werden für die Faltung und/oder den Kofaktoreinbau bestimmte Chaperone benötigt, die über Sequenzelemente des Signalpeptids ihr Substratprotein erkennen. In diesem Falle müsste das Rieske-Protein für den Export also das Rieske-spezifische Signalpeptid mitbringen. Möglicherweise verhindert auch eine „Korrekturlesefunktion“, die die Anwesenheit des Kofaktors überprüft, den erfolgreichen Export [283]. Eine dritte Erklärung besteht darin, dass das ISF zu rasch zu *inclusion bodies* aggregiert und damit nicht in den Tat-Weg münden kann, der Proteine in gefalteter Form transportiert [284]. Die Ablagerung in *inclusion bodies* ließ sich mit den gängigen Variationen der Anzuchtbedingungen ebenso wenig beeinflussen wie durch die Wahl eines Expressionswirtes mit verändertem Disulfidmetabolismus.

Der erfolgversprechendste Ansatz erschien daher, das stark überexprimierte ISF mit N-terminalem His-tag (H6-ISF) in Form von *inclusion bodies* zu isolieren, zu solubilisieren und rückzufalten, um schließlich das Holo-Protein durch Rekonstitution des [2Fe-2S]-Clusters zu gewinnen. Dieser Ansatz wurde nur mit dem *Paracoccus*-

Protein versucht, die bovine Variante wurde nicht weiter verfolgt. Die *inclusion bodies* konnten gut angereichert werden (Abbildung 14). Ein klares und homogenes Solubilisat konnte nur unter reduzierenden Bedingungen mit 8 M GdHCl und längerer Inkubation bei 50 °C erzielt werden. Mildere Solubilisierungsbedingungen führten entweder zu einer trüben Lösung oder zu klaren Solubilisaten, die aber bei der anschließenden NiNTA-Chromatographie deutliche Inhomogenitäten zeigten, also Multimere oder Aggregate, die möglicherweise auf Disulfidverbrückung zurückzuführen sind (Abbildung 16). Mit der beschriebenen Solubilisierung und anschließenden Chromatographie konnte hingegen monodisperses und hochreines Protein in einer Ausbeute von 110 mg/l Kultur gewonnen werden.

Das aufgereinigte Protein H6-ISF wurde anschließend mit verschiedenen Methoden rückgefaltet, die alle eine vergleichbare Ausbeute von ~ 70 % löslichem Protein lieferten. Nach Angaben aus Übersichtsartikeln zu schließen, ist dies eine sehr gute Ausbeute [256]. Dazu trägt wahrscheinlich bei, dass es sich um ein vergleichsweise kleines Protein handelt. Allerdings ist die Löslichkeit zwar ein guter Indikator, jedoch kein hinreichendes Kriterium für ein korrekt rückgefaltetes Protein. Die Proben wurden aus diesem Grunde über native Gelelektrophorese, analytische Gelfiltration und CD-Spektroskopie untersucht. In der nativen PAGE zeigten die rückgefalteten ISF-Proben eine Leiter in der oberen Hälfte des Gels, während das durch limitierte Proteolyse gewonnene native Referenz-ISF eine distinkte Bande in der unteren Hälfte des Gels liefert (Abbildung 19). Der Einsatz stark reduzierender Bedingungen verändert diese Bild nicht, so dass es sich nicht wie zunächst vermutet um disulfidverbrückte Multimere handelt. In der Literatur wurde für verschiedene Proteine ein ähnliches Laufverhalten im Nativgel beschrieben und als Hinweis auf eine mobile Konformation oder partiell ungefaltete Bereiche interpretiert [285,286]. Es ist suggestiv, in diesem Zusammenhang an die noch leere Clusterbindedomäne des ISF zu denken. In diese Richtung weist auch der Befund, dass sich bei den Rekonstitutionsversuchen (siehe unten) neben der weiterhin vorhandenen Leiter eine einzelne Bande zeigt, die zu ähnlicher Weite läuft wie das native Referenzprotein (Abbildung 23). Die Gelfiltration liefert im Gegensatz zur nativen PAGE ein differenzierteres Bild. Es finden sich zwei verschiedene *peaks*, einer mit geringem Elutionsvolumen, also von apparent hohem Molekulargewicht, und ein zweiter mit einem ähnlichen Elutionsvolumen wie das native Referenzprotein. Die Fraktion mit apparent höherem Molekulargewicht dominiert bei Proben, die durch

langsames Entfernen des Chaotrops rückgefaltet wurden, bei raschem Entfernen dominiert die apparent niedermolekulare Fraktion (Abbildung 19). Möglicherweise spiegeln die beiden Fraktionen auch hier eine konformationelle Dynamik oder partielle Entfaltung wieder, allerdings liefern die verschiedenen Methoden der Rückfaltung unterschiedliche Ergebnisse. Wenn man die apparent niedermolekulare Fraktion mit der „richtigen“ Konformation assoziiert, erscheinen schnelle Rückfaltungsverfahren überlegen zu sein, was generell häufig der Fall ist [258]. Von einer rückgefalteten - jedoch bereits rekonstituierten - Probe wurde ein CD-Spektrum aufgenommen, das eine vergleichbare Signatur für die Sekundärstruktur zeigt wie das native bovine ISF [259]. Da die Rekonstitution nur zu einem geringen Prozentsatz erfolgreich ist (siehe unten), kann davon ausgegangen werden, dass das reine Apo-Protein ein ähnliches Bild liefert.

Mit den auf verschiedenen Wegen rückgefalteten Proteinen wurde eine chemische *in vitro*-Rekonstitution des [2Fe-2S]-Clusters versucht [166]. Alternativ wurde eine Rückfaltung durch Verdünnen mit *gleichzeitigem* Einbau des Clusters erprobt, wie andernorts beschrieben [156]. Letztere Strategie lieferte mit rund 1,5 % die beste Ausbeute an Holo-Protein. Die Ausbeute wurde anhand der EPR-Spektren der rekonstituierten Proben durch Vergleich mit dem nativen Referenz-ISF ermittelt (Tabelle 3). Dies legt den Schluß nahe, dass das Cluster besser während als nach der Faltung des Proteins eingebaut werden kann. Dass die rasche Rückfaltung ein „besseres“ Ausgangsmaterial liefert als die Rückfaltung durch graduelles Entfernen des Chaotrops, hat sich hier nicht bestätigt: Rückfaltung durch Verdünnen und anschließende Rekonstitution lieferte eine schlechtere Ausbeute als die Rekonstitution nach Rückfaltung durch Dialyse. Des Weiteren zeigen die Versuche, dass die Rekonstitutionsausbeute wesentlich von der vorherigen Aufreinigung des Proteins abhängig ist: Wurde die gleichzeitige Rückfaltung und Rekonstitution ausgehend von einem groben Zellysat bzw. von einer ungewaschenen *inclusion body*-Fraktion versucht, bewegten sich die Rekonstitutionsausbeuten lediglich im Promillebereich (Abbildung 22). Dieser Befund ist im Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren, sowohl was Rieske-Proteine [183,185] als auch andere Fe-S-Proteine [168] betrifft, auch wenn gelegentlich gute Rekonstitutionsausbeuten ausgehend von groben Lysaten berichtet wurden [156]. Dabei bleibt unklar, ob sich die geringe Reinheit der Probe negativ auf die Rückfaltung, die Rekonstitution oder beide Prozesse auswirkt. Ein

starker Einfluss der Probenreinheit wird in Übersichtsartikeln zur Proteinrückfaltung häufig genannt [287].

Da die Ausbeute des bislang günstigsten Verfahrens immer noch unbefriedigend ist, wurde eine Optimierung dieses Protokolls versucht. Als vermeintlich kritische Parameter wurden insbesondere die auffällige Schwarzfärbung angesehen, die sich im Laufe von etwa 15 min nach der Zugabe der Eisen- und Schwefelsalze ausbildet. Diese Färbung, die mit einem unlöslichen Präzipitat einhergeht, lässt auf die Bildung von Eisensulfiden schließen, die möglicherweise mit der Bildung von Fe-S-Clustern kompetitiert. Die Schwarzfärbung des Rekonstitutionsansatzes wird häufig in der Literatur erwähnt, jedoch meist nicht weiter diskutiert [288,178]. Die Entwickler des Protokolls der gleichzeitigen Rückfaltung und Rekonstitution sind jedoch der Ansicht, dass diese Sulfidbildung auf jeden Fall vermieden werden müsse (Toivo Kallas, persönliche Mitteilung), ohne jedoch konkrete Parameter benennen zu können, die darauf Einfluss nehmen.

Von daher wurden eine Reihe von Versuchsbedingungen - Grad der Anaerobiose, Temperatur, pH-Wert, Puffersubstanzen, Reagenzien, Reaktionszeiten - systematisch variiert und auf ihren Einfluss hinsichtlich der Präzipitatbildung untersucht (Abschnitt 3.1.6). Es zeigt sich, dass allein eine frühere Zugabe von Natriumsulfid - Holton *et. al.* [156] sehen eine 30-minütige Präinkubationszeit vor - zu der Mischung aus Proteinsolubilisat,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Eisen(III)-chlorid die Schwarzfärbung des Ansatzes verhindert. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass viele Rekonstitutionsprotokolle eine gleichzeitige Zugabe der Reagenzien vorsehen [289]. Ein Hinweis auf die Bedeutung des Zugabezeitpunkts war auch die Beobachtung, dass sich nach Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und  $\text{FeCl}_3$  eine intensive rötliche Färbung bildet, die aber im Laufe von 10-20 min weitgehend verblasst. Bei der roten Färbung handelt es sich vermutlich um „Prä-Cluster“ aus vier Mercaptiden mit einem zentralen Eisenatom. Im Zuge der Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  scheinen diese Komplexe wieder zu zerfallen,  $\text{Fe}^{2+}$  steht dann für die Bildung des grünschwarzen, unlöslichen Eisen(II)sulfids  $\text{FeS}$  zur Verfügung [290,291]. Wird das Natriumsulfid zugegeben, solange die Lösung noch deutlich rot ist, entwickelt sich eine intensive rot-braune Färbung. Es ist suggestiv, diese Farbe den gewünschten Fe-S-Clustern zuzuordnen, da konzentrierte Präparationen des nativen Rieske-Proteins die gleiche Färbung aufweisen. Die Entwickler des hier variierten Rekonstitutionsprotokolls bestätigten, dass ein

vielversprechender Rekonstitutionsansatz diese Farbe annimmt (Toivo Kallas, persönliche Mitteilung).

Leider zeigte sich, dass auch mit diesem scheinbar optimierten Protokoll keine günstigere Ausbeute erzielt werden konnte. Der „Flaschenhals“ scheint an anderer Stelle zu liegen. Möglicherweise ist die Struktur des Apo-Proteins nicht gut für den rein chemischen Einbau von [2Fe-2S]-Zentren geeignet und auf enzymatische Hilfsfaktoren oder Chaperone angewiesen. Insbesondere ist dabei an die beiden Cysteinreste zu denken, die in unmittelbarer Nachbarschaft der Clusterliganden liegen und in der nativen Struktur eine Disulfidbrücke ausbilden, die die Clusterbindedomäne stabilisiert [67]. Beim chemischen Einbau kommt es möglicherweise zu einer fehlerhaften Zuordnung der Cysteinreste, die als Clusterliganden dienen sollen, und solchen, die eine Disulfidbrücke ausbilden sollen. Eine mögliche Verbesserung könnten in diesem Zusammenhang sogenannte *redox shuffling*-Systeme bieten, wie sie häufig für die Rückfaltung von Disulfidbrücken tragenden Proteinen eingesetzt werden, also z.B. der kombinierte Einsatz von reduziertem und oxidiertem Glutathion [258].

Eine weitere Alternative ist die enzymgestützte Rekonstitution, wie sie insbesondere in Arbeiten jüngerer Datums zahlreich eingesetzt wurde [173,178,148]. Zuerst wurde diese mit Hilfe des Enzyms Rhodanese beschrieben [170]. Rhodanese ist ein mitochondriales Enzym, das aus Thiosulfat Sulfan-Schwefel freisetzt, der in Gegenwart von Dithiolen zu Sulfid umgesetzt wird. Bemerkenswerterweise wird dieses Enzym durch die Gegenwart von Apo-Fe-S-Proteinen aktiviert, so dass ihm eine chaperonartige Rolle in der Cluster-Biogenese zugeschrieben wurde [171]. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Gencluster entdeckt, deren Genprodukte eine maßgebliche Rolle in Synthese und Einbau von Eisen-Schwefel-Clustern zu spielen scheinen [292]. Die Proteine IscS und NifS katalysieren in diesem Zusammenhang die Freisetzung des Cluster-„Bausteins“ Sulfid aus der Aminosäure Cystein. Diese beiden Enzyme können die *in-vitro*-Rekonstitution verschiedener Apo-Proteine katalysieren. Da sie jedoch nicht kommerziell verfügbar sind, wurde die enzymgestützte Rekonstitution in der vorliegenden Arbeit mit Rhodanese versucht. In einer vergleichenden Arbeit wurden für die Rekonstitution des [2Fe-2S]-Zentrum der Biotin-Synthase alle drei Enzyme eingesetzt und lieferten ähnliche Ausbeuten [177].

Der in dieser Arbeit mit Rhodanese durchgeführte Rekonstitutionsversuch lieferte jedoch ein überraschendes Resultat: Die charakteristische Rieske-EPR-Signatur konnte nicht beobachtet werden, in niedriger Ausbeute scheint jedoch der Einbau eines [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Clusters (Abbildung 24). Die Clusterbindedomäne des ISF scheint also eine - hier unerwünschte - Plastizität zu besitzen, was die Bindung verschiedener Clustertypen betrifft. Auch dies lässt sich plausibel durch die bereits erwähnten überzähligen Cysteinreste erklären. Es ist bekannt, dass unter den reduzierenden Bedingungen des Rekonstitutionsansatzes [4Fe-4S]-Cluster stabiler sind als [2Fe-2S]-Cluster, da erstere aus letzteren durch Reduktion entstehen [293]. Der wahrscheinliche Überschuss an [4Fe-4S]-Clustern würde den Fehleinbau begünstigen. Unklar ist, warum diese Fehlreaktion gerade im enzymgestützten Prozess dominiert. Ein teilweiser Fehleinbau ließ sich jedoch auch in einigen der rein chemischen Rekonstitutionsversuche beobachten (Abbildung 25). Hier wurde durch Inspektion eines weiteren spektralen Bereichs bestätigt, dass es sich beim Nebenprodukt nicht um ein [4Fe-4S]-, sondern um ein [3Fe-4S]-Zentrum handelt. Zusammenfassend erscheint aufgrund der geringen Ausbeute und der schlechten Spezifität die Rekonstitution des Holo-Proteins mit dem Ziel, große Mengen des Proteins für die strukturelle Charakterisierung zu erhalten, eine wenig erfolgversprechende Strategie.

Der Vergleich mit anderen Arbeiten liefert ein sehr heterogenes Bild, sowohl was die Rekonstitution von Fe-S-Proteinen im Allgemeinen als auch die von Rieske- und Rieske-Typ-Proteinen im Besonderen betrifft. Eine detaillierte Übersicht hierzu gibt Abschnitt 1.3.3. Die Ausbeuten fallen sehr unterschiedlich aus, und verschiedene Faktoren könnten hierbei eine Rolle spielen: die Größe des Proteins, seine Fähigkeit, auch als Apo-Protein eine stabile Konformation anzunehmen, die eventuelle Notwendigkeit einer Rückfaltung des Proteins, die Natur des Clusters und dessen Empfindlichkeit etwa gegenüber oxidativer Schädigung. Für das Rieske-Fragment aus *Chlamydomonas* konnten nach chemischer Rekonstitution direkt aus dem Zelllysat Ausbeuten von bis zu 65 % erzielt werden [182], für ein entsprechendes ISF aus *Nostoc* mit einer vergleichbaren Methode nur Ausbeuten von 30 % [156]. Die gleiche Rekonstitutionsmethode hatte beim Spinat-ISF jedoch keinen Erfolg (Toivo Kallas, persönliche Mitteilung). Gubernator *et. al.* versuchten die IscS-gestützte Rekonstitution eines Spinat-ISF, was mit einer Ausbeute von wenigen Prozent gelang, und dies auch nur bei einer bestimmten Rückfaltungsmethode [185]. Schneider *et. al.* benutzten IscS

für die Rekonstitution des *Synechocystis*-Rieske-Proteins [183]. Auch hier liegt die Ausbeute unter 10 %; in dieser Arbeit wurde auch die chemische Rekonstitution versucht und lieferte vergleichbar geringe Ausbeuten (Dirk Schneider, persönliche Mitteilung). Diese Unterschiede zeigen keinen systematischen Zusammenhang auf, ob ein Konstrukt voller Länge (ISP) oder lösliche Fragmente (ISF) eingesetzt wurden. Vielmehr scheint es, dass subtile Unterschiede in der Struktur dieser Proteine über den Erfolg der Rekonstitution entscheiden. Man beachte, dass es sich bei den publizierten Arbeiten ausschließlich um pflanzliche bzw. cyanobakterielle Rieske-Proteine handelt, wo von vornherein geringere Unterschiede zu erwarten sind als zwischen pflanzlichen und  $\alpha$ -proteobakteriellen Rieske-Proteinen.

Eine Vermutung zur schlechten Rekonstitutionsausbeute in dieser Arbeit war, dass das N-terminale His-*tag* mit dem Cluster-Einbau interferiert, indem etwa die Histidine des *tags* mit den eigentlichen Histidin-Liganden wettstreiten. Dies kann nicht ausgeschlossen werden, weshalb auch mehrere Versuche unternommen worden, das reine Strukturgen ohne *tag* in guter Ausbeute zu exprimieren, bzw. das *tag* nachträglich durch limitierte Proteolyse abzuspalten (Abbildung 12). Da dies nicht gelang, kann auch der Einfluss des Affinitäts-*tags* nicht abschließend beurteilt werden. Jedoch spricht gegen einen störenden Einfluss: (i) die räumliche Entfernung des N-Terminus von der Clusterbindedomäne, zumindest in der homologen bovinen ISF-Struktur [67]; (ii) die Tatsache, dass in zahlreichen Arbeiten verschiedene Eisen-Schwefel-Proteine mit His-*tag* exprimiert wurden und entweder direkt *in vivo* ein Holo-Protein bildeten [187] oder in guter Ausbeute rekonstituiert werden konnten [182].

#### 4.1.2 Expression des Rieske-Holo-Proteins

Da ein geringer Prozentsatz des His-getaggten ISF nach Überexpression in der löslichen Fraktion zu finden war, bot sich hier eine mögliche alternative Strategie, das Rieske-Proteinfragment in präparativem Maßstab zu gewinnen. Versuche, das Gleichgewicht bei der Expression zugunsten der löslichen Fraktion zu verschieben, schlugen jedoch bislang fehl. Dabei wurden gängige Parameter (Anzuchttemperatur, Induktionszeitpunkt und -Dauer, Einfluss des Additivs Sorbitol, Wahl verschiedener Wirtsstämme) systematisch variiert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Modifikationen den gewünschten Effekt liefern, wie z.B. ein kurzfristiger Hitzeschock vor der Induktion oder die Zugabe von Ethanol zum Anzuchtmedium [196]. Ein vielversprechender Ansatz wäre sicherlich die Konstruktion von Fusionsproteinen, bei denen der



Fusionspartner die Löslichkeit steigern soll. Hierfür kommen z.B. die Glutathion-S-Transferase oder das Maltose-Bindeprotein in Frage [294,295].

Die lösliche Fraktion ließ sich über eine Metallaffinitätschromatographie anreichern (Abbildung 26). Das Eluat enthielt noch eine Reihe anderer Proteine, für die initiale EPR-Analyse auf Anwesenheit des Clusters wurde dies jedoch hingenommen. Es zeigte sich, dass die lösliche Fraktion kein Rieske-Metallzentrum trägt. Eine Arbeit zur Koexpression des *isc*-Operons mit einer Reihe verschiedener Ferredoxine konnte zeigen, dass die Ausbeute an Holo-Protein durch erhöhte Expression der Hilfsproteine, die vermutlich den biologischen Clustereinbau vermitteln (Abschnitt 1.3.2), deutlich gesteigert werden kann [154]. Angeregt durch diese Arbeiten wurde versucht, ob die Koexpression dieser Hilfsfaktoren auch einen Einfluss auf die Assemblierung des Rieske-Proteins hat. Dies ist nicht zwangsläufig zu erwarten, da es sich bei den von Nakamura *et. al.* [154] untersuchten Beispielen um Proteine mit vier Cys-Liganden handelt, während das Rieske-Metallzentrum zwei His-Liganden benötigt, somit möglicherweise auf andere Hilfsproteine angewiesen ist. Neben dem genannten *isc*-Operon wurden in weiteren Versuchen auch das *nif*-Operon aus *A. vinelandii* und das *suf*-Operon aus *E. coli* überexprimiert (Abschnitt 1.3.2). Die Koexpression hatte keine gesteigerte Löslichkeit des ISF zur Folge (Abbildung 26). Die EPR-Analyse nach chromatographischer Anreicherung zeigte jedoch ein deutliches EPR-Signal in den Koexpressionsstämmen (Abbildung 25). Die Ausbeute an Holo-Protein lag bei Überexpression der *E. coli*-eigenen Biogenesysteme (*isc* und *suf*) jeweils bei fast 10 %, für das *nif*-Operon bei etwa 2 %. Dieser Unterschied könnte auf der Wechselwirkung mit weiteren endogenen Faktoren beruhen, die bei den homolog exprimierten Proteinen eher gegeben ist als bei den Biogenesefaktoren aus *A. vinelandii*, hängt vielleicht aber auch mit unterschiedlichem Codongebrauch zusammen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass das *nif*-System stärker auf die Biogenese der Nitrogenase-Cluster spezialisiert ist und „fremde“ Eisen/Schwefel-Proteine weniger gut prozessiert.

In Anbetracht der Tatsache, dass es sich lediglich um grob angereicherte Proteinfractionen handelte, an denen die Ausbeute auf Basis der Proteinkonzentration ermittelt wurde, dürfte die tatsächliche Ausbeute an Holo-Protein weitaus höher liegen. Sollte es gelingen, die Ausbeute an löslichem Protein zu steigern, scheint dieser Ansatz einen eleganten biotechnologischen Weg zur Gewinnung größerer Mengen des Holo-ISF

darzustellen. Auch über prinzipielle Schwierigkeiten, Rieske-Proteine in *E. coli* zu produzieren, liefern diese Experimente wichtige Aussagen. Wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben, gelingt die heterologe *E. coli*-Expression der Holo-Rieske-Proteine thermophiler Organismen wie *Sulfolobus acidocaldarius*, *Pyrobaculum aeruginosum* oder *Thermus thermophilus* in guter Ausbeute, was auch die strukturelle Charakterisierung dieser Proteine ermöglichte [296,197,196,70]. Das gleiche gilt für Rieske-Typ-Proteine, die das gleiche Metallzentrum besitzen, aber von der Proteinstruktur deutliche evolutionäre Divergenz gegenüber den Rieske-Proteinen zeigen; ein maßgeblicher Unterschied könnte darin bestehen, dass Rieske-Typ-Proteine keine Disulfidbrücke in der Clusterbindedomäne ausbilden. Die heterologe Expression von Holo-ISPs aus mesophilen Organismen gelingt hingegen nicht oder nur in sehr geringen Ausbeuten [76].

Diese Arbeiten zeigen, dass *E. coli* sehr wohl in der Lage ist, Rieske-Eisen-Schwefel-Cluster zu bilden. Der anorganische Teil des Clusters ist prinzipiell der gleiche Baustein wie für andere Eisen-Schwefel-Zentren auch. Das für *E. coli* „fremde“ Element liegt in der Natur der ligandierenden Aminosäurereste. Rieske-Typ-Proteine zeigen möglicherweise einen erleichterten Einbau, da hier keine Disulfidbrücke den Zugang zu den Liganden erschwert. Thermostabile Proteine könnten mit einer stabileren Faltung des Apo-Proteins eine bessere „Plattform“ für die Assemblierung bieten [196]. Rieske-Proteine aus mesophilen Organismen könnten hingegen zusätzliche Chaperonfaktoren benötigen, die die Proteinfaltung unterstützen oder die hochkonservierte Clusterbindedomäne erkennen und den Kofaktor-Einbau vermitteln. Dieser „Flaschenhals“ wird möglicherweise durch die Überexpression der generellen Cluster-Biogenesefaktoren in den hier beschriebenen Experimenten kompensiert. Alternativ könnte auch der Faktor, der für die Assemblierung des Rieske-Proteins nötig ist, in *E. coli* zwar prinzipiell vorhanden sein, aber physiologischerweise nicht in ausreichender Menge transkribiert werden. Es wäre interessant, eingehend Unterschiede und Vorkommen der zahlreichen putativen Fe/S-Biogenesegene in verschiedenen Spezies in Abhängigkeit davon zu inspizieren, ob diese Organismen Rieske-Proteine produzieren.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass aus der Koexpression der Biogenesegene keine gesteigerte Löslichkeit des überexprimierten ISF resultiert. Es scheint, dass nur die geringe Fraktion in Holo-Protein konvertiert werden kann, die auch in

Abwesenheit von Hilfsfaktoren der Ablagerung in *inclusion bodies* entgeht. Das legt nahe, dass der Clustereinbau den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt und die Ablagerung in *inclusion bodies* wesentlich rascher erfolgt. Möglicherweise fördert die partiell ungefaltete Struktur der Apo-Clusterbindedomäne die Aggregation. Vielleicht würden unter Verwendung eines stufenweise regulierbaren, weniger starken Promotors bessere Ergebnisse erzielt, da so die Bildung des Holo-Proteins mit der Expression Schritt halten kann. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass die *inclusion body*-Fraktion nicht EPR-spektroskopisch untersucht wurde: Es wäre denkbar, dass das überexprimierte Protein auch in seiner Holo-Form zur Aggregation neigt. Lu *et. al.* fanden nach Überexpression eines [4Fe-4S]-Proteins Eisen-Schwefel-Cluster gestörter Geometrie in der *inclusion body*-Fraktion [167].

#### 4.1.3 Homologe Expression des Rieske-Proteins und Untersuchung des Transports

Als weitere Expressionsstrategie wurde die Produktion des ISF im homologen Wirt *P. denitrificans* versucht; diese Experimente wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Julie Bachmann durchgeführt [261]. Eventuell könnten auch hier gute Ausbeuten erzielt werden: Zwar stehen keine starken induzierbaren Promotoren wie im Fall von *E. coli* zur Verfügung, jedoch dürfte die Assemblierung des Metallzentrums hier kein prinzipielles Problem darstellen. Die Expression wurde mit dem gleichen Vektorsystem versucht, das auch für die Produktion des gesamten *bc*<sub>1</sub>-Komplexes verwendet wird; dabei kommt der endogene Promotor des *fb*c-Operons zum Einsatz. Im *fb*cF-Genlocus für das Rieske-Protein wurde über verschachtelte PCRs der Teil entfernt, der den Membrananker und die Gelenkregion codiert. Das Fragment entspricht damit dem auch in *E. coli* exprimierten Minimalkonstrukt. Während im heterologen Wirt das ISF zumindest in geringen Mengen gefunden werden konnte, lässt sich im homologen Wirt überhaupt keine Produktion des Proteins nachweisen. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass das trunkeerte Strukturgen entweder eine instabile mRNA oder ein kurzlebige Translationsprodukt erzeugt. Möglicherweise würde auch hier eine N-terminale Extension (*His-tag* o.ä.) Abhilfe schaffen, was aber nicht weiter verfolgt wurde.

Neben der Expression eines löslichen Fragments wurde auch die Expression des ISP in voller Länge untersucht. Hier sollte untersucht werden, ob das bakterielle Rieske-Protein über den *twin arginine translocation pathway* (Tat-Weg) in die Membran

eingebaut wird. Dies legen die beiden für den Tat-Weg indikativen Argininreste nahe, die sich im N-terminalen Bereich des *Paracoccus*-ISP finden [64]. Ein weiteres Argument für diese Vermutung ist die Tatsache, dass das plastidiäre ISP erwiesenermaßen über den zum Tat-Weg homologen  $\Delta$ pH-Weg der Chloroplasten transportiert wird [65]. Um den Transport des *Paracoccus*-ISP über den Tat-Weg zu demonstrieren, wurden zunächst die N-terminalen Regionen von bakteriellen *bc*<sub>1</sub>- und *b<sub>6</sub>f*-Komplexen in Sequenzalignments auf das für den Tat-Weg charakteristische Konsensusmotiv (S/T)-R-R-x-F-L-K hin untersucht. Es zeigte sich, dass bakterielle Rieske-Proteine diesen Konsensus aufweisen, mit der bemerkenswerten Ausnahme, dass sich in keiner der untersuchten Sequenzen der Lysinrest am Ende des Sequenzmotivs findet. In generellen Tat-Substraten ist dieser Rest mit einer Häufigkeit von 70 % vertreten [64]. In bakteriellen ISP-Sequenzen finden sich an dieser Position stattdessen ungeladene Reste wie Tyrosin, Isoleucin oder Phenylalanin. Wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben und durch Transmembranhelix-Vorhersage-Algorithmen bestätigt, könnte dies mit der Doppelrolle des Exportsignals als Membrananker zusammenhängen. Ein Lysinrest an dieser Position scheint für die Ausbildung der Transmembranhelix nicht geeignet. Erste Mutageneseuntersuchungen an dieser Position, die im *Paracoccus*-ISP das „kanonische“ Lysin einführen, zeigen jedoch keinen dramatischen Effekt (Daten nicht gezeigt). Der Einbau in die Membran ist im Vergleich zum Wildtyp allenfalls geringfügig beeinträchtigt. Dieser Befund hat allerdings noch vorläufigen Charakter. Es wäre interessant, z.B. durch alkalisches Waschen der Membranen zu überprüfen, ob die Stabilität der Membranverankerung durch diese Punktmutation leidet. Auch die *bc*<sub>1</sub>-Enzymaktivität könnte einen guten Anhaltspunkt bieten.

Der Export über den Tat-Weg konnte durch gerichteten Austausch des Doppelarginins gegen zwei Lysine blockiert werden (Abbildung 28). Einzelmutanten der beiden Positionen liefern die bemerkenswerte Beobachtung, dass der zweite Argininrest für die Membranintegration essentiell ist, der Austausch des ersten Rests gegen Lysin den Export hingegen nur leicht einschränkt. Die meisten Arbeiten mit anderen Tat-Substraten kommen zu dem Schluss, dass beide Argininreste essentiell für den Export sind [297,298,299]. In Einzelfällen wurden aber auch Abweichungen von dieser Regel gefunden. Bei einer Chimäre aus Tat-Signalpeptid und  $\beta$ -Lactamase konnte der erste Arg-Rest ausgetauscht werden, ohne den Export des Fusionsproteins zu blockieren; die

Effizienz des Transports scheint jedoch beeinträchtigt [300]. Weiterhin finden sich zwei natürliche Beispiele von Tat-Substraten, bei denen der erste Arg-Rest konservativ gegen Lysin ersetzt ist; bei einem dieser Tat-Substrate handelt es sich bemerkenswerterweise um das plastidiäre Rieske-Protein [301,65]. Diesem Austausch kommt keine offensichtliche funktionelle Rolle zu, wie Mutageneseexperimente zeigten [302]. Ferner besitzen Cyanobakterien als evolutionäre Vorläufer der Chloroplasten noch ein kanonisches RR-Motiv [65]. Es scheint also, dass sich einzelne Tat-Substrate in ihrer „Permissivität“ zur Tat-Translokationsmaschinerie unterscheiden können und dass das ISP zu den permissiveren Substraten zählt. In der Bedeutung der beiden „invarianten“ Arginine zeigt sich eine Abstufung, derzufolge der zweite Rest der wichtigere ist.

Der hier gezeigte Export des ISP liefert das erste bakterielle Beispiel für den Tat-vermittelten Transport eines integralen Membranproteins mit N-terminaler TM-Helix. Bislang konnte eine Membranintegration im Falle des *E. coli*-Tat-Systems nur für Proteine mit C-terminaler TM-Helix gezeigt werden [303]. Es wurde demonstriert, dass die Membranintegration unabhängig von YidC erfolgt, einem für alle bislang in *E. coli* untersuchten Membranproteine essentiellen Hilfsfaktor. Der Mechanismus der Tat-abhängigen Membranintegration ist eine spannende Fragestellung; ebenso bleibt zu klären, ob nicht auch Proteine mit mehreren TM-Helices Tat-vermittelt in die Membran gelangen.

Die Cytosol-Fraktion der Doppelmutante zeigt ein für das Rieske-Protein charakteristisches EPR-Signal, so dass ein weiteres Charakteristikum des Tat-Exports für das Rieske-Protein bestätigt werden konnte: Der Kofaktoreinbau findet bereits im Cytoplasma statt [304]. Eine „Korrekturlesefunktion“, die den Export des Proteins vom Einbau des Kofaktors abhängig macht [262,263], konnte hier nicht gefunden werden. Der Export einer Mutante, der einer der Cysteinliganden des [2Fe-2S]-Zentrums entfernt wurde, erfolgt weiterhin, wenn auch nicht quantitativ wie im Falle des Wildtyps. Die verschiedentlich postulierte *proofreading*-Funktion wird cytosolischen Chaperonfaktoren zugeschrieben, die diese Funktion jeweils spezifisch für eine bestimmte Klasse Kofaktor-tragender Proteine (z.B. Hydrogenasen) ausübt [305]. Auf diese Spezifität weisen auch konservierte Sequenzelemente hin, die sich etwa innerhalb der Tat-Substratgruppe der Hydrogenasen im N-terminalen Drittel des Signalpeptids finden [306]. Die Sequenzalignments von bakteriellen Rieske-Proteinen, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, zeigen hingegen keine auffälligen Sequenzähnlich-

keiten im N-terminalen Teilabschnitt des Signalpeptids. Möglicherweise handelt es sich beim Kofaktor-proofreading also nicht um einen generalisierten Mechanismus, und das ISP unterliegt dieser Kontrolle nicht.

Eine zweite, generellere „Qualitätskontrolle“ für Tat-Substrate wurde von DeLisa *et. al.* vorgeschlagen [284]. Dieser Arbeit zufolge diskriminiert das Tat-Translocon selbst zwischen gefalteten und ungefalteten Substratproteinen. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann nicht geschlossen werden, ob diese zweite Kontrollebene im Falle des Rieske-Proteins greift. Jedoch erscheint plausibel, dass das Apo-Rieske-Protein diese Kontrolle „passieren“ könnte: Das ISP bildet weite Teile seiner Struktur unabhängig von der Anwesenheit des Kofaktors aus, der in einer separaten Subdomäne lokalisiert ist [67]. Dies steht im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen, die ihre Tertiärstruktur abhängig vom Kofaktor einnehmen. Diesem Argument zufolge müsste dann aber erst recht ein Kofaktor-*proofreading* das Rieske-Protein auf seinen Assemblierungs-Status überprüfen. Möglicherweise ergibt sich diese Notwendigkeit physiologischerweise nicht, wenn die Faltung und nicht die Bereitstellung des Kofaktors den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Eine andere Erklärung wäre, dass das verschiedentlich beobachtete Kofaktor-*proofreading* wesentlich auf dem unreifen, nicht Export-kompetenten Faltungszustand der Apo-Proteine beruht.

#### 4.1.4 Generierung einer monoklonalen Antikörperbindungsstelle auf dem $bc_1$ -Komplex

Um eine Bindung des monoklonalen Antikörperfragments  $F_v$  18E11 an den  $bc_1$ -Komplex von *P. denitrificans* zu erreichen, wurde zunächst der Antikörper-Antigenkontakt in der Kokristallstruktur des Hefeenzym [48] untersucht. Es zeigte sich, dass das  $F_v$ -Fragment extensive Kontakte mit zahlreichen Resten der ISP-UE ausbildet (Tabelle 5). Dies steht im Gegensatz zur initialen Charakterisierung [48], die für die Bindung nur wenige punktuelle Kontakte verantwortlich macht. An der Bindung sind vor allem die CD-Regionen 1 und 3 der schweren Kette beteiligt. Sie bilden eine Vielzahl von H-Brücken zum ISP-Epitop aus, von denen einige auch über strukturelle Wassermoleküle vermittelt werden. Die leichte Kette hat einen geringeren Anteil an der Kontaktfläche, steuert jedoch eine möglicherweise maßgebliche Salzbrücke zur Bindung bei. Neben den polaren Kräften scheinen auch hydrophobe Wechselwirkungen von Bedeutung zu sein: Eine Reihe von Tyrosinresten ragen aus dem  $F_v$ -Fragment hervor und bilden eine zum ISP komplementäre Oberflächenkontur aus. Die

Beobachtungen decken sich mit Angaben aus der Literatur, wonach Antikörper-Antigen-Kontakte vor allem durch H-Brücken und Wechselwirkungen aromatischer Reste stabilisiert werden [307,308]. Die ausführliche Analyse der Kontaktregion legt nahe, dass solche konformationellen Epitope nur schwerlich durch punktuelle Anpassung einzelner Reste transplantiert werden können und stattdessen die Übertragung längerer Segmente nötig sein wird, um dem Antikörper ein Epitop mit vergleichbarer Raumstruktur zu präsentieren.

Die Analyse der Primärstruktur durch Sequenzalignments zeigt, dass bakterielle Rieske-Proteine wie die von *P. denitrificans*, *R. sphaeroides* oder *R. capsulatus* in der zum untersuchten Epitop homologen Region eine längere Insertion im Vergleich zu den mitochondrialen ISP aufweisen (Abbildung 30). Die Epitopregion ist der am geringsten konservierte Bereich innerhalb der ansonsten von hoher Sequenzidentität geprägten hydrophilen ISP-Domäne, möglicherweise ein Grund für ihre Immunogenität. Die geringe Sequenzhomologie macht es schwer, eine eindeutige Zuordnung verwandter Reste zu treffen. Im wesentlichen lassen sich zwei Varianten ausmachen, die sich beide durch eine Reihe von Analysen stützen lassen (Abschnitt 3.2.2). In einer Variante finden sich zwei Insertionen, ein Teil des Epitops liegt auf einer „Insel“ zwischen den Insertionen, in der anderen Variante findet sich eine längere Insertion stromabwärts des Epitops. Die erste Variante erscheint plausibler, wenn man der Analyse eine große und divergente Auswahl von ISP-Sequenzen zugrundelegt; eine spezifische Auswahl mitochondrialer und proteobakterieller Sequenzen favorisiert die zweite Variante. Da die bakteriellen ISP älteren Ursprungs sind als die mitochondrialen Homologe, handelt es sich bei den Insertionen evolutionär betrachtet eher um Deletionen. Es erscheint plausibler, ein einmaliges Deletionsereignis zu vermuten als zwei separate. Andererseits befindet sich das betreffende Segment in der Sekundärstruktur in einer Schleifenregion, die bekanntermaßen einen geringeren Konservierungsgrad aufweisen und somit auch mehrfache Deletionsereignisse tolerieren könnten. Die Mehrdeutigkeit der Sequenzanalyse liefert neben der Analyse der Antikörperbindung ein weiteres Argument für einen weiträumigen Austausch des homologen Bereichs und lässt eine punktuelle Anpassung wenig erfolgversprechend erscheinen.

Eine aktuelle Arbeit identifiziert ebenfalls dieses Extrasegment in bakteriellen ISP und untersucht dessen funktionelle Bedeutung anhand von Deletionen und Alanin-Substitutionen [264]. Die Autoren sprechen diesem Bereich aufgrund ihrer Ergebnisse

eine Bedeutung für die Stabilität der ISP-Untereinheit zu und vermuten, dass er eine strukturelle Homologie zur UE 9 mitochondrialer Komplexe besitzt, die für die Assemblierung des [2Fe-2S]-Zentrums und/oder die Verankerung des Rieske-Proteins im Komplex maßgeblich sein soll [309].

In drei Epitopmutanten wurde stufenweise die identifizierte Epitopregion im bakteriellen ISP an die Sequenz des Hefe-ISP angepasst. Darüberhinaus wurden zwei Chimären kloniert, in denen die komplette hydrophile Domäne - in einer Variante einschließlich der *hinge*-Region - gegen die entsprechenden Teile der Hefe-Untereinheit ersetzt wurden [310]. Die Mutanten werden alle exprimiert. Die Cytochromspektren entsprechen für die Epitopanpassungen dem komplementierten Wildtyp, bei den Chimären ist der Cytochromgehalt aber deutlich herabgesetzt. Auf Membranebene wie bei den isolierten *bc*<sub>1</sub>-Varianten zeigt sich immunologisch, an der Färbung im SDS-PAGE und anhand von EPR-Spektren jedoch ein substöchiometrischer ISP-Gehalt der Komplexe (Abbildung 33). Bei den Chimären ist der ISP-Gehalt um etwa eine Größenordnung herabgesetzt, bei den Epitopmutanten sogar um bis zu zwei Größenordnungen. In etwa gleichem Maße sind die Aktivitäten auf Membranebene und im isolierten Enzym gegenüber dem Wildtyp herabgesetzt (Tabelle 6). Die kombinierten Befunde legen nahe, dass die stöchiometrisch assemblierte Teilpopulation der *bc*<sub>1</sub>-Mutanten tatsächlich um ein Vielfaches höhere Wechselzahlen aufweisen muss. Teilweise ist die Stabilität der Komplexe bei der Aufreinigung beeinträchtigt, wie der Verlust von Cyt *c*<sub>1</sub> zeigt. Dass die Wechselzahlen im isolierten Enzym den Aktivitäten auf Membranebene weitgehend gleichen, legt aber nahe, dass der Zerfall hauptsächlich die Population betrifft, der von vornherein das ISP fehlt, während der 3-UE-Komplex weitgehend stabil bleibt.

Xiao *et al.* [264] hat im *R. sphaeroides*-Komplex Deletionen und Ala-Substitutionen für den Abschnitt 96-107 bzw. Teile davon hergestellt. Das entspricht im *Paracoccus*-ISP dem Sequenzabschnitt RSAQNSNK-PDA (Abbildung 30). Dieser Abschnitt ist in der vorliegenden Arbeit in den Epitopmutanten 2 und 3 verändert worden (Abbildung 32). Xiao *et al.* kommen zu dem Schluss, dass insbesondere die letzten vier Aminosäuren des Segments von essentieller Bedeutung sind. Diese besondere Bedeutung kann kritisch hinterfragt werden, da diese Positionen weder bei *P. denitrificans* noch bei *R. capsulatus* konserviert sind. Für Mutanten im vorderen und mittleren Drittel dieses Segments finden die Autoren einen Rest-ISP-Gehalt von 50 und



5 % auf Membranebene. Die Cyt *b* und *c*<sub>1</sub>-Level sind dabei unbeeinträchtigt, was sich mit den Befunden für die Epitopmutanten deckt. Xiao und Mitarbeiter konnten ferner zeigen, dass die mRNA-Level für die ISP-Mutanten nicht vom Wildtyp abweichen und die UE vermutlich zunächst in den Komplex assembliert, dann aber rasch abgebaut wird. Diese Ergebnisse lassen im Vergleich mit den hier beschriebenen Experimenten interessante Schlüsse über die Assemblierung des Komplexes zu: Während in den Mutanten von Xiao *et. al.* und den Epitopmutanten die Cytochrom-UE von den Veränderungen im ISP unbeeinträchtigt bleiben, zeigen die Chimären-Membranen einen deutlich herabgesetzten Gehalt dieser UE. Im Fall der Chimären ist zu erwarten, dass die mRNA-Level für das ISP durch den für *Paracoccus* sehr ungünstigen Codongebrauch der Hefesequenz deutlich gesenkt werden. Die Cytochrom-UE sollten in ihrer Transkription hingegen unbeeinträchtigt sein. Im Falle der Chimären scheint also die verringerte Konzentration der Rieske-UE auch auf die Assemblierung der Cytochrome *b* und *c*<sub>1</sub> einen negativen Einfluss zu haben. Die Mutationen im Epitopbereich beeinflussen hingegen nicht die Transkription, die drei UE können zunächst voll assemblieren, und erst nachträglich wird die instabile ISP-UE abgebaut, was die beiden Cytochrome in diesem Stadium aber nicht mehr beeinträchtigt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stützen den Befund von Xiao *et. al.*, dass der untersuchte Bereich des Rieske-Proteins von Bedeutung für die Stabilität dieser UE im Gesamtkomplex ist. Die Details der *Rhodobacter*-Ergebnisse erscheinen jedoch strittig, da in dieser Arbeit die stabilisierende Funktion in besonderem Maße dem letzten Drittel des genannten Segments zugesprochen wird. Dieses Segment ist in der zweiten, jedoch nicht in der ersten Epitopanpassung mutiert (Abbildung 32). Beide Mutanten zeigen aber einen vergleichbaren Abfall in puncto Aktivität und ISP-Gehalt. Die dritte Epitopanpassung erfasst darüber hinaus einen etwas weiter stromabwärts liegenden Bereich, der in der Studie von Xiao unberücksichtigt bleibt, wo sich aber eine weitere Insertion in der bakteriellen Sequenz gegenüber dem mitochondrialen Protein findet (Abbildung 30). Diese Anpassung führt gegenüber der ersten und zweiten Epitopanpassung noch einmal zu einem deutlichen Abfall an Aktivität und ISP-Gehalt. Das legt den Schluß nahe, dass eher die gesamte Sequenz und Konformation der  $\alpha$ 1 $\beta$ 4-Schleife von stabilisierender Bedeutung ist und nicht kurze, definierte Sequenzabschnitte.

Der *pull-down assay* zum Nachweis der Bindung zwischen  $F_v$ -Fragment und  $bc_1$ -Komplex lieferte für die ersten beiden Epitop Anpassungen ein vergleichbares Ergebnis. Beide Mutanten können wie das *Paracoccus*-Wildtypenzym nur in sehr geringem Maße als Ko-Komplex aus der Lösung gezogen werden (Abbildung 35). Sowohl die punktuelle Anpassung als auch die Anpassung, die komplett den Bindungsbereich für die schwere Kette abdeckt, sind somit ohne Erfolg. Erst die dritte Anpassung, die die gesamte Kontaktoberfläche abdeckt, zeigt eine deutlich verbesserte  $F_v$ -Affinität. Offenbar ist der oben diskutierte Kontakt zur leichten Kette von maßgeblicher Bedeutung. Jedoch erscheint die Bindung im Vergleich zum Hefeenzym immer noch schwach. Zum Teil könnte dies daran liegen, dass die Epitopmutante normiert auf das Gesamtprotein eingesetzt wurde, die ISP-Untereinheit und somit die effektive Antigenkonzentration im Vergleich zur Hefekontrolle deutlich herabgesetzt war. Eine geringere Affinität scheint dennoch wahrscheinlich, da sich die  $F_v$ -Fragmente auch bei geringerer Konzentration die passenden Antigene „herausgefischt“ hätten. Abschließend betrachtet erscheint die Transplantation der Epitopregion als prinzipiell möglich und geglückt, für die praktische Anwendung der  $F_v$ -vermittelten Kristallisation jedoch nicht „robust“ genug. Der prinzipielle Ansatz erscheint jedoch weiterhin attraktiv. Man könnte sich vorstellen, dass ein einfacher strukturiertes Epitop quasi als *tag* eingesetzt und zu diesem Zweck auf ein beliebiges zu kristallisierendes Membranprotein verpflanzt wird. Das ISP als Kofaktor-tragende UE ist für eine solche generalisierte Anwendung jedoch sicher ungeeignet.

Die Chimären zeigen eine sehr gute Bindung an das  $F_v$ -Fragment, was bei einem kompletten Ersatz der Domäne zwingend zu erwarten war (Abbildung 35). Auffällig ist jedoch, dass die Cytochrom-UE im *pull-down* stark unterrepräsentiert sind; die ISP-UE wird also selektiv angereichert und aus dem Komplex „gezogen“. Dies wirft die kritische Frage nach der Stabilität auf. Im Fall der Chimäre mit *Paracoccus-hinge*-Region scheint hier tatsächlich ein Problem gegeben, wie der Verlust der Cyt  $c_1$ -UE im Zuge der Aufreinigung zeigt (Abbildung 34). Die Chimäre mit Hefe-*hinge*-Region ist jedoch stabil isolierbar. Ferner wird auch im Fall des Hefeenzym beim *pull-down* die Rieske-UE angereichert und komplett aus dem Komplex gezogen, wenn man eine affinitätschromatographische Reinigung mit dem  $F_v$ -Fragment versucht [232]. Bei der dritten Epitopmutante findet sich jedoch ein apparent stöchiometrischer Komplex im *pull-down*. Diese Beobachtungen könnte man erklären, wenn man annimmt, dass bei

höherer Affinität (niedrigerer Dissoziationskonstante) des Antikörper-Antigen-Komplexes relativ zur Affinität der  $bc_1$ -UE zueinander die betreffende Rieske-UE tatsächlich aus dem Komplex „gezogen“ werden kann, zumal der Antikörper über das Strep-tag sehr fest an den *magnetic beads* verankert ist. Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen mit höherer Dissoziationskonstante - wie im Falle der Epitopmutante - binden weniger Antigen, belassen dafür jedoch den Komplex intakt.

In weiterführenden Experimenten wurde von Thomas Kleinschroth gezeigt, dass bei Zugabe des  $F_v$ -Fragments zur aufgereinigten Chimäre und anschließender hochauflösender Gelfiltration ein Ko-Komplex isoliert werden kann, der die beiden UE des Antikörpers und die drei  $bc_1$ -UE in stöchiometrischem Verhältnis trägt. Dieses Präparat wurde für initiale Kristallisationsversuche eingesetzt und zeigt vielversprechende Ergebnisse. Um diesen Kristallisationsansatz weiter zu verfolgen, ist eine Steigerung der Expression des chimären Enzyms wünschenswert. Eine Analyse des Codongebrauchs für die eingesetzte Hefesequenz zeigt, dass 61 von 130 Codons eine Nutzungshäufigkeit von  $< 10\%$  in *Paracoccus* haben (Graphical Codon Usage Analyzer). Von dem Ersatz dieses Segments durch eine synthetische und entsprechend optimierte Sequenz ist somit eine deutliche Expressionssteigerung zu erwarten. Für eine komplette Strukturaufklärung des *Paracoccus*-Enzyms wäre ferner die separate Kristallisation oder NMR-Strukturbestimmung des Rieske-Proteinfragments erforderlich, da die Chimäre diese Strukturinformation nicht liefert.

## 4.2 Assoziationszustand des $bc_1$ -Komplexes und Bildung von Superkomplexen

Für mitochondriale  $bc_1$ -Komplexe wurde in den Kristallstrukturen ein dimerer Assoziationszustand gefunden (z.B. [47]). Auch zuvor mit verschiedenen Methoden durchgeführte Untersuchungen am mitochondrialen Enzym und am homologen  $b_6f$ -Komplex favorisieren eine dimere Form, allerdings sind hier auch widersprechende Ergebnisse bekannt, nach denen das Protein auch in monomerer Form vorkommen kann und möglicherweise dynamische Assoziationsgleichgewichte vorliegen. Jedoch zeigen die Kristallstrukturen eine besondere kreuzweise Verschränkung der Dimerhälften, indem das mit seiner TM-Helix in einem „Monomer“ verankerte Rieske-Protein mit seiner hydrophilen Domäne funktionell zum anderen „Monomer“ gehört und dort mit Cyt  $b$  und  $c_1$  in Kontakt tritt. Von daher ist eine Monomerisierung ohne einen Zerfall

oder Verlust der Rieske-UE schwierig vorstellbar, zumindest wenn das Monomer weiterhin enzymatisch aktiv sein soll. In jedem Fall erscheint es notwendig, im Vorfeld möglicher Kristallisationsbemühungen den Assoziationszustand des bakteriellen  $bc_1$ -Komplexes aus *P. denitrificans* sicher zu etablieren. Ein dimeres Enzym war vor dem Hintergrund zu erwarten, dass eine enge strukturelle und funktionelle Verwandtschaft des *Paracoccus*-Komplexes einerseits und mitochondrialer Komplexe andererseits angenommen wird. Jedoch erscheint dies nicht selbstverständlich, angesichts der deutlich unterschiedlichen UE-Zusammensetzung pro- und eukaryotischer Enzyme.

Im Zuge der Untersuchungen zum Assoziationszustand des  $bc_1$ -Komplexes wurde beobachtet, dass dieser *in situ* in definierter und gegenüber milden Solubilisierungsbedingungen stabiler Assoziation mit anderen Atmungskettenkomplexen vorzuliegen scheint. Diese Ausbildung von Superkomplexen wurde bereits im rindermitochondrialen System beschrieben [22]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen der Einzelkomplexe der Atmungskette von *P. denitrificans* näher untersucht. Dies geschah zum einen durch chemisches *crosslinking*, zum anderen auf genetischem Weg durch den Einsatz verschiedener Deletionsstämme.

#### 4.2.1 Untersuchungen am isolierten $bc_1$ -Komplex

Um Molekulargewichte isolierter Proteine unter nativen Bedingungen zu untersuchen, ist die analytische Ultrazentrifugation die Methode der Wahl [311]. Sie bietet eine Reihe von Vorteilen: (i) die Beobachtung erfolgt weitgehend „eingriffsfrei“; (ii) es handelt sich um eine Gleichgewichtsmethode, die Aussage ist schlüssiger als bei dynamischen Methoden, bei denen Störparameter wie z.B. Reibungskoeffizienten die Messung beeinflussen; (iii) auch reversible und flüchtige Assoziationsvorgänge werden erfasst und können quantitativ charakterisiert werden. Die Methode kann auch auf Membranproteine angewendet werden [312], jedoch ergibt sich hier als Komplikation die Detergenzbindung der Proteine. Der Detergenzgürtel erhöht die sedimentierende Masse. Um das Protein getrennt betrachten zu können, ist eine sogenannte Dichtekompensation erforderlich, bei der die Dichte des im Experiment verwendeten Puffers der Dichte der reinen Detergenzmizellen angeglichen wird, so dass diese im Schwerfeld „schweben“ und alleine die Sedimentation der Proteinkomponente erfasst wird. Für die Dichtekompensation eignen sich naturgemäß Detergenzien geringer Dichte wie LDAO,  $C_{12}E_9$  oder Triton X-100, bei denen die Pufferdichte durch Zugabe geringer Saccharosekonzentrationen angeglichen werden kann. Für Detergenzien hoher

Dichte wie etwa Dodecylmaltosid ( $\rho \sim 1,23 \text{ g/ml}$ ) sind sehr hohe Saccharosekonzentrationen nötig, was zu Nichtidealitäten führt. Im Besonderen wird durch den Einfluss des Zuckers auf die Hydrathülle des Proteins das partialspezifische Volumen  $\bar{v}$  beeinträchtigt, eine wesentliche Variable in der Molmassenbestimmung. Von daher war es wünschenswert, für die Ultrazentrifugations-(UZ)-Experimente den  $bc_1$ -Komplex in einem anderen Detergenz als DDM stabil und homogen zu isolieren.

Zur Analyse der Stabilität wurde das Elutionsprofil bei Gelfiltration, die Enzymaktivität sowie Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen herangezogen. Letztere gewinnen in vergangenen Jahren aufgrund verbesserter Analysemethoden verstärkt an Bedeutung, da hier eine rasche, sensitive und differenzierte Aussage über die Homogenität bzw. die Massenverteilung in einer Probe getroffen werden kann [248]. Es zeigte sich, dass in anderen untersuchten Detergenzien als DDM keine stabile  $bc_1$ -Präparation zu gewinnen ist. Dabei wurde im Besonderen  $C_{12}E_9$  untersucht, da dieses generell als „mildes“ Detergenz eingestuft wird; TX-100 erwies sich bereits in früheren Arbeiten als inkompatibles Detergenz (Sabine Gemeinhardt, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Experimente mit  $C_{12}E_9$  zeigten, dass es wichtig ist, den Detergenzeffekt nicht nur kurzfristig zu beurteilen. Während das Protein in 0,1 %  $C_{12}E_9$  rasch zerfällt, erscheint es nach dem Wechsel auf 0,01 %  $C_{12}E_9$  zunächst stabil. Wiederholte Gelfiltration des umgepufferten Materials belegt jedoch auch hier den Zerfall (Abbildung 38). Es stellt sich die Frage, ob hier nicht zu strikte Kriterien an die Stabilität angelegt wurden und der Zerfall möglicherweise auch auf die zunehmende Delipidierung des Komplexes bei jedem zusätzlichen Säulenlauf zurückzuführen ist. Allerdings konnte in verschiedenen Versuchen auch die „eingriffsfreie“ Beobachtung im Sedimentationsgeschwindigkeitslauf den mittelfristigen Zerfall bestätigen. Auch in DDM konnte nur ein enges „Fenster“ von Bedingungen (Detergenzkonzentration, pH-Wert, Ionenstärke) gefunden werden, um den Komplex über mehrere Tage bzw. bei wiederholter Gelfiltration stabil zu halten. Diese Befunde sind nicht nur für die hier beschriebenen Experimente von Bedeutung, sie stecken auch den Rahmen für zukünftige Kristallisationsversuche, wo ähnliche Anforderungen an die Stabilität gestellt werden.

Da für die analytischen UZ-Experimente zwangsläufig der in DDM vorliegende Komplex eingesetzt werden musste, wurde nach einer Lösung für das Problem der Dichtekompensation gesucht. Eine prinzipielle Möglichkeit wäre die unabhängige Bestimmung der gebundenen Detergenzmenge über den Einsatz von radioaktiv

markiertem DDM, eine teure und arbeitstechnisch unerwünschte Strategie. Stattdessen wurde ein kombinierter Lösungsansatz verfolgt: (i) durch Saccharose bedingte Nichtidealitäten wurden abgemildert, indem zusätzlich die Puffer für die UZ-Experimente unter Verwendung von D<sub>2</sub>O angesetzt wurden, welches bereits eine gewisse Dichtekompensation leistet. Unter Einsatz von 27,6 % Saccharose konnte so die DDM-Dichte kompensiert werden (Abbildung 43). (ii) Um einen Korrekturterm für die verbleibende Abweichung des partialspezifischen Volumens  $\bar{v}$  des Proteins zu ermitteln, wurde die Cytochrom-Oxidase von *P. denitrificans* als Referenzprotein vermessen. Dieses Protein wurde bereits eingehend in der analytischen UZ untersucht und erlaubt die Verwendung verschiedener Detergenzien, somit die Messung unter idealen Bedingungen gleichermaßen wie die Messung unter den hier verwendeten erhöhten Saccharosekonzentrationen [251]. Dieser Ansatz erscheint legitim, da es sich um ein Protein ähnlicher Monomerenmasse handelt, das eine ähnliche, vorwiegend  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur und vergleichbare Anteile hydrophober und hydrophiler Komponenten hat wie für den  $bc_1$ -Komplex erwartet [2].

Mit diesem Ansatz lässt sich für den DDM-solubilisierten, aufgereinigten, nativen  $bc_1$ -Komplex von *P. denitrificans* reproduzierbar ein Molekulargewicht von  $(240 \pm 30)$  kDa ermitteln, also das  $(2,05 \pm 0,26)$ fache der rechnerischen Monomerenmasse. Daraus folgt, dass der  $bc_1$ -Komplex als Dimer vorliegt. Durch Sedimentationsgleichgewichtsmessungen ohne Dichtekompensation konnte die Menge des gebundenen Detergenz bestimmt werden. Es ergibt sich ein Detergenz/Protein-Verhältnis von  $(0,85 \pm 0,12)$  g/g. Dieser Wert bewegt sich im Mittelfeld der für andere Membranproteine publizierten Daten. Als Minimalwert, mittleren Wert und Höchstwert wurden hier gefunden: PS I von *Synechocystis* PCC 7002: 0,48 g/g; NO-Reduktase von *P. denitrificans*: 0,87 g/g; Lactose-Transporter von *S. thermophilus*: 1,43 g/g [249,272,271]. Das Detergenz/Protein-Verhältnis liefert über eine Plausibilitätsüberlegung eine unabhängige Bestätigung des Assoziationszustandes. Würde es sich bei der sedimentierenden Komponente um ein Monomer handeln, läge die Detergenzbindung bei 2,8 g/g - ein unwahrscheinlich hoher Wert. Ein Trimer könnte hingegen nur noch einen sehr geringen Detergenzanteil von 0,2 g/g mitbringen, für ein hypothetisches Tetramer ergeben sich bereits negative Zahlenwerte.

Im Falle mitochondrialer  $bc_1$ -Komplexe wurde der Assoziationszustand in der Vergangenheit eingehend untersucht. Die Arbeiten kommen mehrheitlich zu dem

Schluß, dass der Komplex stabil als Dimer vorliegt [313], obwohl verschiedentlich auch enzymatisch aktive Monomere berichtet wurden [314]. Der pflanzliche *b<sub>6</sub>f*-Komplex scheint gleichfalls als Dimer vorzuliegen [315], aber auch hier wird die Möglichkeit einer reversiblen Dissoziation zum Monomer ohne Verlust von UE beschrieben [200]. Mit der Bestimmung der Kristallstrukturen mehrerer mitochondrialer *bc<sub>1</sub>*-Komplexe gilt es heute als gesichert, dass das Dimer die kleinste stabile strukturelle Einheit des eukaryotischen *bc<sub>1</sub>*-Komplexes ist. Die ISP-UE verschränken die beiden Dimerhälften kreuzweise und scheinen für eine hypothetische Monomerisierung nicht stabil genug mit den übrigen UE weder des einen noch des anderen Monomers verbunden zu sein. Dies ist letztlich jedoch nicht experimentell bestätigt, und es wird generell kontrovers diskutiert, ob der Oligomerisationszustand eines Proteins im Kristall zwangsläufig seinem „biologischen“ Zustand entspricht.

Für bakterielle *bc<sub>1</sub>*-Komplexe waren zu Beginn dieser Arbeit nur zwei Studien bekannt. Montoya *et al.* finden in der analytischen Gelfiltration einen dimeren Komplex aus *R. sulfidophilum* [55]. Allerdings ist die Massenabschätzung durch Gelfiltration aufgrund des unbekanntes Einflusses des Formfaktors bzw. des Reibungskoeffizienten generell skeptisch zu beurteilen [316], und in der Arbeit von Montoya *et al.* im besonderen, da hier lösliche Referenzproteine zur Eichung eingesetzt wurden und der Einfluss des Detergenz auf das Elutionsverhalten des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes nur anhand von Plausibilitätsüberlegungen eingeschätzt wurde. Sone und Takagi verwenden einen kombinierten Ansatz aus analytischer Gelfiltration mit löslichen Standards bei nachgeschalteter UV-Absorptionsmessung, Bestimmung der Lichtstreuung und Messung des Brechungsindex [54]. Diese komplexe Methode erlaubt die gleichzeitige Bestimmung des gebundenen Detergenz. Die Analyse erscheint plausibel und ist in mehreren Fällen erprobt [317]. Für den *bc<sub>1</sub>*-Komplex des thermophilen Bakteriums PS3 finden die Autoren ebenfalls ein stabiles Dimer.

Die hier durchgeführte Studie liefert unter Anwendung der analytischen UZ eine sehr robuste Analyse und stützt die Befunde der beiden erwähnten Arbeiten zum prokaryotischen *bc<sub>1</sub>*-Komplex. Es scheint somit eine generalisierbare Aussage, dass auch die bakteriellen Enzyme ein strukturelles Dimer bilden. Dies ist keineswegs selbstverständlich: Einerseits ist angesichts der Homologie zu den mitochondrialen Enzymen eine vergleichbare Struktur zu erwarten, andererseits ließen sich angesichts der bis zu acht zusätzlichen UE mitochondrialer Enzyme auch deutliche Unterschiede

plausibel begründen. Eine aktuellere Publikation [56] demonstriert auch für den *bc*<sub>1</sub>-Komplex von *R. sphaeroides* einen dimeren Assoziationszustand und liefert auf elegante Weise ein deutliches Argument dafür, dass die ISP-UE wie im mitochondrialen Komplex wechselseitig verschränkt sind. Es wurden an beiden Enden der vermuteten TM-Helix des ISP sowie an mehreren Positionen im Cyt *b* Cysteinreste eingeführt. Unter oxidierenden Bedingungen entstand ein disulfidverbrücktes Produkt, das im SDS-PAGE die apparente Masse eines Dimers hatte. Auch die vorliegende Arbeit liefert deutliche Hinweise, dass das Rieske-Protein eine wichtige Rolle für den Zusammenhalt des Dimers spielt. In der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse, die sehr sensitiv Heterogenitäten in einer Probe aufzuzeigen vermag, zeigte sich neben der in Gleichgewichtsläufen als Dimer identifizierten Komponente eine Nebenkompone, die etwa das halbe Molekulargewicht besitzt, also ein putatives Monomer (Abbildung 42). Mit zunehmendem Alter der Probe nimmt diese Komponente mengenmäßig zu, gleichzeitig verbreitert sich der Hauptpeak, sein Maximum verschiebt sich geringfügig zu einem kleineren Molekulargewicht. Es ist suggestiv, dies als Verlust der kleinsten UE - also des ISP - zu interpretieren, die mit einer Zunahme der Monomerkonzentration einhergeht. Das Herauslösen des ISP ist auch bei ungünstigen Detergenzbedingungen in der Gelfiltration zu beobachten (Abbildung 37). Die analytische Auflösung der Gelfiltration in diesem Molekulargewichtsbereich ist jedoch zu gering, als dass eine Dimer-Monomer-Aufspaltung beobachtet werden könnte; es zeigt sich aber eine deutliche Heterogenität und Verbreiterung des Hauptpeaks.

Neben der analytischen UZ wurden als Vergleichsmethoden zur Bestimmung des Assoziationszustands zwei dynamische Flussverfahren eingesetzt, die analytische Gelfiltration (GF) und die Blau-Nativ-Gelelektrophorese (BN-PAGE). Diese Verfahren lieferten überraschenderweise deutlich von der UZ-Analyse abweichende Ergebnisse. Die analytische GF wurde mit einer Auswahl von integralen Membranproteinen geeicht, um den oben genannten Kritikpunkt zu umgehen, dass mit löslichen Referenzproteinen die Detergenzbindung nicht berücksichtigt wird. Die Referenzproteine zeigen zwar sehr gut reproduzierbare Elutionsvolumina, welche aber nur eine ungefähre Korrelation mit dem Molekulargewicht aufweisen. Ein genauer exponentieller Zusammenhang wie bei löslichen Referenzproteinen lässt sich nicht herstellen (Abbildung 40). Der *Paracoccus-bc*<sub>1</sub>-Komplex eluiert gemäß der provisorischen Eichgerade bei einem Molekulargewicht, das nahezu der achtfachen Monomerenmasse entspricht. Das ist ein



unplausibler biologischer Assoziationszustand. Selbst wenn man die bekannten Limitationen der Methode in Betracht zieht - Einfluss des Formfaktors/Reibungskoeffizienten, unterschiedliche Detergenzbindung der Proteine, geringe Auflösung der Gelfiltrationssäule im hochmolekularen Bereich - fällt es dennoch schwer, einen so großen Fehler anzunehmen, dass ein tatsächliches Dimer als apparentes Oktamer eluiert. Dass es sich um ein unspezifisches Aggregat handelt, scheint angesichts des symmetrischen Elutionspeaks, der auch nicht im Ausschlussvolumen der Säule eluiert unwahrscheinlich. Berry und Trumpower [23] kommen nach einer ähnlichen Analyse des *Paracoccus*-Komplexes zu dem Schluss, dass das Enzym nicht als Dimer, sondern in einem „höheren Assoziationszustand“ vorliegen muss. Die Autoren verwendeten zur Kalibrierung lösliche Referenzproteine, der  $bc_1$ -Komplex eluierte bei apparenten 1,3 MDa. Mit der hier ermittelten Detergenzbindung ergibt sich daraus eine apparente Proteinmasse von 700 kDa, was einem Hexamer entspräche.

Auf einen höheren Assoziationszustand weist ebenfalls die BN-PAGE hin, wo als Größenstandard ein Solubilisat von OXPHOS-Komponenten aus Rindermitchondrien dient (Abbildung 41). Der aufgereinigte  $bc_1$ -Komplex läuft im Gel in etwa vergleichbar mit dem mitochondrialen  $bc_1$ -Komplex, für den eine (Dimer-)Masse von 480 kDa bekannt ist. Der *Paracoccus*-Komplex (Monomer 115 kDa) ist hier also ein apparentes Tetramer. Auch hier könnten Formparameter, unterschiedliche Bindung des Ladungsträgers Coomassie-Blau oder auch Aggregationsphänomene als mögliche Kritikpunkte angeführt werden. Jedoch zeigt die Gelanalyse in der zweiten, denaturierenden Dimension - in Abbildung 41 ist dies für das Membransolubilisat gezeigt - zwei weitere Laufformen bei niedrigeren Molekulargewichten. Es liegt nahe, diese als Dimer und Monomer zu identifizieren, zumal in der kleinsten Laufform das ISP fehlt, wie oben für einen monomeren Komplex bereits vermutet. Außerdem findet sich in Membransolubilisaten noch eine höhermolekulare Laufform, die als Superkomplex der Atmungskettenkomplexe I, III und IV identifiziert wurde. Dieser Superkomplex konnte von Anke Stroh [234] isoliert und hinsichtlich der Stöchiometrie von Protein und Kofaktoren eingehend untersucht werden. Diese stöchiometrischen Untersuchungen zeigten, dass sich zumindest im Superkomplex vier  $bc_1$ -Monomere finden. Ein weiterer Punkt ist, dass sich auch in der Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse des aufgereinigten  $bc_1$ -Komplexes eine höhermolekulare Komponente nachweisen lässt, die jedoch nur einen sehr geringen Anteil an der

Gesamtproteinmenge hat (Abbildung 42). Reversible Assoziationsvorgänge konnten jedoch sowohl in der GG-Analyse als auch in den Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten ausgeschlossen werden. Weder war eine Anpassung der GG-Daten mit mehr als einer Boltzmann-Funktion nötig, noch zeigte die Messung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen einen Einfluss auf die *s*-Wert-Verteilung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Analyse von labilen Membranproteinen in der analytischen Ultrazentrifugation ein neues Verfahren der Dichtekompensation entwickelt wurde, das die exakte Bestimmung des nativen Molekulargewichts erlaubt, sofern ein vergleichbares, stabiles Referenz-Membranprotein wie hier die Cytochrom-Oxidase zur Verfügung steht, um einen Korrekturterm für das partialspezifische Volumen  $\bar{v}$  zu ermitteln. Mit diesem Ansatz konnte für das aufgereinigte Protein zweifelsfrei ein dimerer Assoziationszustand nachgewiesen werden. Dieser Befund deckt sich mit Untersuchungen für andere *bc*<sub>1</sub>-Komplexe. Dynamische Messverfahren deuten jedoch darauf hin, dass auch höhermolekulare Assoziationszustände möglich sind und sogar unter bestimmten Bedingungen die dominierende Form darstellen können. Drei hypothetische Aspekte könnten dabei eine Rolle spielen: (i) Der Assoziationszustand ist konzentrationsabhängig; für die Gelfiltration und die Gelelektrophorese werden relativ konzentrierte Proben eingesetzt, die auch während der Analysedauer in einer Bande fokussiert bleiben. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass die rindermitochondriale Cytochrom-Oxidase durch Verdünnen aus einem Dimer in ein Monomer konvertiert werden kann [318]. (ii) Die Dissoziation höherer Assoziate erfolgt nur langsam, ist aber ein irreversibler Prozess. Im kurzen Zeitrahmen der dynamischen Messverfahren wird die tetramere Form als dominierende Komponente beobachtet, im Gleichgewicht nach mehreren Stunden oder Tagen wie im UZ-Experiment erweist sich hingegen das Dimer als stabile Hauptkomponente. (iii) Die Stabilität höherer Assoziate wird durch strukturell konservierte Lipide vermittelt, die während eines langen UZ-Laufs aus dem Komplex diffundieren. In jedem Fall bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um die Gültigkeit der Ergebnisse aus den dynamischen Messungen zu überprüfen und deren Aussage zu präzisieren.

#### 4.2.2 Wechselwirkung mit anderen Atmungskettenkomplexen

Nachdem in den BN-PAGE-Untersuchungen zum Assoziationszustand des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes höhermolekulare Assoziate mit anderen Atmungskettenkomplexen

gefunden wurden, sollten diese „Superkomplexe“ weitergehend charakterisiert werden. Dies geschah zum einen im Rahmen der Doktorarbeit von Anke Stroh [234]. Sie konnte chromatographisch einen stabilen Superkomplex isolieren, der sich stöchiometrisch aus einem Komplex I, vier Komplex III und vier Komplex IV ( $I_1III_4IV_4$ ) zusammensetzt und eine enzymatisch aktive NADH-Oxidase darstellt. Das membranständige Cyt  $c_{552}$  ist ebenfalls in diesem Komplex vertreten, wenn auch in scheinbar vermindertem Anteil. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten hingegen erste strukturelle Aspekte aufgeklärt werden: Wie hängen die Einzelkomplexe zusammen, können konkrete UE identifiziert werden, die die Wechselwirkung vermitteln? Hierfür wurde zunächst als Ansatz das chemische *crosslinking* gewählt. Mit dieser Methode konnten in einer Reihe von Studien topologische Informationen über große Membranproteinkomplexe gewonnen werden [319]. Als *crosslinker* wurde das Reagenz DSP gewählt, die Argumente für diese Wahl sind in Abschnitt 3.4.1 aufgeführt.

Das System wurde zunächst mit den getrennt aufgereinigten Atmungskettenkomplexen III und IV sowie dem Cyt  $c_{552}$  einzeln und in Kombination getestet. Es konnten schlüssig verschiedene Quervernetzungsprodukte identifiziert werden: Cyt  $b$  mit Cyt  $c_1$ , Cyt  $b$  mit ISP und ein ternärer Komplex aus ISP, Cyt  $c_1$  und Cyt  $c_{552}$  (Abbildung 45). Dies zeigt, dass der gewählte *crosslinker* mit den zu untersuchenden Membranproteinen prinzipiell funktioniert. Die *crosslink*-Produkte fanden sich meist nur in geringen Ausbeuten, was allerdings ein generelles Problem der Methode ist. Die Vorexperimente zeigen aber, dass auch mit „falschnegativen“ Ergebnissen zu rechnen ist: Es konnte keine Wechselwirkung von Cyt  $c_{552}$  mit der  $aa_3$ -Oxidase gezeigt werden, obwohl diese Proteine erwiesenermaßen stabil miteinander interagieren können [23]. Natürlich war auch ein Nachweis der Interaktion der Komplexe III und IV in diesen Vorversuchen erwünscht, konnte jedoch nicht erbracht werden. Denkbar ist, dass die Dissoziation des Superkomplexes bei separater Aufreinigung der Komplexe irreversibler Natur ist und die Proteine nicht reassoziieren können. Ein interessanter Befund in diesem Zusammenhang ist, dass in Cardiolipin-defizienten Mutanten von *S. cerevisiae* die Assoziation von KIII und KIV gestört ist, die Superkomplexe *in situ* jedoch durch Zugabe von Cardiolipin rekonstituiert werden können [320]. *Crosslink*-Versuche in nicht-solubilisierten Membranen erzeugten lediglich eine diffuse Verteilung im SDS-PAGE, definierte Produkte konnten auch immunologisch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Zugänglichkeit für das Reagenz zu den Proteinkomplexen in

diesem Ansatz nicht gut. Eine andere Erklärung ist, dass die Proteine in den Membranfragmenten zu dicht konzentriert vorliegen, der *crosslinker* dadurch zu „promiskuitiv“ reagiert.

Der chemischen *crosslink* wurde daraufhin am chromatographisch aufgereinigten Superkomplex versucht. In einem Ansatz wurde eine immunologische Analyse nach Auftrennung der Probe in der SDS-PAGE und *blotting* auf PVDF-Membranen durchgeführt. Die Membran wurde dabei in parallele Streifen zerschnitten, die getrennt mit verschiedenen Antisera inkubiert wurden. Ein *crosslink* sollte durch separaten Nachweis zweier UE bei gleicher Laufweite im Gel identifiziert werden. Dies gelang auch prinzipiell. Jedoch finden sich nach stringenter Analyse auch hier nur zwei der bereits in den Versuchen mit den Einzelkomplexen identifizierten *crosslink*-Produkte sowie ein ternärer Komplex aus ISP, Cyt  $c_{552}$  und COX-UE 2 (Abbildung 46). Wechselwirkungen zwischen den großen, mehrere TM-Helices ausbildenden UE der Komplexe I, III und IV konnten nicht ausgemacht werden. Zwar findet sich eine deutlich größere Zahl von potenziellen *crosslink*-Produkten, die jedoch vor allem das Kriterium der Massenabschätzung nicht bestehen: Sie zeigen zu deutliche Abweichungen zwischen errechneter und apparenter Masse, um plausibel zu sein. Möglicherweise ist dieses Kriterium auch zu „streng“ und führt zu falschnegativen Ergebnissen.

In weiterführenden Experimenten könnten die Proteine aus dem Gel in Höhe des vermuteten *crosslinks* ausgeschnitten und analysiert werden, eventuell unter Anwendung massenspektroskopischer Verfahren [321,322]. In einem alternativen Ansatz wurde der DSP-behandelte Superkomplex zuerst in einer nativen Dimension und dann in einer zweiten, denaturierenden Geldimension aufgetrennt. In der nativen Dimension wurden dabei Detergenzbedingungen gewählt, die den Superkomplex (SK) weitgehend in die Einzelkomplexe dissoziieren. Sollten sich dabei dennoch höhermolekulare Assoziate finden, wären diese durch die chemische Quervernetzung stabilisiert. So könnte zum einen eine quantitative Anreicherung des *crosslink*-Produkts in der ersten Geldimension erfolgen, zum anderen würde eine Vorauswahl der wirklich relevanten Quervernetzungen getroffen. Jedoch zeigte sich, dass es durch DSP-*crosslinking* nicht gelingt, den Superkomplex oder zumindest hochmolekulare Assoziate zweier Einzelkomplexe zu stabilisieren (Abbildung 47). Auch die Analyse der beobachteten *crosslinks* auf immunologischem Weg erwies sich in diesem Ansatz als

schwer realisierbar. Qualitativ konnte die Aussage getroffen werden, dass Cyt *b* an zahlreichen *crosslinks* beteiligt ist. Der  $bc_1$ -Komplex ist enzymatisch betrachtet das mittlere Glied der Atmungskette. Daher erscheint es plausibel, für Cyt *b* auch eine zentrale strukturelle Position im Superkomplex anzunehmen. Für zukünftige Experimente können folgende Vorschläge gemacht werden: (i) die Anreicherung und Vorauswahl relevanter *crosslinks* in einer nativen Geldimension erscheint als wertvolle Strategie. Deshalb sollten *crosslink*-Bedingungen gesucht werden, die einen Superkomplex stabilisieren. (ii) Möglicherweise ist hierfür ein weniger selektiver *crosslinker* nötig; DSP ist in seiner Reaktivität auf freie Aminogruppen beschränkt und hat eine relativ kurze „Spannweite“. Denkbar wäre etwa die Verwendung eines photoreaktiven *crosslinker*. (iii) Die immunologische Analyse der *crosslinks* im 2D-Gel erwies sich als schwierig. Eine massenspektroskopische Analyse würde sicherlich die schlüssigsten Ergebnisse liefern.

Alternativ zum chemischen *crosslinking* wurde ein genetischer Ansatz verfolgt, indem einzelne Atmungskettenkomplexe deletiert oder inaktiviert wurden und der Effekt auf die verbleibenden Komplexe analysiert wurde. Bei dem von Moshe Finel [201] zur Verfügung gestellten Komplex I-Deletionsstamm ( $\Delta$ KI) stellte sich heraus, dass es sich in Wirklichkeit um einen ( $\Delta$ KI +  $\Delta$ KIV)-Stamm handelt. Eigene Versuche, zentrale UE des Komplex I zu deletieren, schlugen fehl. Um dennoch einen  $\Delta$ KI-Stamm zu erhalten, wurde der ( $\Delta$ KI +  $\Delta$ KIV)-Stamm mit der deletierten COX-UE 1 *in trans* komplementiert. Ein möglicher Schwachpunkt an dieser Vorgehensweise könnte sein, dass die Überexpression von KIV zu artifiziellen Ergebnissen führt. Da allerdings nur eine der vier UE überexprimiert wird und die übrigen drei von genomischen Loci codiert werden, ist nicht unbedingt eine gesteigerte Membranassemblierung der COX zu erwarten. Dies bestätigen die spezifischen Aktivitäten und Redoxdifferenzspektren der Membranen des komplementierten Stammes. Die Analyse der spezifischen Enzymaktivitäten der Stämme  $\Delta$ KI,  $\Delta$ KIII,  $\Delta$ KIV und  $\Delta c_{552}$  auf Membranebene zeigt interessante wechselseitige Beziehungen. Während die KIII-Aktivität unabhängig von der Anwesenheit der anderen Komponenten ist, führt die Deletion von KIII zu einem starken Abfall der KI und KIV-Aktivitäten. Dieses Ergebnis spricht wie der *crosslink*-Befund für eine zentrale strukturelle Rolle des  $bc_1$ -Komplexes im Superkomplex-Verbund. Auch die Inaktivierung von Cyt  $c_{552}$  senkt die KI und KIV-Aktivitäten; der Effekt ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Des Weiteren beeinflussen sich KI und

KIV wechselseitig: Die Inaktivierung einer der beiden Komplexe führt zur Abnahme der Enzymaktivität des jeweils anderen Komplexes. Auch wenn die Aktivitätsmessungen einen starken Hinweis liefern, dass sich die Atmungskomplexe wechselseitig in ihrer Stabilität und/oder Assemblierung beeinflussen, ergeben sich immer noch andere Erklärungsmöglichkeiten. Denkbar wäre, dass die Inaktivierung einer der Komponenten physiologische Regulationsmechanismen in Gang setzt, die z.B. eine verminderte Expression der anderen Komponenten bewirkt. Ferner konnte gezeigt werden, dass die KI-Aktivität in den verschiedenen Stämmen zwar herabgesetzt ist, die verbleibende Enzymaktivität aber keine gesteigerte Detergenzempfindlichkeit im Vergleich zum Wildtyp (Wt) zeigt. Dieser Befund weist zunächst nicht darauf hin, dass Komplex I in labiler Form vorliegt.

Versuche, residualen Komplex I oder teilassemblierte Superkomplexe aus den Mutantenmembranen chromatographisch aufzureinigen, schlugen jedoch fehl (nicht gezeigt; Versuch durchgeführt von Anke Stroh). Die elektrophoretische Analyse der Digitonin-solubilierten Membranen im Blau-Nativ-Gel (BN-PAGE) zeigt deutlich die verminderte KI-Stabilität relativ zu Wt-Membranen. Nach Inaktivierung von KIII oder KIV findet sich hier kein assemblierter Komplex I (Abbildung 50). KI ist für seine strukturelle Stabilität also auf die Gegenwart von KIII *und* KIV angewiesen. Dies liefert einen wichtigen Hinweis auf die mögliche biologische Rolle der Ausbildung eines SK. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu sehen, dass bei Organismen wie *E. coli*, *A. aeolicus* oder *Y. lipolytica* keine Superkomplexe gefunden werden, Komplex I hingegen detergentstabil isoliert werden kann [29,30]. Bei *Paracoccus* hingegen gelang es trotz zahlreicher intensiver Bemühungen nicht, Komplex I zu isolieren [323]. Bei Inaktivierung von Komplex I bildet sich weiterhin ein residualer SK von KIII und KIV. Dieser Teilkomplex ist also eine strukturelle Einheit, die unabhängig von Komplex I assemblieren kann. Die stabile (KIII+KIV)-Assoziation zeigten bereits frühere Arbeiten an *Paracoccus* [23]. Eine Assoziation aus KI und KIII konnte interessanterweise weder im Wildtyp noch im  $\Delta$ KIV-Stamm beobachtet werden, obwohl eine Reihe von Detergenzbedingungen systematisch analysiert wurden (Anke Stroh, Hermann Schägger: unveröffentlichte Ergebnisse). In Hefe, *Arabidopsis thaliana* wie in menschlichen Mitochondrien wurde hingegen ein  $I_1III_2$ -Subkomplex als „Grundgerüst“ beobachtet, auf das wechselnde Stöchiometrien von KIV assemblieren können [22,324,325]. Die Abhängigkeit der KI-Stabilität von der KIII-Gegenwart, wie sie hier für *Paracoccus*

beschrieben wird, findet sich interessanterweise auch in menschlichen Mitochondrien: Bei Patienten mit *nonsense*-Mutationen in Komplex III ist eine assoziierte Komplex I-Defizienz zu beobachten [325]. Dies wurde im Mausmodell und in menschlicher Zellkultur bestätigt [326]. Bemerkenswerterweise ist der assoziierte Komplex I-Defekt auch hier nicht immer aus den enzymatischen Aktivitäten ersichtlich und zeigt sich erst klar in der BN-PAGE-Analyse. Diese Befunde legen nahe, dass die Ausbildung und Funktion von Superkomplexen evolutionär konserviert ist.

Weiter konnte gezeigt werden, dass das membranverankerte Cyt  $c_{552}$  keine essentielle strukturelle Funktion im *Paracoccus*-Superkomplex hat, aber dennoch eine stabilisierende Rolle zu spielen scheint (Abbildung 50). Interessanterweise korreliert eine abnehmende Stabilität von Superkomplexen mit einer gesteigerten Mobilität des Elektronenüberträgers Cytochrom *c*. *Paracoccus* bildet einen sehr stabilen SK aus, Cytochrom *c* ist hier membranverankert. *S. cerevisiae* hat einen SK mittlerer Stabilität, hier findet sich ein lösliches Cyt *c*, das aber in kinetischen Analysen kein „Pool-Verhalten“ zeigt, sich also nicht wie ein frei diffundierendes Substrat verhält [327]. Rindermitochondrien zeigen im Vergleich die labilsten SK, Cyt *c* zeigt hier Pool-Verhalten [328]. Eine naheliegende Hypothese ist, dass die Stabilisierung des SK über elektrostatische Wechselwirkungen des an seiner Oberfläche zahlreiche Ladungen tragenden Cyt *c* mit den hydrophilen Ektodomänen von KIII und KIV auf der elektropositiven Membranseite zu Stande kommt.

Als Ausblick bieten sich eine Reihe von Möglichkeiten, den Superkomplex von *P. denitrificans* funktionell und strukturell weitergehend zu charakterisieren. Der isolierte Komplex könnte einer elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse unterzogen werden, um eine niedrigauflösende Struktur zu gewinnen. Erste Versuche in diese Richtung wurden bereits unternommen (Michael Rademacher, unveröffentlichte Ergebnisse). In diesem Zusammenhang könnte sich der His-getaggte SK (Abschnitt 3.4.2) als nützlich erweisen, indem er ein Aufreinigungsschema mit besserer Ausbeute zulässt und zum anderen die Möglichkeit bietet, über anti-His-Antikörper die Cytochrom-Oxidase im SK sehr genau zu lokalisieren. Für den I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>-Superkomplex aus *A. thaliana* wurden entsprechende Versuche bereits veröffentlicht und belegen eine strukturell definierte Assoziation der beiden Einzelkomplexe [329]. Des Weiteren wäre eine Vertiefung der *crosslink*-Versuche sinnvoll, um die Wechselwirkung auf der Ebene definierter UE nachzuweisen (siehe oben). Für den hefemitochondrialen SK aus KIII

und KIV wurde gezeigt, dass eine Reihe akzessorischer UE nicht für die Wechselwirkung nötig sind, ebenso wenig die katalytische UE ISP oder das Überträgerprotein Cyt *c* [330]. Ferner deuten nicht zuletzt die oben beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass die Assoziation von Superkomplexen evolutionär konserviert ist. Da die *Paracoccus*-Komplexe III und IV lediglich aus drei bzw. vier UE bestehen, lässt sich die Zahl potenzieller Bindungspartner zumindest im Fall dieser beiden Komplexe stark eingrenzen. Eine strukturelle Analyse des Hefe-*bc*<sub>1</sub> zeigt außerdem eine „Höhle“, die von der TM-Helix von Cyt *c*<sub>1</sub> und drei TM-Helices von Cyt *b* gebildet wird und sich als Bindestelle für die COX aufdrängt [331]. Von daher erscheint auch der Ansatz sinnvoll, über *cystein scanning*-Mutagenese [332] eine spezifische, ortsgerichtete Quervernetzung der Komplexe zu versuchen. Ferner konnte in Hefe gezeigt werden, dass das Phospholipid Cardiolipin eine wichtige stabilisierende Rolle für den (KIII+KIV)-SK hat [320]. Die Cytoplasmamembran von *P. denitrificans* enthält ebenfalls Cardiolipin [333], und die einfache genetische Zugänglichkeit in Kombination mit den zur Verfügung stehenden Genomdaten (DOE Genome Institute 2005) sollte es ermöglichen, eine Cardiolipin-defiziente Mutante zu generieren und den Einfluss auf den SK zu untersuchen.

Es fällt auf, dass die beschriebenen mitochondrialen SK in der Regel die Stöchiometrie I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1-4</sub> aufweisen [22,21,324]. Dazu steht der doppelte KIII-Gehalt des *Paracoccus*-SK in auffälligem Gegensatz. In Kombination mit dem oben diskutierten Widerspruch, den die Untersuchung des *bc*<sub>1</sub>-Assoziationszustands mit Gleichgewichtsmethoden (Dimer) und dynamischen Messmethoden (Tetramer oder sogar größere Einheiten) aufzeigt (Abschnitt 4.2.1), regt dieser Befund dazu an, die Stöchiometrie des bakteriellen Superkomplexes [234] kritisch zu überprüfen.

Die Mehrzahl der heute vorliegenden kinetischen Analysen favorisiert weiterhin das *random diffusion*-Modell der Atmungskette [334,335], auch wenn neuere Arbeiten zumindest die Assoziation von KI und KIII stützen [336]. Mittels metabolischer Flusskontroll-Analyse [337] müsste der *Paracoccus*-SK auch auf der Membranebene kinetisch nachweisbar sein. Generell wäre der Nachweis des SK *in situ* wünschenswert, um dem häufigen Einwand zu begegnen, bei Superkomplexen handele es sich in Wirklichkeit um unspezifische Aggregate, Aufreinigungsartefakte oder unvollständig solubilisierete Membranfragmente. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine FRET-Analyse über die Ankopplung von Fluorophoren, die Bestimmung von



Diffusionsgeschwindigkeiten von Einzelkomplexen in Wt- und Mutantenmembranen und die EPR-spektroskopische Beobachtung der Wechselwirkung der zahlreichen paramagnetischen Zentren (Khalid Siddiqui, unveröffentlichte Ergebnisse).

### 4.3 Protonentranslokation und Chinonbindungsstöchiometrie

Chemische Modifizierungsexperimente mit dem Aminosäurereste modifizierenden Reagenz N,N'-dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) deuten darauf hin, dass saure Reste an der protonentranslozierenden Aktivität des  $bc_1$ -Komplexes beteiligt sind [338,339]. Untereinheiten, die als Kandidaten für die DCCD-Markierung angesehen wurden, waren zunächst UE 9 des Rinder-Komplexes [340] oder Cyt *b* des Rinder- bzw. *R. sphaeroides*-Komplexes [341,342]. Als weiteres modifizierendes Reagenz wurde N-(Ethoxycarbonyl)-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) eingesetzt, das spezifisch saure Reste in hydrophober Umgebung modifizieren soll. In Experimenten mit dem bovinen Komplex ging die EEDQ-Markierung der Core-UE 2 und des Rieske-Proteins mit einem entkoppelnden Effekt einher [343]. Um den Beitrag der akzessorischen UE des eukaryotischen Komplexes auszuklammern und alleine den Effekt der Modifikation der drei katalytischen UE zu untersuchen, wurde in einer neueren Arbeit der lediglich aus diesen drei UE bestehende *Paracoccus*-Komplex in Markierungsexperimenten mit DCCD und EEDQ untersucht [112]. Abhängig von der DCCD-Konzentration konnten mit diesem Reagenz alle drei UE markiert werden. Ein entkoppelnder Effekt korreliert jedoch einzig mit der Modifikation der Rieske-UE. EEDQ modifiziert bei einer gegebenen Konzentration nur Cyt  $c_1$  und das Rieske-Protein, jedoch nicht Cyt *b*, und hat dabei ebenfalls einen entkoppelnden Effekt. In Kombination legen beide Ergebnisse nahe, dass ein saurer Rest in der Rieske-UE für den entkoppelnden Effekt verantwortlich ist. Tryptischer Verdau dieser Untereinheit, Identifizierung des modifizierten Fragments mittels Fluoreszenz und anschließende Ansequenzierung führte in beiden Fällen zur Identifikation eines definierten Proteinfragments. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch gerichtete Mutagenese den sauren Aminosäurerest innerhalb dieser Proteinregion zu identifizieren, der bei chemischer Modifikation für den entkoppelten Phänotyp des Enzyms verantwortlich ist.

Die Zahl der am Chinoloxidationszentrum des  $bc_1$ -Komplexes gebundenen Substratmoleküle wird kontrovers diskutiert [97]. Anhänger des *double-occupancy*-Modells [87] postulieren die gleichzeitige Bindung zweier Chinone. Die beiden

Substratmoleküle dienen in verschiedenen mechanistischen Modellen dazu, die Aufspaltung der Elektronenwege am  $Q_o$ -Zentrum zu erklären [95,96,57]. Im Rahmen der FTIR-spektroskopischen Charakterisierung des *Paracoccus-bc<sub>1</sub>*-Komplexes (in Zusammenarbeit mit Michaela Ritter, AG Dr. Petra Hellwig) fiel auf, dass das Spektrum von Signalen des mit dem Enzym aufgereinigten Substrats Chinon dominiert wird. Bereits in einer früheren Arbeit wurde beschrieben, dass das *Paracoccus*-Enzym mit deutlich höherem Chinongehalt isoliert werden kann, als dies für *bc<sub>1</sub>*-Komplexe aus vielen anderen Organismen der Fall ist [35,344]. Man kann davon ausgehen, dass im isolierten *bc<sub>1</sub>*-Komplex von *P. denitrificans* beide Chinonbindungsstellen besetzt sind. Somit erlaubt die stabile Substratbindung, direkt die Stöchiometrie für die gebundenen Chinonmoleküle zu untersuchen und damit eine Information zu einem wichtigen mechanistischen Detail zu erhalten. Ferner ergibt sich die Möglichkeit, die molekularen Details der Substratbindung am  $Q_o$ -Zentrum FTIR-spektroskopisch zu erfassen, was bei Spektren von anderen *bc<sub>1</sub>*-Komplexen bislang nicht möglich war [345,346,347].

#### 4.3.1 Entkopplungseffekt eines sauren Restes in der Rieske-Untereinheit

Durch gerichtete Mutagenese sollte ein Aminosäurerest identifiziert werden, dessen chemische Modifikation zu einer Abnahme der  $H^+/e^-$ -Stöchiometrie bei dem in Phospholipidvesikel rekonstituierten Enzym führt [112]. Der modifizierbare Rest findet sich in einem Proteinfragment Thr118 - Arg164. Der favorisierte Kandidat ist dabei Asp160, da es sich um einen konservierten Rest handelt, der zudem in hydrophober Umgebung liegt, wie es die Chemie der für die Modifizierung eingesetzten Reagenzien erfordert. Da die Mutagenese dieses Rests wahrscheinlich zu einer Instabilisierung der gesamten UE führen würde [72], wurden stattdessen die fünf übrigen, nicht-konservierten sauren Reste in dieser Proteinregion durch die entsprechenden Säureamide ersetzt.

Um mehrere Mutationen gleichzeitig einführen zu können, wurde das kommerzielle Mutagenesesystem QuikChange (Stratagene) modifiziert. Durch den Einsatz einer thermostabilen Ligase im *thermocycling* kann zirkularisierte, einzelsträngige Plasmid-DNA gewonnen werden, die die Mutation trägt. Neben der Möglichkeit, die Reaktion mit mehreren mutagenen Oligonucleotiden gleichzeitig durchzuführen, bringt die modifizierte Methode zwei weitere Vorteile: (i) Pro mutierter Position wird nur ein mutagenes Oligonucleotid benötigt, während für das konventionelle Verfahren je zwei Oligonucleotide benötigt werden. (ii) Die gewonnene Kolonienzahl nach

Transformation der Mutagenesereaktion liegt eine Größenordnung über der des bisherigen Verfahrens, so dass auch chemisch-kompetente Zellen mit einer moderaten Transformationseffizienz von  $\sim 10^6$  problemlos verwendet werden können. Die verbesserte Ausbeute könnte dadurch zustande kommen, dass die kompaktere zirkuläre ss-DNA besser aufgenommen wird als die lineare ds-DNA, die bei der konventionellen QuikChange-Methode entsteht. Da nur ein mutagenes Oligonucleotid eingesetzt wird, kann dieses nur mit der Parental-DNA hybridisieren. Beim ursprünglichen Verfahren mit zwei Oligonucleotiden gibt es hingegen die - kinetisch bevorzugte - konkurrierende Reaktion, dass die beiden Primer miteinander hybridisieren. Auch dieser Aspekt dürfte zum beobachteten Ausbeuteunterschied beitragen.

Die Fünffachmutante konnte auf genetischer Ebene konstruiert, in *P. denitrificans* eingebracht, exprimiert und aufgereinigt werden. Die Mutante zeigt einen stark verringerten Anteil der Rieske-UE und eine Aktivität, die etwa eine Größenordnung unter der Wt-Aktivität liegt. Bezogen auf die Enzymfraktion, die alle drei UE enthält, ist die „intrinsische“ Aktivität der Mutante damit deutlich höher. Unklar ist, ob das Fehlen des ISP auf ein Problem bei der Assemblierung des Enzyms zurückzuführen ist oder ob es sich um einen sekundären Verlust handelt. Für letztere Erklärung spricht die Instabilität des Proteinkomplexes, die sich in der analytischen Gelfiltration zeigt, sowie die einmalige Beobachtung einer Präparation mit höherem ISP-Gehalt (Abbildung 53). Eine Modifikation des mutierten Enzyms mit dem Reagenz EEDQ konnte für die ISP-UE nicht mehr nachgewiesen werden (Experiment durchgeführt von Tiziana Cocco, Universität Bari). Unklar ist dabei aber, ob durch den substöchiometrischen ISP-Gehalt die Nachweisgrenze unterschritten wurde oder ob es tatsächlich aufgrund der Mutation nicht mehr zur Modifikation kommt. Der Einfluss der Mutation auf die protonentranslozierende Aktivität des Komplexes konnte nicht sinnvoll untersucht werden. Dies ist zum einen der geringen Restaktivität der Präparation zuzuschreiben. Zum anderen kommt es bei Rekonstitution der Mutante in Phospholipidvesikel nicht mehr zum preferentiellen Einbau des Enzyms in der richtigen Orientierung, was beim Wt jedoch der Fall ist (Abschnitt 3.5.5). Somit konnte aufgrund der offensichtlichen strukturellen Defekte dieser Mutante die Frage nicht beantwortet werden, ob Asp160 der Rest ist, dem das Entkopplungsphänomen zugeschrieben werden kann.

Eine ganz ähnliche Fragestellung bearbeiteten Ebert *et. al.* am Hefeenzym [348]. Hier wurde der zu <sup>Pd</sup>Asp160 homologe Rest <sup>Sc</sup>Asp186 unter anderem gegen Alanin ersetzt.

Erstaunlicherweise führte dieser Austausch nicht zum Verlust des [2Fe-2S]-Clusters, die Mutante ist nahezu vollständig mit Holo-ISP assembliert. Den deutlichen Widerspruch zu früheren Arbeiten [72], in denen selbst der konservative Austausch <sup>Sc</sup>D186N zum kompletten Clusterverlust führte, erklären die Autoren damit, dass es sich bei der früheren Arbeit um einen chemischen Zufalls-Mutageneseansatz gehandelt hat, so dass es dabei möglicherweise zu nicht identifizierten *second site*-Mutationen kam, die die Assemblierung der ISP-UE beeinträchtigten. Somit kann also entgegen der ursprünglichen Annahme - die auch für die Planung der vorliegenden Arbeit getroffen wurde - dieser hochkonservierte Rest doch mutagenisiert werden. Das resultierende Enzym zeigt bei Ebert *et. al.* eine um 50 % herabgesetzte Cytochrom-Reduktase-Aktivität, die sich schlüssig auf das um ~ 100 mV herabgesetzte Mittelpunktspotential des [2Fe-2S]-Zentrums zurückführen lässt [100]. Auf der Basis von MD-Simulationen machen die Autoren globale strukturelle Veränderungen in der ISP-Ektodomäne für diesen Effekt der ~ 30 Å vom Metallzentrum entfernten D186A-Mutation verantwortlich. Diese Veränderungen sollen zu einer geänderten Orientierung des Metallzentrums relativ zum Chinoloxidationszentrum führen.

Interessanterweise zeigt die D186A-Mutante die gleiche H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>-Stöchiometrie nach Vesikelrekonstitution wie das Wt-Enzym. Bei Modifikationsexperimenten reagiert wie beim Wt das Rieske-Protein und die Core-UE 2 mit EEDQ, und auch der entkoppelnde Effekt des Reagens ist weiterhin gegeben. Der Fluoreszenznachweis der Modifikation in der Mutante liefert beim ISP allerdings ein deutlich schwächeres Signal als beim Wt. Diese Studie demonstriert drei Dinge: (i) Auch im Hefeenzym lässt sich zeigen, dass die Modifikation eines sauren Restes im ISP einen entkoppelnden Effekt hat, was die Hypothese von Cocco *et. al.* [112] stützt. (ii) Wie bei Cocco *et. al.* vermutet, wird der Rest <sup>Sc</sup>Asp186 bzw. <sup>Pd</sup>Asp160 modifiziert, wie die verringerte Fluoreszenzintensität in der Mutante zeigt. (iii) Diesem Rest ist allerdings nicht der entkoppelnde Effekt bei Modifikation zuzuschreiben. (iv) Es gibt einen weiteren modifizierbaren Rest im ISP, wie die verbleibende Fluoreszenzmarkierung zeigt. Es erscheint plausibel, diesem nicht identifizierten Rest die für die Kopplung der H<sup>+</sup>-Translokation relevante Funktion zuzuschreiben. Ebert *et al.* erscheint <sup>Sc</sup>Asp172 ein plausibler Kandidat, ein zwar nicht invarianter, aber doch teilweise konservierter Rest. In *Paracoccus* entspricht diese Position <sup>Pd</sup>Asp146. Als Ausblick erscheint es daher vielversprechend, die Einzelmutationen der neben <sup>Pd</sup>Asp160 vorhandenen sauren Reste in der von Cocco *et.*

*al.* identifizierten Proteinregion zu analysieren. Im Zuge der Konstruktion der Fünffachmutante wurden bereits die Einzelmutationen in sämtlichen Kombinationen auf genetischer Ebene erzeugt (Abschnitt 3.5.4). Des Weiteren könnte überprüft werden, ob sich der/die modifizierte(n) Rest(e) nicht auch im Wildtyp-Enzym identifizieren lassen, etwa über eine massenspektrometrische Analyse des modifizierten Proteinfragments. Letzteres würde allerdings noch nicht zwingend demonstrieren, dass der gefundene Rest bei Modifikation auch tatsächlich den Entkopplungseffekt erzeugt. Dieser Kritikpunkt ergibt sich allerdings rückblickend auch für die gewählte Strategie der Ausschlussanalyse. Selbst wenn es mit der Fünffachmutante möglich gewesen wäre, Asp160 als modifizierten Rest zu identifizieren, hätte sich daraus die Verbindung zum Entkopplungseffekt nicht zwingend ergeben. Denkbar wäre dann immer noch, dass dieser Effekt an anderer Stelle im  $bc_1$ -Komplex ausgelöst wird, etwa durch eine Modifikation, die in der indirekten Fluoreszenzdetektion der Modifizierungsreaktion „übersehen“ wird. Wirklich schlüssig wäre nur der positive Nachweis, indem es nach Mutation eines Restes nicht mehr zur Entkopplung von Elektronentransfer und Protonentranslokation durch chemische Modifikation kommt.

Mechanistisch stellt sich die Frage, wie eine Entkopplung von Elektronentransfer und Protonentranslokation im Rahmen des Redoxschleifen-Mechanismus des  $bc_1$ -Komplexes funktionieren soll. Die Aufnahme von Protonen auf der Innenseite der Membran ist nämlich wie die Abgabe von Protonen auf der Außenseite stets an die Redoxchemie der Chinonmoleküle gekoppelt. Hier kann nicht, wie im Fall der Cytochrom-Oxidase, ein „Kanal“ blockiert werden. Eine denkbarer Mechanismus der Entkopplung wäre der Rückfluss der am Chinoloxidationszentrum freigesetzten Protonen auf die elektronegative Seite der Membran. Dafür spricht, dass die Kopplungseffizienz bei Pumpexperimenten in Gegenwart eines pH-Gradienten über der Membran deutlich herabgesetzt ist [349]. Es ist eine sinnvolle Annahme, dass ein entsprechender elektrochemischer Gradient die „Leckage“ von Protonen befördern würde. Einen interessanten Hinweis in diese Richtung liefert eine aktuelle Arbeit [350]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Vesikelrekonstitution eines  $bc_1$ -Komplexes, der eine kofaktorlose ISP-UE trägt, die Phospholipidmembran permeabel für Protonen macht, ganz vergleichbar zum Effekt des Entkopplers CCCP. Ein vergleichbarer Effekt zeigt sich bei proteolytischer Abspaltung der ISP-Ektodomäne; jedoch kann die erhöhte Permeabilität in diesem Fall durch Zugabe der freien löslichen ISF-Domäne z.T. wieder

rückgängig gemacht werden. Die Autoren sprechen dem [2Fe-2S]-Cluster die Rolle eines *proton-exiting gate* zu, dessen Fehlen zu einer Leckage der an  $Q_o$  generierten Protonen auf die elektronegative Seite der Membran führt. Als möglicher „Protonenkanal“ werden einerseits das  $Q_o$ -Zentrum, andererseits das  $Q_i$ -Zentrum oder die Einbuchtung diskutiert, die sich auf der elektronegativen Seite der Membran zwischen den Cyt *b*-Monomeren bildet. Dazwischen finden sich allerdings  $\sim 17 \text{ \AA}$  in der Cyt *b*-Struktur, die nicht wasserzugänglich erscheinen. Diese Teilstrecke könnte nach Meinung der Autoren aber - mit Unterstützung des pH-Gradienten - durch die ausgedehnte Kavität zurückgelegt werden, die sich zwischen den Monomerhälften ausbildet. Die Befunde stützen zusammenfassend die Analyse von Cocco *et. al.*, dass das ISP tatsächlich eine entscheidende Rolle für die Kopplung von Elektronentransfer und Protonentranslokation spielt [112].

#### 4.3.2 Untersuchung der Chinonbindung

Um das gebundene Chinon *via* FTIR zu quantifizieren, wurde ein Extinktionskoeffizient für die Schwingung der Methoxyseitenkette bestimmt. Diese liefert ein prominentes Signal bei  $1262 \text{ cm}^{-1}$ , das sich durch eine weitgehende Unabhängigkeit von der Protein- oder Lösungsumgebung auszeichnet (Petra Hellwig, persönliche Mitteilung). Dies konnte durch Vergleichsmessungen in  $\text{H}_2\text{O}$  und Tetrahydrofuran bestätigt werden. Das Enzym wurde über die Cytochrom *b*-Absorption quantifiziert. Da in der Literatur kein Extinktionskoeffizient für das *Paracoccus*-Enzym vorlag, wurde dieser nach einer Methode von Berry und Trumpower [244] bestimmt. Es konnte mit  $\epsilon_{b(560-574 \text{ nm})} = 29,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ein Wert im Bereich der für mitochondriale Enzyme publizierten Extinktionskoeffizienten ermittelt werden [240,243]. Für die Chinonbindung pro Enzymmonomer ergibt sich bei einer Probe nach Aufreinigung über Anionenaustauscher- und Gelfiltrationssäule eine durchschnittliche Stöchiometrie von 3,3. Nach intensivem Umpuffern mit Hilfe von Ultrafiltratoren sinkt das Verhältnis auf 2,6 ab. Der höhere Wert deckt sich gut mit der Stöchiometrie von 3,5, die Yang und Trumpower durch chemische Extraktion bestimmt haben [35]. Das ist auch insofern bemerkenswert, als in dieser Studie ein Aufreinigungsprotokoll verwendet wurde, das sich deutlich von der Aufreinigung in der vorliegenden Arbeit unterscheidet. Über die Studie von Yang und Trumpower hinausgehend, finden sich hier deutliche Belege, dass es sich bei den erfassten Chinonen um spezifisch gebundene Moleküle handelt. Die Bandenaufspaltung der beiden C=O-Streckschwingungen des Chinons ist

charakteristisch für die definierte Ausbildung von H-Brücken mit der Proteinumgebung [351]. Die im Vergleich zu freiem Chinon schärferen Banden zeigen eine festgelegte Orientierung und eingeschränkte konformationelle Freiheit der Chinonmoleküle. Andererseits kommt es bei der Bindung hier wie auch in anderen Studien [352,353] allenfalls zu minimalen Verschiebungen der einzelnen Chinonsignale, so dass sich aus diesem wichtigen Parameter leider kein deutlicher Indikator für eine spezifische Bindung ergibt.

Die ermittelten Bindungsstöchiometrien stützen das sogenannte *double-occupancy*-Modell, demzufolge zwei Chinonmoleküle am Chinioxidationszentrum binden [87,97]. Nach diesem Modell müssten wie hier beobachtet drei Chinonmoleküle pro  $bc_1$ -Monomer binden, zwei am  $Q_o$ -Zentrum und eines am  $Q_i$ -Zentrum. Ding *et. al.* [87] postulieren auf Basis der EPR-Signale, dass sich am  $Q_o$ -Zentrum eine schwächer und eine stärker gebundene Chinon-Spezies unterscheiden lassen ( $Q_{ow}$  und  $Q_{os}$ ). Auch dieser Befund wird durch die vorliegende Arbeit gestützt: Durch extensives Umpuffern lässt sich  $\sim 1$  Chinonmolekül aus dem Komplex entfernen, es könnte sich dabei sehr gut um  $Q_{ow}$  handeln. Bartoschek *et. al.* [97] konnten zeigen, dass durch die Titration verschiedener Inhibitoren selektiv 1-3 Chinonmoleküle aus dem bovinen  $bc_1$ -Komplex freigesetzt werden können. Dieser Befund liefert insofern eine stärkere Evidenz für das *double-occupancy*-Modell, als dass durch die Verwendung der Inhibitoren eine Zuordnung der Chinone zu den beiden Zentren  $Q_o$  und  $Q_i$  möglich ist. Eine Schwäche dieses Ansatzes gegenüber dem hier gewählten ist allerdings, dass nicht direkt das gebundene, sondern nur das freigesetzte Chinon durch NMR-spektroskopisch erfasst wurde, vor dem Hintergrund eines in Lösung vorliegenden Überschusses an Chinon. Das niedrige Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist daher ein berechtigter Kritikpunkt an dieser Methode. Ausblickend wäre es wünschenswert, den Ansatz der direkten, FTIR-spektroskopischen Detektion mit der Verwendung selektiver Inhibitoren zu verknüpfen. Die methodische Schwierigkeit liegt hier darin, dass das freigesetzte Chinon vom Protein abgetrennt werden muss, die dafür erforderlichen Waschschrte selbst aber auch zur Extraktion beitragen können, was sorgfältige Kontrollexperimente erforderlich macht. Der experimentelle Beleg für die doppelte Besetzung ist von großer Bedeutung für das Verständnis des Mechanismus der Chinoloxidation und der obligatorischen Aufspaltung des Elektronentransports. Zwei am  $Q_o$ -Zentrum gebundene Chinone würden einen raschen Elektronentransfer von der distalen Position - nahe des [2Fe-2S]-

Zentrums - zu der proximal zu Häm *b* gelegenen Position der Bindungstasche ermöglichen [95,96]. Die stabile Chinonbindung des *Paracoccus*-Komplexes liefert ein wichtiges Argument, die kristallographische Charakterisierung dieses Enzyms voranzutreiben.

Neben der Chinonstöchiometrie lieferte die Analyse spektraler Details Hinweise zu Protonierungsreaktionen im  $bc_1$ -Komplex, woraus sich wichtige mechanistische Aspekte der Chinonbindung erschließen könnten. In der spektralen Region oberhalb von  $1710\text{ cm}^{-1}$  lassen sich im FTIR-Spektrum Beiträge der Seitenketten von Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten zuordnen. Die Messung des  $bc_1$ -Komplexes bei verschiedenen pH-Werten deutet darauf hin, dass mit abnehmendem pH ein bestimmter Rest deprotoniert wird und stattdessen eine oder mehrere Protonierungen an anderer Stelle auftreten. Dies korreliert interessanterweise mit einem abnehmenden Chinongehalt bei niedrigerem pH-Wert. In einem weiteren Experiment wurde deshalb die spektrale Region um  $1700\text{ cm}^{-1}$  in Proben mit unterschiedlichem Chinongehalt beim selben pH-Wert untersucht. Es findet sich ein ganz ähnliches Muster von Protonierungs- und Deprotonierungsprozessen. Zusammenfassend scheint die Protonierung eines sauren Aminosäurerests, der mit dem Signal bei  $1746\text{ cm}^{-1}$  assoziiert ist, mit der Bindung eines Chinonmoleküls in Zusammenhang zu stehen und die Bindung eines Chinons vom Vorliegen eines zunächst deprotonierten Restes abzuhängen, wie der pH-Effekt nahelegt.

In einer Reihe von Arbeiten wird diskutiert, dass ein konserviertes Glutamat im Cyt *b* ( $^{Sc}\text{Glu272}$  bzw.  $^{Pd}\text{Glu295}$ ) als primärer Protonenakzeptor bei der Hydrochinonoxidation dient [94,50]. Es ist eine attraktive Hypothese, die beobachtete Protonierung diesem Rest zuzuordnen. Diese Annahme wird mittlerweile durch weiterführende Experimente mit Inhibitoren sowie der FTIR-spektroskopischen Charakterisierung des Hefe-Komplexes gestützt [347]. Die Zugabe von Stigmatellin führt in beiden Enzymen zum Verschwinden des  $1746\text{ cm}^{-1}$ -Signals. Kristallstrukturen mit Stigmatellin im  $Q_o$ -Zentrum zeigen, dass der Inhibitor mit seiner OH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke zum vermutlich deprotonierten Glu272 ausbildet [48]. Bei Zugabe des Inhibitors HHDBT zum Hefeenzym bleibt das  $1746\text{ cm}^{-1}$ -Signal dagegen in verbreiteter und geringfügig verschobener Form erhalten, was auf eine schwache Wasserstoffverbrückung des protonierten Restes hinweist [347]. In Übereinstimmung damit zeigt die Kristallstruktur mit diesem Inhibitor eine aus der Substratbindungstasche weggedrehte Seitenkette von



Glu272, die in vermutlich protonierter Form über ein H<sub>2</sub>O-Molekül mit der Propionat-Seitenkette von Häm *b<sub>L</sub>* in Verbindung tritt.

Die FTIR-Experimente ergänzen somit passend das statische Bild der Kristallstrukturen. Die kombinierten Ergebnisse weisen schlüssig darauf hin, dass bei der Hydrochinonbindung eine H-Brücke zwischen der OH-Gruppe des Substrats und dem deprotonierten <sup>Sc</sup>Glu272/<sup>Pd</sup>Glu295 entsteht und dass das Proton bei der Chinoloxidation auf die Carboxylseitenkette übertragen wird. Ohne weiteren Enzymumsatz verbleibt der Rest bei Bindung von Chinon oder HHDBT in protonierter Form; Stigmatellin fixiert hingegen die deprotonierte Form. Die oben beschriebenen Extraktionsversuche deuten zudem darauf hin, dass das an <sup>Sc</sup>Glu272/<sup>Pd</sup>Glu295 bindende Chinon der von Ding *et. al.* [87] postulierten Q<sub>ow</sub>-Spezies entspricht. Ein gewisser Widerspruch zeigt sich allerdings im Vergleich der FTIR-Daten des *Paracoccus*- und Hefeenzym: Da im bakteriellen Enzym das Protonierungssignal mit einem hohen Chinongehalt korreliert und bei partieller Extraktion verschwindet, ist es verwunderlich, dieses Signal im Hefekomplex überhaupt zu beobachten, da dieser nur mit einem deutlich geringeren Chinongehalt aufgereinigt werden kann [347]. Dies stellt insbesondere die Zuordnung zu einer schwach bindenden Chinonspezies in Frage.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, intrinsisch unterschiedliche pK-Werte für den relevanten Glutamatrest in beiden Enzymen zu postulieren, so dass der freie Rest in Abwesenheit von Substrat im Hefeenzym häufiger in protonierter Form vorliegt als im bakteriellen Enzym. Gegen diese Hypothese spricht der hohe evolutionäre Konservierungsgrad von Cyt *b*. Andererseits würde sie eine Erklärung für die offensichtlich deutlich unterschiedliche Chinonbindungsaffinität liefern: Der Hefe-*bc<sub>1</sub>* könnte mit einem bereits protonierten Glu272 keine H-Brücke zum Substrat ausbilden. Eine definitive und differenzierte Aussage lässt sich ausblickend wohl nur mit weiterführenden Studien treffen, in denen relevante saure Reste im Enzym gezielt ersetzt werden. Eine entsprechende Mutagenesestudie wurde bereits begonnen (Thomas Kleinschroth, unveröffentlichte Ergebnisse). Die gewonnenen Erkenntnisse wären nicht nur für das mechanistische Verständnis von Relevanz. Eine detaillierte Beschreibung der Chinonbindung hätte große praktische Bedeutung, etwa in Bezug auf den Einsatz von Chinonanaloga als Fungizide und Malaria-Therapeutika [34].

Um die FTIR-Spektren des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes zuordnen zu können, wurden zum Vergleich die löslichen Ektodomänen von Cyt *c<sub>1</sub>* und ISP untersucht. Als weiteres Teilprojekt

wurde daher ein Aufreinigungsprotokoll für das durch limitierte Proteolyse erzeugte Rieske-Proteinfragment (ISF) erarbeitet (Abbildung 55). Es kombiniert Elemente bereits beschriebener Prozeduren [259,276], mit denen für sich genommen die in dieser Arbeit benötigte hohe Reinheit nicht erzielt werden konnte. Insbesondere Spuren von Cyt  $c_1$  wirken sich in zweifacher Hinsicht störend aus: (i) Die deutlich höhere Absorption der Hämgruppe dominiert das schwächer ausgeprägte UV/Vis-Spektrum des ISF. (ii) Aufgrund des ähnlichen Redoxpotentials und der vielfältigen Porphyrinschwingungsmodi interferieren Cyt  $c_1$ -Verunreinigungen mit der redoxabhängigen FTIR-spektroskopischen Analyse des ISF. Die gesteigerte Reinheit geht allerdings auf Kosten der Ausbeute, die mit dieser Präparationsmethode erzielt werden kann. Die Ausbeute ist auch generell limitiert, da auf den zuvor aufgereinigten  $bc_1$ -Komplex zurückgegriffen muss, der als komplexes Membranprotein nur in geringer Ausbeute exprimiert werden kann. Eine heterologe Überexpression mit quantitativem Einbau des Metallzentrums sollte vor diesem Hintergrund weiter angestrebt werden. Eine detaillierte Analyse der FTIR-spektroskopischen Eigenschaften des durch limitierte Proteolyse gewonnenen ISF ist in Arbeit (Petra Hellwig, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese soll Aufschluss über redoxabhängige Protonierungsreaktionen sowie eine davon abhängige Konformationsdynamik geben, wie sie von Iwata *et. al.* [47] postuliert wurde.

## Zusammenfassung

Cytochrom *bc*-Komplexe sind zentrale Enzyme energietransduzierender Elektronentransportketten. Anerkanntes Funktionsprinzip ist der Q-Zyklus; wesentliche mechanistische Details insbesondere der Chinoloxidation am  $Q_o$ -Zentrum sind jedoch noch unklar. Ein detailliertes Verständnis des  $Q_o$ -Zentrums ist auch insofern von Interesse, als hier Inhibitoren in Form von Fungiziden und Malariatherapeutika wichtige Anwendung finden. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe mitochondrialer Komplexe kristallographisch charakterisiert, die Struktur eines bakteriellen Enzyms steht jedoch aus. Hauptziel dieser Arbeit war es, Ansätze zur Strukturaufklärung des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes aus *Paracoccus denitrificans* (*P.d.*) zu finden, der als homologes Enzym mitochondrialer Komplexe bei einfacher genetischer Zugänglichkeit ein wichtiges Modellsystem darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Kristallisation des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes aus *S. cerevisiae* aufgebaut, die mit Hilfe monoklonaler Antikörperfragmente ( $F_v$ ) gegen die Rieske-Untereinheit (ISP) erreicht wurde; die  $F_v$ -Fragmente erleichtern die Ausbildung von Kristallkontakten. Die Epitopregion in der Hefestruktur wurde charakterisiert und genetisch auf den bakteriellen Komplex übertragen, um dessen Ko-Kristallisation mit dem bereits verfügbaren  $F_v$  zu ermöglichen. Die  $F_v$ -Bindung der *bc*<sub>1</sub>-Epitop-Mutanten wurde in einem *pull-down-assay* untersucht. Punktuelle Anpassungen führten zu keiner signifikanten Bindung, ein weitergehender Austausch des entsprechenden ISP-Bereichs verbesserte die Bindung hingegen deutlich. Die besten Ergebnisse konnten mit chimären Enzymen erzielt werden, bei denen die gesamte ISP-Ektodomäne durch das Hefe-Homologe ersetzt wurde. Aufbauend auf dieser Arbeit scheint die  $F_v$ -vermittelte Kristallisation des Enzyms somit ein greifbares Ziel.

Eine komplementäre Strategie zielte auf die strukturelle Charakterisierung der Rieske-Ektodomäne (ISF). Das klonierte ISF wurde in *E. coli* überexprimiert, lag jedoch fast vollständig in *inclusion bodies* vor. Das ISF konnte in eine lösliche Form rückgefaltet werden, die anschließende chemische Rekonstitution zum Holo-Protein gelang jedoch nur mit einer Ausbeute von ~ 1 %. Die geringe Menge an löslichem ISF, die sich nach Expression in *E. coli* isolieren lässt, trägt kein [2Fe-2S]-Zentrum. Durch Koexpression der für die Biogenese von Eisen-Schwefel-Zentren relevanten Gencluster konnte die lösliche ISF-Fraktion *in vivo* in die Holo-Form konvertiert werden. Auch hier war jedoch die Gesamtausbeute für strukturelle Untersuchungen zu gering. Eine homologe

Expression in *P.d.* war nur für das komplette ISP nachweisbar, nicht für das verkürzte ISF. Durch gerichtete Mutagenese konnte hier erstmals gezeigt werden, dass das bakterielle Rieske-Protein über den Tat-Translokationsweg in die Membran inseriert.

Die Kristallstrukturen mitochondrialer  $bc_1$ -Komplexe zeigen ein dimeres Enzym. Die Assoziation des bakteriellen Komplexes wurde in dieser Arbeit mit der analytischen Ultrazentrifugation untersucht, und auch hier wurde eindeutig ein Dimer nachgewiesen. Dynamische Messverfahren - Gelfiltration und Nativgelelektrophorese - deuteten jedoch auf einen höheren Assoziationszustand hin. Es bleibt unklar, ob diese Diskrepanz durch Formparameter oder die Detergenzbindung begründet ist oder ob unter bestimmten Versuchsbedingungen möglicherweise Tetramere vorliegen. *In situ* ist der  $bc_1$ -Komplex strukturell mit den Komplexen I und IV sowie dem Elektronenüberträger Cyt  $c_{552}$  assoziiert. Die Analyse verschiedener Deletionsstämme zeigte, dass Komplex I der Atmungskette durch diesen Superkomplex stabilisiert wird. Dieser Befund konnte kürzlich in anderen Arbeiten auch an menschlichen Mitochondrien bestätigt werden.

Neben strukturellen Aspekten wurden am  $bc_1$ -Komplex auch die  $H^+$ -Translokation und die Chinonbindung untersucht. Da chemische Modifikationsexperimente zeigen, dass ein saurer Rest im ISP eine kritische Rolle für die Kopplung von  $H^+$ -Translokation und Elektronentransport spielt, wurden durch gerichtete Mutagenese kombinatorisch saure Reste gegen entsprechende Säureamide ersetzt. Die biochemische Charakterisierung wurde nur für eine Fünffach-Mutante durchgeführt; diese erwies sich jedoch als zu instabil, um verlässliche Daten aus  $H^+$ -Pumpexperimenten zu gewinnen. Die Charakterisierung der übrigen Mutanten scheint lohnenswert, da der relevante Aminosäurerest auch in anderen Arbeiten noch nicht identifiziert werden konnte. Der Gehalt des aufgereinigten Enzyms an spezifisch gebundenem Chinon wurde FTIR-spektroskopisch quantifiziert. Eine Stöchiometrie von  $\sim 3$  Chinonmolekülen/Monomer stützt das *double occupancy*-Modell, demzufolge zwei Substratmoleküle am  $Q_o$ -Zentrum binden; das dritte Chinon bindet am  $Q_i$ -Zentrum. Partielle Extraktion des Chinons und Messungen bei verschiedenen pH-Werten zeigten, dass die Substratbindung mit Protonierung eines sauren Rests einhergeht. Möglicherweise handelt es sich dabei um Glu295 des Cytochrom *b*, das auf Basis der Kristallstrukturen als primärer  $H^+$ -Akzeptor am  $Q_o$ -Zentrum diskutiert wird. Aufbauend auf dieser Arbeit können die an der Chinonbindung beteiligten Reste durch Mutagenese identifiziert werden.

## Literatur

1. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism, *Nature* 191, 144-144
2. Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature* 376, 660-669
3. Friedrich T (2001) Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump?, *J Bioenerg Biomembr* 33, 169-177
4. Mitchell P (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation, *FEBS Lett* 59, 137-139
5. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science* 269, 1069-1074
6. Gennis RB (2004) Coupled proton and electron transfer reactions in cytochrome oxidase, *Front Biosci* 9, 581-591
7. Margulis L (1970) Origin of Eukaryote Cells, *Yale University Press New Haven*
8. John P, Whatley FR (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion, *Nature* 254, 495-498
9. Gray MW, Burger G, Lang BF (2001) The origin and early evolution of mitochondria, *Genome Biol* 2
10. Beijerinck M (1910) Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien, *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II* 25, 30-63
11. Woese CR (1987) Bacterial evolution, *Microbiol Rev* 51, 221-271
12. de Gier JW, Lubben M, Reijnders WN, Tipker CA, Slotboom DJ, Van Spanning RJ, Stouthamer AH, van der OJ (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*, *Mol Microbiol* 13, 183-196
13. Chance B, Williams GR (1955) A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation, *Nature* 176, 250-254
14. Hatefi Y (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system, *Annu Rev Biochem* 54, 1015-1069
15. Gupte S, Wu ES, Hoehli L, Hoehli M, Jacobson K, Sowers AE, Hackenbrock CR (1984) Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2606-2610
16. Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport, *J Bioenerg Biomembr* 18, 331-368
17. Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175, 720-731
18. Fowler LR, Richardson SH (1963) Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system, *J Biol Chem* 238, 456-463
19. Ragan CI, Heron C (1978) The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association, *Biochem J* 174, 783-790
20. Bruel C, Brasseur R, Trumpower BL (1996) Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex, *J Bioenerg Biomembr* 28, 59-68
21. Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W, Stuart RA (2000) The cytochrome *bc*<sub>1</sub> and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria, *J Biol Chem* 275, 18093-18098
22. Schägger H, Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J* 19, 1777-1783
23. Berry EA, Trumpower BL (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bc*<sub>1</sub> and cytochrome *c-aa*<sub>3</sub> complexes, *J Biol Chem* 260, 2458-2467
24. Sone N, Sekimachi M, Kutoh E (1987) Identification and properties of a quinol oxidase supercomplex composed of a *bc*<sub>1</sub> complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3, *J Biol Chem* 262, 15386-15391
25. Iwasaki T, Matsuura K, Oshima T (1995) Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus sp.* strain 7. I. The archaeal terminal oxidase supercomplex is a functional fusion of respiratory complexes III and IV with no *c*-type cytochromes, *J Biol Chem* 270, 30881-30892

26. Niebisch A, Bott M (2003) Purification of a cytochrome *bc-aa<sub>3</sub>* supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome *aa<sub>3</sub>* oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome *c<sub>1</sub>*, *J Biol Chem* 278, 4339-4346
27. Leif H, Sled VD, Ohnishi T, Weiss H, Friedrich T (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*, *Eur J Biochem* 230, 538-548
28. Fernandes AS, Pereira MM, Teixeira M (2002) Purification and characterization of the complex I from the respiratory chain of *Rhodothermus marinus*, *J Bioenerg Biomembr* 34, 413-421
29. Gemperli AC, Dimroth P, Steuber J (2002) The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump, *J Biol Chem* 277, 33811-33817
30. Peng G, Fritzsche G, Zickermann V, Schägger H, Mentele R, Lottspeich F, Bostina M, Radermacher M, Huber R, Stetter KO, Michel H (2003) Isolation, characterization and electron microscopic single particle analysis of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the hyperthermophilic eubacterium *Aquifex aeolicus*, *Biochemistry* 42, 3032-3039
31. Crofts AR, Berry EA (1998) Structure and function of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex of mitochondria and photosynthetic bacteria, *Curr Opin Struct Biol* 8, 501-509
32. Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Q<sub>0</sub> inhibitor fungicides, *Pest Manag Sci* 58, 859-867
33. Mather MW, Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Cooley JW, McIntosh MT, Daldal F, Vaidya AB (2005) Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system, *J Biol Chem* 280, 27458-65
34. Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Lange BB, Hill P, Meunier B, Meshnick SR, Trumppower BL (2005) Cytochrome *b* mutations that modify the ubiquinol-binding pocket of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 280, 17142-17148
35. Yang XH, Trumppower BL (1986) Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*, *J Biol Chem* 261, 12282-12289
36. Schägger H, Link TA, Engel WD, von Jagow G (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the *bc<sub>1</sub>* complex from beef heart, *Methods Enzymol* 126, 224-237
37. Borst P, Grivell LA (1981) Small is beautiful-portrait of a mitochondrial genome, *Nature* 290, 443-444
38. Kurowski B, Ludwig B (1987) The genes of the *Paracoccus denitrificans bc<sub>1</sub>* complex. Nucleotide sequence and homologies between bacterial and mitochondrial subunits, *J Biol Chem* 262, 13805-13811
39. Baker SC, Ferguson SJ, Ludwig B, Page MD, Richter OMH, van Spanning RJM (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility, *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1046-1078
40. Beattie DS, Clejan L, Chen YS, Lin CI, Sidhu A (1981) Orientation of complex III in the yeast mitochondrial membrane: labeling with <sup>125</sup>I diazobenzenesulfonate and functional studies with the decyl analogue of coenzyme Q as substrate, *J Bioenerg Biomembr* 13, 357-373
41. Li Y, Leonard K, Weiss H (1981) Membrane-bound and water-soluble cytochrome *c<sub>1</sub>* from *Neurospora* mitochondria, *Eur J Biochem* 116, 199-205
42. Ohnishi T, Schägger H, Meinhardt SW, LoBrutto R, Link TA, von Jagow G (1989) Spatial organization of redox active centers in the bovine heart ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase, *J Biol Chem* 264, 735-744
43. Gennis RB, Barquera B, Hacker B, Van Doren SR, Arnaud S, Crofts AR, Davidson E, Gray KA, Daldal F (1993) The *bc<sub>1</sub>* complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*, *J Bioenerg Biomembr* 25, 195-209
44. Ozawa T, Tanaka M, Shimomura Y (1983) Crystallization of cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 921-925
45. Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from bovine heart mitochondria, *Science* 277, 60-66
46. Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc<sub>1</sub>*, *Nature* 392, 677-684
47. Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *Science* 281, 64-71
48. Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmann T, Michel H (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment, *Structure Fold Des* 8, 669-684

49. Lange C, Hunte C (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome  $bc_1$  complex with its bound substrate cytochrome  $c$ , *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2800-2805
50. Palsdottir H, Lojero CG, Trumpower BL, Hunte C (2003) Structure of the yeast cytochrome  $bc_1$  complex with a hydroxyquinone anion  $Q_0$  site inhibitor bound, *J Biol Chem* 278, 31303-31311
51. Kleymann G, Ostermeier C, Ludwig B, Skerra A, Michel H (1995) Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes, *Biotechnology (N Y)* 13, 155-160
52. Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome  $b_6f$  complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science* 302, 1009-1014
53. Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D (2003) An atypical haem in the cytochrome  $b_6f$  complex, *Nature* 426, 413-418
54. Sone N, Takagi T (1990) Monomer-dimer structure of cytochrome- $c$  oxidase and cytochrome  $bc_1$  complex from the thermophilic bacterium PS3, *Biochim Biophys Acta* 1020, 207-212
55. Montoya G, te Kaat K, Rodgers S, Nitschke W, Sinning I (1999) The cytochrome  $bc_1$  complex from *Rhodovulum sulfidophilum* is a dimer with six quinones per monomer and an additional 6-kDa component, *Eur J Biochem* 259, 709-718
56. Xiao K, Chandrasekaran A, Yu L, Yu CA (2001) Evidence for the intertwined dimer of the cytochrome  $bc_1$  complex in solution, *J Biol Chem* 276, 46125-46131
57. Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M, Berry EA (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the  $bc_1$  complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors, *Biochemistry* 38, 15807-15826
58. Rieske JS (1964) Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome  $c$  reductase complex of the respiratory chain, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15, 338-338
59. Trumpower BL, Edwards CA (1979) Purification of a reconstitutively active iron-sulfur protein (oxidation factor) from succinate:cytochrome  $c$  reductase complex of bovine heart mitochondria, *J Biol Chem* 254, 8697-8706
60. Trumpower BL, Gennis RB (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation, *Annu Rev Biochem* 63, 675-716
61. Riedel A, Rutherford AW, Hauska G, Müller A, Nitschke W (1991) Chloroplast Rieske Center. EPR study on its spectral characteristics, relaxation and orientation properties, *J Biol Chem* 266, 17838-17844
62. Schäfer G, Purschke W, Schmidt CL (1996) On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man, *FEMS Microbiol Rev* 18, 173-188
63. Schmidt CL, Shaw L (2001) A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins, *J Bioenerg Biomembr* 33, 9-26
64. Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?, *Mol Microbiol* 22, 393-404
65. Molik S, Karnachov I, Weidlich C, Herrmann RG, Klosgen RB (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome  $b_6f$  complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts?, *J Biol Chem* 276, 42761-42766
66. Beattie DS, Wang Y, Obungu VH (1999) The role of various domains of the iron-sulfur protein in the assembly and activity of the cytochrome  $bc_1$  complex of yeast mitochondria, *J Bioenerg Biomembr* 31, 215-224
67. Iwata S, Saynovits M, Link TA, Michel H (1996) Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome  $bc_1$  complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution, *Structure* 4, 567-579
68. Link TA (1999) The structure of Rieske and Rieske-type proteins, *Advances in inorganic chemistry* 47, 83-157
69. Carrell CJ, Zhang H, Cramer WA, Smith JL (1997) Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein, *Structure* 5, 1613-1625
70. Hunsicker-Wang LM, Heine A, Chen Y, Luna EP, Todaro T, Zhang YM, Williams PA, McRee DE, Hirst J, Stout CD, Fee JA (2003) High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison, *Biochemistry* 42, 7303-7317
71. Kauppi B, Lee K, Carredano E, Parales RE, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S (1998) Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase, *Structure* 6, 571-586

72. Gatti DL, Meinhardt SW, Ohnishi T, Tzagoloff A (1989) Structure and function of the mitochondrial  $bc_1$  complex. A mutational analysis of the yeast Rieske iron-sulfur protein, *J Mol Biol* 20, 421-435
73. Gurbiel RJ, Batie CJ, Sivaraja M, True AE, Fee JA, Hoffman BM, Ballou DP (1989) Electron-nuclear double resonance spectroscopy of  $^{15}\text{N}$ -enriched phthalate dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* proves that two histidines are coordinated to the [2Fe-2S] Rieske-type clusters, *Biochemistry* 28, 4861-4871
74. Britt RD, Sauer K, Klein MP, Knaff DB, Kriauciunas A, Yu CA, Yu L, Malkin R (1991) Electron spin echo envelope modulation spectroscopy supports the suggested coordination of two histidine ligands to the Rieske Fe-S centers of the cytochrome  $b_6f$  complex of spinach and the cytochrome  $bc_1$  complexes of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* R-26, and bovine heart mitochondria, *Biochemistry* 30, 1892-1901
75. Davidson E, Ohnishi T, Atta-Asafo-Adjei E, Daldal F (1992) Potential ligands to the [2Fe-2S] Rieske cluster of the cytochrome  $bc_1$  complex of *Rhodobacter capsulatus* probed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 31, 3342-3351
76. Van Doren SR, Yun CH, Crofts AR, Gennis RB (1993) Assembly of the Rieske iron-sulfur subunit of the cytochrome  $bc_1$  complex in the *Escherichia coli* and *Rhodobacter sphaeroides* membranes independent of the cytochrome  $b$  and  $c_1$  subunits, *Biochemistry* 32, 628-636
77. Denke E, Merbitz-Zahradnik T, Hatzfeld OM, Snyder CH, Link TA, Trumpower BL (1998) Alteration of the midpoint potential and catalytic activity of the rieske iron-sulfur protein by changes of amino acids forming hydrogen bonds to the iron-sulfur cluster, *J Biol Chem* 273, 9085-9093
78. Schröter T, Hatzfeld OM, Gemeinhardt S, Korn M, Friedrich T, Ludwig B, Link TA (1998) Mutational analysis of residues forming hydrogen bonds in the Rieske [2Fe-2S] cluster of the cytochrome  $bc_1$  complex in *Paracoccus denitrificans*, *Eur J Biochem* 255, 100-106
79. Snyder CH, Merbitz-Zahradnik T, Link TA, Trumpower BL (1999) Role of the Rieske iron-sulfur protein midpoint potential in the protonmotive Q-cycle mechanism of the cytochrome  $bc_1$  complex, *J Bioenerg Biomembr* 31, 235-242
80. Guergova-Kuras M, Kuras R, Ugulava N, Hadad I, Crofts AR (2000) Specific mutagenesis of the rieske iron-sulfur protein in *Rhodobacter sphaeroides* shows that both the thermodynamic gradient and the pK of the oxidized form determine the rate of quinol oxidation by the  $bc_1$  complex, *Biochemistry* 39, 7436-7444
81. von Jagow G, Ohnishi T (1985) The chromone inhibitor stigmatellin-binding to the ubiquinol oxidation center at the C-side of the mitochondrial membrane, *FEBS Lett* 185, 311-315
82. Kim H, Xia D, Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1998) Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial  $bc_1$  complex from bovine heart, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8026-8033
83. Mitchell P (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome  $bc_1$  complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle, *FEBS Lett* 56, 1-6
84. Slater EC (1973) The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin, *Biochim Biophys Acta* 301, 129-154
85. Gao X, Wen X, Esser L, Quinn B, Yu L, Yu CA, Xia D (2003) Structural basis for the quinone reduction in the  $bc_1$  complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome  $bc_1$  with bound substrate and inhibitors at the  $Q_i$  site, *Biochemistry* 42, 9067-9080
86. Trumpower BL (1981) New concepts on the role of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain, *J Bioenerg Biomembr* 13, 1-24
87. Ding H, Robertson DE, Daldal F, Dutton PL (1992) Cytochrome  $bc_1$  complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the  $Q_o$  site: a double-occupancy  $Q_o$  site model, *Biochemistry* 31, 3144-3158
88. Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Moser CC, Dutton PL, Daldal F (2000) Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome  $bc_1$  and its implications for energy conversion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4567-4572
89. Samoilova RI, Kolling D, Uzawa T, Iwasaki T, Crofts AR, Dikanov SA (2001) The interaction of the Rieske iron sulfur protein with occupants of the  $Q_o$ -site of the  $bc_1$  complex, probed by 1D and 2D electron spin echo envelope modulation, *J Biol Chem* 277, 4605-8
90. Brandt U, Okun JG (1997) Role of deprotonation events in ubihydroquinone:cytochrome  $c$  oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria, *Biochemistry* 36, 11234-11240
91. Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M, Berry EA (1998) Mechanistic aspects of the  $Q_o$ -site of the  $bc_1$ -complex as revealed by mutagenesis studies, and the crystallographic structure, *The Phototrophic Prokaryotes* 229-239



92. Ugulava NB, Crofts AR (1998) CD-monitored redox titration of the Rieske Fe-S protein of *Rhodobacter sphaeroides*: pH dependence of the midpoint potential in isolated  $bc_1$  complex and in membranes, *FEBS Lett* 440, 409-413
93. Snyder C, Trumpower BL (1998) Mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome  $bc_1$  complex: pre-steady-state kinetics of cytochrome  $bc_1$  complexes containing site-directed mutants of the Rieske iron-sulfur protein, *Biochim Biophys Acta* 1365, 125-134
94. Crofts AR, Hong S, Ugulava N, Barquera B, Gennis R, Guergova-Kuras M, Berry EA (1999) Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the  $bc_1$  complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10021-10026
95. Ding H, Moser CC, Robertson DE, Tokito MK, Daldal F, Dutton PL (1995) Ubiquinone pair in the  $Q_o$  site central to the primary energy conversion reactions of cytochrome  $bc_1$  complex, *Biochemistry* 34, 15979-15996
96. Brandt U (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome  $bc_1$  complex by proton-gated charge transfer, *FEBS Lett* 387, 1-6
97. Bartoschek S, Johansson M, Geierstanger BH, Okun JG, Lancaster CR, Humpfer E, Yu L, Yu CA, Griesinger C, Brandt U (2001) Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome  $bc_1$  complex, *J Biol Chem* 276, 35231-35234
98. Link TA (1997) The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q(P)) site of the cytochrome  $bc_1$  complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism, *FEBS Lett* 412, 257-264
99. Lancaster CR, Michel H (1997) The coupling of light-induced electron transfer and proton uptake as derived from crystal structures of reaction centres from *Rhodospseudomonas viridis* modified at the binding site of the secondary quinone,  $Q_B$ , *Structure* 5, 1339-1359
100. Snyder CH, Gutierrez-Cirlos EB, Trumpower BL (2000) Evidence for a concerted mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome  $bc_1$  complex, *J Biol Chem* 275, 13535-13541
101. Berry EA, Huang LS (2003) Observations concerning the quinol oxidation site of the cytochrome  $bc_1$  complex, *Febs Letters* 555, 13-20
102. Brugna M, Rodgers S, Schricker A, Montoya G, Kazmeier M, Nitschke W, Sinning I (2000) A spectroscopic method for observing the domain movement of the Rieske iron-sulfur protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2069-2074
103. Schoepp B, Brugna M, Riedel A, Nitschke W, Kramer DM (1999) The  $Q_o$ -site inhibitor DBMIB favours the proximal position of the chloroplast Rieske protein and induces a pK-shift of the redox-linked proton, *FEBS Lett* 450, 245-250
104. Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM (2002) Certain metal ions are inhibitors of cytochrome  $b_6/f$  complex 'Rieske' iron-sulfur protein domain movements, *Biochemistry* 41, 4070-4079
105. Tian H, Yu L, Mather MW, Yu CA (1998) Flexibility of the neck region of the rieske iron-sulfur protein is functionally important in the cytochrome  $bc_1$  complex, *J Biol Chem* 273, 27953-27959
106. Tian H, White S, Yu L, Yu CA (1999) Evidence for the head domain movement of the rieske iron-sulfur protein in electron transfer reaction of the cytochrome  $bc_1$  complex, *J Biol Chem* 274, 7146-7152
107. Xiao K, Yu L, Yu CA (2000) Confirmation of the involvement of protein domain movement during the catalytic cycle of the cytochrome  $bc_1$  complex by the formation of an intersubunit disulfide bond between cytochrome  $b$  and the iron-sulfur protein, *J Biol Chem* 275, 38597-38604
108. Nett JH, Hunte C, Trumpower BL (2000) Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome  $bc_1$  complex, *Eur J Biochem* 267, 5777-5782
109. Obungu VH, Wang Y, Amyot SM, Gocke CB, Beattie DS (2000) Mutations in the tether region of the iron-sulfur protein affect the activity and assembly of the cytochrome  $bc_1$  complex of yeast mitochondria, *Biochim Biophys Acta* 1457, 36-44
110. Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR (2000) Structure and function of cytochrome  $bc$  complexes, *Annu Rev Biochem* 69:1005-75., 1005-1075
111. Izrailev S, Crofts AR, Berry EA, Schulten K (1999) Steered molecular dynamics simulation of the Rieske subunit motion in the cytochrome  $bc_1$  complex, *Biophys J* 77, 1753-1768
112. Cocco T, Cutecchia G, Ludwig B, Korn M, Papa S, Lorusso M (2001) Carboxyl residues in the iron-sulfur protein are involved in the proton pumping activity of *P. denitrificans*  $bc_1$  complex, *Biochemistry* 40, 15396-15402
113. Crofts AR (2004) The cytochrome  $bc_1$  complex: function in the context of structure, *Annu Rev Physiol* 66, 689-733

114. Kolling DR, Samoilova RI, Holland JT, Berry EA, Dikanov SA, Crofts AR (2003) Exploration of ligands to the Q<sub>i</sub> site semiquinone in the bc<sub>1</sub> complex using high-resolution EPR, *J Biol Chem* 278, 39747-39754
115. Lange C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex structure, *EMBO J* 20, 6591-6600
116. De Vries S, Albracht SP, Berden JA, Slater EC (1982) The pathway of electrons through QH<sub>2</sub>:cytochrome c oxidoreductase studied by pre-steady-state kinetics, *Biochim Biophys Acta* 681, 41-53
117. Bechmann G, Weiss H, Rich PR (1992) Non-linear inhibition curves for tight-binding inhibitors of dimeric ubiquinol-cytochrome c oxidoreductases. Evidence for rapid inhibitor mobility, *Eur J Biochem* 208, 315-325
118. Trumpower BL (2002) A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome bc<sub>1</sub> complex, *Biochim Biophys Acta* 1555, 166-173
119. Covian R, Trumpower BL (2005) Rapid Electron Transfer between Monomers when the Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex Dimer Is Reduced through Center N, *J Biol Chem* 280, 22732-22740
120. Brandt U, Trumpower B (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29, 165-197
121. Furbacher PN, Girvin ME, Cramer WA (1989) On the question of interheme electron transfer in the chloroplast cytochrome b<sub>6</sub> *in situ*, *Biochemistry* 28, 8990-8998
122. de Vitry C, Desbois A, Redeker V, Zito F, Wollman FA (2004) Biochemical and spectroscopic characterization of the covalent binding of heme to cytochrome b<sub>6</sub>, *Biochemistry* 43, 3956-3968
123. Yan J, Cramer WA (2003) Functional insensitivity of the cytochrome b<sub>6</sub>f complex to structure changes in the hinge region of the Rieske iron-sulfur protein, *J Biol Chem* 278, 20925-20933
124. Wade N (1998) Experiment Supports Theory That Life Began in Volcanic Environment, *New York Times*
125. Huber C, Wächtershäuser G (1998) Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life, *Science* 281, 670-672
126. Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry - the iron sulfur world, *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 58, 85-201
127. Beinert H (2000) A tribute to sulfur, *European Journal of Biochemistry* 267, 5657-5664
128. Warburg O (1949) Heavy metal prosthetic groups and enzyme action, *Clarendon Press*, Oxford
129. Beinert H, Dervartanian DV, Hemmerich P, Veeger C, Van Voor (1965) On the ligand field of redox active non-heme iron in proteins, *Biochim Biophys Acta* 96, 530-533
130. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI (1996) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology, *Chem Rev* 96, 2239-2314
131. Beinert H, Holm RH, Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science* 277, 653-659
132. Einsle O, Tezcan FA, Andrade SL, Schmid B, Yoshida M, Howard JB, Rees DC (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor, *Science* 297, 1696-1700
133. Dean DR, Bolin JT, Zheng L (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis, *J Bacteriol* 175, 6737-6744
134. Lovenberg W, Walker MN (1978) Rubredoxin, *Methods Enzymol* 53, 340-346
135. Cammack R (1992) Iron sulfur Clusters in enzymes - themes and variations, *Advances in inorganic chemistry* 38, 281-322
136. Bartsch RG (1978) Purification of (4Fe-4S)<sub>1-2</sub>-ferredoxins (high-potential iron-sulfur proteins) from bacteria, *Methods Enzymol* 53, 329-340
137. Breton JL, Duff JL, Butt JN, Armstrong FA, George SJ, Petillot Y, Forest E, Schäfer G, Thomson AJ (1995) Identification of the iron-sulfur clusters in a ferredoxin from the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. Evidence for a reduced [3Fe-4S] cluster with pH-dependent electronic properties, *Eur J Biochem* 233, 937-946
138. Werst MM, Kennedy MC, Houseman AL, Beinert H, Hoffman BM (1990) Characterization of the [4Fe-4S]<sup>+</sup> cluster at the active site of aconitase by <sup>57</sup>Fe, <sup>33</sup>S, and <sup>14</sup>N electron nuclear double resonance spectroscopy, *Biochemistry* 29, 10533-10540
139. Ollagnier S, Mulliez E, Schmidt PP, Eliasson R, Gaillard J, Deronzier C, Bergman T, Graslund A, Reichard P, Fontecave M (1997) Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction, *J Biol Chem* 272, 24216-24223
140. Kiley PJ, Beinert H (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria, *Curr Opin Microbiol* 6, 181-185

141. Rouault TA, Klausner RD (1996) Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron, *Trends in Biochemical Sciences* 21, 174-177
142. Hidalgo E, Bollinger JM, Bradley TM, Walsh CT, Demple B (1995) Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription, *J Biol Chem* 270, 20908-20914
143. Khoroshilova N, Popescu C, Munck E, Beinert H, Kiley PJ (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6087-6092
144. Ugalde RA, Imperial J, Shah VK, Brill WJ (1984) Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor in the absence of nitrogenase, *J Bacteriol* 159, 888-893
145. Jacobson MR, Cash VL, Weiss MC, Laird NF, Newton WE, Dean DR (1989) Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*, *Mol Gen Genet* 219, 49-57
146. Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2754-2758
147. Zheng L, White RH, Cash VL, Dean DR (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product, *Biochemistry* 33, 4714-4720
148. Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 599-604
149. Krebs C, Agar JN, Smith AD, Frazzon J, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK (2001) IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis, *Biochemistry* 40, 14069-14080
150. Zheng L, Cash VL, Flint DH, Dean DR (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*, *J Biol Chem* 273, 13264-13272
151. Jung YS, Gao-Sheridan HS, Christiansen J, Dean DR, Burgess BK (1999) Purification and biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein, *J Biol Chem* 274, 32402-32410
152. Hoff KG, Silberg JJ, Vickery LE (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7790-7795
153. Tokumoto U, Takahashi Y (2001) Genetic analysis of the isc operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins, *J Biochem (Tokyo)* 130, 63-71
154. Nakamura M, Saeki K, Takahashi Y (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster, *J Biochem (Tokyo)* 126, 10-18
155. Chen S, Zheng L, Dean DR, Zalkin H (1997) Role of NifS in maturation of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase, *J Bacteriol* 179, 7587-7590
156. Holton B, Wu X, Tsapin AI, Kramer DM, Malkin R, Kallas T (1996) Reconstitution of the 2Fe-2S center and g = 1.89 electron paramagnetic resonance signal into overproduced *Nostoc sp.* PCC 7906 Rieske protein, *Biochemistry* 35, 15485-15493
157. Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, Luther C, Ruzicka FJ, Beinert H, Kiley PJ (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14895-14900
158. Patzer SI, Hantke K (1999) SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 181, 3307-3309
159. Takahashi Y, Tokumoto U (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids, *J Biol Chem* 277, 28380-28383
160. Gerber J, Lill R (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology, *Mitochondrion* 2, 71-86
161. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins, *EMBO J* 18, 3981-3989
162. Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A), *Hum Mol Genet* 8, 743-749
163. Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Mühlenhoff U, Kispal G, Lill R (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins, *Embo Reports* 2, 715-720
164. Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione, *J Biol Chem* 277, 26944-26949

165. Mühlhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins, *Human Molecular Genetics* 11, 2025-2036
166. Malkin R, Rabinowitz JC (1966) The reconstitution of clostridial ferredoxin, *Biochem Biophys Res Commun* 23, 822-827
167. Lu WP, Schiau I, Cunningham JR, Ragsdale SW (1993) Sequence and expression of the gene encoding the corrinoid/iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* and reconstitution of the recombinant protein to full activity, *J Biol Chem* 268, 5605-5614
168. Moulis JM, Davasse V, De Jesus F (1994) Characteristic features of the heterologous functional synthesis in *Escherichia coli* of a 2[4Fe-4S] ferredoxin, *Biometals* 7, 272-278
169. Cheng H, Xia B, Reed GH, Markley JL (1994) Optical, EPR, and H-1-NMR spectroscopy of serine-ligated [2Fe-2S] ferredoxins produced by site-directed mutagenesis of cysteine residues in recombinant *Anabaena-7120* vegetative ferredoxins, *Biochemistry* 33, 3155-3164
170. Pagani S, Bonomi F, Cerletti P (1984) Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin, *Eur J Biochem* 142, 361-366
171. Cerletti P (1986) Seeking a better job for an under-employed enzyme - Rhodanese, *Trends in Biochemical Sciences* 11, 369-372
172. Bonomi F, Pagani S, Kurtz DM, Jr. (1985) Enzymic synthesis of the 4Fe-4S clusters of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin, *Eur J Biochem* 148, 67-73
173. Zheng L, Dean DR (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster, *J Biol Chem* 269, 18723-18726
174. Hidalgo E, Dimple B (1996) Activation of SoxR-dependent transcription *in vitro* by noncatalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe-2S] clusters into apo-SoxR, *J Biol Chem* 271, 7269-7272
175. Agar JN, Zheng LM, Cash VL, Dean DR, Johnson MK (2000) Role of the IscU protein in iron-sulfur cluster biosynthesis: IscS-mediated assembly of a [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster in IscU, *Journal of the American Chemical Society* 122, 2136-2137
176. Busch JLH, Breton JL, Davy SL, James R, Moore GR, Armstrong FA, Thomson AJ (2000) Ferredoxin III of *Desulfovibrio africanus*: sequencing of the native gene and characterization of a histidine-tagged form, *Biochemical Journal* 346, 375-384
177. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645
178. Flint DH (1996) *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase, *J Biol Chem* 271, 16068-16074
179. Jaschkowitz K, Seidler A (2000) Role of a NifS-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 in the maturation of FeS proteins, *Biochemistry* 39, 3416-3423
180. Wollenberg M, Berndt C, Bill E, Schwenn JD, Seidler A (2003) A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] and [4Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] apo proteins, *Eur J Biochem* 270, 1662-1671
181. Green J, Bennett B, Jordan P, Ralph ET, Thomson AJ, Guest JR (1996) Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*, *Biochemical Journal* 316, 887-892
182. Soriano GM, Guo LW, de Vitry C, Kallas T, Cramer WA (2002) Electron transfer from the Rieske iron-sulfur protein (ISP) to cytochrome *f* in vitro, *Journal of Biological Chemistry* 277, 41865-41871
183. Schneider D, Jaschkowitz K, Seidler A, Rogner M (2000) Overexpression and reconstitution of a Rieske iron-sulfur protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, *Indian J Biochem Biophys* 37, 441-446
184. Schneider D, Skrzypczak S, Anemüller S, Schmidt CL, Seidler A, Rogner M (2002) Heterogeneous Rieske proteins in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex of *Synechocystis* PCC6803?, *J Biol Chem* 277, 10949-10954
185. Gubernator B, Seidler A, Rogner M, Szczepaniak A (2003) Overexpression and reconstitution of a Rieske iron-sulfur protein from the higher plant, *Protein Expression and Purification* 29, 8-14
186. Agarwal A, Tan J, Eren M, Tevelev A, Lui SM, Cowan JA (1993) Synthesis, cloning and expression of a synthetic gene for high potential iron protein from *Chromatium vinosum*, *Biochem Biophys Res Commun* 197, 1357-1362
187. Tang C, Henry HL (1993) Overexpression in *Escherichia coli* and affinity purification of chick kidney ferredoxin, *J Biol Chem* 268, 11474-
188. Cheng H, Markley JL (1995) NMR spectroscopic studies of paramagnetic proteins - iron sulfur proteins, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 24, 209-237

189. Armengaud J, Jouanneau Y (1995) Overexpression in *Escherichia coli* of the fdxA gene encoding *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin II, *Protein Expr Purif* 6, 176-184
190. Eltis LD, Iwagami SG, Smith M (1994) Hyperexpression of a synthetic gene encoding a high potential iron sulfur protein, *Protein Eng* 7, 1145-1150
191. Hurtubise Y, Barriault D, Sylvestre M (1996) Characterization of active recombinant His-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase, *Journal of Biological Chemistry* 271, 8152-8156
192. Pikus JD, Studts JM, Achim C, Kauffmann KE, Munck E, Steffan RJ, McClay K, Fox BG (1996) Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and rieske components of a four- protein complex, *Biochemistry* 35, 9106-9119
193. Chebrou H, Hurtubise Y, Barriault D, Sylvestre M (1999) Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it, *J Bacteriol* 181, 4805-4811
194. Couture MM, Colbert CL, Babini E, Rosell FI, Mauk AG, Bolin JT, Eltis LD (2001) Characterization of BphF, a Rieske-type ferredoxin with a low reduction potential, *Biochemistry* 40, 84-92
195. Cafaro V, Scognamiglio R, Viggiani A, Izzo V, Passaro I, Notomista E, Dal Piaz F, Amoresano A, Casbarra A, Pucci P, Di Donato A (2002) Expression and purification of the recombinant subunits of toluene/o-xylene monooxygenase and reconstitution of the active complex, *European Journal of Biochemistry* 269, 5689-5699
196. Schmidt CL, Hatzfeld OM, Petersen A, Link TA, Schäfer G (1997) Expression of the *Solfobus acidocaldarius* Rieske iron sulfur protein II (SOXF) with the correctly inserted [2FE-2S] cluster in *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun* 234, 283-287
197. Henninger T, Anemüller S, Fitz-Gibbon S, Miller JH, Schäfer G, Schmidt CL (1999) A novel Rieske iron-sulfur protein from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*: sequencing of the gene, expression in *E. coli* and characterization of the protein, *J Bioenerg Biomembr* 31, 119-128
198. Eichhorn A (2003) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
199. Kleymann G (1994) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
200. Breyton C, Tribet C, Olive J, Dubacq JP, Popot JL (1997) Dimer to monomer conversion of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. Causes and consequences, *J Biol Chem* 272, 21892-21900
201. Finel M (1996) Genetic inactivation of the H(+)-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* is facilitated by insertion of the ndh gene from *Escherichia coli*, *FEBS Lett* 393, 81-85
202. Maneg O (2003) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
203. Anderka O (1999) Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
204. Kapust RB, Waugh DS (2000) Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease, *Protein Expr Purif* 19, 312-318
205. Van Spanning RJ, Wansell CW, Reijnders WN, Harms N, Ras J, Oltmann LF, Stouthamer AH (1991) 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 c550, c551i, and c553i, *J Bacteriol* 173, 6962-6970
206. Mejean V, Iobbi-Nivol C, Lepelletier M, Giordano G, Chippaux M, Pascal MC (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon, *Mol Microbiol* 11, 1169-1179
207. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103-119
208. Hedges RW, Jacob AE (1974) Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons, *Mol Gen Genet* 132, 31-40
209. Kramer B, Kramer W, Fritz HJ (1984) Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell* 38, 879-887
210. Miroux B, Walker JE (1996) 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* 260, 289-298
211. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166, 557-580
212. Gottesman S, Gottesman M, Shaw JE, Pearson ML (1981) Protein degradation in *E. coli*: the Ion mutation and bacteriophage lambda N and cII protein stability, *Cell* 24, 225-233
213. Turba A (1993) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
214. Korn M (1994) Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

215. Raitio M, Wikstrom M (1994) An alternative cytochrome-oxidase of *Paracoccus denitrificans* functions as a proton pump, *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1186, 100-106
216. de Vries S (1989) *Arch Microbiol* 152, 52-57
217. Ludwig B (1986) Cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Methods Enzymol* 126, 153-159
218. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680
219. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Protein Eng* 8, 127-134
220. Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr A* 47, 110-119
221. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523
222. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467
223. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-491
224. Bensadoun A, Weinstein D (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials, *Anal Biochem* 70, 241-250
225. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal Biochem* 87, 206-210
226. Gill SC, von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal Biochem* 182, 319-326
227. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
228. Ahn T, Yim SK, Choi HI, Yun CH (2001) Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes, *Anal Biochem* 291, 300-303
229. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem* 166, 368-379
230. Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal Biochem* 199, 223-231
231. Maurer HR, Dati FA (1972) Polyacrylamide gel electrophoresis on micro slabs, *Anal Biochem* 46, 19-32
232. Palsdottir H (2004) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
233. von Jagow G, Schägger H (1994) A practical guide to membrane protein purification, *Academic Press*
234. Stroh A (2004) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
235. Drosou V (2001) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
236. Qiagen (2002) The Expressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins
237. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York
238. Bui BTS, Escalettes F, Chottard G, Florentin D, Marquet A (2000) Enzyme-mediated sulfide production for the reconstitution of [2Fe-2S] clusters into apo-biotin synthase of *Escherichia coli* - Sulfide transfer from cysteine to biotin, *European Journal of Biochemistry* 267, 2688-2694
239. Ludwig B, Schatz G (1980) A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa*<sub>3</sub>) from *Paracoccus denitrificans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 196-200
240. Zaugg WS, Rieske JS (1962) The quantitative estimation of cytochrome *b* in sub-mitochondrial particles from beef heart, *Biochem Biophys Res Commun* 9, 213-217
241. Chance B (1957) Techniques for the assay of the respiratory enzymes, *Methods Enzymol* 4, 273-329
242. Williams JN (1964) A Method for the Simultaneous Quantitative Estimation of Cytochromes *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, and *c* in Mitochondria, *ABB* 107, 537-537
243. Berden JA, Slater EC (1970) The reaction of antimycin with a cytochrome *b* preparation active in reconstitution of the respiratory chain, *Biochim Biophys Acta* 216, 237-249
244. Berry EA, Trumpower BL (1987) Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra, *Anal Biochem* 161, 1-15

245. Mäntele W (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms, *Trends Biochem Sci* 18, 197-202
246. Hellwig P, Scheide D, Bungert S, Mäntele W, Friedrich T (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain, *Biochemistry* 39, 10884-10891
247. Hendler RW, Pardhasaradhi K, Reynafarje B, Ludwig B (1991) Comparison of energy-transducing capabilities of the two- and three-subunit cytochromes  $aa_3$  from *Paracoccus denitrificans* and the 13-subunit beef heart enzyme, *Biophys J* 60, 415-423
248. Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review, *Protein Sci* 11, 2067-2079
249. Tziatzios C, Schuck P, Schubert D, Tsiotis G (1994) The molar mass of an active photosystem-I complex from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC-7002, *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 49, 220-222
250. Durchschlag H (1986) Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology, *Springer (Berlin)*, 45-128
251. Mayer G, Ludwig B, Müller HW, van den Broek JA, Friesen RH, Schubert D (1999) Studying membrane proteins in detergent solution by analytical ultracentrifugation: different methods for density matching, *Prog Colloid Polym Sci* 113, 176-181
252. Crane FL, Barr R (1971) Determination of Ubiquinones, *Methods Enzymol* 18, 137-165
253. Kröger A (1978) Determination of contents and redox states of ubiquinone and menaquinone, *Methods Enzymol* 53, 579-591
254. Parks TD, Leuther KK, Howard ED, Johnston SA, Dougherty WG (1994) Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase, *Anal Biochem* 216, 413-417
255. Thomas JD, Daniel RA, Errington J, Robinson C (2001) Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 39, 47-53
256. Chanda VB (2000) Current Protocols in Protein Science, *John Wiley & Sons (New York)*
257. Stempfer G, Holl-Neugebauer B, Rudolph R (1996) Improved refolding of an immobilized fusion protein, *Nat Biotechnol* 14, 329-334
258. De Bernardes CE, Schwarz E, Rudolph R (1999) Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding, *Methods Enzymol* 309, 217-236
259. Link TA, Saynovits M, Assmann C, Iwata S, Ohnishi T, von Jagow G (1996) Isolation, characterisation and crystallisation of a water-soluble fragment of the Rieske iron-sulfur protein of bovine heart mitochondrial  $bc_1$  complex, *Eur J Biochem* 237, 71-75
260. Beinert H (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5, 2-15
261. Bachmann J (2004) Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
262. Santini CL, Ize B, Chanal A, Müller M, Giordano G, Wu LF (1998) A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*, *EMBO J* 17, 101-112
263. Jack RL, Buchanan G, Dubini A, Hatzixanthis K, Palmer T, Sargent F (2004) Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins, *EMBO J* 23, 3962-3972
264. Xiao K, Liu X, Yu CA, Yu L (2004) The extra fragment of the iron-sulfur protein (residues 96-107) of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome  $bc_1$  complex is required for protein stability, *Biochemistry* 43, 1488-1495
265. Morgenstern B, Frech K, Dress A, Werner T (1998) DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment, *Bioinformatics* 14, 290-294
266. Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Ohnishi T, Daldal F (1999) Structure and function of the bacterial  $bc_1$  complex: domain movement, subunit interactions, and emerging rationale engineering attempts, *J Bioenerg Biomembr* 31, 275-288
267. Korn M (1999) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
268. Ostermeier C (1995) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
269. Edelstein SJ, Schachman HK (1967) The simultaneous determination of partial specific volumes and molecular weights with microgram quantities, *J Biol Chem* 242, 306-311
270. Schubert D, Tziatzios C, van den Broek JA, Schuck P, Germeroth L, Michel H (1994) Determination of the molar mass of pigment-containing complexes of intrinsic membrane proteins, *Prog Colloid Polym Sci* 94, 14-19

271. Friesen RH, Knol J, Poolman B (2000) Quaternary structure of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus* in the detergent-solubilized and membrane-reconstituted state, *J Biol Chem* 275, 40658-
272. Hendriks J, Warne A, Gohlke U, Haltia T, Ludovici C, Lubben M, Saraste M (1998) The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center, *Biochemistry* 37, 13102-13109
273. Joshi S, Burrows R (1990) ATP synthase complex from bovine heart mitochondria. Subunit arrangement as revealed by nearest neighbor analysis and susceptibility to trypsin, *J Biol Chem* 265, 14518-14525
274. Ritter M (2004) Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
275. Ritter M, Anderka O, Ludwig B, Mäntele W, Hellwig P (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex from *Paracoccus denitrificans*: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding, *Biochemistry* 42, 12391-12399
276. de Vries S, Cherepanov A (1998) Spectroscopic investigations on the water-soluble fragment of the Rieske [2Fe-2S] protein from *Paracoccus denitrificans*, *Inorganica Chimica Acta* 275-276, 493-499
277. Razzaq TM, Ozege P, Jury EC, Sembi P, Blackwell NM, Kabouridis PS (2004) Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains, *Immunology* 113, 413-426
278. Lappalainen P, Aasa R, Malmstrom BG, Saraste M (1993) Soluble Cu<sub>A</sub>-binding domain from the *Paracoccus* cytochrome *c* oxidase, *J Biol Chem* 268, 26416-26421
279. Maneg O, Ludwig B, Malatesta F (2003) Different interaction modes of two cytochrome-*c* oxidase soluble Cu<sub>A</sub> fragments with their substrates, *J Biol Chem* 278, 46734-46740
280. Wienk H, Maneg O, Lucke C, Pristovsek P, Lohr F, Ludwig B, Rüterjans H (2003) Interaction of cytochrome *c* with cytochrome *c* oxidase: an NMR study on two soluble fragments derived from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry* 42, 6005-6012
281. Varshavsky A (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-12149
282. Blaudeck N, Sprenger GA, Freudl R, Wiegert T (2001) Specificity of signal peptide recognition in Tat-dependent bacterial protein translocation, *J Bacteriol* 183, 604-610
283. Hatzixanthis K, Clarke TA, Oubrie A, Richardson DJ, Turner RJ, Sargent F (2005) Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8460-8465
284. DeLisa MP, Tullman D, Georgiou G (2003) Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6115-6120
285. Sarfo KJ, Winstone TL, Papish AL, Howell JM, Kadir H, Vogel HJ, Turner RJ (2004) Folding forms of *Escherichia coli* DmsD, a twin-arginine leader binding protein, *Biochem Biophys Res Commun* 315, 397-403
286. Creighton TE (1980) Counting integral numbers of amino acid residues per polypeptide chain, *Nature* 284, 487-489
287. Georgiou G, Valax P (1999) Isolating inclusion bodies from bacteria, *Methods Enzymol* 309, 48-58
288. Hong JS, Rabinowitz JC (1970) The all-or-none mode of the reconstitution and the reactions of a,a'-bipyridyl and mercurials with clostridial ferredoxin, *J Biol Chem* 245, 6574-6581
289. Hong J, Rabinowitz JC (1967) Preparation and properties of clostridial apoferreredoxins, *Biochem Biophys Res Commun* 29, 246-252
290. Shriver DF, Atkins PW, Langford EH (1994) Inorganic Chemistry, *Oxford University Press*
291. Holleman AF, Wiberg E (1985) Anorganische Chemie, *Walter de Gruyter (Berlin)*
292. Frazzon J, Dean DR (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry, *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 166-173
293. Holm RH (1992) Trinuclear cuboidal and heterometallic cubane-type iron-sulfur clusters: new structural and reactivity themes in chemistry and biology, *Advances in inorganic chemistry* 38, 1-71
294. Maina CV, Riggs PD, Grandea AG, III, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan CD (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein, *Gene* 74, 365-373
295. Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathione S-Transferase, *Gene* 67, 31-40
296. Bonisch H, Schmidt CL, Schäfer G, Ladenstein R (2002) The structure of the soluble domain of an archaeal Rieske iron-sulfur protein at 1.1 Å resolution, *J Mol Biol* 319, 791-805
297. Chaddock AM, Mant A, Karnauchov I, Brink S, Herrmann RG, Klosgen RB, Robinson C (1995) A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase, *EMBO J* 14, 2715-2722



298. Halbig D, Wiegert T, Blaudeck N, Freudl R, Sprenger GA (1999) The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding, *Eur J Biochem* 263, 543-551
299. Buchanan G, Sargent F, Berks BC, Palmer T (2001) A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif, *Arch Microbiol* 177, 107-112
300. Niviere V, Wong SL, Voordouw G (1992) Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein, *J Gen Microbiol* 138, 2173-2183
301. Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T, Berks BC (2001) A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif, *FEBS Lett* 497, 45-49
302. Finazzi G, Chasen C, Wollman FA, de Vitry C (2003) Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo, *EMBO J* 22, 807-815
303. Hatzixanthis K, Palmer T, Sargent F (2003) A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase, *Mol Microbiol* 49, 1377-1390
304. Weiner J (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins, *Cell* 93, 93-101
305. Palmer T, Sargent F, Berks BC (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway, *Trends Microbiol* 13, 175-180
306. Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000) The Tat protein export pathway, *Mol Microbiol* 35, 260-274
307. Davies DR, Cohen GH (1996) Interactions of protein antigens with antibodies, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7-12
308. Essen LO, Harrenga A, Ostermeier C, Michel H (2003) 1.3 Å X-ray structure of an antibody Fv fragment used for induced membrane-protein crystallization, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 677-687
309. Phillips JD, Graham LA, Trumpower BL (1993) Subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex is required for insertion of EPR-detectable iron-sulfur cluster into the Rieske iron-sulfur protein, *J Biol Chem* 268, 11727-11736
310. Kleinschroth T (2003) Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
311. Ralston G (1993) Introduction to Analytical Ultracentrifugation, *Beckman Instruments*
312. Schubert D, Schuck P (1991) Analytical ultracentrifugation as a tool for studying membran proteins, *Prog Colloid Polym Sci* 86, 12-22
313. Linke P, Bechmann G, Gothe A, Weiss H (1986) Dimeric ubiquinol:cytochrome *c* reductase of *Neurospora* mitochondria contains one cooperative ubiquinone-reduction centre, *Eur J Biochem* 158, 615-621
314. Nalecz MJ, Azzi A (1985) Functional characterization of the mitochondrial cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex: steady-state kinetics of the monomeric and dimeric forms, *Arch Biochem Biophys* 240, 921-931
315. Huang D, Everly RM, Cheng RH, Heymann JB, Schägger H, Sled V, Ohnishi T, Baker TS, Cramer WA (1994) Characterization of the chloroplast cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex as a structural and functional dimer, *Biochemistry* 33, 4401-4409
316. Tanford C, Reynolds JA (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solutions, *Biochim Biophys Acta* 457, 133-170
317. Hayashi Y, Takagi T, Maezawa S, Matsui H (1983) Molecular weights of alpha beta-protomeric and oligomeric units of soluble (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase determined by low-angle laser light scattering after high-performance gel chromatography, *Biochim Biophys Acta* 748, 153-167
318. Bolli R, Nalecz KA, Azzi A (1985) The aggregation state of bovine heart cytochrome *c* oxidase and its kinetics in monomeric and dimeric form, *Arch Biochem Biophys* 240, 102-116
319. Greie JC, Deckers-Hebestreit G, Altendorf K (2000) Subunit organization of the stator part of the F<sub>0</sub> complex from *Escherichia coli* ATP synthase, *J Bioenerg Biomembr* 32, 357-364
320. Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes, *J Biol Chem* 278, 52873-52880
321. Rais I, Karas M, Schägger H (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification, *Proteomics* 4, 2567-2571
322. Wu CC, Yates JR, III (2003) The application of mass spectrometry to membrane proteomics, *Nat Biotechnol* 21, 262-267

323. Bernardo SD, Yano T, Yagi T (2000) Exploring the membrane domain of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*: characterization of the NQO7 subunit, *Biochemistry* 39, 9411-9418
324. Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Braun HP (2004) Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria, *Plant Physiol Biochem* 42, 937-942
325. Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I, *J Biol Chem* 279, 36349-36353
326. Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Perez-Martos A, Bruno C, Moraes CT, Enriquez JA (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria, *Mol Cell* 13, 805-815
327. Boumans H, Grivell LA, Berden JA (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit, *J Biol Chem* 273, 4872-4877
328. Genova ML, Bianchi C, Lenaz G (2003) Structural organization of the mitochondrial respiratory chain, *Ital J Biochem* 52, 58-61
329. Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225-3229
330. Schägger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria, *Biochim Biophys Acta* 1555, 154-159
331. Schägger H (2001) Respiratory chain supercomplexes, *IUBMB Life* 52, 119-128
332. Kaufmann A, Manting EH, Veenendaal AK, Driessen AJ, van der DC (1999) Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighboring SecE, *Biochemistry* 38, 9115-9125
333. Wilkinson BJ, Morman MR, White DC (1972) Phospholipid composition and metabolism of *Micrococcus denitrificans*, *J Bacteriol* 112, 1288-1294
334. Kröger A, Klingenberg M (1973) Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin, *Eur J Biochem* 39, 313-323
335. Gupte SS, Hackenbrock CR (1988) The role of cytochrome *c* diffusion in mitochondrial electron transport, *J Biol Chem* 263, 5248-5253
336. Bianchi C, Genova ML, Parenti CG, Lenaz G (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis, *J Biol Chem* 279, 36562-36569
337. Kholodenko BN, Westerhoff HV (1993) Metabolic channelling and control of the flux, *FEBS Lett* 320, 71-74
338. Lorusso M, Gatti D, Boffoli D, Bellomo E, Papa S (1983) Redox-linked proton translocation in the *bc<sub>1</sub>* complex from beef-heart mitochondria reconstituted into phospholipid vesicles. Studies with chemical modifiers of amino acid residues, *Eur J Biochem* 137, 413-420
339. Degli EM, Meier EM, Timoneda J, Lenaz G (1983) Modification of the catalytic function of the mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex by dicyclohexylcarbodiimide, *Biochim Biophys Acta* 725, 349-360
340. Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M (1999) Localization of acidic residues involved in the proton pumping activity of the bovine heart mitochondrial *bc<sub>1</sub>* complex, *FEBS Lett* 456, 37-40
341. Wang Y, Howton MM, Beattie DS (1995) Topographical organization of cytochrome *b* in the yeast mitochondrial membrane determined by fluorescence studies with N-cyclohexyl-N'-[4-(dimethylamino)naphthyl]carbodiimide, *Biochemistry* 34, 7476-7482
342. Wang Y, Obungu V, Beattie DS (1998) Dicyclohexylcarbodiimide inhibits proton pumping in ubiquinol:cytochrome *c* oxidoreductase of *Rhodobacter sphaeroides* and binds to aspartate-187 of cytochrome *b*, *Arch Biochem Biophys* 352, 193-198
343. Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M (1998) Chemical modification of the bovine mitochondrial *bc<sub>1</sub>* complex reveals critical acidic residues involved in the proton pumping activity, *Biochemistry* 37, 2037-2043
344. Hauska G, Hurt E, Gabellini N, Lockau W (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome *c*/plastocyanin oxidoreductases, *Biochim Biophys Acta* 726, 97-133
345. Baymann F, Robertson DE, Dutton PL, Mäntele W (1999) Electrochemical and spectroscopic investigations of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochemistry* 38, 13188-13199
346. Iwaki M, Giotta L, Akinsiku AO, Schägger H, Fisher N, Breton J, Rich PR (2003) Redox-induced transitions in bovine cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex studied by perfusion-induced ATR-FTIR spectroscopy, *Biochemistry* 42, 11109-11119

347. Ritter M, Palsdottir H, Abe M, Mäntele W, Hunte C, Miyoshi H, Hellwig P (2004) Direct evidence for the interaction of stigmatellin with a protonated acidic group in the bc<sub>1</sub> complex from *Saccharomyces cerevisiae* as monitored by FTIR difference spectroscopy and <sup>13</sup>C specific labeling, *Biochemistry* 43, 8439-8446
348. Ebert CE, Ghosh M, Wang Y, Beattie DS (2003) Aspartate-186 in the head group of the yeast iron-sulfur protein of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex contributes to the protein conformation required for efficient electron transfer, *Biochim Biophys Acta* 1607, 65-78
349. Cocco T, Di Paola M, Minuto M, Carlino V, Papa S, Lorusso M (1997) Steady-state proton translocation in bovine heart mitochondrial bc<sub>1</sub> complex reconstituted into liposomes, *J Bioenerg Biomembr* 29, 81-87
350. Gurung B, Yu L, Xia D, Yu CA (2005) The-iron-sulfur cluster of the rieske iron sulfur protein functions as a proton exiting gate in the cytochrome bc<sub>1</sub> complex, *J Biol Chem* .,
351. Breton J, Boullais C, Berger G, Mioskowski C, Navedryk E (1995) Binding sites of quinones in photosynthetic bacterial reaction centers investigated by light-induced FTIR difference spectroscopy: symmetry of the carbonyl interactions and close equivalence of the QB vibrations in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas viridis* probed by isotope labeling, *Biochemistry* 34, 11606-11616
352. Baymann F (1995) Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
353. Hellwig P, Mogi T, Tomson FL, Gennis RB, Iwata J, Miyoshi H, Mäntele W (1999) Vibrational modes of ubiquinone in cytochrome bo(3) from *Escherichia coli* identified by Fourier transform infrared difference spectroscopy and specific (<sup>13</sup>C) labeling, *Biochemistry* 38, 14683-14689



## Publikationen

- Mayer G, Anderka O, Ludwig B, Schubert D (2002) The state of association of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex from *Paracoccus denitrificans* in solutions of dodecyl maltoside, *Progr Colloid Polym Sci* 119, 77-83
- Ritter M, Anderka O, Ludwig B, Mäntele W, Hellwig P (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex from *Paracoccus denitrificans*: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding, *Biochemistry* 42, 12391-12399
- Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B, Schägger H (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*, *J Biol Chem* 279, 5000-5007
- Werner Müller-Esterl, Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kieß, Katrin Ridinger und Michael Plenikowski (2004) Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, *Spektrum Akademischer Verlag*
- Bachmann J, Bauer B, Zwicker K, Ludwig B, Anderka O (2005) The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* inserts into the cytoplasmic membrane via the Tat-pathway, *in Vorbereitung*
- Mooser D\*, Anderka O\*, Ludwig B, Hellwig P (2005) Mid and low infrared spectroscopic studies on protonation dependent events in Rieske iron sulfur proteins from *T. thermophilus* and *P. denitrificans*, *in Vorbereitung* (\* gleichwertiger Anteil beider Autoren)



## Abkürzungsverzeichnis

β-ME	β-Mercaptoethanol
Amp	Ampicillin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BN-PAGE	Blau-Nativ-Gelelektrophorese
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bt etc. als Index	verweist in AS-Sequenzen auf den Organismus
CDR	<i>complimentarity determining region</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
Cm	Chloramphenicol
COX	Cytochrom <i>c</i> -Oxidase
Cyt	Cytochrom
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonucleosidtriphosphat
DPH	Diphenyl-1,3,5-hexatrien
DQ	n-Decylchinon
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
ET	Elektronentransfer
EtOH	Ethanol
Fdx	Ferredoxin
Fe-S-Protein	Eisen-Schwefel-Protein
FTIR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GdHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H6	Hexahistidyl- <i>tag</i>
H6-ISF	Ektodomäne des Rieske-Proteins mit N-terminalem Hexahistidyl- <i>tag</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ISF	hydrophile Ektodomäne des Rieske-Proteins
ISP	Rieske-Eisen-Schwefel-Protein
KI/KIII/KIV	Komplex I / III /IV der Atmungskette
ΔKI/KIII/KIV	Deletion/Inaktivierung von Komplex I / III /IV
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani-Medium
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	2-(N-morpholino)-propansulfonsäure
NAD(H)	Nicotinamidadeninucleotid (reduzierte Form)

NBT	Nitroblautetrazolium
NCS	<i>newborn calf serum</i>
N-Seite	elektronegative Seite der Membran
OD	optische Dichte
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
<i>P.d.</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNK	T4-Polynucleotidkinase
PS	Photosystem
P-Seite	elektropositive Seite der Membran
Q / QH <sub>2</sub>	Ubichinon / Ubihydrochinon
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK	Superkomplex
Sm	Streptomycin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNM	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid
ü.N.	über Nacht
UE	Untereinheit(en)
ÜNK	Übernachkultur
UZ	Ultrazentrifugation
Vol	Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid



## Danksagung

Diese Dissertation wurde von vielen Seiten unterstützt und bereichert. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle bedanken bei:

Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete und aufmerksame Betreuung und sein offenes Ohr für alle Höhen und Tiefen des Labor- und sonstigen Lebens. Ich möchte ihm auch besonders für den gewährten Freiraum und sein Verständnis gegenüber meiner Nebentätigkeit als Lehrbuchautor danken, die über längere Zeiträume meine Arbeitskapazitäten ziemlich in Anspruch nahm.

Prof. Dr. Werner Müller-Esterl für die einmalige Gelegenheit, während meiner Promotionszeit an einem Biochemie-Lehrbuch mitarbeiten zu können, auch wenn dies dem Vorankommen meiner Doktorarbeit nicht immer förderlich war...

Meinen Kooperationspartnern aus Frankfurt - Gottfried Mayer und Dieter Schubert, Anke Stroh und Hermann Schägger, Hildur Palsdottir und Carola Hunte, Michaela Ritter und Petra Hellwig - sowie *last but not least* Tiziana Cocco aus Bari. Alle diese Zusammenarbeiten waren aus persönlicher und wissenschaftlicher Sicht eine unschätzbare Bereicherung.

Klaus Zwicker im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ulrich Brandt für die Möglichkeit, allzeit EPR-Spektren aufnehmen zu können, für die netten Gespräche während vieler *scans* und wegen der Gewissheit, bei der Interpretation der Ergebnisse nicht alleine gelassen zu werden.

Meinen „Ex-Diplomanden“ Julie Bachmann und Thomas Kleinschroth für ihren unermüdlichen Einsatz und eine Zusammenarbeit, die ich mir besser nicht hätte vorstellen können. Thomas bin ich insofern besonders dankbar, als er „unserem“ Protein treu geblieben ist und die Arbeit mit bewundernswerter Geduld, Zielstrebigkeit und Professionalität weiterführt.

Andrea Hermann für die ausgezeichnete technische Hilfe, ihren Optimismus und Humor und die vielen tiefeschürfenden Gespräche über die Musik und das Leben im Allgemeinen.

Werner Müller, dem legendären TA, für seinen unerschöpflichen Fundus an Erfahrungen zur Proteinbiochemie und zum Leben außerhalb des Labors, seine stete Hilfsbereitschaft, seine Herzlichkeit, sowie für seine vielen Cytochrom *b<sub>c1</sub>*-„Abfälle“.

Krishna Saxena, bei dem immer alles klappt, für die vielen Tipps zum Klonieren und Proteinputzen und seinen unerschöpflichen CD-Fundus.

Oliver Richter für die manchmal anregenden, manchmal aufreibenden, in jedem Fall höchst interessanten wissenschaftlichen Dispute, seinen erfrischenden Sarkasmus und seinen unermüdlichen und aufopferungsvollen Einsatz dafür, dass der Arbeitskreis nicht im Chaos versinkt.

Dem Team von Labor 120: Oliver „OMa“ Maneg für seine entspannte Sicht der Dinge, Thomas „Royal TS“ Schröter für seine pfälzische Lebensfreude, Klaus „Subklonierer“ Hoffmeier - unbeschreiblich, wenn man ihn nicht kennt, Freya Alena Bundschuh für die ungezählten Gauloises und ihr Schlappmaul sowie Khalid Siddiqui für seine fernöstliche Gelassenheit und das indische Essen.

Den anderen *party people* außerhalb von Labor 120, die diese Zeit unvergesslich gemacht haben: Anna Eichhorn, Peter Greiner, Jule Janzon, Daniela Mooser und Caro Werner.

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern und Großeltern, die alles überhaupt erst möglich gemacht haben und immer an mich glaubten.

Mélanie Weiss, die mir mit ihrer Liebe und Zuversicht über die vielen Frustrationsschwellen einer Doktorarbeit hinweggeholfen hat und die unendliche Geduld, die sie in dieser Zeit mit meinen Launen hatte.

Meiner kleinen Tochter Nuria für das größte Glück überhaupt und dafür, dass sie mich in den letzten Monaten angetrieben hat, mit meiner Doktorarbeit fertigzuwerden.

## Lebenslauf

### Oliver Anderka

Diplom-Biochemiker

geboren am 11.10.1973 in Frankfurt am Main

ledig

### Berufstätigkeit

- 11/2001 - dato **Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Promotion**  
 Institut für Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Prof. Dr. Bernd Ludwig
- 02/2001 - 03/2005 **Koautor eines Biochemie-Lehrbuchs**  
 Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt,  
 Prof. Dr. Werner Müller-Esterl
- 11/1999 - 12/1999 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Lehrtätigkeit**  
 Institut für Biochemie, Goethe-Universität Frankfurt

### Hochschulbildung

- 01/2000 - 04/2001 **DFG-Stipendiat / Promotion**  
 Graduiertenkolleg: Proteinstrukturen, Dynamik und Funktion
- 24.09.1999 **Diplom in Biochemie**  
 Abschlußnote: sehr gut, Prädikat  
 "mit Auszeichnung"
- 10/1996 - 09/1999 **Hauptstudium**  
 Goethe-Universität Frankfurt, Studiengang  
 Biochemie und Biophysikalische Chemie;  
 Wahlpflichtfach Pharmakologie
- 10/1994 - 09/1996 **Grundstudium Biologie**  
 Goethe-Universität Frankfurt

### Schulbildung und Zivildienst

- 11/1993 - 10/1994 Zivildienst im Wohnstift Augustinum, Bad Soden
- 08/1987 - 06/1993 Gymnasium mit Abitur in Frankfurt
- 08/1984 - 06/1987 Gymnasialzweig Gesamtschule Hattersheim
- 08/1979 - 06/1984 Grundschule mit Eingangsstufe in Hattersheim



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Oliver Anderka, geboren am 11.10.1973 in Frankfurt am Main, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex aus *Paracoccus denitrificans*“ selbständig angefertigt und keine andere Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegebenen benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 01.08.2005