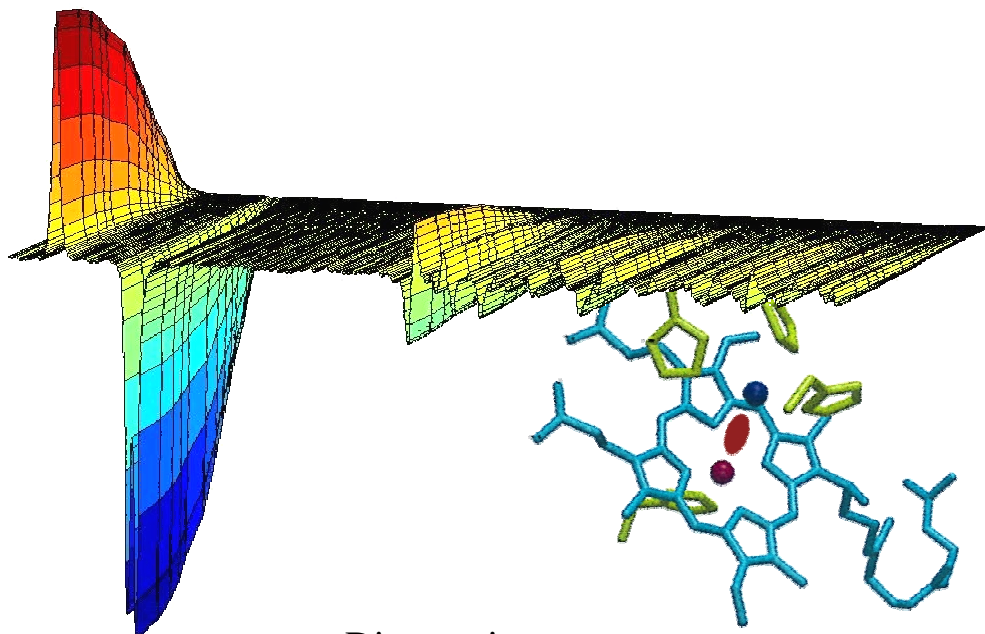


LIGANDENBINDUNG UND -DYNAMIK BEI OXIDASEN

IR–spektroskopische Untersuchungen kinetischer und
thermodynamischer Eigenschaften



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Andreas Böhm
aus Eichstätt

Frankfurt am Main, 2002

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der
Universität Frankfurt

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Reinhard Dörner

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Mäntele

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Disputation: 21. Februar 2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
	Fragestellungen und Ziel der Arbeit	3
1.1.1	Die mitochondriale Atmungskette	4
	Häm-Kupfer Oxidasen	5
1.1.2	Struktur und Aufbau der Cytochrom <i>c</i> Oxidasen	8
	1.1.2.1 Cytochrom <i>c</i> Oxidase aus dem Bakterium <i>Paracoccus denitrificans</i>	8
	Untereinheit I-IV	
	1.1.2.2 Cytochrom <i>c</i> Oxidasen aus dem Bakterium <i>Thermus thermophilus</i>	13
1.1.3	Funktion und Katalysezyklus der Oxidase	14
	1.1.3.1 Funktion am Beispiel der <i>aa₃</i> Oxidase von <i>Paracoccus denitrificans</i>	14
	Sauerstoff-Umsetzung	14
	Elektronentransferwege	14
	Protonentransferwege	15
	Katalysezyklus	15
	1.1.3.2 Strukturelle Besonderheiten der Cytochrom <i>c</i> Oxidasen aus dem	
	Bakterium <i>Thermus thermophilus</i>	19
1.2	Ligandenbindung und Experimente an Cytochrom <i>c</i> Oxidasen	20
1.2.1	Bindung von CO	20
1.2.2	Energielandschaft und Konformationssubzustände	21
1.2.3	Blitzphotolyse	22
1.2.4	Ligandenrückbindung und Energiebarriere	24
1.2.5	Kinetik und Ratenverteilung	24
1.3	Photoinduzierte Reduktion an Cytochrom <i>c</i> Oxidasen	26
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Meßmethoden	27
	Absorptionsspektren	27
2.1.1	Messungen im sichtbaren Spektralbereich (VIS)	27
2.1.2	Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FT-IR)	27
	Mathematische Grundlagen zur Fouriertransformation	28
2.2	Zeitaufgelöste FT-IR Spektroskopie	30
2.2.1	Rapid-Scan Technik	30
2.2.2	Step-Scan Technik	31
2.3	Infrarotspektroskopie an Proteinen	32
2.3.1	H ₂ O und D ₂ O als Lösungsmittel	32
2.3.2	Absorptionsbanden von Proteinen	33
	Peptidrückgrat	33
	Aminosäureseitenketten	34
	Schwingungen der Hämgruppe	35
	Verschiebung von Absorptionsbanden aufgrund Isotopenmarkierung	37

2.4	Proteinpräparation	38
2.4.1	Proteinreinigung	38
2.4.2	Vorbereitung der Proben für die Messung / Probenpräparation	38
	Umpuffern und pH-Wert-Einstellung	38
	H ₂ O / D ₂ O Austausch (Deuterierung)	39
	Reduktion der Probe, CO-Inhibierung und Befüllen der Meßzelle	39
	Photo-Reduktion der Oxidase mit Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid	40
2.5	IR-spektroskopische Messungen bei verschiedenen Temperaturen	41
	A) kryogene Temperaturen	41
	B) physiologische Temperaturen	42
	Spektrenaufnahme für CO-Photolyse Experimente	43
	Spektrenaufnahme bei Photo-Reduktions-Experimenten	43
	Differenztechnik und Datenauswertung	44
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
3.1	CO Photolyse an vollreduzierter Cytochrom <i>c</i> Oxidase von <i>P. denitrificans</i> und <i>T. thermophilus</i>; Spektrendiskussion	46
3.1.1	VIS - Spektrum	47
3.1.2	CO Banden im Differenzspektrum bei 140 K im Vergleich	50
3.1.3	Proteinbanden bei 140 K	52
	Zuordnung von Moden der Häm-Gruppen	52
	Polypeptid-Rückgrat	56
	Schwingungen von Aminosäure-Seitenketten	59
3.2	CO Banden: pH-, thermodynamische und kinetische Eigenschaften	64
3.2.1	CO Banden von <i>Paracoccus denitrificans</i> <i>aa</i> ₃ Oxidase	64
	3.2.1.1 pH-Abhängigkeit der CO Moden	64
	3.2.1.2 Temperaturabhängigkeit der CO Banden	65
	Absorptionsbande(n) des ¹³ CO-Isotops	66
	3.2.1.3 Kinetiken der CO Rückbindung bei der <i>P. denitrificans</i> <i>aa</i> ₃ Oxidase	67
	Ligandenbindung unterhalb 240 K	67
	Ligandenbindung oberhalb 240 K	70
	Arrhenius-Darstellung	71
3.2.2	CO Banden der <i>ba</i> ₃ Oxidase von <i>Thermus thermophilus</i>	74
	3.2.2.1 pH-Abhängigkeit der CO Moden	74
	3.2.2.2 Temperaturabhängigkeit der CO Bandenpopulationen	74
	3.2.2.3 CO Rückbindungskinetiken an der <i>ba</i> ₃ Oxidase	76
	Arrhenius-Darstellung	77
3.2.3	CO Banden der <i>caa</i> ₃ Oxidase von <i>Thermus thermophilus</i>	79
	3.2.3.1 pH-Abhängigkeit der CO Moden	79
	3.2.3.2 Temperaturabhängigkeit der CO Bandenpopulationen	79
	3.2.3.3 CO Rückbindungskinetiken an der <i>caa</i> ₃ Oxidase	81
	Arrhenius-Darstellung	82
3.2.4	Vergleichende Betrachtung der verschiedenen Oxidasen und Resümee	83

3.3	Messungen an Mutanten der Cytochrom <i>c</i> Oxidase von <i>P. denitrificans</i> und ¹³C-isotopenmarkierten Häm-Propionaten	87
3.3.1	Vergleich der Differenzspektren nach CO Photolyse an der vollreduzierten Cytochrom <i>c</i> Oxidase vom „Wildtyp“ und dem ¹³ C-isotopenmarkierten Enzym	89
3.3.2	Vergleich der Differenzspektren nach CO Photolyse an der vollreduzierten Cytochrom <i>c</i> Oxidase vom „Wildtyp“ und der Mutante Arg473Lys	92
3.3.3	Vergleich der Differenzspektren nach CO Photolyse an der vollreduzierten Cytochrom <i>c</i> Oxidase vom „Wildtyp“ und der Mutante His403Ala	94
3.3.4.	Mutanten an der Aminosäure Aspartat 399; FT-IR Differenzspektren nach CO Photolyse	96
	FT-IR Differenzspektren im Spektralbereich von 2100-1900 cm ⁻¹	97
	FT-IR Differenzspektren im Spektralbereich von 1800-1200 cm ⁻¹	99
3.3.5	Schwingungsmoden von Hämpropionaten und deren Zuordnung mittels Mutanten und ¹³ C-Markierung; Schlußbetrachtung	101
3.4	Cytochrom <i>bd</i> Oxidase aus <i>Escherichia coli</i>	103
3.4.1	VIS - Spektrum	104
3.4.2	CO Blitzlicht Photolyse bei 84 K an der vollreduzierten <i>bd</i> Oxidase	105
3.4.3	Protein-Bereich bei CO Photolyse	109
3.4.4	Infrarotsignale im Bereich der –COOH Gruppen von Aspartat und Glutamat	110
3.4.5	CO Rückbindungs-Kinetik bei 84 K	111
3.4.6	Photoreduktion der Cytochrom <i>bd</i> Oxidase mittels Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid	113
3.4.7	Diskussion	115
4	ZUSAMMENFASSUNG	118
5	ANHANG UND GLOSSAR	120
6	LITERATURVERZEICHNIS	130
	Danksagung	140
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Einführung

Proteine spielen eine zentrale Rolle in allen lebenden Systemen (griech. πρωτεϊος: das erste,...). Sie sind an fast allen zellulären Prozessen wie Katalyse, Transport von Energie, Ladung und Materie, beteiligt und regeln elementare Stoffwechselfvorgänge (Metabolismus; regulatorischen Wirkung zur Steuerung physiologischer Prozesse). Sie speichern Information und sorgen für ihre Weitergabe [Skript zur Vorlesung]. Diese linearen Polymerketten werden nach einem in der DNA gespeicherten Code in den Zellen aus 22 verschiedenen Aminosäuren synthetisiert.

Die Struktur von Proteinen wird auf vier verschiedenen Ebenen charakterisiert: Man unterscheidet die Strukturebenen der Primär-, der Sekundär-, der Tertiär- und der Quartärstruktur. Die Sequenz der Aminosäuren stellt die Primärstruktur des Proteins dar. In der nächsten Ebene ist diese Kette räumlich zur Sekundärstruktur angeordnet. Beispiele hierfür sind α -helikale oder β -Faltblattstrukturen. Als Tertiärstruktur bezeichnet man die räumliche Beziehung zwischen allen Aminosäuren einer Peptidkette; hier kommen Aminosäuren in räumlichen Kontakt, die bezüglich ihrer linearen Sequenz weit voneinander entfernt liegen können. Diese Struktur-Ebene entspricht der vollständigen dreidimensionalen Anordnung. Gruppierungen aus mehreren spezifischen Polypeptidketten werden als Untereinheiten eines größeren Protein-Komplexes angeordnet und definieren als weitere Strukturebene die Quartärstruktur. Faltung der Peptid-Kette und Anordnung der Untereinheiten sind eindeutig festgelegt, denn es gibt nur eine biologisch aktive Form des Proteins, die seiner Funktion gerecht werden kann.

An der Grenze zwischen belebter und unbelebter Materie gehorchen diese Moleküle einerseits den Gesetzen der Chemie und Physik, andererseits sind aber auch Strukturänderungen bzw. -fluktuationen erforderlich, damit ein solches Protein seine Funktion erfüllen kann [Haustein 2000]. Aus der Aminosäuresequenz allein kann bisher weder auf die dreidimensionale Struktur noch auf die Funktion eines Proteins geschlossen werden. Selbst aus dem räumlichen Aufbau allein ist die Funktionsweise noch nicht ableitbar (da u. a. während der Funktion im allgemeinen Zwischenzustände angenommen werden).

Eine der Aufgaben der molekularen Biophysik ist es, eine Korrelation zwischen der gegebenenfalls bekannten statischen Struktur von Proteinen und deren Funktion und Dynamik

herzustellen und entsprechende Methoden zu deren Untersuchung zu entwickeln oder zu verfeinern.

Um den Energiebedarf einer Zelle zu decken, haben sich im Laufe der Evolution vor allem zwei Haupt-Mechanismen entwickelt: Energiegewinnung durch Einfangen von Licht (phototrop) und durch Oxidation von Nährstoffen (chemotrop). Ein Teil dieser dabei gewonnenen Energie, die durch einen elektrochemischen Gradienten über einer Membran entsteht, wird in eine spezielle Form umgewandelt, bevor sie u. a. zur Biosynthese genutzt wird. Der Träger dieser freien Energie ist hauptsächlich das Adenosintriphosphat (ATP) [Stryer 1994].

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit geht es um ein Protein, dessen Funktion die katalytische Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser bei gleichzeitigem Aufbau eines Protonengradienten ist. Dieses, 1924 von Otto Warburg entdeckte und als „Atmungsferment“ bezeichnete Enzym, ist die Cytochrom *c* Oxidase und bildet als integrales Membranprotein den letzten Schritt in der Zellatmung.

Für eine Reihe von Cytochrom Oxidasen liegen inzwischen vollständige röntgenkristallographische Strukturanalysen vor. Aufgrund der Kenntnis der Architektur und der grundlegenden Funktion des Enzyms (enzymatische Tätigkeit: Reduktion von Sauerstoff, Aufbau eines Protonengradienten über die Zellmembran) versucht man spektroskopisch, Einblicke in die Dynamik dieses Prozesses zu erhalten und aufzuklären, inwiefern strukturelle Änderungen innerhalb des Proteins damit zusammenhängen.

Um gezielt den Einfluß und die Relevanz bestimmter Aminosäuren für den enzymatischen Prozeß zu klären, werden unter anderem Aminosäure-Seitenketten molekularbiologisch mittels Mutation durch andere Seitengruppen ersetzt. Entsprechende Veränderungen im jeweiligen Experiment lassen sich nun eindeutig einer bestimmten Aminosäure zuordnen. Auch Untersuchungen über (zeitliche) Veränderungen bestimmter spektraler Bandenmuster, die mit definierten Aminosäuren korreliert werden können, lassen Rückschlüsse auf die Struktur-Funktions-Beziehung zu.

Trotz großer Fortschritte im Verständnis des Mechanismus bleiben noch viele Fragen offen und verschiedene Experimente führten diesbzgl. zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen. So ist bisher auf molekularer Ebene noch nicht eindeutig entschieden (es existieren mehrere Modelle), wie die Sauerstoffreduktion mit dem Transport von Protonen und Elektronen verknüpft ist und welche Rolle die Kofaktoren beim katalytischen Prozeß übernehmen.

Prinzipielle Eigenschaften sowohl struktureller als auch funktioneller Natur im und in der Nähe des binuklearen Reaktions-Zentrums stehen hierbei zur Diskussion.

Aus dem Verständnis von bakteriellen Oxidasen erhofft man, durch Analogieschlüsse Modelle für mitochondriale Systeme zu erhalten, insbesondere um das Prinzip des Protonenpumpens aufzuklären. Ein Vorteil der bakteriellen Systeme ist die Möglichkeit der Mutagenese an definierten Stellen innerhalb des Proteins. Diese Methode ist im mitochondrialen Pendant nicht anwendbar.

Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe der zeitaufgelösten FT-IR Spektroskopie die Ligandendynamik an verschiedenen Oxidasen zu untersuchen. Als Ligand dient hierbei Kohlenmonoxid, das als spektroskopische Sonde die Bindung von Sauerstoff an das Reaktionszentrum nachahmt. Über das Bindungsverhalten bei verschiedenen Temperaturen erhält man sowohl Information über Energiebarrierenhöhen als auch über Protein-Reorganisationen in der unmittelbaren Umgebung der Reaktion.

Durch photolytisch initiierte Reduktion können Elektronentransferprozesse im gesamten Protein untersucht und mit den Ergebnissen der Ligandenbindung am Reaktionszentrum verglichen werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt im Vergleich verschiedener Cytochrom Oxidasen untereinander: sie haben alle eine identische Funktion, weisen jedoch geringe Sequenz-homologie auf. Es stellt sich die Frage, inwiefern diese Unterschiede Auswirkung auf das Reaktionszentrum selbst haben, bzw. in wie weit diese relevant sind.

Ferner wurden im speziellen Fall der *Paracoccus denitrificans* Cytochrom *c* Oxidase verschiedene Mutanten untersucht, die auf ihre Beteiligung an der katalytischen Funktion Hinweis geben sollten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung dienen als wichtige Grundlage und Interpretationshilfe bei Analogieschlüssen der verschiedenen Oxidasen.

1.1.1 Die mitochondriale Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Proteinkomplexen, die in der Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Ihre Funktion besteht darin, Elektronen von NADH (Nicotinamid Adenin Dinucleotid) und FADH₂ (Flavin Adenin Dinucleotid) aus den verschiedenen Stoffwechselkreisläufen über mehrere Stufen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen und diesen zu Wasser zu reduzieren. Ziel dieser Reaktion ist der Aufbau eines Protonengradienten über die Membran. In Abbildung 1-1 ist dieser Prozeß mit den einzelnen beteiligten Protein-Komplexen schematisch dargestellt.

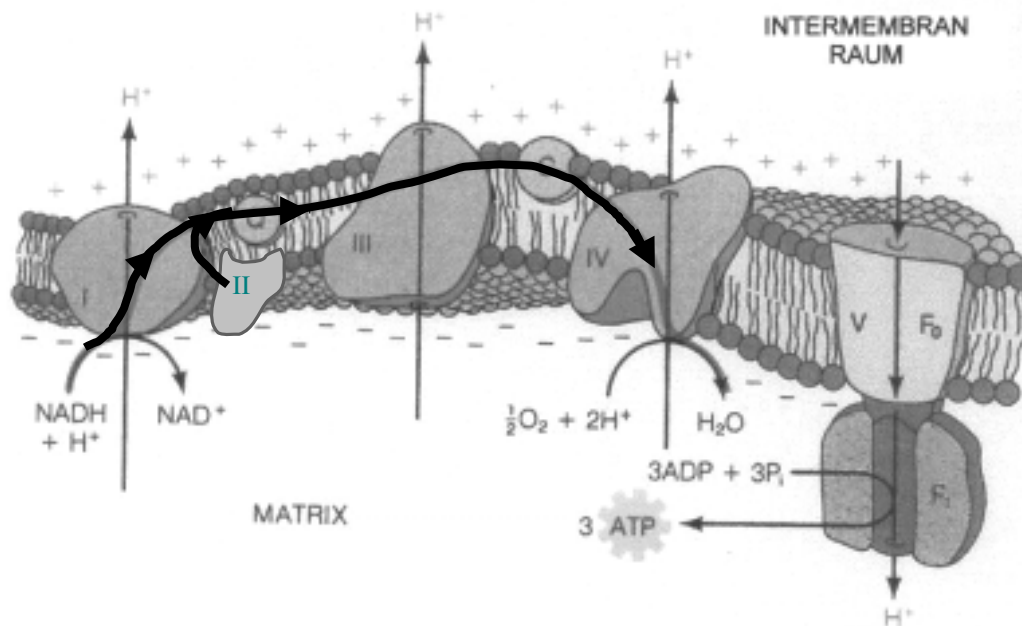


Abbildung 1-1: Aufbau der Atmungskette in der Mitochondrienmembran (schematisch) und der Verlauf des Elektronentransfers (schwarzer Pfeil). Die von Komplex I, III und IV gepumpten Protonen erzeugen einen Protonengradienten über die Membran [Abbildung nach Follmann 1998].

Durch die Oxidation von NADH zu NAD⁺ unter Entstehung eines Protons treten Elektronen über die NADH Oxidoreduktase (Komplex I) in die Atmungskette ein. Dort werden sie auf den sogenannten „Elektronencarrier“ Ubichinon weitergegeben. Auch über die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II) gelangen Elektronen zum Ubichinon. Von dort erfolgt die Übertragung der Elektronen auf Komplex III (dem Cytochrom *bc* Komplex). Der weitere Transfer geht über membranassoziiertes Cytochrom *c* (befindet sich ungebunden im Intermembranraum) zur Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), dem Endglied der Atmungskette. Dort erfolgt die Reaktion zusammen mit Protonen und Sauerstoff zu Wasser.

In der Elektronentransportkette wird die Redoxenergie stufenweise vermindert und die freiwerdende Energie in den Komplexen I, III und IV dazu benutzt, Protonen von der

Matrixseite der Innenmembran durch die Membran zu pumpen [Mitchell 1966; Follmann 1998]. Der entstehende Protonengradient führt zu einem elektrochemischen Potential über die Membran [Mitchell 1966; Wikström and Saraste 1984]. Die Energie dieses Gradienten wird für die Synthese von ATP genutzt.

Die Enzymkomplexe befinden sich bei Eukaryoten in der inneren Membran der Mitochondrien, welche die Matrix (Innenseite) vom Intermembranraum (Außenseite) trennt. In Prokaryoten, die keine Mitochondrien besitzen, befinden sich die Komponenten der Atmungskette in der Zellmembran [John und Whatley 1995], weisen aber ansonsten dieselbe Anordnung und Funktion wie in Mitochondrien auf.

Während unter aeroben Bedingungen Sauerstoff zu Wasser katalysiert wird, kann z. B. bei denitrifizierenden Bakterien (*Paracoccus denitrificans*) unter anaeroben Bedingungen mit bestimmten Voraussetzungen eine Nitratatmung einsetzen [Schlegel 1985]. Hierbei werden die Enzymkomplexe Nitratreductase A und Nitritreductase ausgebildet, die die Reduktion von Nitrat über Nitrit zu Distickstoffoxid und Stickstoff übernehmen. Nitrat ist hier terminaler Wasserstoffakzeptor.

Häm-Kupfer Oxidasen

Die drei Hauptkategorien der terminalen Enzyme der Atmungskette sind aufgrund ihrer Eigenschaften der Kern-Untereinheiten definiert, die durch drei Hauptlinien der Evolution begründet werden: Typ A (mitochondrial-artige, unterteilt in zwei Unterarten), Typ B (*ba₃*-artige, kanonische Aminosäuren* der Protonenkanäle nicht konserviert) und Typ C (*cbb₃*-artige) – Oxidasen (siehe aktuelle Einteilung nach [Pereira et al. 2001]). Unterschieden werden diese Oxidasen nach Sequenzhomologie, konservierten Protonenwegen u. a.. Gemeinsame wichtige Eigenschaften dieser Proteine sind ihre zwei katalytischen Untereinheiten (Subunits) SU I und SU II. Ihre Definition erfolgt in bezug auf Abweichungen der Protonenwege.

Ausschließlich SU I ist allen Häm-Kupfer Oxidasen gemeinsam. Dies rührt daher, daß sie das katalytische Zentrum beinhaltet: das Häm-Kupfer binukleare Zentrum und dessen Elektronendonator, ein low-spin Häm. Im binuklearen Zentrum findet die Sauerstoffreduktion zu Wasser statt. In prokaryotischen Oxidasen kommen drei verschiedene Häm-Typen *a*, *b*

* siehe auch Glossar: kanonische Oxidasen

und *o* vor, die sich durch unterschiedliche Seitenketten (Hydroxyethylfarnesylgruppe, Formylgruppe, Methylgruppe, etc.) am Häm-Grundgerüst voneinander unterscheiden (vgl. Abb. 1-2 und Tabelle 1-1). In der Porphyrinbiosynthese entstehen Häm *o* und Häm *a* durch diese Modifizierungen des Häm *b*.

In Chinoloxidasen koppelt diese Untereinheit mit dem Substrat, das in vielen Prokaryoten membrangebundenes Ubichinol oder Menachinol ist.

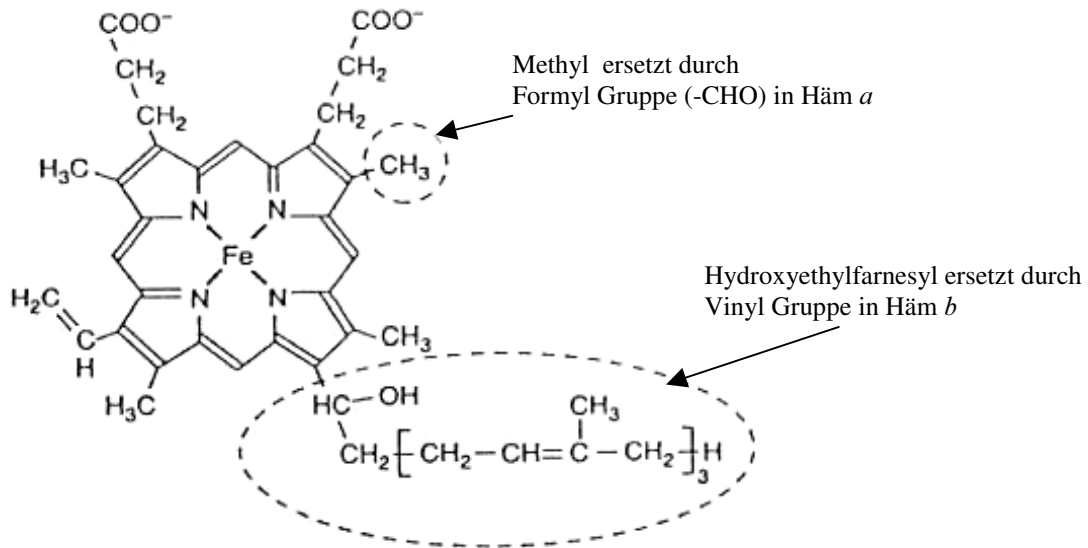


Abbildung 1-2: Porphyringerüst des Häm *o*, gezeigt mit alternativen Substituenten für Häm *a* und Häm *b*. Allen gemeinsam sind die beiden Propionat-Seitengruppen. [Quelle: www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/cyt_ox.html]

Porphyrinring	Substituenten am Häm	
	Rest x	Rest y
Häm <i>a</i>	Formyl	Farnesyl
Häm <i>b</i>	Formyl → Methyl	Farnesyl → Vinyl
Häm <i>o</i>	Formyl → Methyl	

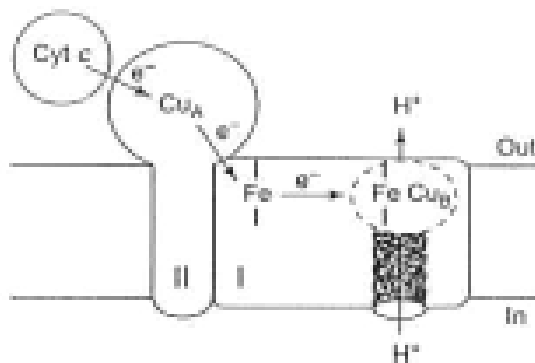
Tabelle 1-1 zeigt eine Übersicht über verschiedene Hämgruppen, und welche Seitengruppe durch welche Reste ersetzt sind.

In der SU II findet die Wechselwirkung mit dem Elektronendonator statt. Sie enthält bei Typ A und Typ B Oxidasen ein Di-Kupferzentrum (Cu_A) mit zwei über Cysteine verbrückten Kupferatomen als ersten Elektronenakzeptor von Cytochrom *c* (Abb. 1-3).

Im Gegensatz dazu gibt es in Chinoloxidasen kein Cu_A Zentrum und auch keine Cytochrom *c* Andockstelle [Garcia-Horsman et al. 1994; Wilmanns et al. 1995].

Abweichend hiervon sind auch Oxidasen vom *caa₃* oder *cbb₃* Typ: hier ist das Cytochrom *c* in der Nähe des Cu_A in diese Untereinheit „fusioniert“, d. h. kovalent an sie gebunden. Cytochrome vom *c*-Typ bilden Cystein-Sulphydrylgruppen, die an die Vinylgruppen gekoppelt und – im Gegensatz zu Häm *a*, *b* oder *o* - kovalent ans Protein gebunden sind.

In Abbildung 1-3 ist einer der drei Hauptzweige der Superfamilie mit seinen elementaren Bestandteilen anhand einiger Beispiele der sie konservierten Organismen dargestellt.



Oxidase, Typ A;

Vorkommen in:

Rinderherz,
P. denitrificans,
R. sphaeroides
Hefe

Abbildung 1-3: Untereinheiten I und II mit Cytochrom *c* als Substrat der Cytochrom *c* Oxidase
 [Quelle: http://www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/cyt_ox.html].

Grundsätzlich ist die katalytische Funktion durch die Untereinheiten SU I und SU II vollständig erfüllt. Je nach Organismus kommen noch weitere Untereinheiten in den Oxidasen hinzu, deren Funktion sowohl mit dem Sauerstoff-Schutz als auch mit der höheren Lebensdauer (der mitochondrialen Systeme) zu tun hat. So finden sich für das Archae-Bakterium *Thermus thermophilus* zwei Untereinheiten [Soulimane et al. 2000], für die Oxidase aus der bakteriellen Cytoplasmamembran drei bzw. vier Untereinheiten, für Säugetiere und Fische 13 Untereinheiten [Kadenbach et al. 1983]. In Eukaryoten sind die drei größten Untereinheiten homolog zu den drei Untereinheiten in Prokaryoten [Follmann 1998].

Neben den genannten Systemen gibt es auch Oxidasen, bei denen trotz Sauerstoffumsetzung keine Energietransduktion stattfindet. Hierzu gehört die ebenfalls in dieser Arbeit behandelte *bd* Chinol Oxidase, in der kein Kupfer Zentrum vorliegt und die deshalb auch nicht zur Familie der Häm-Kupfer Oxidasen gehört; weiterhin werden auch keine Protonen gepumpt. Dieser Fall wird ausführlich in Kapitel 3.4 behandelt.

1.1.2 Struktur und Aufbau der Cytochrom *c* Oxidasen

1.1.2.1 Cytochrom *c* Oxidase aus dem Bakterium *Paracoccus denitrificans*

Nach zahlreichen Untersuchungen an Oxidasen mit diversen molekularbiologischen und spektroskopischen Methoden [für Übersichtsartikel siehe: Trumppower & Gennis 1994; Babcock & Wikström 1992; Saraste 1990; Calhoun et al. 1994] wurde im Jahre 1995 über Röntgenstrukturanalyse die Strukturen der Cytochrom *c* Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* [Iwata et al. 1995] und aus Rinderherz [Tsukihara et al. 1995] aufgeklärt und in den folgenden Jahren verfeinert [Tsukihara et al. 1996; Yoshikawa et al. 1998; Ostermeier et al. 1997; Michel et al. 1998b]. Im Jahre 2000 folgten mit der *ba*₃ Oxidase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* [Soulimane et al. 2000] und kürzlich mit *Rhodobacter sphaeroides* [Svensson-Ek et al. 2002] weitere Strukturen. Wie aus der Gen-Sequenz bekannt, zeigte ein Vergleich für das Rinderherz-Enzym 13, für das Bodenbakterium 4 und für das thermophile Bakterium nur 2 (+ Iia) Untereinheiten. Die Strukturmerkmale der zwei Untereinheiten, die den katalytischen Kern des Enzyms bilden, sind sehr ähnlich und weichen nur in einigen wenigen Details voneinander ab [siehe Pereira et al. 2001 für eine Übersicht]. So enthält beispielsweise die mitochondriale Oxidase zusätzlich ein Zink-, ein Natrium- und ein Magnesium-Atom [Tsukihara et al. 1996], die Helix in Untereinheit Iia von *T. thermophilus* entspricht Helix II aus Untereinheit II von *P. denitrificans* [Soulimane et al. 2000].

Die Cytochrom c Oxidase von Paracoccus denitrificans

Alle in dieser Arbeit gemachten Angaben zur Struktur und Funktion beziehungsweise Numerierung der Aminosäuren folgen der Nomenklatur der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans*.

Diese besteht aus 1329 Aminosäuren, die in vier Untereinheiten angeordnet sind. Sie enthält drei Kupferatome, zwei Hämgruppen und ein Magnesiumatom. Ihre Sekundärstruktur weist insgesamt 22 transmembrane α -Helices auf, wie in Abb. 1-4 in der Tertiär-Struktur Darstellung gezeigt ist. Ihre größte Längsausdehnung durch die Membran beträgt 55 Ångström. Im Folgenden werden die Untereinheiten, deren Aufbau und Funktion kurz erläutert.

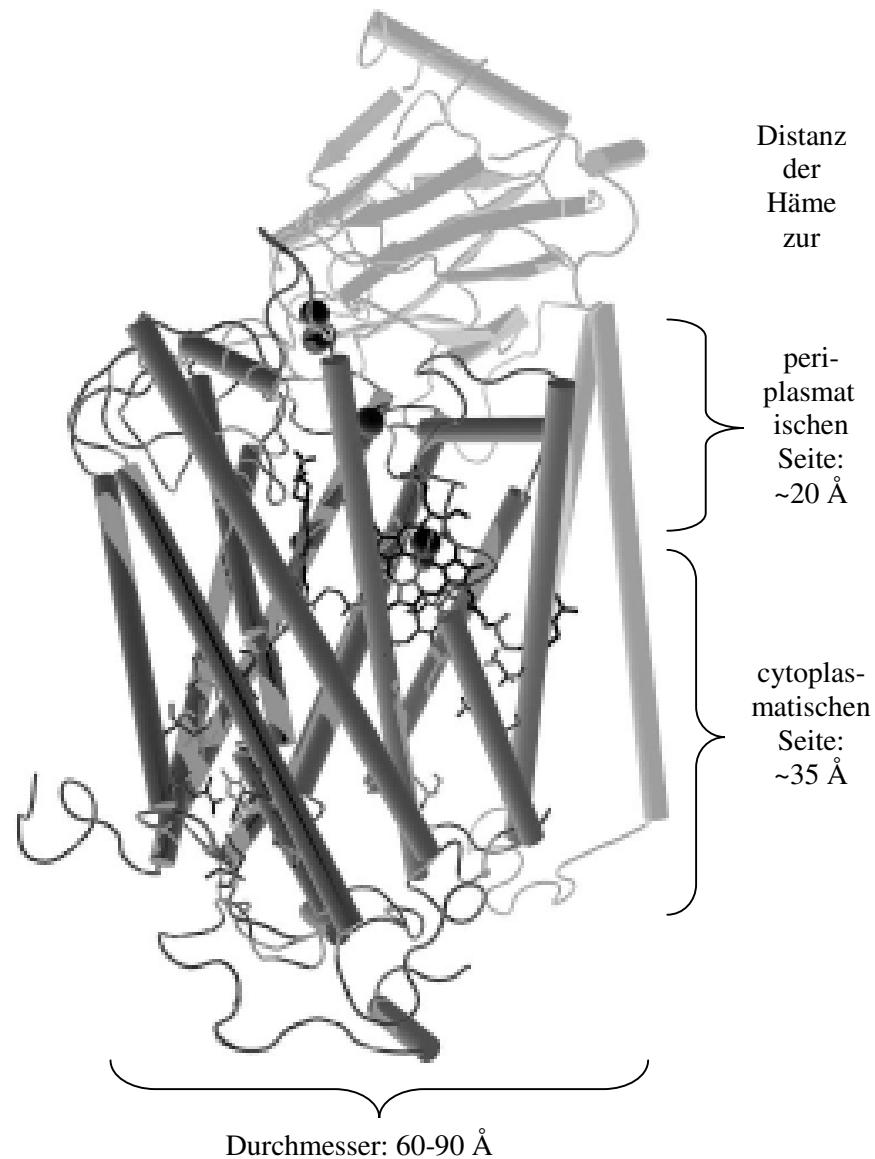


Abbildung 1-4: Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* [nach Ostermeier et al. 1997; Pdb-Code: 1AR1]. Untereinheit I ist dunkelgrau, Untereinheit II grau dargestellt. In schwarz sind die beiden Hämgruppen a und a_3 , als auch Cu_A und Cu_B zu sehen. Angegeben sind ferner die Abmessungen des Enzyms, wie man sie aus der Kristallstruktur kennt. Untereinheit III und IV wurden zur besseren Ansicht weggelassen.

Untereinheit I

besteht aus 12 transmembranen Helices und enthält die katalytischen Zentren Häm a , Häm a_3 und Cu_B . Wie bereits ausgeführt, bildet sie die zentrale Untereinheit aller Oxidasen, da hier sowohl die Sauerstoffreduktion, als auch der Protonentransfer stattfindet. Wie aus Abb. 1-5 ersichtlich, sind die Helices in der Membran zu drei Halbkreisen angeordnet, derart, daß auf diese Weise Kanäle quer zur Membran entstehen. In je einem der Kanäle ist je eine der beiden Hämgruppen lokalisiert. Ebenfalls in dieser Untereinheit befindet sich das Cu_B -Zentrum und ein Magnesiumatom (siehe auch Abb. 1-6).

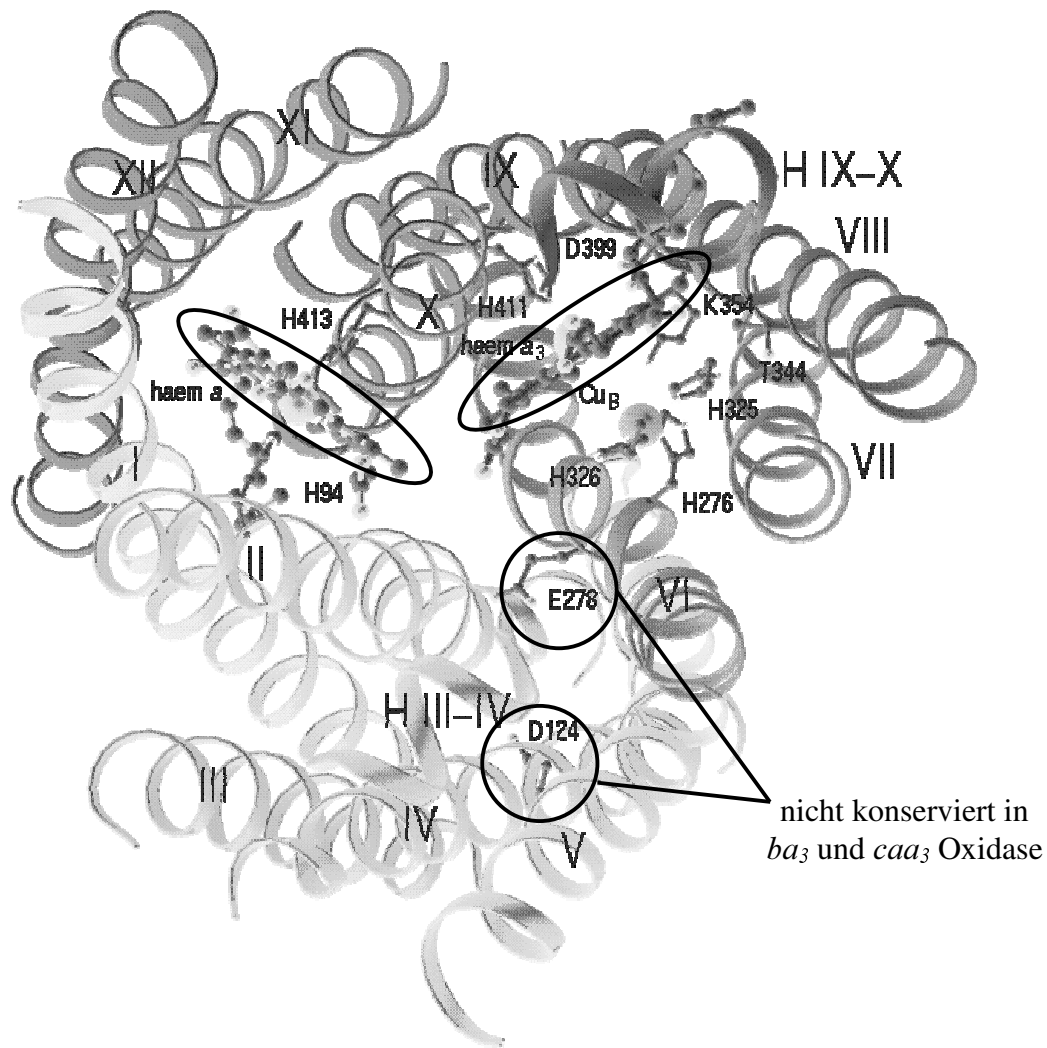


Abbildung 1-5: Struktur der Untereinheit I [nach Iwata et al. 1995], Aufsicht. Gesondert markiert sind die beiden Häme und die für das Protonenpumpen relevanten Aminosäuren. Interessanterweise sind diese essentiellen Reste nicht generell in allen Oxidasen konserviert (vgl. Text).

Beide Häme sind ungefähr gleich tief im Protein lokalisiert (20 Å) und an der gleichen Helix koordiniert, jedoch nicht kovalent ans Protein gebunden. Die beiden Porphyrinebenen stehen nahezu senkrecht zur Membran und schließen einen Winkel von 108° ein. Die Eisen-Zentren sind 13,2 Å voneinander entfernt und der kürzeste Abstand zwischen den Häm-Propionaten beträgt 4,5 Å.

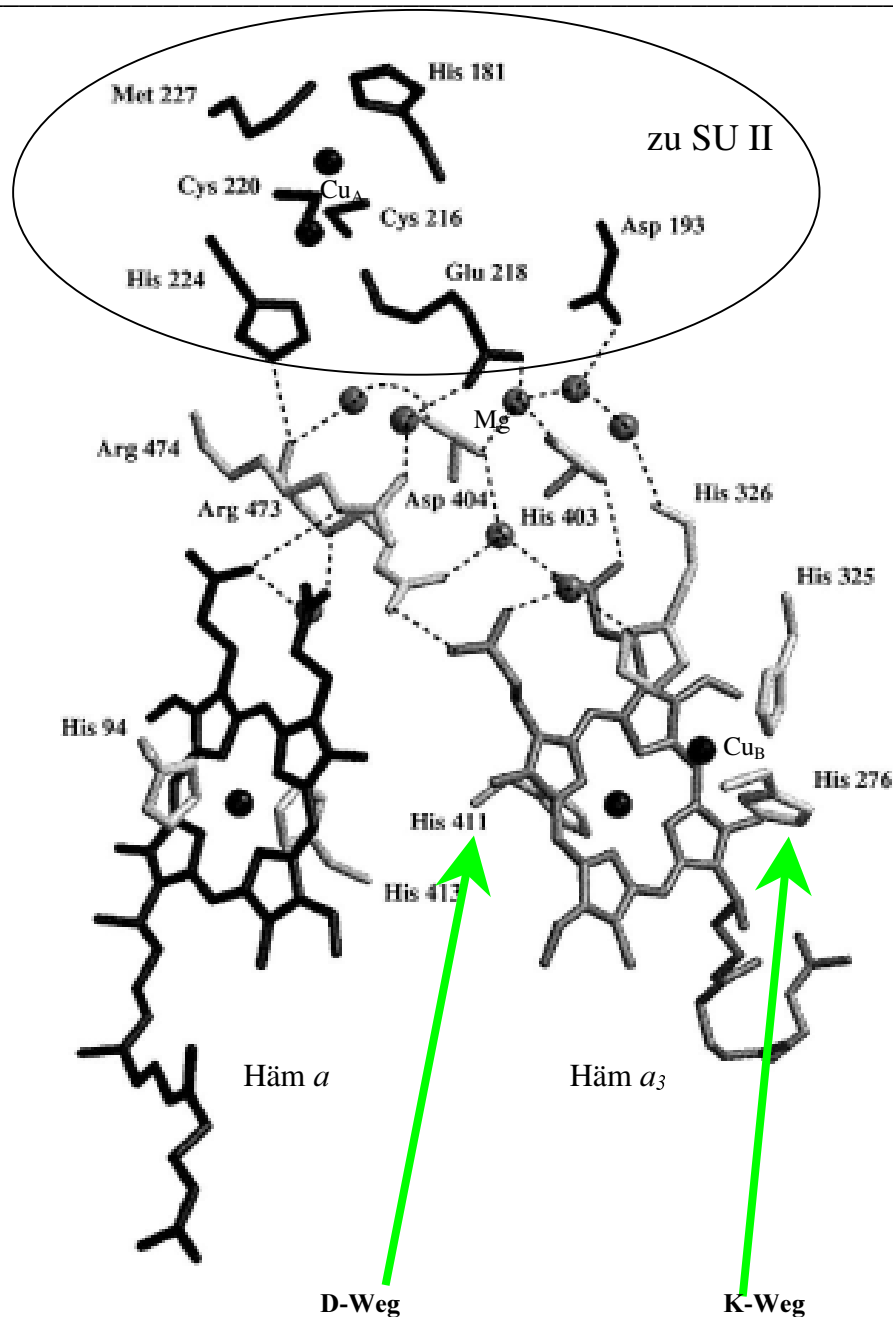


Abbildung 1-6: Binukleares Zentrum (Häm a_3 und Cu_B) mit Kofaktoren. Dargestellt ist ferner das Wasserstoff-verbrückte Netzwerk zwischen den Hämgruppen [aus Ostermeier et al. 1997]. Schematisch angedeutet die beiden Protonenkanäle (Erläuterung in Kap. 1.1.3.1).

In Abb. 1-6 sind die zentralen Elemente in Untereinheit I und II im Detail dargestellt. Als Kofaktoren agieren hier

- ein **low spin Häm a** , dessen Eisen seine 5. Koordination an His 94 in Helix II und die 6. Koordination an His 413 in Helix X hat. Die Formylgruppe ist Wasserstoff-verbrückt zu Arg 54. Die Funktion dieses Häms besteht im Übertragen von Elektronen zwischen Cu_A und dem sogenannten binuklearen Zentrum Häm a_3 und Cu_B .
- im Falle der ba_3 Oxidase ein **low spin Häm b** anstatt Häm a

-
- ein **high spin Häm a_3** , dessen Eisen seine 5. Koordination an His 411 in Helix X hat. Seine 6. Koordinationsstelle ist unbesetzt und zeigt in Richtung Cu_B , von dem es $5,2 \text{ \AA}$ entfernt ist. Im reduzierten Zustand ist es die Bindungsstelle von Sauerstoff oder Kohlenmonoxid.
 - ein **Cu_B** Atom, koordiniert an His 276, His 325 und His 326 als Liganden. Im oxidierten Zustand des Enzyms wird hier OH^- oder Wasser als 4. Koordination vermutet.
 - ein **Mg** Atom an der Schnittstelle zu Untereinheit II und 15 \AA vom binuklearen Zentrum entfernt, das wahrscheinlich den „Abtransport“ des bei der Reduktion von Sauerstoff entstehenden Wassers regelt und somit die Umkehrung des katalytischen Prozesses verhindert [vgl. dazu: Florens et al. 2001].

Untereinheit II

Diese Untereinheit enthält zwei transmembrane Helices und über dem cytosolischen Teil der Untereinheit I eine große extramembrane Domäne, die aus zehn β -Faltblättern besteht. Ferner beinhaltet sie das Cu_A -Zentrum, das als primärer Elektronenakzeptor in diesem Enzym arbeitet. Durch die Aufklärung der Struktur konnten spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden, daß dieses Zentrum aus zwei Kupferatomen besteht, die über Thiolate durch die Seitenketten von Cys 216 und Cys 220 miteinander verbrückt sind. Sie liegen in der gemischt-valenten Form vor: $\text{Cu}_A^{+1,5}/\text{Cu}_A^{+1,5}$ [Steffens et al. 1993] und sind $2,6 \text{ \AA}$ voneinander entfernt. Eine Andockstelle für den Elektronendonator Cytochrom *c* ist inzwischen bekannt [Drosou et al. 2002].

Untereinheit III

besteht aus sieben transmembranen Helices. Die Funktion dieser Untereinheit ist noch nicht geklärt, da ohne sie die vollständige katalytische Reaktion des Enzyms erhalten bleibt [Solioz et al. 1982; Haltia et al. 1989]. Eine mögliche Stabilisierung des Enzymkomplexes wird diskutiert, ebenso eine Funktion als Sauerstoff-Zubringer [Bratton et al. 1999].

Untereinheit IV

besteht aus nur einer transmembranen Helix. Ihre Funktion ist vermutlich ebenso stabilisierender Art.

1.1.2.2 Cytochrom *c* Oxidasen aus dem Bakterium *Thermus thermophilus*

Das thermophile, Gram-negative* Eubakterium *T. thermophilus* exprimiert bei 75 °C zwei unterschiedliche Oxidasen: einen *ba*₃ – Typ unter niedriger Sauerstoffkonzentration und einen *caa*₃ – Typ bei hoher Sauerstoffkonzentration [Fee et al. 1980; Zimmermann et al. 1988].

- Die ***ba*₃ Oxidase** ist die kleinste bekannte Cytochrom *c* Oxidase und besteht aus nur zwei Untereinheiten [Bresser et al. 1993], welche gut mit den Untereinheiten I und II der anderen Oxidasen übereinstimmen [Keightley et al. 1995]. Im Jahre 2000 wurde von Soulimane et al. (2000) zusätzlich eine Untereinheit IIa in der Kristallstruktur gesehen, die der Helix II aus Untereinheit II der *P. denitrificans* Oxidase entspricht. Ferner enthält Untereinheit I statt des low spin Häm *a* ein low spin Häm *b* und der Farnesylrest des Häm *a*₃ ist durch eine Geranylgeranyl-Seitenkette ersetzt [Zimmermann et al. 1988].
- In der ***caa*₃ Oxidase** ist der Elektronen-Donor Cytochrom *c* kovalent an Untereinheit II gebunden. Eine Röntgenstruktur liegt bisher noch nicht vor.

Neben diesen strukturellen Unterschieden gibt es auch Abweichungen in der Funktion und im Protonenpumpen, da essentielle Aminosäuren, die in diesem Prozeß involviert zu sein scheinen, nicht konserviert sind (siehe nächstes Kapitel).

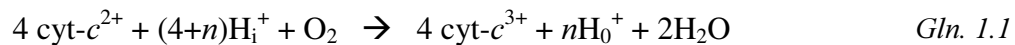
* siehe auch Glossar: gram-negativ

1.1.3 Funktion und Katalysezyklus der Oxidase

1.1.3.1 Funktion am Beispiel der aa_3 Oxidase von *Paracoccus denitrificans*

Sauerstoff - Umsetzung

Die Cytochrom *c* Oxidase überträgt als terminales Enzym der Zellatmung vier Elektronen von Cytochrom *c* auf Sauerstoff, der mit vier Protonen aus der Matrix zu Wasser reduziert wird. Bei diesem Prozeß werden zusätzlich vier Protonen über die Membran gepumpt [Wikström et al. 1981], entsprechend der Gleichung



wobei H_i^+ und H_0^+ die Protonen der inneren und äußeren Seite der Membran und n die Zahl der gepumpten Protonen bedeuten (für „kanonische“ Cytochrom *c* Oxidasen* wie beispielsweise *P. denitrificans* aa_3 -Oxidase ist $n = 4$; hiervon abweichend kennt man bisher nur *T. thermophilus* ba_3 -Oxidase mit $n = 2$ [Kannt et al. 1998]). Der resultierende Protonengradient steuert die ATP Synthese aus ADP und P_i [von Jagow und Engel 1980] (siehe Einleitung). Bei den umgesetzten Protonen unterscheidet man zwischen gepumpten (vektoriellen) und den für die Wasserbildung verwendeten (skalaren) Protonen.

Elektronentransferwege

Elektronendonator ist das frei bewegliche Substrat Cytochrom *c*, das Ladungen auf das Cu_A – Zentrum in Untereinheit II überträgt. Dies ist der primäre Elektronenakzeptor der Oxidase. Von dort werden Elektronen über eine Distanz von 19,5 Å auf das Häm *a* übertragen. Der Transfer erfolgt wahrscheinlich über eine Kette von kovalenten Bindungen und Wasserstoffbrücken [Hill 1994a]. Der nächste Weg führt möglicherweise über die beiden Hämpropionate von Häm *a* zu Häm a_3 . An dieser Stelle beträgt der Abstand nur 4,5 Å, was zusammen mit dem delokalisierten π -Elektronensystem des Porphyrinringes einen schnellen Transfer der Elektronen gewährleistet. Von dort gelangt die Ladung zum binuklearen Zentrum, wo die Sauerstoffreduktion stattfindet.

* siehe auch Glossar: kanonische Oxidasen

Protonentransferwege

Wie oben (und in Gln. 1.1) beschrieben, werden beim katalytischen Prozeß zweierlei „Arten“ von Protonen unterschieden: Skalare Protonen, die bei der O₂ Reduktion konsumiert werden, und vektorielle Protonen, die über die Membran gepumpt werden.

Über den Vergleich der Gensequenz verschiedener Oxidasen wurde auf die Relevanz bestimmter Aminosäuren geschlossen. Durch ortsgerichtete Mutagenese und spektroskopische Methoden wurden diese hochkonservierten Gruppen zwei Protonentransferpfaden zugeordnet, je nachdem, welche Funktion der Oxidase durch die Mutationen gestört wurde [Gennis 1998].

Der **K-Weg** ist benannt nach der Aminosäure Lys (**K**) 354 auf der cytoplasmatischen Seite und galt bisher als der „Eingang“ für Protonen. Er verläuft über die Aminosäuren Thr 351 und Tyr 280, das kovalent an His 276, einem Liganden des Cu_B, gebunden ist [Iwata et al. 1995]. Als neuer Teil des Eingangs wurde vor kurzem Glu 78 in SU II zur Diskussion gestellt [Ma et al. 1999].

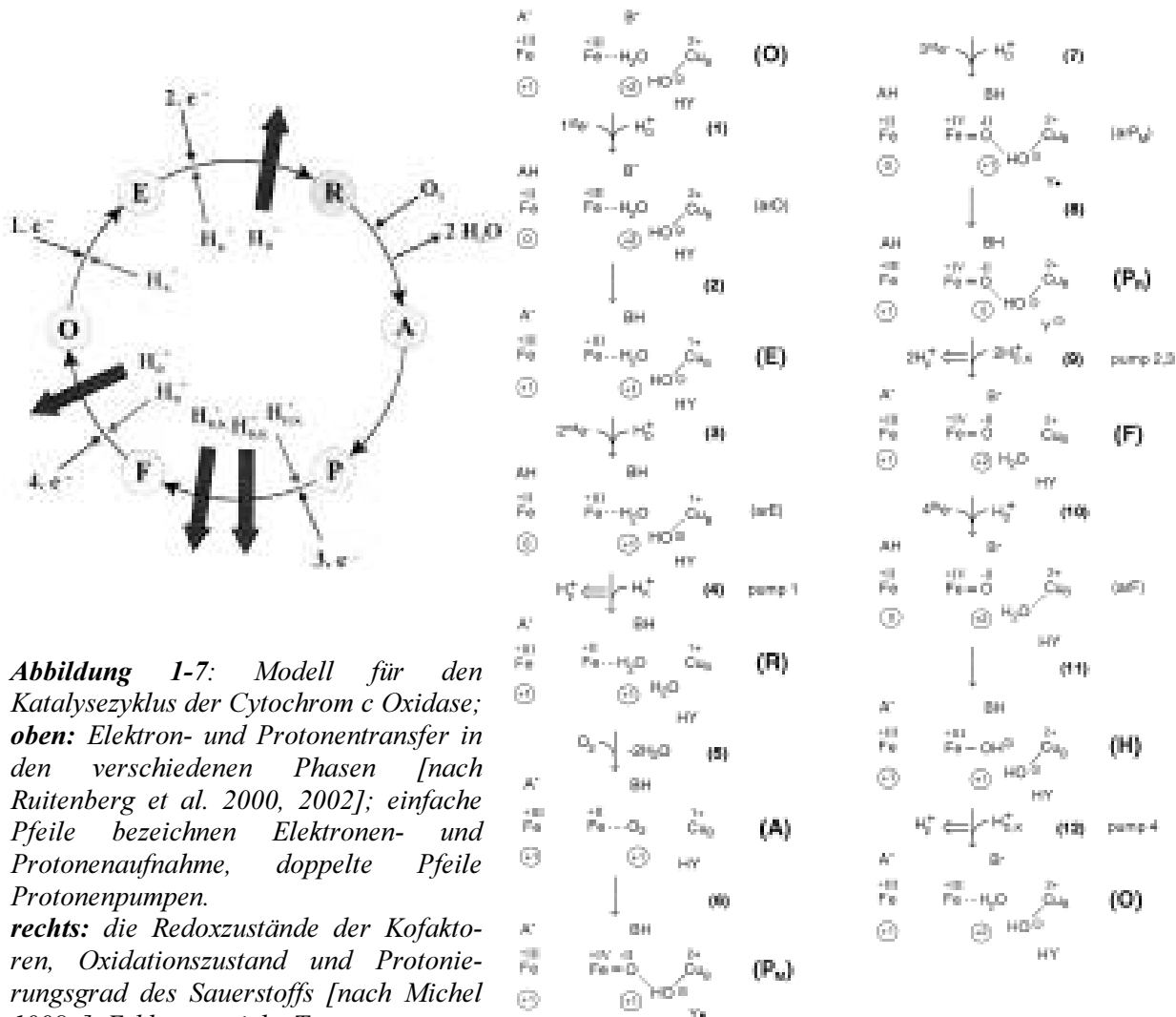
Der **D-Weg** beginnt mit Asn (**D**) 124 und führt über Asn 199, 113 und 131 über Tyr 35 zu Ser 134 und 193. Von dort führt der Weg über mehrere Wassermoleküle und über Glu 278 entweder zum binuklearen Zentrum, oder die Protonen werden über Asp 399 nach „außen“ gepumpt. Ein 1994 von Wikström vorgeschlagener „Shuttle-Mechanismus“ über einen Konformationswechsel von His 325 [Wikström et al. 1994] konnte nicht bestätigt werden [Harrenga und Michel 1999]. In der Rinderherzoxidase fehlen die letzten beiden Anbindungen zum binuklearen Zentrum; der Pfad führt über polare Gruppen direkt zur Intermembranseite [Yoshikawa et al. 1998] und scheint ausschließlich für das Protonen-pumpen zuständig zu sein.

Katalysezyklus

Für die komplexe Reaktion von O₂ zu H₂O sind in den letzten 20 Jahren eine Vielzahl von Modellen kontrovers diskutiert worden. Zur Zeit steht eine direkte Diskussion zwischen zwei Lagern im Mittelpunkt des Geschehens:

Neben dem Modell nach Wikström [Wikström 2000] gibt es aufgrund neuester Experimente [Ruitenbergh et al. 2002] ein überarbeitetes Modell, das im folgenden schematisch dargestellt wird.

Die prinzipiellen Fragestellungen und Kontroversen betreffen den Mechanismus der Sauerstoffreduktion und den damit gekoppelten Transport von Protonen sowohl zum Reaktionszentrum als auch über die Membran hinweg und deren Status bei den jeweiligen Redoxvorgängen. In Abbildung 1-7 ist der Katalysezyklus schematisch (*links*) und mit den jeweiligen Redoxzuständen der beteiligten Kofaktoren (*rechts*) vereinfacht dargestellt.



Nach aktuellem Stand [Ruitenberg et al. 2002] sei hier der Katalysezyklus stichpunktartig skizziert:

1. Ausgangspunkt der Beschreibung des Katalysezyklus ist das volloxydierte Enzym (Zustand **O**); aufgrund der Röntgenstrukturanalyse vermutet man H_2O oder OH^- im Reaktionszentrum.
2. Der Zyklus beginnt mit dem Elektronentransfer von Cytochrom *c* über Cu_A zu Häm *a*; Ein Proton wird dabei durch den K-Kanal aufgenommen [Ruitenberg et al. 2000]. Das Enzym befindet sich nun im einfach reduzierten Zwischenzustand (**E**).

-
3. Nun gelangt ein zweites Elektron zu Häm a . Um die Ladungen im inneren des Proteins zu kompensieren [Mitchell und Rich 1994] erfolgt zugleich eine Protonenaufnahme, wieder über den K-Kanal [Thomas et al. 1993]; nun wird das erste Proton über den D-Kanal gepumpt [Michel 1999]; das binukleare Zentrum ist nun im vollreduzierten Zustand (**R**).
 4. Sauerstoff bindet transient an Cu_B und anschließend an das Häm-Eisen; zwei Wassermoleküle werden dabei aus dem Zentrum „verdrängt“; dann wird Zustand (**A**) erreicht.
 5. Durch Elektronenumverteilung im binuklearen Zentrum beginnt die Sauerstoffreduktion: erster Zwischenzustand ist hierbei ein gemischtvalenter Peroxy-Zwischenzustand **P_M**; Nach Aufnahme des dritten Elektrons und des dritten Protons wird ein zweites Proton gepumpt; danach wird die Sauerstoffbindung gespalten. Metallionen des binuklearen Zentrums können für diesen Prozeß drei Elektronen liefern, für die Reduktion des Sauerstoffs zu H_2O braucht es aber insgesamt vier; dieses eine könnte durch Bildung eines Radikals geliefert werden: lange stand Tyr 280 zur Debatte, da es kovalent mit His 276 verknüpft und somit als Quelle des vierten Elektrons dienen könnte [Fabian et al. 1999; Buse et al. 1999].
 6. Das nächste Intermediat im Katalysezyklus ist die um ein weiteres Elektron reduzierte Peroxy-Form (**P_R**); als alternative Möglichkeit kann dieses Elektron auch am binuklearen Zentrum lokalisiert sein (Tyr oder H_2O); Nach Reorganisation der Ladungen und Übertragung eines Elektrons auf Cu_B wird ein drittes Proton gepumpt; dies bringt das Enzym in die sogenannte Oxo-Ferrylform **F**.
 7. Mit Aufnahme eines vierten Elektrons und dessen Transfer von Cu_A über Häm a_3 zu Cu_B sowie einer Protonenaufnahme über den D-Kanal werden in diesem Schritt zwei Protonen zum Sauerstoffatom gebracht, das zu Wasser reduziert wird ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$), dieses verbleibt im Zentrum bis zum nächsten Katalysezyklus (und wird bei Punkt 4 verdrängt);
 8. Der aktuelle Redoxzustand der Oxidase wird jetzt als Hydroxy-Form **H** bezeichnet. Infolge einer gekoppelten Protonenaufnahme ist der Schritt zu **H** pH-abhängig.
 9. Nach Aufnahme eines vierten Protons wird schließlich noch ein Proton über die Membran gepumpt [Ruitenberg et al. 2002]; im Zentrum bildet sich das zweite H_2O -Molekül
 10. Nach Durchlaufen des vollständigen Zyklus befindet sich die Oxidase nun wieder im Ausgangszustand der volloxydierten Form (**O**).
-

Historische Fußnote zur Entwicklung eines Modells für den Katalysezyklus:

Verschiedene Arten von Experimenten führten in den vergangenen Jahren zu sich widersprechenden Schlußfolgerungen; auch werden immer neue Intermediate und elektrostatisch agierende Aminosäuregruppen zur Erläuterung des detaillierten Mechanismus ins Feld geführt.

Wikström hatte 1989 aufgrund experimenteller Ergebnisse geschlossen, daß nur die Übergänge vom P- in den F- und von F- in den oxidierten Ausgangszustand O an das Pumpen von (jeweils zwei) Protonen gekoppelt sind. Als Folge davon wurde ein sogenannter Histidin-Zyklus für den Mechanismus des Protonenpumpens postuliert [Wikström et al. 1994], da Histidin die einzige Aminosäure ist, die durch Wechseln zwischen der Imidazolatform und der Imidazoliumform des Seitenkettenimidazols in der Lage ist, zwei Protonen aufzunehmen und wieder abzugeben. Iwata et al. (1995) diskutierte ebenfalls aufgrund der Röntgenstrukturanalyse diesen Mechanismus. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch später weder für das oxidierte noch für das reduzierte Enzym bestätigen [Harrenga und Michel 1999].

Nach neueren Experimenten werden nun nach Wikström [Ebec 2002, Vortrag; Verkhovsky et al.1999] bei der Re-Reduktion zwei Protonen gepumpt, wovon eines davon nach Michel von $E \rightarrow R$, das andere jedoch bei $F \rightarrow O$ gepumpt wird (für die Überlegung, daß in der reduktiven Phase schon gepumpt werden muß, siehe: [Michel 1998a; Michel 1999a]).

Durch zahlreiche Experimente, die in Kombination mit ortsgerichteter Mutagenese durchgeführt wurden, wurden folgende Protonenkanäle als relevant für die jeweiligen Schritte ermittelt:

- Der K-Kanal ist involviert in den Reaktionsschritten von $O \rightarrow E$ [Ruitenbergh et al. 2000] und von $E \rightarrow R$;
- Beim Übergang von $R \rightarrow P$ erfolgt keine Protonenaufnahme;
- Der D-Kanal ist beteiligt an Reaktionen von $P_R \rightarrow O$ [Ädelroth et al. 1997; Brzezinski und Ädelroth 1998] und von $F \rightarrow O$ [Konstantinov et al. 1997]

d. h. daß der D-Kanal sowohl für „chemische“ als auch für „gepumpte“ Protonen zuständig ist [Gennis 1998], während der K-Kanal nur in die Protonenaufnahme involviert ist.

1.1.3.2 Strukturelle Besonderheiten der Oxidasen aus dem Bakterium *Thermus thermophilus*

Für beide - sowohl *ba₃* als auch *caa₃* Oxidase aus *T. thermophilus* - sind Aminosäuren, die in anderen Oxidasen den K- oder D-„Weg“ definieren, wie K 354, D 124 und E 278 (*P. denitrificans* Numerierung), nicht konserviert. Diese Aminosäuren werden jedoch als für die Enzym-Aktivität essentiell angenommen (vgl. *aa₃* Oxidase). Beide Oxidase-Typen zeigen dennoch Protonenpumpaktivität [Gennis 1984; Pereira et al. 2001].

Neben der geringen Sequenz-Identität der Aminosäuren im Vergleich mit anderen Oxidasen [Castresana et al. 1995] zeigt die *Thermus thermophilus ba₃* Oxidase nicht nur Unterschiede bzgl. der Protonen-Kanäle [Soulimane et al. 2000], sondern auch Abweichungen in ihrer Funktion: Im Gegensatz zur *caa₃* oder *aa₃* Oxidase beträgt die Protonenpumpaktivität für die *ba₃* Oxidase nur 50 % (für O₂ Reduktion: Umsatz von 1 H⁺/e⁻ und Pumpen von 0.4 – 0.5 H⁺/e⁻ [Kannt et al. 1998]).

In der *caa₃* Oxidase, von der bisher noch keine Struktur vorliegt, kommt man aufgrund von Sequenzhomologie-Vergleichen zur Arbeitshypothese, daß ein Tyr-Ser – Paar das Glu 278 im Protonenkanal funktionell ersetzt [Pereira et al. 2001].

1.2 Ligandenbindung und Experimente an Cytochrom *c* Oxidasen

1.2.1 Bindung von CO

Wie Myoglobin oder Hämoglobin ist auch die Cytochrom *c* Oxidase in der Lage, neben dem natürlichen Bindungspartner Sauerstoff andere Liganden wie CO oder NO zu binden. Diese Liganden werden an das reduzierte Eisen (Fe^{2+}) der Häm a_3 – Gruppe kovalent gebunden. Liegt dieses Eisen in oxidierten Form (Fe^{3+}) vor, kann kein CO binden. In Abbildung 1-8 ist das binukleare Zentrum in oxidierten und reduziert-ligandierter Form dargestellt, wie es röntgen-kristallographisch ermittelt wurde [Tsukihara et al. 1996; Yoshikawa et al. 1998].

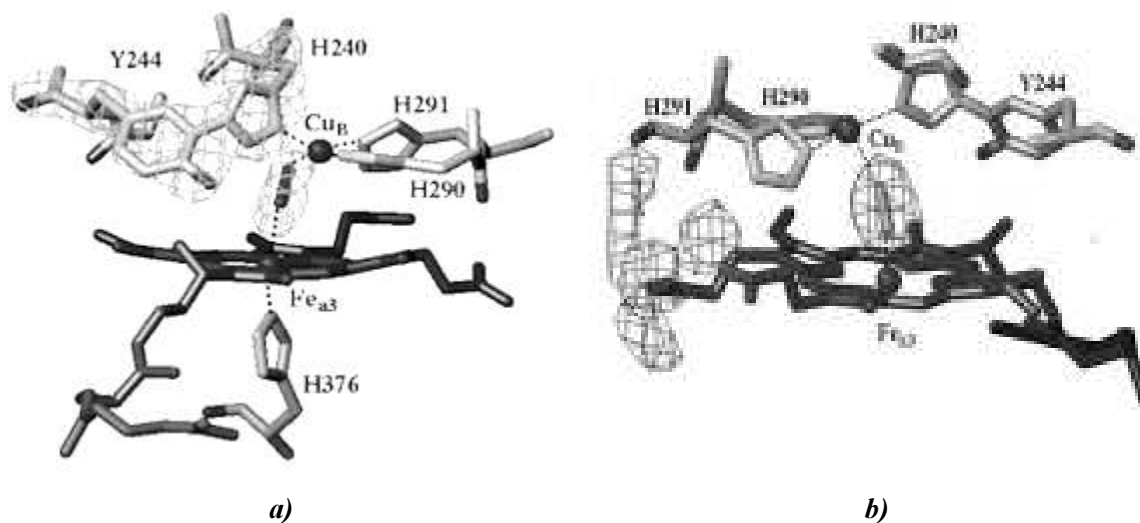


Abbildung 1-8: Röntgen-Kristall-Struktur der oxidierten, unligandierten Rinderherz-Oxidase (a) und der vollreduzierten, CO gebundenen Form (b) [pdb-Code: 1OCC; 1OCO].

Die Anregung des Häms mit Licht im sichtbaren oder im UV-Bereich führt zur Photolyse: CO dissoziiert vom Häm a_3 und bindet an Cu_B. Für Temperaturen unter 140 K ist eine Rückbindung ausgeschlossen und CO bleibt dort gebunden [Alben et al. 1981]. Bei höheren Temperaturen erfolgt eine Rückbindung zum Häm a_3 mit einer für das jeweilige Enzym für eine bestimmte Temperatur definierten Zeitkonstanten. Um die Umgebung des binuklearen Zentrums zu untersuchen, werden in dieser Arbeit die Schwingungsbanden der vollreduzierten, CO vergifteten Oxidase vor und nach der Photolyse von *T. thermophilus* und *P. denitrificans* mittels FT-IR Differenz-Spektroskopie charakterisiert und miteinander verglichen.

1.2.2 Energielandschaft und Konformationszustände

Da die zwischenmolekularen Wechselwirkungen, die die drei-dimensionale Struktur stabilisieren, relativ schwach sind, gibt es für ein gefaltetes Protein keinen eindeutigen Zustand der kleinsten freien Energie. Der Grundzustand ist hoch entartet, so daß das Enzym in jeder Konformation auch in einer großen Anzahl Iso-energetischer Strukturen existiert, die man Konformations-Subzustände nennt [Frauenfelder et al. 1979; Nienhaus 1996]. Diese können als Minima in einer multidimensionalen Konformations-Energie-Oberfläche dargestellt werden.

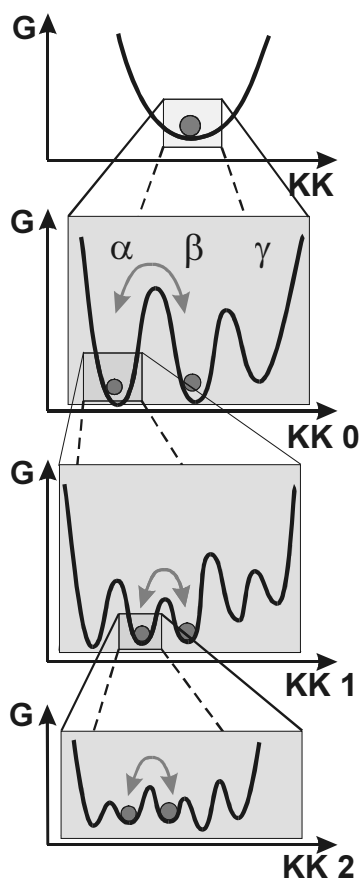


Abbildung 1-9: Hierarchische Energielandschaft [Frauenfelder et al. 1991]; Schema aus Haustein (2000).

Die Energielandschaft stellt die potentielle Energie des Proteins als Funktion sogenannter Konformations-Koordinaten dar. Sie zeigt Strukturen über viele Skalen, wobei die Konformations-subzustände hierarchisch angeordnet werden können. In Abb. 1-9 ist diese Aufspaltung des Minimums der potentiellen Energie (Parabel) angedeutet. CO gebundene Oxidase zeigt im Infrarotspektrum verschiedene Schwingungsbanden, die auf solch eine Komplexität hindeuten. Jede Mode kann somit einem bestimmten Subzustand zugeordnet werden, die hier mit α , β und γ bezeichnet sind. Trotz gleicher Aminosäuresequenz weisen sie leichte strukturelle Unterschiede auf, die zum Teil durch Protonierung bestimmter Seitengruppen hervorgerufen werden [Frauenfelder et al. 1991; vgl. Haustein 2000].

Als Ergebnis von Ligandenbindungs-Experimenten ließen sich schon Myoglobinstrukturen in ein hierarchisches Schema einordnen. Dieses ist beispielsweise charakterisiert durch verschiedenen Arten von Strukturübergängen und durch die Höhe der Barrieren zwischen zwei lokalen Minima [Frauenfelder et al. 1991].

1.2.3 Blitzphotolyse

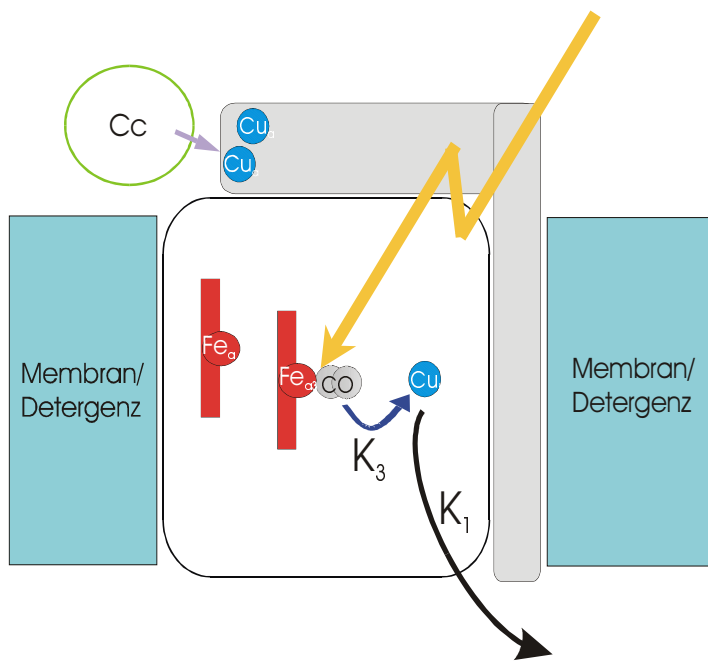


Abbildung 1-10: schematische Darstellung einer Blitz-Photolyse – Experimentes.

Durch Photolyse (kurzer Laserblitz, typischerweise 532 nm) absorbiert die Hämgruppe ein Photon und ein Elektron aus dem π -Elektronensystem wird in einen antibindenden Zustand angeregt: die Bindung des Liganden zum Eisen bricht auf. Der Wirkungsgrad (Quantenausbeute) dieses Prozesses beträgt für CO als Liganden fast 100%. Damit verbunden sind Absorptionsänderungen einmal des Liganden selbst und der Häm-Bindungsstelle, und anderer-

seits der Umgebung dieses Reaktionszentrums. Das Prinzip der Messung besteht nun darin, a) den Unterschied zwischen gebundenem und photolysiertem Liganden über den gesamten Spektralbereich, in dem das Enzym absorbiert, einzelnen Molekülgruppen zuzuordnen und b) den zeitlichen Verlauf der Änderung im Spektrum und der damit verbundenen Ligandenrückbindung an das Häm a_3 nach dem Laserblitz zu verfolgen und aus diesen beiden Methoden Aussagen über die Dynamik des Proteins, insbesondere des Reaktionszentrums zu machen. CO dient auf diese Weise als Sonde und ahmt die Bindung des O_2 an das binukleare Zentrum nach.

In Abbildung 1-10 sind mögliche Zustände nach der Photolyse im Protein schematisch dargestellt, die in Abbildung 1-11 zu einem Reaktionsschema abstrahiert werden. K_3 beschreibt den Transfer an die Cu_B Bindungsstelle; von dort aus kann der Ligand unterhalb 140 K nicht an das Häm zurückbinden, wie an der Rinderherz Oxidase gezeigt wurde [Alben et al. 1981]. Bei höheren Temperaturen ist dieser Zustand nur ein Zwischenschritt dazu, daß der Ligand das Protein verläßt und ins Lösungsmittel gelangt (K_1).

Abbildung 1-11 zeigt schematisch nach Einarsdóttir et al. (1993) die Photolyse, transiente Zustände und die Rückbindung von CO an die Oxidase: Nach Anregung des Häm-Eisen (II) mit einem Laser ($h\nu$) bricht die Bindung zum CO auf und es erfolgt eine Umlagerung (K_3) des Liganden vom Häm a_3 zum Cu_B (I). Von dort aus kann CO bei höheren Temperaturen ins Lösungsmittel gelangen (K_1). Danach erfolgt die Rückbindung des CO aus dem Lösungsmittel zurück zum Cu_B (I) und von dort zum Häm a_3 – Eisen (II). Die Geschwindigkeit der letzten beiden Schritte ist stark von der CO-Konzentration im Lösungsmittel abhängig. Die Reaktionsraten K ergeben sich als Resultierende aus dem thermodynamischen Gleichgewicht von „Hin- (k_-)“ und „Rückreaktion (k_+)“.

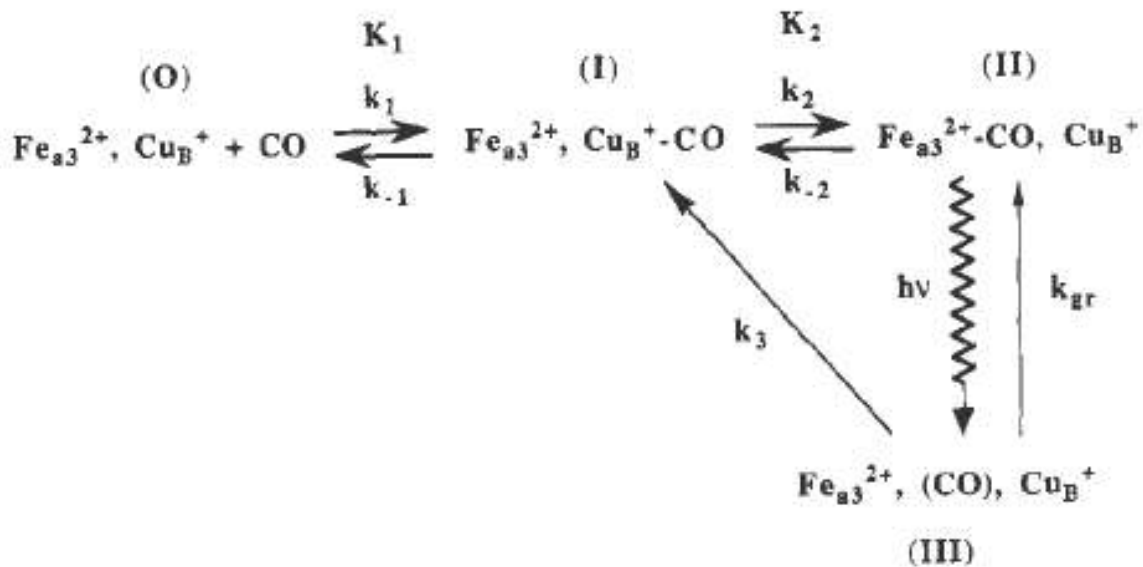


Abbildung 1-11: Reaktionsschema der CO-Photolyse nach Einarsdóttir et al. (1993).

Kinetische Experimente zur Bestimmung von K werden durch zeitabhängige Absorptionmessungen der CO Streck-Schwingung realisiert (siehe dazu Kap. 2.5).

Typische Absorptionen für CO im infraroten Spektralbereich ergeben sich für

- freies, gasförmiges CO bei $2143,3 \text{ cm}^{-1}$ [Handbook of Chemistry and Physics, 1996]
- in wässriger Lösung: $\sim 2140 \text{ cm}^{-1}$ (als breite Bande)
- am Häm-Zentrum gebunden: 1937 bis 1984 cm^{-1} [Ray et al. 1994]; die Verschiebung erfolgt hier zu kleineren Wellenzahlen hin, da die C=O Bindung geschwächt wird.

1.2.4 Ligandenrückbindung und Energiebarriere

Eine andere Darstellung für diese verschiedenen Zustände kann in Form einer Potentialbarriere in Abhängigkeit vom Reaktionszustand des Liganden gewählt werden. In Abbildung 1-12 ist ein solches Modell nach Steinbach et al. (1992) dargestellt. Es beinhaltet ein Dreizustandsmodell der Form

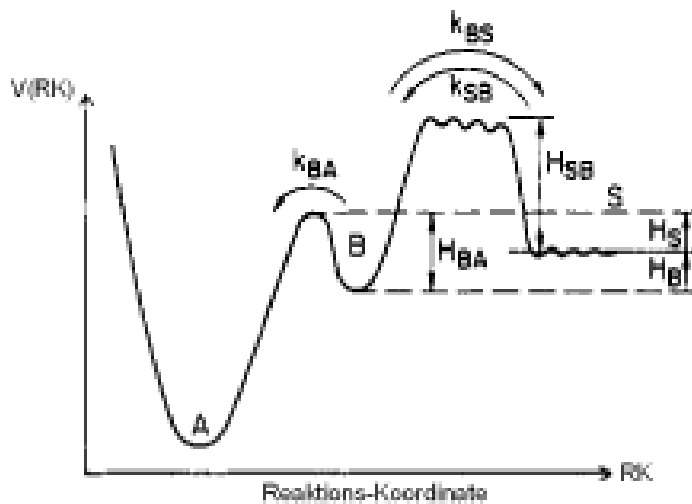
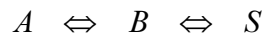


Abbildung 1-12: Reaktionsenergie in Abhängigkeit vom Reaktionszustand [Steinbach et al. 1992].

wobei A hier den Zustand bezeichnet, bei dem das CO an das Hämeisen gebunden ist. Im Zustand B befindet sich der Ligand am Cu_B und in S im Lösungsmittel. Die Zustände sind durch Energiebarrieren ΔH voneinander getrennt.

Unterhalb des Glasübergangs ist das Protein ausgefroren und der Ligand kann nicht ins Lösungsmittel gelangen; bezüglich der Reaktionszustände liegt dann ein vereinfachtes Zweizustands-System vor.

1.2.5 Kinetik und Ratenverteilung

In Kapitel 1.2.2 wurde bereits angesprochen, daß für die Konformation von Proteinen kein globales Energieminimum existiert, sondern daß diesbzgl. mehrere Subzustände äquivalenter Energie vorkommen. Dies hat zur Folge, daß die Aktivierungsenergie eines bestimmten Prozesses für jeden dieser Subzustände geringfügig anders ist [Beece et al. 1980]. Somit zeigen auch die Geschwindigkeitskonstanten von beteiligten Reaktionen eine Verteilung. Als Beispiel für eine solche Verteilung von Kinetiken sind in Abbildung 1-13 CO Blitzlicht-Photolyse-Experimente am Pottwal-Myoglobin dargestellt [siehe Haustein 2000].

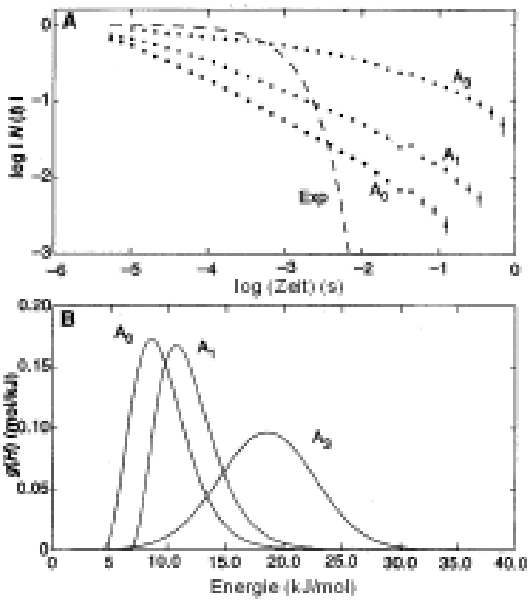


Abbildung 1-13: allgemeine Form von Rückbindungskinetiken (Myoglobin, 120K), nach Haustein (2000)

Die A-(Sub-)Zustände zeigen nicht nur unterschiedliche Spektrallinien, sie weisen auch unterschiedliche Rückbindungs-Kinetiken auf. Wie zu sehen, ist der Verlauf jedoch im allgemeinen deutlich nicht-exponentiell.

In der unteren Graphik sind die zugehörigen (temperaturunabhängigen) Verteilungen der Barrierenhöhen dargestellt. Diese beschreiben die unterschiedlichen Energiebarrieren für die Ligandenrückbindung der Konformere (vgl. Abb. 1-12). Man erhält sie durch globale mathematische Anpassung aus den Rückbindungskinetiken in Abhängigkeit von der Temperatur über

$$N(t) = \int g(H_{BA}) \cdot e^{-k(H_{BA})t} dH_{BA} \quad \text{Gln. 1.2}$$

wobei die Reaktionsrate k_{BA} gegeben ist durch

$$k_{BA} = A_{BA} \cdot \frac{T}{T_0} \cdot e^{-\frac{H_{BA}}{RT}} \quad \text{Gln. 1.3}$$

Für die Bezugstemperatur T_0 wird 100 K gewählt [Johnson et al. 1996].

In der Eyringtheorie der chemischen Reaktionen [Atkins 1988] steht der präexponentielle Faktor A_{BA} der Arrheniusgleichung in folgendem Zusammenhang:

$$A_{BA} = \frac{k_B T}{h} \exp(S/R) = \frac{k_B T}{h} N_{BA} / N_B \quad \text{Gln. 1.4}$$

mit der Boltzmannkonstante k_B , der Planckkonstante h , der Besetzungszahl des B-Zustandes N_B und der Besetzungszahl des Übergangszustandes N_{BA} [Gerthsen 1993]. Der Term $k_B T/h$ repräsentiert dabei die Stoßfrequenz und der Term $\exp(S/R)$ die Aktivierungsentropie der Reaktion.

1.3 Photoinduzierte Reduktion an Cytochrom *c* Oxidasen

Eine weitere Möglichkeit - neben CO Photolyse - experimentell das Verhalten des Proteins nach Auslösung einer Reaktion spektroskopisch zu verfolgen, stellt der Einsatz von photoaktivierbaren Reaktanden dar, oft auch als „caged compounds“ bezeichnet. Diese „gebundenen“ Substanzen werden durch einen Lichtblitz freigesetzt und veranlassen daraufhin das Enzym, dem mit diesen Komponenten gekoppelten Prozess nachzugehen. Neben beispielsweise ‚caged oxygen‘ oder ‚caged proton‘, mit denen man O₂- oder pH-Sprünge induzieren kann, gibt es das sogenannte ‚caged electron‘, mit dem man redoxgekoppelte Vorgänge auslösen kann.

Zur Reduktion von Oxidasen wurden neben Riboflavin-Derivaten [Ahmad et al. 1982] auch schon Rutheniumverbindungen [Nilsson 1992; Zaslavsky et al. 1993] verwendet.

In dieser Arbeit wurde Tris(2,2'-Bipyridin)-ruthenium(II)-chlorid verwendet, das bei Lichtanregung sein Mittelpunktspotential verändert und dadurch als Elektronendonator wirkt. Der Komplex bindet kovalent an die Cytochrom *c* Bindestelle des Proteins, wenn es direkt in die Proteinlösung gegeben wird, was die Handhabung sehr vereinfacht.

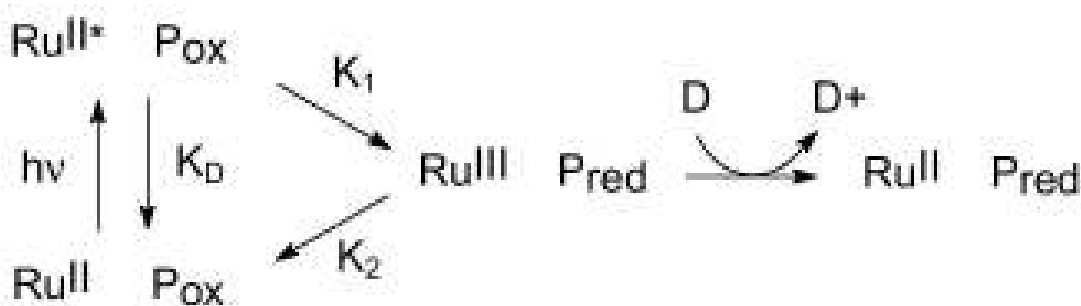


Abbildung 1-14: Reaktionsschema von Ruthenium-Komplexen (Abbildung nach [Ruitenberg 2001]).

In Abbildung 1-14 ist das Prinzip der Photoreduktion schematisch dargestellt. Der kovalent gebundene Rutheniumkomplex wird durch einen Laserblitz angeregt und wird dadurch zum Reduktionsmittel. Nach Abgabe des Elektrons an ein oxidiertes Enzym (P_{ox}) und Rückkehr in den Grundzustand (k_1) wird die Rückreaktion (k_2) durch einen zugesetzten Quencher (D) verhindert, der den Rutheniumkomplex wieder reduziert. Als Quencher dient in diesem Fall EDTA, das als Elektronendonator für den oxidierten Metallkomplex dient.

Im UV/VIS – Spektrum zeigt der Rutheniumkomplex Absorptionsbanden bei ca. 290 nm und eine verbreiterte Linie bei 450 nm [Roundhill 1994]. In diesem Bereich wird die Reaktion angeregt.

2. Material und Methoden

2.1 Meßmethoden

Absorptionsspektren

Beschrieben durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beträgt die Intensität einer gemessenen Strahlung durch die Probe

$$I(x) = I_0 10^{-\varepsilon x c} \quad \text{Gln. 2.1}$$

wobei I_0 die eingestrahelte Intensität, $I(x)$ die Intensität nach dem Weg x durch die Probe und c die Konzentration der Probe mit dem Extinktionskoeffizient ε bedeutet. Für die Absorption A ergibt sich hieraus bei einer bestimmten Wellenlänge

$$A = -\log \frac{I(x)}{I_0} = \varepsilon x c \quad \text{Gln. 2.2}$$

Mißt man die Extinktion einer Probe in Abhängigkeit von der Frequenz des eingestrahelten Lichtes, so erhält man ein Absorptionsspektrum.

2.1.1 Messungen im sichtbaren Spektralbereich (VIS)

Mit der Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich mißt man elektronische Übergänge von Molekülen im Bereich von ca. 400 – 900 nm. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit der Oxidations- bzw. Reduktionszustand des präparierten Enzyms kontrolliert. Das verwendete Diodenarray-Spektrometer wurde von Oliver Klein in der Arbeitsgruppe aufgebaut [Klein 1999] und weist eine spektrale Auflösung von 0,8 nm auf.

2.1.2 Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FT-IR)

In der Infrarot-Spektroskopie mißt man Rotations- bzw. Schwingungsübergänge in Molekülen (vor allem im mittleren IR-Bereich von 2,5 – 40 μm). Voraussetzung für eine Absorption ist dabei die Änderung des Dipolmomentes mit der Kernbewegung.

Ein Fourierspektrometer enthält als „Herzstück“ ein (Michelson-) Interferometer, wie in Abb. 2-1a) dargestellt. Die von einer breitbandigen Infrarotquelle (Globar, Nernst-Stift) abgegebene Strahlung wird durch einen Spiegel kollimiert und trifft auf einen halbdurchlässigen Strahlteiler. Von den Teilstrahlen trifft einer auf einen ortsfesten, der andere auf einen beweglichen Spiegel. Nach der Reflexion und erneutem Durchgang durch den Strahlteiler interferieren diese beiden Teilstrahlen. Dieser Strahl fällt nun durch die Probe auf den Detektor, wo die transmittierte Intensität in Abhängigkeit von der Spiegelposition des

beweglichen Spiegels gemessen wird. Für $\Delta x = 0$ erhält man maximale Intensität (konstruktive Interferenz für alle Wellenlängen). Dieser Ort wird als Weißlichtposition bezeichnet. Aus der Intensität in Abhängigkeit vom Spiegelweg $I(x)$ erhält man ein sogenanntes Interferogramm (Abb. 2-1b), aus dem man durch Fouriertransformation das Spektrum $I(\nu)$ berechnen kann (Abb. 2-1c) [Günzler und Heise 1996]. In Abb. 2-1 sind die prinzipiellen Einheiten eines FT-IR-Spektrometers dargestellt.

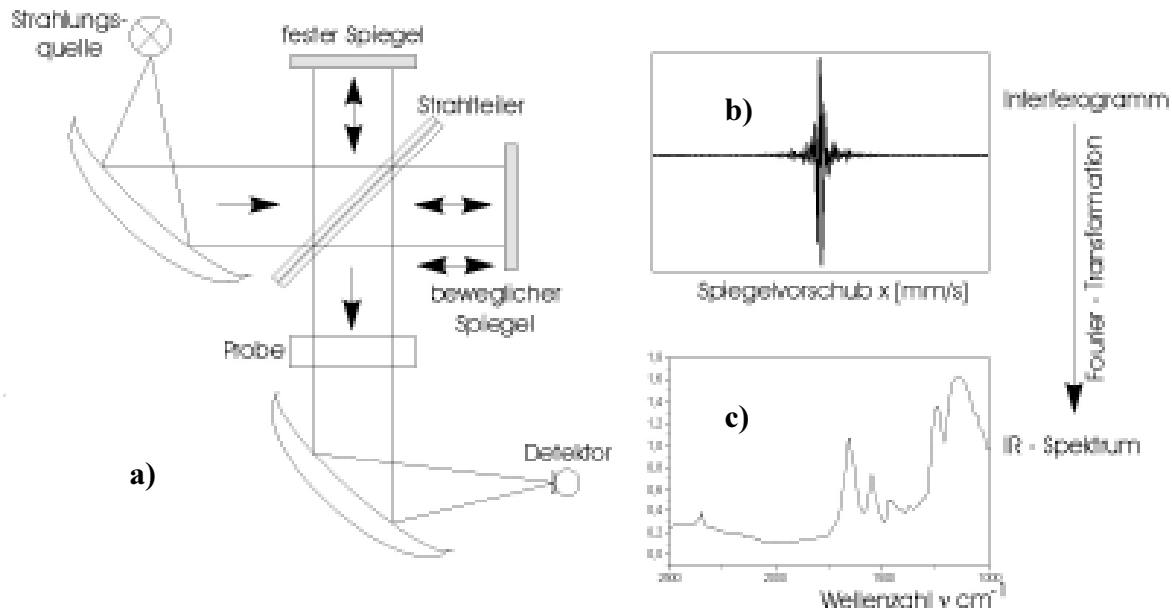


Abbildung 2-1: Schema zur Entstehung eines IR - Spektrums:

- a) Spektrometer zur Erzeugung von Interferenzen (Quelle; Michelson-Interferometer: Strahlteiler, beweglicher und fester Spiegel; Probe; Detektor)
- b) Erfassung des Interferogramms
- c) Berechnen des IR-Spektrums aus dem Interferogramm durch Fouriertransformation

Mathematische Grundlagen zur Fouriertransformation

[vgl. Skript zur Vorlesung; Engel 1998; Haustein 2000]

Betrachtet wird eine ebene elektromagnetische Welle mit der Frequenz ν und der Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1/\lambda$. Für deren Amplitude am Ort x zur Zeit t gilt:

$$A(x, \tilde{\nu}) = A_0 \cdot e^{i(kx - \omega t)} = A_0 \cdot e^{2\pi i(\tilde{\nu}x - \nu t)} \quad \text{Gln. 2.3}$$

Im Michelsoninterferometer interferieren die beiden Teilstrahlen

$$A_1(x, \tilde{\nu}) = A_0 \cdot e^{2\pi i(\tilde{\nu}x - \nu t)}, \quad A_2(x, \tilde{\nu}) = A_0 \cdot e^{2\pi i(\tilde{\nu}(x + \Delta x) - \nu t)} \quad \text{Gln. 2.4}$$

und überlagern sich nach Verschiebung des Spiegels aus der Nulllage um $\Delta x/2$ zu

$$A_{ges} = A_1(x, \tilde{\nu}) + A_2(x, \tilde{\nu}) = A_0 \cdot e^{-2\pi i \nu t} \cdot e^{2\pi i \tilde{\nu} x} \cdot (1 + e^{i \tilde{\nu} \Delta x}) \quad \text{Gln. 2.5}$$

Für die Intensität ergibt sich daraus

$$I(\Delta x, \tilde{\nu}) = |A_{ges}(\Delta x, \tilde{\nu})|^2 = 2 \cdot A_0^2 \cdot (1 + \cos(\tilde{\nu}\Delta x)) \quad \text{Gln. 2.6}$$

Unter Berücksichtigung der von der Lichtquelle nach der Absorption durch die Probe transmittierten Intensität $S(\tilde{\nu})$ erhält man für die gemessene Gesamtintensität, nachdem man für polychromatisches Licht über alle Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ integriert:

$$I(\Delta x) = \int_0^{\infty} I(\Delta x, \tilde{\nu}) \cdot S(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad \text{Gln. 2.7}$$

$$I(\Delta x) = 2 \cdot \underbrace{\int_0^{\infty} A_0^2 \cdot S(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}_{\frac{1}{4}I(0)} + 2 \cdot A_0^2 \cdot \underbrace{\int_0^{\infty} \cos(2\pi\nu\Delta x) \cdot S(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}_{FT \text{ des Spektrums}} \quad \text{Gln. 2.8}$$

Der linke Term repräsentiert die Weißlichtposition, d. h., wenn die Teilwellenzüge keinen Gangunterschied haben, der rechte Term stellt ein Fourierintegral dar. Das Spektrum kann somit durch Fourier-Rücktransformation erhalten werden,

$$S(\tilde{\nu}) = const \cdot \int_0^{\infty} [2I(\Delta x) - I(0)] \cdot \cos(2\pi\tilde{\nu}\Delta x) d(\Delta x) \quad \text{Gln. 2.9}$$

In der Praxis kann der obere Grenzwert des Integrals nicht gemessen werden. Dadurch wird die Auflösung des Systems begrenzt. Man definiert als die maximale Auflösung, wenn zwei Linien, die um $\delta\tilde{\nu}$ auseinander liegen, noch getrennt werden können, wenn sie die Bedingung

$$\delta\tilde{\nu} \geq \frac{1}{2 \cdot \Delta x_{\max}} \quad \text{Gln. 2.10}$$

erfüllen, wobei Δx_{\max} die maximale Spiegelauslenkung bedeutet.

Über geeignete Apodisierungsfunktionen („Abschneidefunktionen“) versucht man, die Fehler, die durch die endlichen oberen Integralgrenzen entstehen, möglichst gut zu korrigieren; des weiteren läßt sich vor der Fouriertransformation das Interferogramm mathematisch verlängern (zero filling), was eine Verbesserung der Auflösung ergibt.

Die FT-IR – Methode hat entschiedene Vorteile gegenüber dispersiven Geräten:

- Alle Frequenzen der breitbandigen Quelle werden gleichzeitig gemessen (Multiplex-Vorteil \Rightarrow „ Fellgett’s Vorteil“) = Zeitvorteil; das Signal/Rausch-Verhältnis ist wesentlich besser im Vergleich zu dispersiven Geräten, da durch den Zeitvorteil mehrere Interferogramme gemittelt werden können.

- Die Intensitätsausnutzung ist effektiver, da es keine den Strahl begrenzenden Elemente (Spalte) gibt (\Rightarrow „Jacquinot’s Vorteil“); die Auflösung ist nicht von der Spaltbreite, sondern nur von der durchlaufenen Wegstrecke des Spiegels abhängig.
- genaue Frequenzzuordnung, da die Position des beweglichen Spiegels im Michelson-Interferometer über einen Referenzlaser (in der Regel ein He-Ne-Laser, $\lambda=632,8$ nm) bestimmt wird (\Rightarrow „Connes’ Vorteil“).

2.2 Zeitaufgelöste FT-IR Spektroskopie

Da viele chemische und biologische Prozesse sehr schnell ablaufen, wurden verschiedene Optionen entwickelt, um die Meßzeit für Spektren zu reduzieren. Neben schnellen Fourier-Transformations-Algorithmen (**F**ast-**F**ourier-**T**ransform) sowie der ‚Transformation nach dem Messen‘ wurden auch neue Techniken entwickelt, die es erlauben, bis in den ms-, im speziellen sogar bis in den ns-Bereich zu messen [Uhmann et al. 1991; Rödiger et al. 1994]. Gängige Standardmethoden werden hier kurz vorgestellt [Siebert 1995].

2.2.1 Rapid - Scan Technik

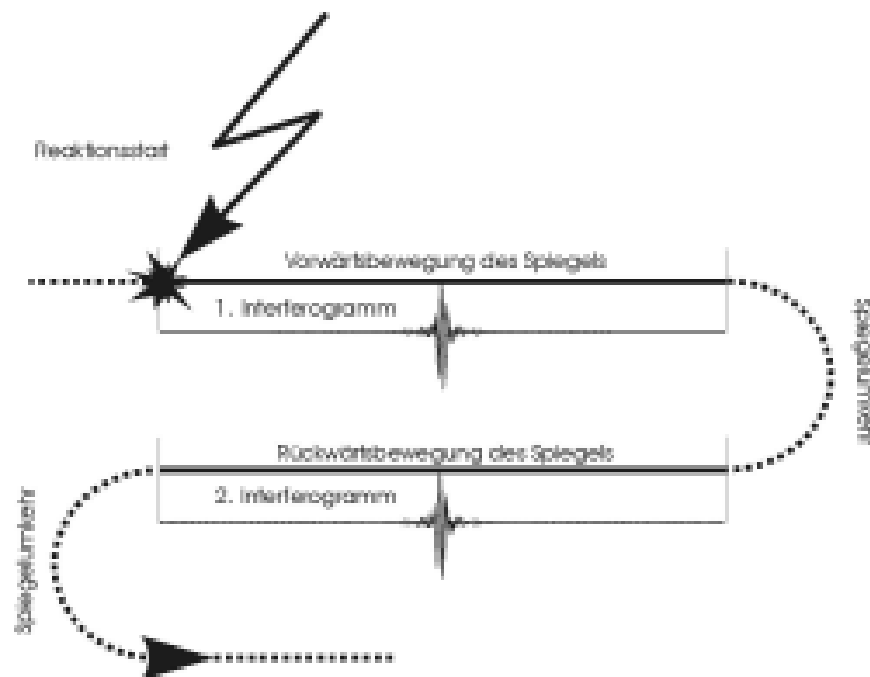


Abbildung 2-2: Meßprinzip bei der Rapid-Scan-Technik: nach Initiierung der Reaktion werden jeweils bei der Vor- und Rückwärtsbewegung des Spiegels Daten aufgenommen [Abbildung nach Rost 1999].

Bei dieser Technik erfolgt die Datenaufnahme des Interferogramms sowohl bei der Vor- als auch bei der Rückwärtsbewegung des Spiegels. Aufgrund der Symmetrie des Interferogramms erhält man bereits aus einem halben Interferogramm ein Spektrum; Über diese Aufspaltung läßt sich die Zeitauflösung noch einmal verdoppeln. Dabei ließ sich mit der in dieser Arbeit verwendeten spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} eine Zeitauflösung von 25 ms erzielen. Wählt man eine geringere Auflösung (4 cm^{-1} oder schlechter) so hat die daraus resultierende Verkürzung des Spiegelweges eine nochmalige Erhöhung der Zeitauflösung zur Folge. In Abb. 2-2 ist das Meßprinzip schematisch dargestellt. Die limitierenden Faktoren dieser Technik sind die Geschwindigkeit des bewegten Spiegels, da an dessen Umkehrpunkten hohe Beschleunigungen und Instabilitäten auftreten, sowie die Datenaufnahme und -digitalisierung.

2.2.2 Step-Scan Technik

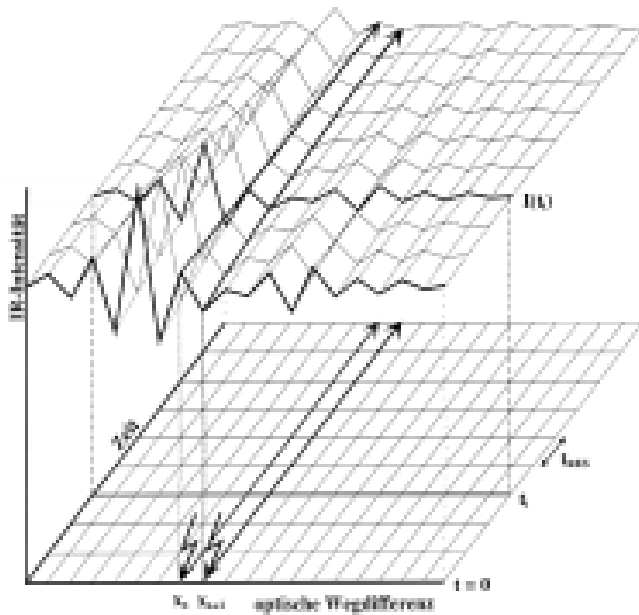


Abbildung 2-3: Prinzip einer Step-Scan Messung [Rammelsberg et al. 1997]. Voraussetzung ist die Reversibilität des untersuchten Reaktions-Mechanismus.

Für noch höhere Zeitaufösungen im μs oder ns – Bereich wurde die Step-Scan-Technik entwickelt. Hier wird der bewegliche Spiegel an den einzelnen Interferogrammpunkten x_n angehalten (siehe Abb. 2-3), die Reaktion initiiert und die Zeitabhängigkeit des IR-Signals an dieser Interferogrammposition gemessen. Die Zeitauflösung wird nur durch den Detektor limitiert. Nach der Relaxierung des Systems geht der Scanner zur nächsten Position x_{n+1} ; hier wird die Reaktion erneut gestartet. Nach Messung der Zeitabhängigkeit aller Interfero-

grammpunkte werden die verschiedenen Datenpunkte entsprechend der Zeit nach der Reaktion so umgeordnet, daß für jede definierte Zeiteinheit ein komplettes Interferogramm $I(t_i)$ entsteht; dies wird dann in ein zeitabhängiges Spektrum Fourier-transformiert [Siebert 1995].

2.3 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Elektromagnetische Strahlung kann mit den Schwingungen der Atome koppeln, falls sich deren elektrisches Dipolmoment mit der Kernbewegung ändert. Bei Biomolekülen sind im mittleren Infrarot-Bereich die Übergänge zwischen den Schwingungsniveaus zu beobachten. In der sogenannten „Fingerprint-Region“ von $800 - 2200 \text{ cm}^{-1}$ sind für jedes Molekül typische Absorptionen zu sehen.

2.3.1 H_2O und D_2O als Lösungsmittel

Da Proteine vor allem in wässriger Lösung vorliegen, ergibt sich hieraus die Schwierigkeit, daß H_2O gerade in dieser Region aufgrund seiner $\delta\text{O-H}$ Schwingung bei 1645 cm^{-1} stark absorbiert. Eine Möglichkeit besteht nun darin, H_2O gegen D_2O auszutauschen; dies verschiebt die Bande von 1645 nach 1215 cm^{-1} ($\delta\text{O-D}$ -Schwingung). Dadurch erhält man nun ein „spektroskopisches Fenster“ bis ca. 1250 cm^{-1} , wie die Gegenüberstellung in Abb. 2-4 zeigt. Der Isotopenaustausch kann jedoch auch Auswirkungen auf die Beiträge des Proteins selbst haben (vgl. nächstes Kapitel). Um dies zu vermeiden, werden generell sehr dünne Schichtdicken (bis $10 \mu\text{m}$), konzentrierte, oder dehydrierte Proben verwendet.

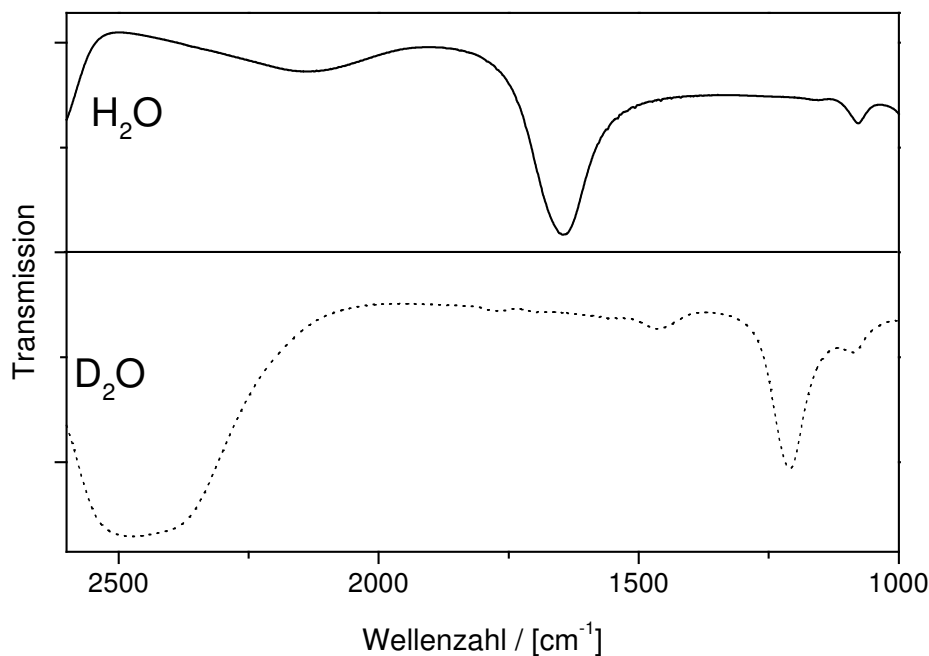


Abbildung 2-4: Transmissionsspektren von H_2O und D_2O (optische Weglänge: $10 \mu\text{m}$). Deutlich zu sehen ist das „spektroskopische Fenster“ bis ca. 1250 cm^{-1} , das sich nach Isotopenaustausch im Fingerprint-Bereich ergibt.

2.3.2 Absorptionsbanden von Proteinen

Generell gestaltet sich eine Bandenzuordnung bei Proteinen als schwierig: es handelt sich um komplexe Systeme, in denen Absorptionen von Molekülketten stark von der Umgebung und den Wechselwirkungen mit den nächsten Nachbarn abhängen (gekoppelte Schwingungen). Genauere Zuordnungen lassen sich nur mit Hilfe von Vergleichsmessungen (Resonanz-Raman Daten), Modellsystemen oder Modellrechnungen treffen. Mit Isotopen markierte Seitenketten oder ortsgerichtete Mutationen sind aufwendiger, erlauben jedoch konkrete Aussagen über das untersuchte Enzymsystem. In dieser Arbeit wurden viele Zuordnungen im Vergleich zu elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen gemacht, die von allen hier vermessenen Systemen vorlagen (vgl. auch Kap. 3.1.3 und [Hellwig et al. 1998 – 2002]).

Peptidrückgrat

Die Absorptionen, die durch diese Protein-Strukturelemente hervorgerufen werden, entstehen durch Kopplungen der Schwingungen, an die die einzelnen Aminosäure-Seitenketten gebunden sind. Die damit korrelierten Sekundärstrukturmerkmale sind α -Helices, β -Faltblätter, Schleifen und Zufallsknäuel.

Neben den Normalmoden der N-H Streck-schwingung bei ca. 3300 cm^{-1} tritt als wichtigster Übergang die sogenannte **Amid I** – Mode auf, deren Absorption bei $1610\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ liegt. Dieser Schwingungstyp besteht aus der Überlagerung von C=O, C-N Streck- und N-H Deformationsschwingungen, die in Abb. 2-5 hervorgehoben sind. Berechnungen über Normalkoordinatenanalyse ergeben, daß die potentielle Energie dieser Mode von ca. 80% C=O und ca. 10% C-N Streck- und N-H Deformationsschwingung bestimmt wird [Arrondo et al. 1993]. Die damit korrelierten Absorptionsbereiche sind in Abb. 2-6 zusammengestellt; die Extinktionskoeffizienten sind jedoch nicht genau bekannt und variieren zudem stark von Struktur zu Struktur.

Die Kopplung der C-N Streck- und N-H Biegeschwingung bei $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ wird **Amid II** – Bereich genannt; dessen Lage ist weitgehend von der Sekundärstruktur unabhängig. Diese Region umfaßt nach Berechnungen über Normalkoordinatenanalyse 40-60% N-H Deformations- und 18-40% C-N Streck-Schwingungen [Arrondo et al. 1993]. Die

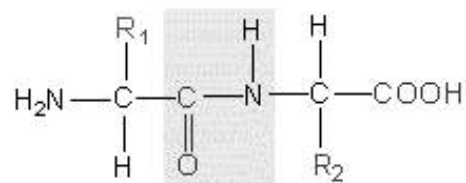


Abbildung 2-5: Die Bindungen des Peptid-Rückgrates bilden gekoppelte Schwingungen aus; hier markiert: Amid I Kopplungen; R_x entspricht einer von 22 Aminosäuren-Seitengruppen

angegebene prozentuale Verteilung entspricht dem berechneten Anteil an potentieller Energie.

Diese Schwingungsfrequenzen sind stark von der Anwesenheit von Wasserstoff-Brückenbindungen beeinflusst. So wird im Falle der Amid II Bande bei Deuterierung die Kopplung der N-H Biege- und C-N Streck-Schwingung aufgehoben, was eine starke Verschiebung der Absorptionslinie zur Folge hat. Die C-N Streck-Schwingung verschiebt sich in den Wellenzahlenbereich von 1490 bis 1460 cm^{-1} und die N-D Biegeschwingung in den Bereich unter 1100 cm^{-1} . Die Empfindlichkeit der Amid I Bande gegenüber H/D Austausch ist jedoch gering (die Verschiebung beträgt bis 12 cm^{-1}); (vgl. auch Abb. 2-6).

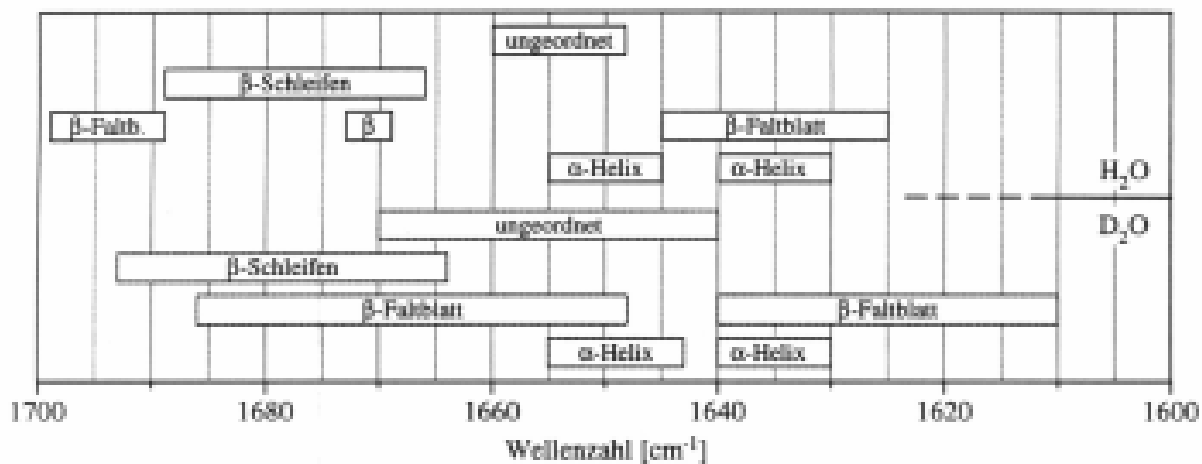


Abbildung 2-6: Übersicht der Amid I Schwingungen unterschiedlicher Sekundärstrukturmerkmale in H₂O (oben) und deren Verschiebungen in D₂O (unten); [Baymann 1995].

Aminosäureseitenketten

Eine qualitative Zusammenstellung der Beiträge einzelner Aminosäuren, welche im mittleren IR absorbieren, ist in Abbildung 2-7 gezeigt: Je nach Umgebung der einzelnen Seitenkette (Überlappung mit Moden anderer Gruppen im Protein), Stärke der Wasserstoffbrückenbindung (verursacht eine Verschiebung der Wellenzahl bei H₂O/D₂O-Austausch), in Lösung oder kristallisiert, protoniert oder geladen, etc. variieren die angegebenen Werte sowohl in ihrer Frequenz als auch in ihrer Extinktion. Für in der Literatur angegebene quantitative Übersichten siehe [Baymann 1995; Hellwig 1998; Barth 2001].

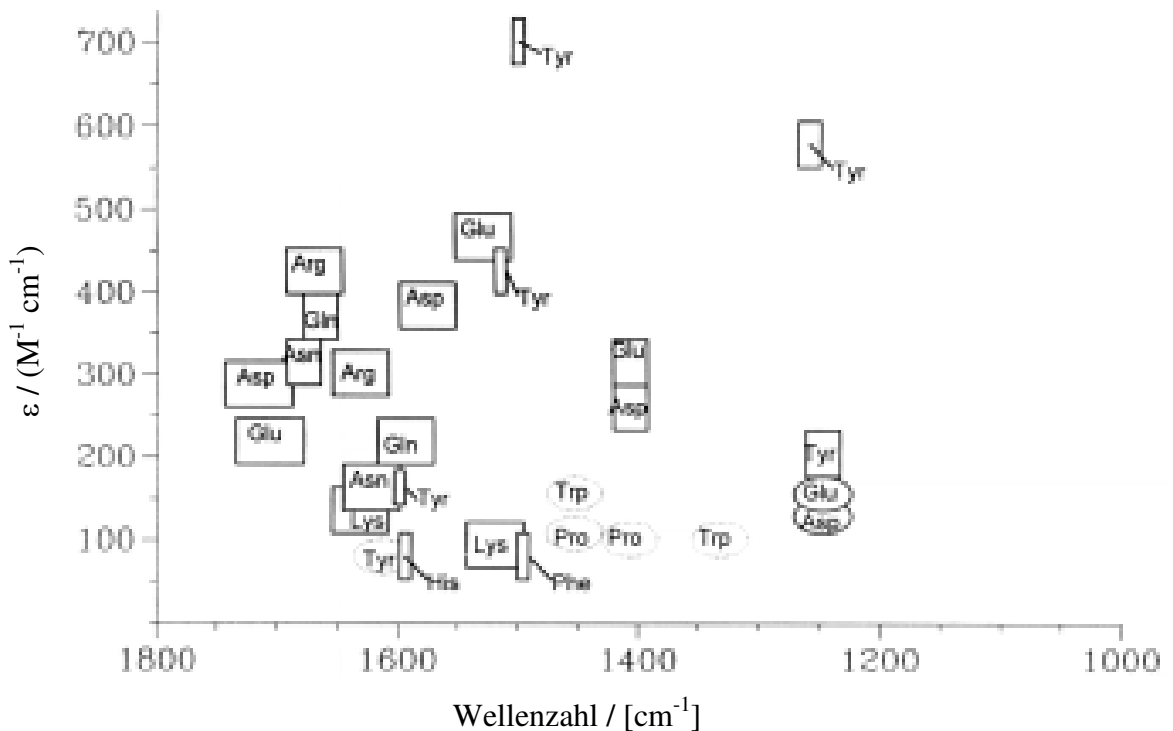


Abbildung 2-7: Absorptionsbanden der Aminosäuresideketten in H_2O ; die Breite der Kästchen veranschaulicht die Halbwertsbreite der Banden; Kreise: Halbwertsbreite nicht bekannt; gestrichelt: Extinktionskoeffizient nicht bekannt [Abbildung aus Baymann 1995].

Schwingungen der Hämgruppe

Die Lage und Intensität der Schwingungsbanden des Porphyringerüsts (siehe Abbildung 2-8 und Tabelle 2-1) sind abhängig vom Oxidations- und Spinzustand des Zentral-Eisens. Zusätzlich beeinflussen noch die Umgebung, in die es eingebettet ist, und die jeweiligen Substituenten die Lage und Intensität (vgl. Häm *a-b-o*-Übersicht Kap. 1.1.1).

Inzwischen gibt es zahlreiche Zuordnungen von Absorptionsbanden, sowohl über Resonanz-Raman- als auch über IR-Spektroskopie. So findet man in der Literatur für Häme des Typs *a* in Proteinen Angaben bei [Heibel et al. 1993; Park et al. 1996; Hellwig et al. 1998-2002]; für Häm *b* an Modell-Systemen bei [Spiro et al. 1979; Choi et al. 1982; Berthomieu et al. 1992]; die jeweiligen Werte stimmen mit geringen Abweichungen miteinander überein.

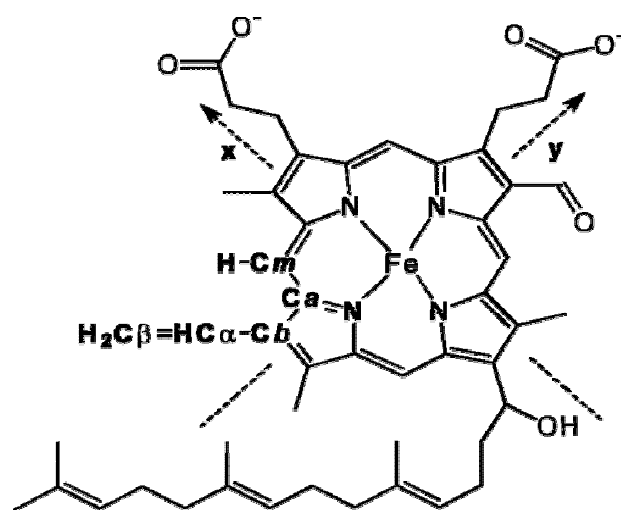


Abbildung 2-8: Struktur des Porphyringerüsts (Häm a) mit Vinylsubstituenten. Angegeben ist die entsprechende Nomenklatur der Schwingungen nach Ogoshi et al. (1972), Choi et al. (1982) und Heibel et al. (1993) [aus Hellwig et al. 1998].

Je nach ihrer Kopplung mit anderen Schwingungen des Hämgerüsts (vgl. Abb. 2-8) wurde in der Literatur für die verschiedenen Absorptionsbanden eine Nomenklatur eingeführt, die in Tabelle 2-1 entsprechend angegeben ist.

Haupt-schwingung	gekoppelte Schwingung	Nomenklatur	typischer Spektralbereich der Absorption (cm ⁻¹)
$\nu(\text{CaCm})$	$\delta(\text{CaCmH}), \delta(\text{CmX})$	ν_{37}	1560-1625
$\nu(\text{CbCb})$	$\nu(\text{CaCm}), \nu(\text{NCa}), \nu(\text{CbX}), \delta(\text{CbX})$	ν_{38}	1535-1570
$\nu(\text{CaCm})^{\text{sym}}$	$\nu(\text{NCa}), \nu(\text{CbCb}), \nu(\text{CaCm})$	ν_{39}	1450-1490
$\nu(\text{CaCb})$	$\delta(\text{CbX}), \nu(\text{NCa}), \delta(\text{CaCbCb})$	ν_{40}	1435-1450
$\nu(\text{CaN})$	$\nu(\text{CaCb}), \delta(\text{CbX}), \delta(\text{CaCbCb})$	ν_{41}	1360-1395
$\delta(\text{CmH})$	$\delta(\text{CbX}), \nu(\text{CaN}), \nu(\text{CaCb})$	δ_{42}	1220-1270

Tabelle 2-1: Überblick über IR Absorptionsbanden des Porphyringrundgerüsts [nach Choi et al. 1982; Berthomieu et al. 1992; Hellwig 1998]; Nomenklatur vgl. Abb. 2-8; X: Substituent des Porphyringerüsts; ν : Streckschwingung; δ : Deformationsschwingung

Je nach Häm-Typ können neben Propionat-Seitenketten auch mögliche Schwingungs-Moden den entsprechenden Vinyl- und Formyl- Seitenketten zugeordnet werden. Aufgrund der starken Wechselwirkung der Seitenketten mit der Umgebung weichen Daten von Modell-

systemen zum Teil erheblich von gemessenen Werten ab. Die Diskussion der möglichen Bandenpositionen wird deshalb in Kap. 3.1.3 für den jeweiligen Fall ausführlich behandelt.

Verschiebung von Absorptionsbanden aufgrund Isotopenmarkierung

Da die Schwingungsfrequenz von der Masse der Kerne abhängt, erhält man eine Verschiebung der Schwingungsfrequenzen (Isotopeneffekt), falls bestimmte Atome gegen ihre Isotope ausgetauscht werden (z. B. ^{13}C anstatt ^{12}C).

Isotopenverschiebungen

Betrachtet man beispielsweise das CO-Molekül als eindimensionalen harmonischen Oszillator, so ergibt sich nach Übergang ins Schwerpunktsystem der beiden schwingenden Massenpunkte m_1 und m_2 und Einführung der reduzierten Masse μ als Lösung der Schwingungsgleichung die Frequenz ν der Schwingung (mit k als der Kraftkonstanten der Bindung) zu

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{mit} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad \text{Gln. 2.11}$$

[Gerthsen 1993].

Variiert man die Masse eines der schwingenden Teilchen, so erhält man:

$$\nu_1 \cdot \sqrt{\mu_1} = \nu_2 \cdot \sqrt{\mu_2} \quad \text{Gln. 2.12}$$

Aus diesen Abschätzungen für die Frequenzverschiebungen kann man beispielsweise über ^{13}C -Isotopenmarkierung an definierten Stellen im Protein oder am Liganden (^{13}CO) exakte Banden-Identifizierung machen. Die Verschiebungen diesbzgl. führen zu einer Erniedrigung der Schwingungsfrequenz um den Faktor 0,9777 und liegen je nach ursprünglicher Wellenzahl zwischen 30 und 45 cm^{-1} (für 1300 bzw. 2000 cm^{-1}).

2.4 Proteinpräparation

2.4.1 Proteinreinigung

- *Paracoccus denitrificans* Bakterien wurden im Arbeitskreis von Prof. B. Ludwig am Institut für Biochemie, Universität Frankfurt/M. nach [Gerhus et al. 1990] angezogen. Die Aufreinigung der *aa₃* Cytochrom *c* Oxidase erfolgte mitunter auch im Arbeitskreis von Prof. H. Michel am Max Planck Institut für Biophysik, Frankfurt/M. mit Hilfe eines Antikörper F_V-Fragments wie beschrieben in [Kleymann et al. 1995].
- *Thermus thermophilus ba₃* und *caa₃* Oxidase wurden im Arbeitskreis von Dr. Tewfik Soulimane (Paul Scherrer Institut, Life Sciences, Villingen, Schweiz) isoliert, vorbereitet und zur Verfügung gestellt. Angaben hierüber finden sich für
 - die *ba₃* Cytochrom *c* Oxidase in [Soulimane et al. 2002]; entsprechend
 - die *caa₃* Oxidase nach [Schell 2000].
- Oxidase aus *Escherichia coli* vom *bd* Typ wurde vom Arbeitskreis Prof. Tatsushi Mogi (Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um isoliertes, nicht membrangebundenes Enzym.
- Ortsgerichtete Mutanten* der Oxidase von *Paracoccus denitrificans* wurden freundlicherweise von den folgenden angegebenen Personen aus den Arbeitsgruppen B. Ludwig und H. Michel bereit gestellt. Für Details zur Aufreinigung und Herstellung sei auf entsprechende Stelle verwiesen:
 - (Aspartat) **D399N** (Asparagin), **D399E** (Glutamat) und **D399L** (Leucin) nach [Pfitzner et al. 1998, 2000]
 - (Arginin) **R473K** (Lysin) und (Histidin) **H403A** (Alanin) nach [Behr et al. 2000]
- ¹³C Isotopenmarkierung der Häm-Propionate an der *P. denitrificans* Oxidase wurde von J. Behr, Arbeitsgruppe H. Michel, MPI für Biophysik, Frankfurt/M. bereitgestellt [Behr et al. 1998].

2.4.2 Vorbereitung der Proben für die Messung / Probenpräparation

Umpuffern und pH-Wert-Einstellung

Um die verschiedenen Oxidasetypen untereinander vergleichen zu können, müssen äquivalente Bedingungen gewährleistet sein. So wurden ca. 3-5 µl der Enzymlösung jeweils

* siehe auch Glossar: *ortsgerichtete Mutation*

vor der Messung in 200 mM Kalium-Phosphat-Puffer (K_2HPO_4 / KH_2PO_4) mit dem gewünschten pH-Wert 6, 7 oder 8 „umgepuffert“. *In praxi* wurde das Protein dafür drei mal in je 400 μ l Puffer gelöst und über Microcon Ultrafiltrations-Zellen (Mikro-Konzentrationszellen, Fa. Amicon) aufkonzentriert.

Für die Proteine aus *T. thermophilus* wurde der Puffer mit 1,6 mM n-decyl- β -D-Maltopyranosid als Detergenz versetzt, für die anderen Oxidasen (*aa₃* und *bd* sowie Mutanten) betrug die Konzentration 3,2 mM n-decyl- β -D-Maltopyranosid.

Das Endvolumen der Enzymlösung (vor Weiterbehandlung) betrug ca. 5 μ l, die Endkonzentration ca. 0,5 mM.

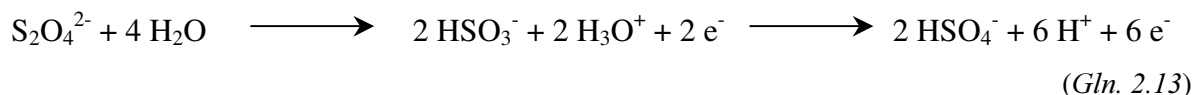
Der in der Diskussion angegebene pH-Wert wurde über den verwendeten Puffer definiert. Der tatsächliche pH-Wert des Enzyms kann aufgrund seiner Eigenpufferung und der weiteren Präparation (s. u.) geringfügig davon abweichen, ist aber aufgrund des geringen Proben- und Meßzellenvolumens technisch nicht meßbar.

H₂O / D₂O Austausch (Deuterierung)

Der H/D Austausch erfolgte analog zum Pufferwechsel in H₂O. Der pD – Wert des dazu angesetzten D₂O-Kalium-Phosphat-Puffers betrug pD = 7,4; damit ist es möglich, die Auswirkungen der Deuterierung auf das Enzym mit pH = 7 gemäß pD = pH + 0.4 [Glasoe und Long 1960] zu vergleichen. Zusätzlich wurde die Probe für CO-Photolyse-Experimente nach Reduktion mit Dithionit und CO Vergiftung auf dem IR-Fenster angetrocknet und mit D₂O-Puffer re-solubilisiert, um den Austausch zu verbessern.

Reduktion der Probe, CO-Inhibierung und Befüllen der Meßzelle

Die Oxidaseproben wurden mittels einer gepufferten Natriumdithionit – Lösung ($Na_2S_2O_4$) reduziert, die der Enzymlösung unter Kohlenmonoxid-Atmosphäre zugesetzt wurde. Die Reaktion erfolgt gemäß der Gleichung:



Um eine Änderung des pH Wertes durch die entstehenden Protonen zu vermindern, wurde präventiv ein hochkonzentrierter Puffer (200 mM Kalium-Phosphat-Puffer) verwendet.

In der Praxis wurden zur Reduktion und CO Vergiftung 5-10 μl der umgepufferten Enzymlösung in einem Eppendorfhütchen ca. 1 Minute mit CO gespült, ca. 20 Minuten auf Eis gelagert und dieses Verfahren 3 mal wiederholt, um einen vollständigen Austausch der Lösung mit CO zu gewährleisten und den Sauerstoff zu verdrängen. Dazu wurden 3-4 μl einer 0,5 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung gegeben, die im entsprechenden Puffer angefertigt, und mit obigem Verfahren ebenfalls 3 mal mit CO inkubiert worden war.

Nach Zusetzung der Dithionitlösung (unter CO) wurde das Präparat mit CO-Begasung aus einer Spritzennadel „umgerührt“ und wiederum 20-30 Minuten auf Eis gelagert, um eine vollständige Reduktion zu erwirken.

Danach erfolgte die erneute Einengung mit CO auf ein Endvolumen von ca. 6-7 μl . Diese Probe wurde nun auf ein CaF_2 -Fenster aufgetragen und so verteilt, daß sie eine vorgefertigte Lochblende aus Teflon überdeckte. Es erfolgte die Antrocknung und „Aufkonzentration“ des Proteins (mit CO). Danach wurde die Abstands-Folie zur Einstellung einer definierten Probendicke (typischerweise 10 μm optische Weglänge) aufgelegt und mit einem zweiten CaF_2 -Fenster die Zelle verschlossen.

Photo-Reduktion der Oxidase mit Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid

Nach einer Methode von Nilsson (1992) wurde für die hier verwendeten Oxidasen das Verfahren der Photoreduktion im Detail ausgearbeitet. Hierzu wurden ca. 8 μl der umgepufferten Oxidaselösung (pH = 7) mit folgenden Lösungen versetzt:

- 2 μl 5 mM Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid in 200 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH = 7 und
- 2 μl 20 mM EDTA, ebenfalls in 200 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH = 7

Diese Mischung wurde nicht mit CO, sondern mit N_2 eingedickt, um keine halbreduzierte Oxidase zu kreieren, und tatsächlich ein reduziert-minus-oxidiert-Spektrum im Experiment zu erhalten. Die Kontrolle des Redox-Zustandes erfolgte über die entsprechenden Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich.

2.5 IR-spektroskopische Messungen bei verschiedenen Temperaturen

A) kryogene Temperaturen

Die Zelle mit der Probe (vgl. Abb. 2-10a) wurde für **Tieftemperaturmessungen** (bis 84 K) in einem in der Arbeitsgruppe gebauten, mit flüssigem Stickstoff betriebenen Kryostaten geladen und abgekühlt. Dieser war so in die Messapparatur integriert, daß, wie in Abb. 2-9 dargestellt, zur Initiierung der Reaktion (Blitzlichtphotolyse im Enzym) ein 7 ns, 532 nm, 30 mJ Laser-Puls eines frequenzverdoppelten Nd:YAG Laser-Systems (Fa. Big Sky Laser Tech.) eingekoppelt und auf die Probe justiert werden konnte.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden an einem modifizierten Bruker IFS 66 FT-IR-Spektrometer über den gesamten mittleren-IR-Bereich ($2500\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) durchgeführt.

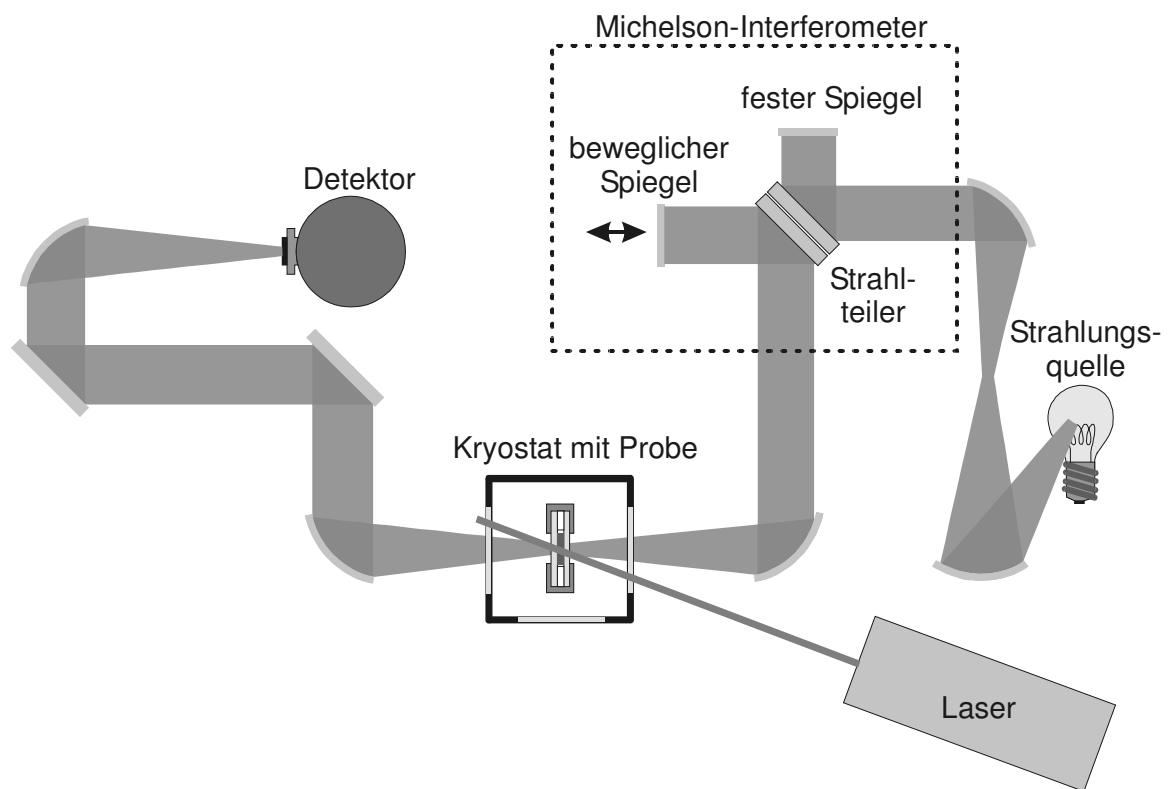
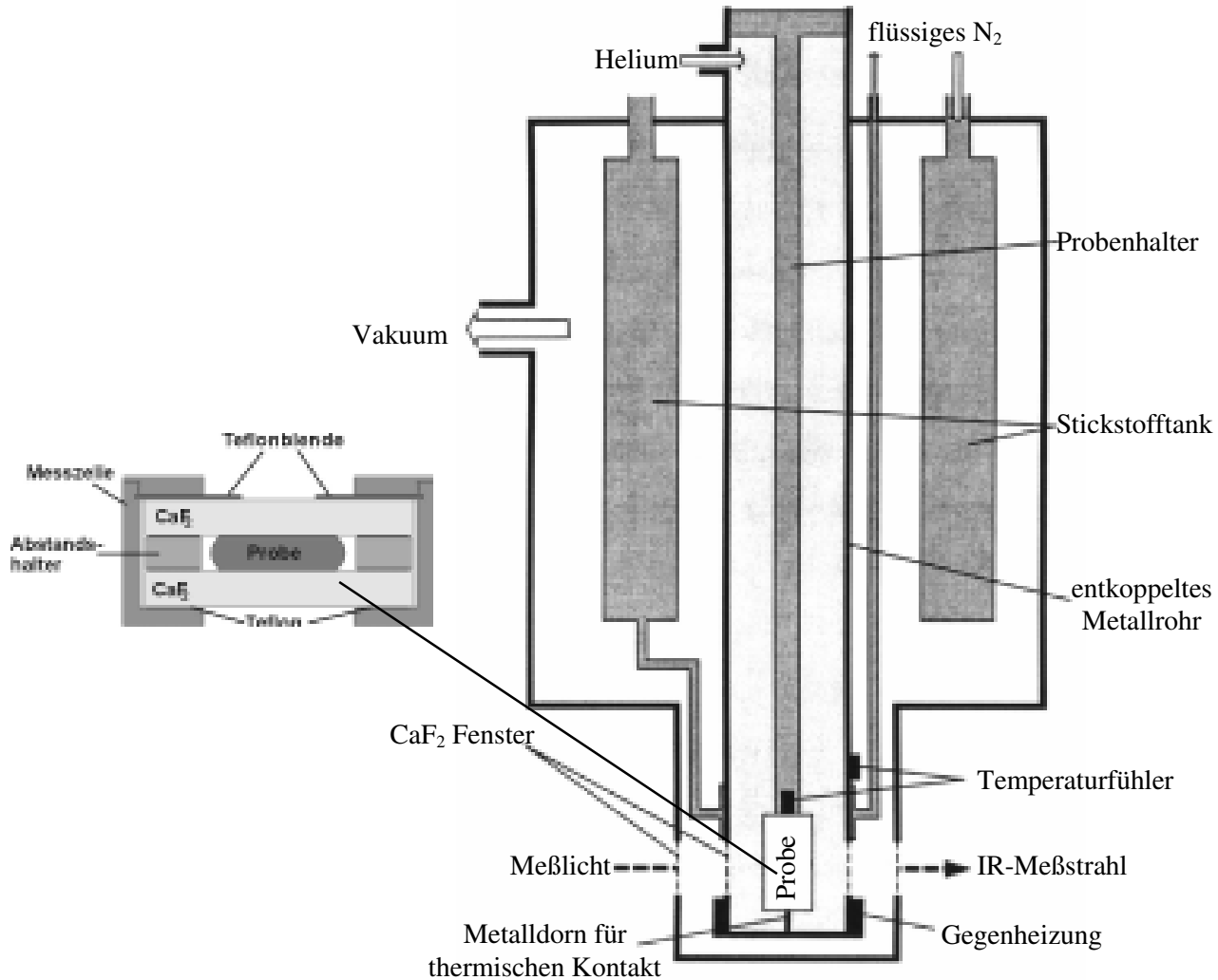


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung der Meßapparatur: IR-Fourierspektrometer, Kryostat mit Probe und Photolyselaser [Engel 1998; Haustein 2000]



a)

Meßzelle (Detailansicht) mit Enzymlösung, Abstandshalter (10 µm) und IR-Fenster (CaF₂)

b)

Aufbau des stickstoffgekühlten Kryostaten. Der untere Teil mit dem Metallhorn befindet sich auf konstant 77K; die Probe kann über eine thermisch isolierte Zuführung separat gewechselt werden und koppelt erst über den Metallhorn an den gekühlten Teil [Abbildung nach Rost 1999]. Über den Durchfluss von flüssigem N₂ kann die Temperatur geregelt werden.

Abbildung 2-10: a) Meßzelle und b) Kryostat für Tieftemperaturmessungen.

B) physiologische Temperaturen

Für Messungen bei **Temperaturen über 260 K** wurde die Probe mit einem handelsüblichen Thermostaten (Modell: Haake Fisons) gekühlt.

Spektrenaufnahme für CO-Photolyse Experimente

- Spektren über 220 K wurden mittels **Rapid-Scan Technik** im IR-Spektralbereich von 1000 cm^{-1} bis 2500 cm^{-1} mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. Je nach Geschwindigkeit der Reaktion wurden vor der Reaktion 100 bis 200 Interferometer-Scans als Referenz-Spektrum, nach Reaktionsstart mehrere „Einzel-Scans“ gemessen (bis 25 ms Zeitauflösung), die gegen längere Reaktionszeiten hin gemittelt wurden. Da die hier initiierte Reaktion reversibel ist, kann zur Verbesserung des Signal/Rausch – Verhältnisses die Messung beliebig oft wiederholt werden. Für die gezeigten Spektren wurden 30-500 Einzelmessungen gemittelt.
- Für Temperaturen unter 180 K wurden typischerweise 1000 scans im **serienmäßigen Meßmodus** je vor der Photolyse als Referenz gemessen; nach der Photolyse wurde wahlweise je nach Temperatur und Enzym im Rapid-Scan oder im Normal-Modus gemessen.
- Unterhalb 140 K wurden typischerweise 5×1000 Interferometer-Scans je vor der Photolyse (=Dunkelspektren) und analog danach 5×1000 Scan Hellspektren gemessen; die Photolyse erfolgte über mehrere Laserblitze. Zur thermischen Relaxation des Liganden zurück zur Hämeisen-Bindungsstelle wurde die Probe auf Raumtemperatur gebracht und anschließend erneut abgekühlt. Dieses Prozedere wurde ca. 5-10 mal (und mit verschiedenen Präparationen) wiederholt. Diese Datensätze wurden gegeneinander verrechnet und gemittelt und daraus die Differenzspektren berechnet.

Spektrenaufnahme bei Photo-Reduktions-Experimenten

Nach Rost (1999) zeigt Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid in wässriger Lösung Absorptionsmaxima bei 245, 286 und 454 nm. Zur Photoreduktion wurde deshalb ein Xenon-Blitz mit UV-Durchlassfilter-System verwendet, das breitbandig unterhalb 400 nm (bis 200 nm) Anregungsenergie liefert. Aufgrund der geringen Quantenausbeute des Komplexes (~3% [Nilsson 1992]) wurde ca. 15 mal geblitzt, bis sich das resultierende Differenz-Signal nicht mehr signifikant änderte und die Reduktion als abgeschlossen betrachtet werden konnte.

Im Experiment wurde vor der Reaktion bei Raumtemperatur ein VIS-Spektrum der mit dem Rutheniumkomplex vermischten (oxidierten) Proteinprobe gemessen. Anschließend wurde die Probe im IR-Spektrometer auf 268 K abgekühlt und mehrere Referenzspektren genommen. Danach wurde mit der Xe-Lampe geblitzt und im Rapid-Scan-Modus zeitaufgelöst gemessen, um eventuelle Intermediate beim Elektronentransfer festzustellen. Schließlich wurden im normalen Scan-Modus weitere Spektren aufgenommen. Diese

Prozedur wurde solange wiederholt, bis das Differenzspektrum kaum noch Änderungen zeigte. Zur Berechnung des reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektrums wurden all diese Einzelmessungen addiert, um die Änderungen des gesamten Reduktionsprozesses auszuwerten.

Differenztechnik und Datenauswertung

Die hier dargestellten Absorptionsspektren werden als Differenz bzgl. des Proteins vor (I_0) und nach der Reaktion (I) berechnet, d. h. das Einkanalspektrum vor der Reaktion wird mit dem Einkanalspektrum nach der Reaktion gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 2.2) verrechnet. Als Reaktion gilt hier sowohl CO Blitzphotolyse als auch die Photoreduktion der Probe. In Abbildung 2-11 ist dieser generalisierte Fall mit einer Abbildung nach Zscherp und Barth (2001) dargestellt.

Der Vorteil der Differenztechnik besteht darin, daß selbst kleinste reaktionsspezifische Veränderungen im Protein ($\ll 1\%$ relativ zur Gesamtabsorption) gut meßbar sind. Ferner „sieht“ man ausschließlich die „Elemente“, die direkt an der Reaktion beteiligt sind. Der Rest des Enzyms, an der Reaktion unbeteiligte Strukturelemente sowie H_2O und Detergenz, sind nicht sichtbar.

Die thermodynamischen Parameter (Reaktionsrate $k(T)$, Höhe der Energiebarriere etc.) wurden aus der Zeitentwicklung (Kinetik) der CO Rekombination mit dem Häm-Eisen nach der Photolyse über die Änderung der Absorption mit einer Zeitauflösung von maximal 25 ms verfolgt, welche als Funktion der Zeit nach dem Laser-Blitz bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen wurde.

Die entsprechenden Populationen für Cu_B -CO Moden und Fe-CO Moden wurden über die Integration von $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ um das Absorptions-Banden-Maximum im Differenzspektrum berechnet (um einen Überlapp mit anderen breiten Bandenprofilen von CO-Konformeren auszuschließen, wurde nicht über die gesamte Moden-Fläche integriert, was zur Verfälschung der jeweiligen Zeitkonstanten der entsprechenden Konformere geführt hätte). Diese Absorptionsbanden-Fläche wird gegen die Zeit nach der Photolyse aufgetragen, um so den Anteil jener Proteine zu veranschaulichen, dessen Liganden bei der Temperatur T zum Zeitpunkt t noch nicht wieder zurückgebunden haben.

Um verschiedene Kinetiken anschaulich miteinander zu vergleichen, wurden, wie an entsprechender Stelle angegeben, die Flächen auf das jeweils erste Spektrum normiert. Somit erhält man einen quantitativen Überblick der prozentualen Rückbindung der entsprechenden Population für verschiedene Oxidase - Typen.

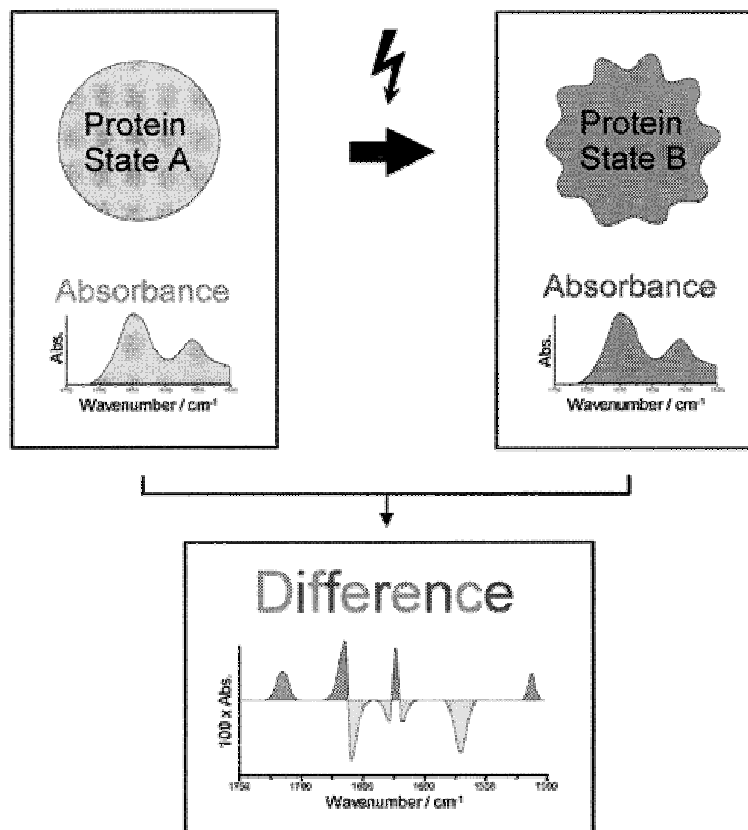


Abbildung 2-11: Meßprinzip der Differenzspektroskopie [Abbildung nach Zscherp und Barth 2001]. Zustand A beschreibt das Enzym vor der CO Photolyse, Zustand B danach. Analog bei Photoreduktion repräsentiert Zustand A den oxidierten, Zustand B den reduzierten Zustand.

Die IR Daten wurden mit der Spektroskopie-Software OPUS von Bruker berechnet und ausgewertet. Die kinetischen Daten wurden über Origin (Microcal Software Inc.) gefittet und dararaus die thermodynamischen Parameter ermittelt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 CO Photolyse an vollreduzierter Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* und *Thermus thermophilus*; Spektrendiskussion

Die in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurden an der vollreduzierten Form der Cytochrom *c* Oxidase des jeweiligen Bakteriums gemacht. Alle Kofaktoren liegen daher im reduzierten Zustand vor: $\text{Cu}_A^{1+}/\text{Cu}_A^{1+}$ (und Häm c^{2+} im Falle der Cytochrom *caa*₃ Oxidase), Häm a^{2+} (respektive Häm b^{2+} im Falle der Cytochrom *ba*₃ Oxidase), Cu_B^{1+} und Häm a_3^{2+} . Am Letzteren ist das CO-Molekül gebunden, wie in Abb. 3-1 schematisch dargestellt.

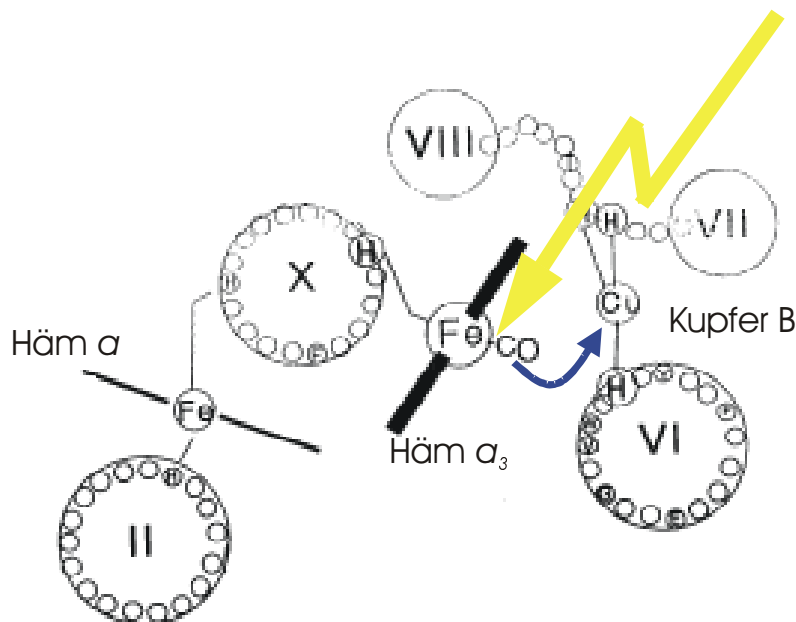


Abbildung 3-1: schematische Darstellung der CO Photolyse im binuklearen Zentrum der vollreduzierten Cytochrom *c* Oxidase (Aufsicht; nach Park et al. 1996). CO bindet nach der Reaktion an das Cu_B ; von dort bindet es bei tiefen Temperaturen nicht an das Häm zurück.

Nach Anregung der Hämgruppe durch einen Laserpuls bricht die Bindung zum CO Molekül auf. Schnelle kinetische Studien an Rinderherz *aa*₃ Oxidase zeigten, daß die Photo-dissoziation von CO innerhalb 150 fs abläuft und der Cu_B^{1+} -CO Zustand innerhalb 1 ps ausgebildet ist [Woodruff 1993]. Bei Raumtemperatur ist dieser Zustand transient und der Ligand kann weiter in das Lösungsmittel diffundieren. Bei tieferen Temperaturen verbleibt das CO Molekül innerhalb des Proteins und kann vom Cu_B ans Häm-Fe zurückbinden. Diese Reaktion ist thermisch aktiviert; für $T \leq 140$ K ist die Bindung an das Cu_B stabil und es findet keine Rückbindung statt.

3.1.1 VIS – Spektren

Im sichtbaren Spektralbereich (400 – 900 nm) kann man Absorptions-Banden der verschiedenen Häme beobachten, die in den unterschiedlichen Oxidasen vorkommen (vgl. Kap. 1.1.1: *a*, *b*, *c*, *o* -Häme). Deren elektronische Übergänge ($\pi \rightarrow \pi^*$) werden hier angeregt [für Häm *a* und Häm *a*₃ siehe: Vaneste 1966; generell: Moore und Pettigrew 1990]. Sie sind spezifisch für den jeweiligen Häm-Typ und abhängig vom Oxidationszustand und vom Liganden. Die Absorption der einzelnen Banden bezeichnen jeweils die in Tabelle 3-1 aufgeführten elektronischen Übergänge.

Wellenlänge [nm]	Bezeichnung	Anregungszustand
415-446	Soret	$S_0 \rightarrow S_3$
550-610	α -Bande	$S_0 \rightarrow S_0$
~519	β -Bande	$S_0 \rightarrow S_1$

Tabelle 3-1: VIS-Spektralbereich für den Übergang der Häme [Moore und Pettigrew 1990]

In Abbildung 3-2 ist das VIS-Absorptionsspektrum der *Paracoccus denitrificans* Oxidase (Typ *a* Häm) im oxidierten und reduzierten Zustand dargestellt. Genauere Details für die hier untersuchten Häm-Typen finden sich in Tabelle 3-2.

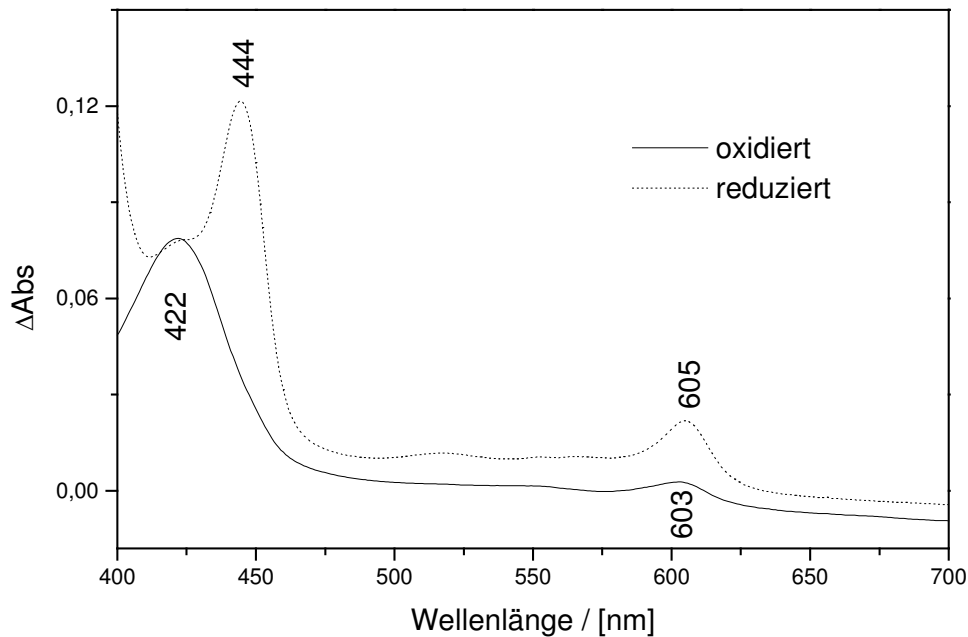


Abbildung 3-2: Absorptionsspektrum der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* im oxidierten und reduzierten Zustand bei pH = 8,7; T=293 K. Die Spektren sind gegeneinander verschoben dargestellt.

Nach Bindung von CO verändern sich die Eigenschaften des Häms, je nachdem, ob es 5- oder 6-fach koordiniert, und/oder ob es high- oder low-spin ist, was auf die Elektronenverteilung im Porphyrinring hinweist. Für die reduzierte und CO vergiftete Cytochrom *c* Oxidase weist die Absorption der Banden die in Abb. 3-3 gezeigten Maxima für die hier untersuchten Oxidasen auf.

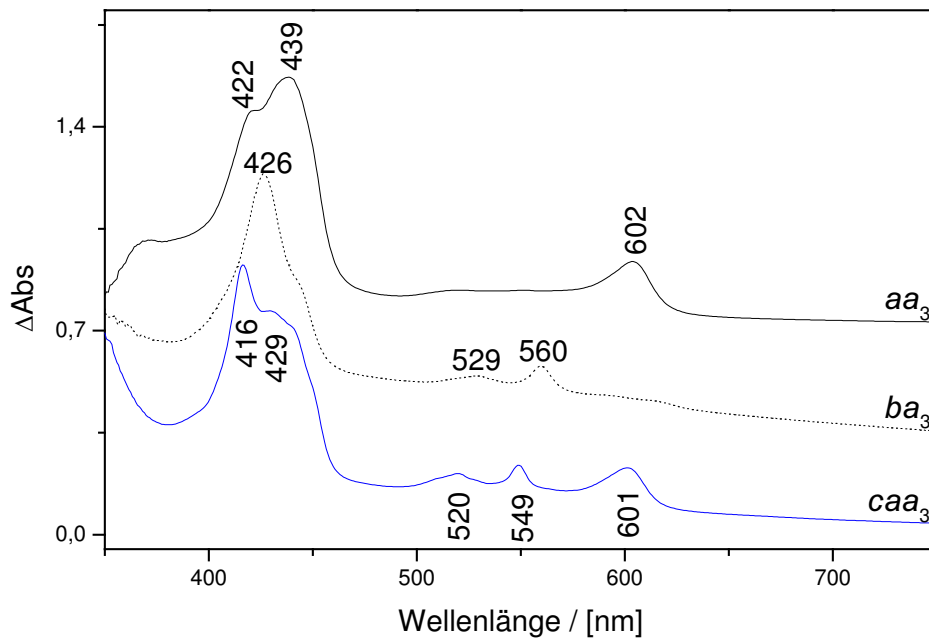


Abbildung 3-3: Vis-Absorptionsspektrum der vollreduzierten, CO-vergifteten Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* (aa_3) und *Thermus thermophilus* (ba_3 und caa_3) (293 K, H_2O , $pH=8$). Die Zuordnungen der Banden zu den entsprechenden Hämen sind in Tabelle 3-2 zusammengestellt. Die Spektren sind gegeneinander verschoben dargestellt.

Signale von Cu_A wurden bei 834, 808, 484 und 530 nm an isolierten Untereinheiten nachgewiesen, sind jedoch sehr klein und von der Absorption der Häme überlagert [Lappalainen et al. 1993, 1995]. Da Cu_B nicht zu „charge-transfer“-Komplexen wie Cu_A zählt und über Liganden anders koordiniert ist, zeigt es im sichtbaren Spektralbereich keine nennenswerte Absorption [Babcock 1988].

Für die Absorption der Häme in den jeweiligen Oxidasen gibt folgende Tabelle einen Überblick:

Soret	α		Soret	α				
<i>a</i>	<i>a</i>		<i>a₃</i>	<i>a₃</i>				
Rinderherz aa₃								
ox (a ³⁺) 428 ^d		ox (a ₃ ³⁺)	418 ^d					
red (a ²⁺) 444 ^d	605 ^d	red (a ₃ ²⁺)	445 ^b	610 ^b				
			(a ₃ ²⁺)-CO 430 ^b	(a ₃ ²⁺)-CO 590 ^b				
Paracoccus denitrificans aa₃								
ox (a ³⁺) 425 ^a		ox (a ₃ ³⁺)	414 ^a					
red (a ²⁺) 444 ^a	604 ^a	red (a ₃ ²⁺)	446 ^a	588+609 ^a				
			(a ₃ ²⁺)-CO 430 ^c	(a ₃ ²⁺)-CO ~590 ^c				
Thermus thermophilus ba₃								
			Soret	α		Soret	α	β
			<i>a₃</i>	<i>a₃</i>		<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
		ox a ₃			ox b	408 ^e		
		red a ₃	441 ^e , 442 ^h , 444 ^g	611 ^e , 612 ^h , 614 ^g	red b	427 ^{e, g, h}	559 ^{e, g} , 560 ^h	528 ^e , 530 ^h
			a ₃ -CO 427 ^g	a ₃ -CO 592 ^g				
Thermus thermophilus caa₃								
			Soret	α		Soret	α	β
			<i>a + a₃</i>			<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
			ox 422 ^f		ox c	403 ^f		
			red 442 ^f	red 603 ^{f, i}	red c	415 ^f	517 ^f + 547 ^f , 549 ⁱ	

Tabelle 3-2: Bandenmaxima für die Cytochrom c Oxidasen bei verschiedenen Oxidations- und Bindungszuständen der Häm.

Quellen: ^a Hellwig et al. 1999a; ^b Hill 1994b; ^c Rost 1999; ^d Dodson et al. 1996; ^e Hellwig et al. 1999b; ^f Hellwig et al. 2002; ^g Koutsoupakis et al. 2002; ^h Oertling et al. 1994; ⁱ Fee et al. 1993.

In Abb. 3-3 sind vor allem im Soret-Bereich kleinere Abweichungen gegenüber den Literaturwerten in Tabelle 3-2 festzustellen. Diese entstehen durch Überlagerung der Banden für reduziertes Häm *a* und reduziertes Häm *a₃*, das CO gebunden hat. Ferner könnten kleine Unterschiede in den publizierten Daten auch gerätebedingte Ursachen haben.

3.1.2 CO Banden im Differenzspektrum bei 140 K im Vergleich

In Abbildung 3-4 ist das „hell über dunkel“ FT-IR-Differenzspektrum von aa_3 , ba_3 und caa_3 Oxidase bei 140 K dargestellt. Dabei entsprechen die negativen Banden in der IR-Region von 1950 bis 1985 cm^{-1} der Photodissoziation von Häm a_3 ; die positiven Banden von 2040 bis 2080 cm^{-1} der Bildung der Cu_B -CO Bindung.

Details für die untersuchten Oxidasen sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

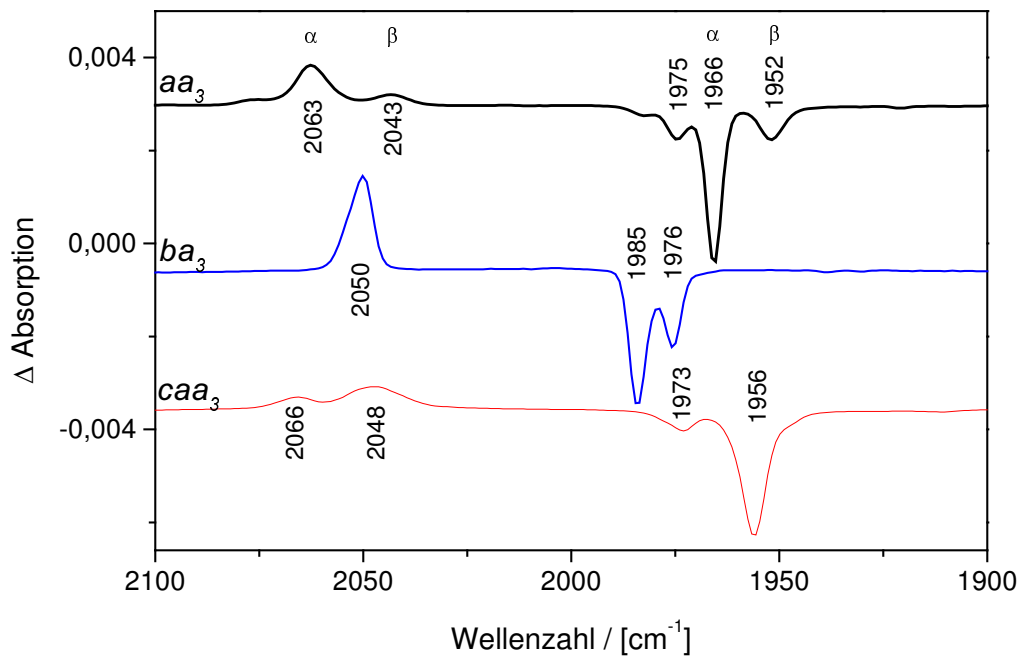


Abbildung 3-4: Vergleich der „hell über dunkel“ FT-IR Differenzspektren der vollreduzierten, CO vergifteten aa_3 (*P. denitrificans*), ba_3 und caa_3 (*T. thermophilus*) Cytochrom c Oxidase bei 140 K, pH=8. Gezeigt ist die IR-Region, in der die C-O Schwingung absorbiert. Die jeweiligen Banden sind gegeneinander verschoben dargestellt.

Die vollreduzierte Form weist typische Ähnlichkeiten mit Banden auf, die schon früher mittels Tieftemperatur-Experimenten an Rinderherz Oxidase [Alben et al. 1981; Fiamingo et al. 1982; Park et al. 1996; Kitagawa 2000], *Paracoccus denitrificans* [Rost et al. 1999] und *Rhodobacter sphaeroides* [Mitchell et al., 1996a; 1996b] charakterisiert wurden.

Ein erster Vergleich zeigt, daß sich die CO Banden der ba_3 Oxidase von *Thermus thermophilus* wesentlich von den anderen hier dargestellten unterscheiden, wie bereits von Einarsdóttir et al. (1989) beschrieben. Die Absorptionsbande des an das Häm-Eisen gebundenen CO bei 1975,5 und 1984,6 cm^{-1} liegen energetisch signifikant höher. Außerdem gibt es nur ein Cu_B -CO Konformer bei 2050,2 cm^{-1} .

Im Vergleich zu Einarsdóttir et al. (1989) weichen jedoch die CO Banden-Positionen für die *caa₃* Oxidase erheblich von den dort publizierten Daten ab. Die Gründe sind nicht klar. Zwei breite Moden bei 1956 und 1973 cm⁻¹ sind hier zu sehen. Ein besonderes Merkmal ist die sehr breite Cu_B-CO Bande bei 2048 cm⁻¹ mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von ~13,5 cm⁻¹ verglichen mit 6 bis 8 cm⁻¹ im Falle der *aa₃* und *ba₃* Oxidase. Das weist auf eine flexible Umgebung der Cu Seite hin, die dieses Konformer betrifft.

Oxidase	<i>aa₃</i>	<i>ba₃</i>	<i>caa₃</i>
$\nu(\text{C=O})$ Cu _B -CO	2077		
$\nu(\text{C=O})$ Cu _B -CO (α)	2063		2066
$\nu(\text{C=O})$ Cu _B -CO (β)	2042,6	2050,2	2048
$\nu(^{13}\text{C=O})$ Cu _B -CO		2004	
$\nu(\text{C=O})$ Häm <i>a₃</i> -CO	1983,2	1984,6	
$\nu(\text{C=O})$ Häm <i>a₃</i> -CO	1974,6	1975,5	1973
$\nu(\text{C=O})$ Häm <i>a₃</i> -CO (α)	1965,6		
$\nu(\text{C=O})$ Häm <i>a₃</i> -CO (β)	1952,2		1956
$\nu(^{13}\text{C=O})$ Häm <i>a₃</i> -CO (α)	1921	1939	1927,3
$\nu(^{13}\text{C=O})$ Häm <i>a₃</i> -CO (β)	1907,5	1931	1910,6

Tabelle 3-3: Übersicht über die C O Streckschwingungen der unterschiedlichen Oxidasen bei 140 K.

3.1.3 Proteinbanden bei 140 K

Wie im letzten Kapitel erörtert, zeigt sich, daß die verschiedenen hier untersuchten Oxidasen trotz gleicher Funktion und großer Ähnlichkeit des binuklearen Zentrums erhebliche Abweichungen der CO Banden aufweisen. Doch nicht nur am Liganden selbst zeigen sich diese Unterschiede: die Variationen der Umgebung spiegeln sich auch in der Proteinregion wider, in der man zusätzliche oder modifizierte Absorptionsbanden findet.

In Abbildung 3-5 repräsentieren negative Signale die Schwingungsbanden vor, und positive Banden diejenigen nach der Photolyse des CO vom Häm a_3 bei 140 K. Der untersuchte IR-Bereich von 1800 bis 1200 cm^{-1} spiegelt sowohl Konformationsänderungen des Polypeptid-Rückgrats, als auch die Reorganisation vom Häm a_3 und einzelnen Aminosäuren-Seitenketten bei der CO Photolyse wider.

Durch Vergleich mit früheren Daten aus elektrochemischen und CO Blitzphotolyse FT-IR Experimenten an entsprechenden Oxidasen, sowie mit Literaturwerten von Häm Modell-Systemen und Ergebnissen aus der Resonanz-Raman Spektroskopie werden die hier dargestellten Spektren diskutiert. Auf dieser Basis wird der vorläufige Versuch von Bandenzuordnungen unternommen und in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Zuordnung von Häm-Moden

Bei der CO Blitzlichtphotolyse kann man nur Veränderungen erwarten, die Häm a_3 und seine direkte Umgebung betreffen. Eventuell vorkommende Beiträge der Häme a , b oder c werden hier vernachlässigt.

Für Häm a_3 kann man Beiträge voraussetzen, die herrühren von:

- C-C, C-N Moden des Porphyrinrings
- C=O von protonierten oder C \cdots O von deprotonierten Propionatgruppen
- C=C Schwingungen der Vinyl-Substituenten
- C=O Schwingungen der a_3 Formyl-Gruppe

Die Häm-Schwingungsmoden werden beziehungsweise auf die Nomenklatur nach Spiro and Li (1988) zugeordnet (vgl. auch Abb. 2.8 in Kap 2.3.2).

a) Häm-Propionate

Im Bereich von ca. 1704 bis ca. 1661 cm^{-1} absorbieren $\nu(\text{C=O})$ Moden von protonierten Carboxylgruppen der Hämpropionate. Hier sind signifikante Unterschiede für die ba_3

Oxidase zu sehen: eine starke negative Bande bei 1704 und eine positive Bande bei 1698 cm^{-1} deuten aufgrund ihrer Form, die der Ableitung einer Absorptionsbande ähnelt, auf die Verschiebung einer Mode bei 1701 cm^{-1} hin. Analoge Signale werden sowohl in elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektren bei 1708 und 1698 cm^{-1} [Hellwig et al. 1999b], als auch bei der Photoreduktion mit dem „caged electron“-System Tris-(Bipyridin)-Ruthenium-Chlorid gesehen [Rost 1999; Anhang].

Weniger ausgeprägte Signale bei 1697/1691/1687 cm^{-1} können hier für die aa_3 Oxidase ausgemacht werden. Aufgrund von $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Austausch wurden von Rost (1999) aufgrund ihrer Wellenzahl-Verschiebung bei 84 K verschiedene Linien diesen Häm-Propionsäuren zugeordnet: dies betrifft eine Absorptionsbande bei 1690,5 cm^{-1} , die sich nach 1685,5 cm^{-1} verschiebt und eine Bande bei 1680, die eine Verschiebung nach 1677,5 cm^{-1} erfährt.

Für die ba_3 Oxidase gibt es ferner markante Absorptionen bei 1676, 1670 und 1661 cm^{-1} , die aufgrund ihrer asymmetrischen Form offenbar nicht miteinander gekoppelt sind. Das Signal bei 1670 cm^{-1} rührt wahrscheinlich vom Häm-Formylsubstituenten her. Hellwig et al. 1999b verweisen darauf, daß in elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektren Signale der ba_3 Oxidase bei 1672 und 1676 cm^{-1} sehr viel stärker sind, als vergleichbare Signale von der aa_3 Oxidase von *P. denitrificans*. Insgesamt deutet dies auf eine unterschiedliche Umgebung der Häm a_3 Propionate hin. Jedoch sind für eindeutige Zuordnungen ortsgerichtete Mutationen oder Isotopenmarkierungen nötig (für aa_3 Oxidase vgl. Kap. 3.3).

Konsistent mit dieser Zuordnung ist der damit korrelierende Bereich der deprotonierten Form der Propionate: die antisymmetrische Streck-Schwingung $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ zeigt im Bereich von 1570 bis 1530 cm^{-1} ein starkes positives Differenz-Signal für die ba_3 Oxidase bei 1558 cm^{-1} und kleinere Signale von 1546 bis 1519 cm^{-1} (mit negativen Signalen bei 1546, 1539 und 1529 cm^{-1}). Diese zeigen analoge Bandstrukturen zur aa_3 Oxidase, welche kleine Moden von 1576 bis 1545 cm^{-1} und eine starke Absorptionsbande bei 1532 cm^{-1} aufweist.

Die Zuordnung dieser Absorptions-Bande wird unterstützt durch elektrochemisch induzierte Differenzspektren von ^{13}C -isotopenmarkierter Oxidase von *P. denitrificans* [Behr et al. 1998]. Die Isotopen-Substitution verursacht eine Verschiebung der Differenzbanden bei 1570 cm^{-1} für Häm a (bei CO Photolyse nicht angesprochen) und bei 1538 cm^{-1} , welche auf deprotonierte Häm-Propionate hinweist. Jedoch ist hier eine Zuordnung zur ν_{38y} Schwingung von Häm a_3 wahrscheinlicher, da sich bei CO Photolyse der Redoxzustand der Propionate kaum ändern dürfte (vgl. Kap. 3.3.1).

Im elektrochemisch induzierten Differenzspektrum wurde die symmetrische $\nu(\text{COO}^-)^{\text{sym}}$ Mode bei 1380 cm^{-1} deprotonierten Häm-Propionaten zugeordnet, welche für alle hier untersuchten Oxidasen im Bereich von 1371 bis 1374 cm^{-1} zu sehen ist. Für die aa_3 Oxidase aus *P. denitrificans* konnte dies im Photolyse-Experiment bestätigt werden (Kap. 3.3.1).

Für die caa_3 Cytochrom Oxidase sind sowohl von 1663 bis 1699 cm^{-1} als auch in der Region von 1537 bis 1578 cm^{-1} nur kleine Differenzbanden zu sehen. Auch die aufgespaltenen Banden bei $1371/1374\text{ cm}^{-1}$ für Schwingungen der deprotonierten Carboxylgruppen sind sehr klein.

b) Absorption von Formyl Substituenten

Abhängig von der Wasserstoffbrücken-Bindung zu benachbarten Aminosäuren kann man die $\nu(\text{C=O})\text{CHO}$ Mode des Formyl-Substituenten im Bereich zwischen 1680 bis 1606 cm^{-1} erwarten.

Basierend auf Resonanz-Raman Daten von Babcock (1988) wurden in elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektren der aa_3 Oxidase von *P. denitrificans* von Hellwig et al. (1999a) Signale bei 1678 (oxidierte Form) und 1662 cm^{-1} (reduzierte Form) zugeordnet.

Ebenfalls im elektrochemisch induzierten FT-IR Experiment wurden Moden bei 1676 (oxidierte Form) und ein Signal bei 1668 cm^{-1} für die ba_3 Oxidase in reduziert-minus-oxidiert Differenz-Spektren diskutiert [Hellwig et al. 1999b], die auf der Basis von Resonanz-Raman Spektren der *T. thermophilus* ba_3 Oxidase beruhen. Dort konnten Oertling et al. (1994) dieser Seitengruppe eine Mode bei 1676 cm^{-1} in der oxidierten und bei 1669 cm^{-1} in der reduzierten Form zuordnen.

Für die caa_3 Oxidase wurden bei 1664 in der reduzierten und bei 1673 cm^{-1} für die oxidierte Form früher schon Signale an Häm a_3 in Resonanz-Raman Experimenten gemessen [Gerscher et al. 1998] und, bezugnehmend dazu, wurde ein 1678 (oxidierte Form) und 1669 cm^{-1} (reduzierte Form) Signal in FT-IR Messungen von Hellwig et al. (2002) zugeordnet.

Auf dieser Grundlage können hier im Photolyse-Experiment Signale bei $1667/1674\text{ cm}^{-1}$ für aa_3 Oxidase und für ba_3 Oxidase bei $1676/1670\text{ cm}^{-1}$ diskutiert werden, welche jedoch auch Häm-Propionat Moden entsprechen könnten; für die caa_3 Oxidase entspricht dies Absorptionsbanden bei $1664/1669\text{ cm}^{-1}$. Bemerkenswert ist eine Schwingungs-Mode bei 1674 cm^{-1} für die aa_3 Oxidase, welche nur bei pH=6 und 7 sichtbar ist, nicht jedoch bei pH=8.

c) Beiträge vom **Porphyrin Ring** können unterschiedliche Sub-Moden aufweisen: Aufgrund von Untersuchungen an Modellsystemen kann die Schwingungsmode von ν_{37} auf den Bereich von 1586 bis 1655 cm^{-1} eingeschränkt werden [Li et al. 1990]. Park et al. (1996) ordnet für aa_3 Oxidase von Rinderherz bei CO Blitzphotolyse FT-IR Experimenten Signale bei 1580/1589 und 1565 cm^{-1} dieser Mode zu. Für *P. denitrificans* aa_3 Oxidase findet Hellwig et al. (1999a) in elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen ein Differenz-Signal bei 1588 cm^{-1} und für die ba_3 Oxidase bei 1610 cm^{-1} [Hellwig et al. 1999b] als möglichen Kandidaten für die ν_{37} Mode. Resonanz-Raman Spektren für die caa_3 Oxidase zeigen ein Signal bei 1584 cm^{-1} für Häm a_3 [Gerscher et al. 1998].

Für alle drei hier untersuchten Oxidasen können entsprechende Signale von 1576 bis 1587 cm^{-1} beobachtet werden. Sie sind jedoch ausgeprägter für die aa_3 und ba_3 Oxidase.

Die ν_{38} Schwingungsmode und deren Aufspaltung aufgrund der reduzierten Symmetrie der Häm a Porphyrine (Liganden an Häm a gegenüber Häm b) [Heibel et al. 1993; Hellwig et al. 1999a] kann für die ν_{38y} Komponente zwischen 1529 und 1535 cm^{-1} [Gerscher et al. 1998] und für ν_{38x} zwischen 1565 und 1570 cm^{-1} angenommen werden [Li et al. 1990]. In diesem Fall hier können die Moden jedoch nicht klar identifiziert werden: mehrere überlappende Absorptionsbanden sind in dieser Region des Spektrums zu sehen.

Die ν_{41} Moden (ν_{41}) mit zugeordneten Differenz-Signalen von 1319 bis 1389 cm^{-1} [Heibel et al. 1993; Park et al. 1996] sind schwierig zuzuordnen, da die $\nu(\text{COO}^-)^{\text{sym}}$ von deprotonierten Häm-Propionaten ebenfalls in diesem Bereich absorbieren (siehe oben).

d) Die $\nu(\text{C}=\text{C}_\beta)$ Mode des Häm a_3 **Vinyl Substituenten** wird in Resonanz-Raman Spektren bei ca. 1618 cm^{-1} [Oertling et al. 1994] beobachtet und wurde in CO Blitz-Photolyse FT-IR Messungen an Rinderherz Oxidase bei 1627 cm^{-1} zugeordnet [Park et al. 1996].

Für die Oxidasen aus thermophilen Bakterien (Abb. 3-5) sieht man Banden zwischen 1619 und 1632 cm^{-1} , welche von den kleinen Signalen im aa_3 Pendant abweichen. Von Rost (1999) wird für die aa_3 Oxidase die starke Absorption bei 1610 cm^{-1} dieser Gruppe zugeordnet. Dennoch ist es fraglich, ob dieser Substituent bei CO Photolyse überhaupt angesprochen wird.

e) Ein klares gemeinsames Merkmal ist das negative Signal um 1237 cm^{-1} , zugehörig zur **Ring His-Fe-CO** Schwingung, die sich ebenfalls bei Photolyse ändert. Während dies für die caa_3 und aa_3 Oxidase ein breites Signal ist, besteht es im Fall der ba_3 Oxidase aus mehreren aufgespaltenen Linien (1237/1235 und 1227 cm^{-1}).

Betrachtet man zusammenfassend die Häm-Umgebung der hier untersuchten unterschiedlichen Oxidasen, so kommt man zu dem Schluß, daß sich besonders für den *ba*₃ Typ Moden nach der CO Photolyse auffällig stark ändern. Dies verweist auf ein Häm, das verglichen mit dem der *aa*₃ und *caa*₃ Oxidase in eine deutlich andere Umgebung eingebettet zu sein scheint. Einen Hinweis gibt ein möglicher Brückenligand in der *ba*₃ Cytochrom Oxidase: basierend auf den Daten der Röntgen-Strukturanalyse kann man im binuklearen Zentrum ein Sauerstoffatom (O²⁻, OH⁻ oder H₂O) annehmen [Soulimane et al. 2000], während man in der Struktur der Oxidase von *P. denitrificans* zwei Liganden favorisiert [Ostermeier et al. 1997]. Aufgrund dieser Abweichung kann man Unterschiede an der Sauerstoff-Bindungsseite durchaus erwarten.

Polypeptid-Rückgrat

Aufgrund der CO Photolyse mit dem daraus resultierenden „Platzbedarf“ des Kohlenmonoxids sind aufgrund dieser mechanistischen Wechselwirkung auch Beiträge der Reorganisation des Protein-Rückgrats zu erwarten.

Die *Amid I – Mode* (1690-1610 cm⁻¹) wird überwiegend durch Veränderung der C=O Streck-Schwingung des Polypeptid-Rückgrats verursacht, welche schon auf kleine Störungen der Sekundär-Struktur-Elemente reagiert, also auch auf Reorganisationen bei CO Photolyse.

In der Umgebung von Häm *a*₃ zeigt die Kristallstruktur überwiegend α -Helices [Ostermeier et al. 1997; Soulimane et al. 2000]. Aufgrund dessen werden Moden bei 1642, 1664 und 1658,5 cm⁻¹ von Rost (1999) α -helikalen Strukturänderungen zugeordnet; einige kleinere Moden oberhalb 1664 cm⁻¹ können eventuell mit Schwingungsmoden von β -Faltblatt-Strukturen in der *Paracoccus* Oxidase assoziiert werden, die in diesem Spektralbereich absorbieren.

Bei D₂O Austausch sollten für diese Moden Verschiebungen in der Größenordnung von 2 – 10 cm⁻¹ auftreten (Arrondo et al. 1993). Hellwig et. al (1999b) führt aufgrund elektrochemisch induzierter FT-IR Messungen für die *ba*₃ Oxidase Banden bei 1662 und 1656 cm⁻¹ auf α -helikale Sekundär-Struktur-Elemente und Moden bei 1646 and 1630 cm⁻¹ auf β -Faltblätter zurück. Analog können bei den hier vorgestellten Daten Absorptionen bei 1653,8 und 1660,6 cm⁻¹ beobachtet werden und Signale im Bereich von 1631,6 bis 1650 cm⁻¹ werden vermutlich von β -Faltblättern verursacht (vgl. D₂O Daten in Abb. 3.5).

Im analogen Experiment ordneten Hellwig et al. (2002) für die *caa3* Oxidase aufgrund der starken Verschiebung in D₂O ein Signal bei 1660 cm⁻¹ einer ungeordneten Struktur zu. Bei CO Photolyse ist für Absorptionsbanden in diesem Bereich keine Verschiebung zu sehen. Kleinere Auswirkungen sieht man im Bereich von 1696 bis 1674 cm⁻¹ und von 1646 bis 1620 cm⁻¹, welche β -Faltblatt Sekundärstruktur-Elementen zugeordnet werden könnten.

Auch können in diesem Wellenzahlen-Bereich Beiträge der Formylgruppe der Häme, von Häm-Propionaten und von Aminosäure-Seitenketten (Arginin) erwartet werden.

Die ***Amid II – Absorptionsbanden (1575-1480 cm⁻¹)*** bestehen aus gekoppelten C-N Streck- und N-H Biegeschwingungs-Moden. Bei H/D Austausch wird die N-D Kopplung aufgehoben und eine starke Verschiebung der davon betroffenen Banden sollte beobachtet werden. Hellwig et. al (1999a) stellt keine oder kaum eine Verschiebung für die *aa3* Oxidase fest. Auch werden Amid II Absorptionsbanden in dieser Region für *ba3* [Hellwig et al. 1999b] und *caa3* Oxidase [Hellwig et al. 2002] ausgeschlossen, da keine Verschiebung bei H/D Austausch festgestellt wird. Für alle hier bei CO Photolyse-Experimenten untersuchten Oxidasen gibt es keine signifikanten Signale in diesem Bereich. Entweder wird diese Gruppe bei der CO Photolyse nicht angesprochen oder strukturelle Änderungen sind aufgrund der tiefen Temperaturen unterbunden.

Aromatische Aminosäure-Seitengruppen, Häm C=C Gruppen, antisymmetrische COO⁻-Moden von Aspartat- und/oder Glutamat-Resten und Häm-Propionaten, die in der 1748/1736 cm⁻¹ Region absorbieren, können ebenfalls in diesem Bereich einen Beitrag liefern.

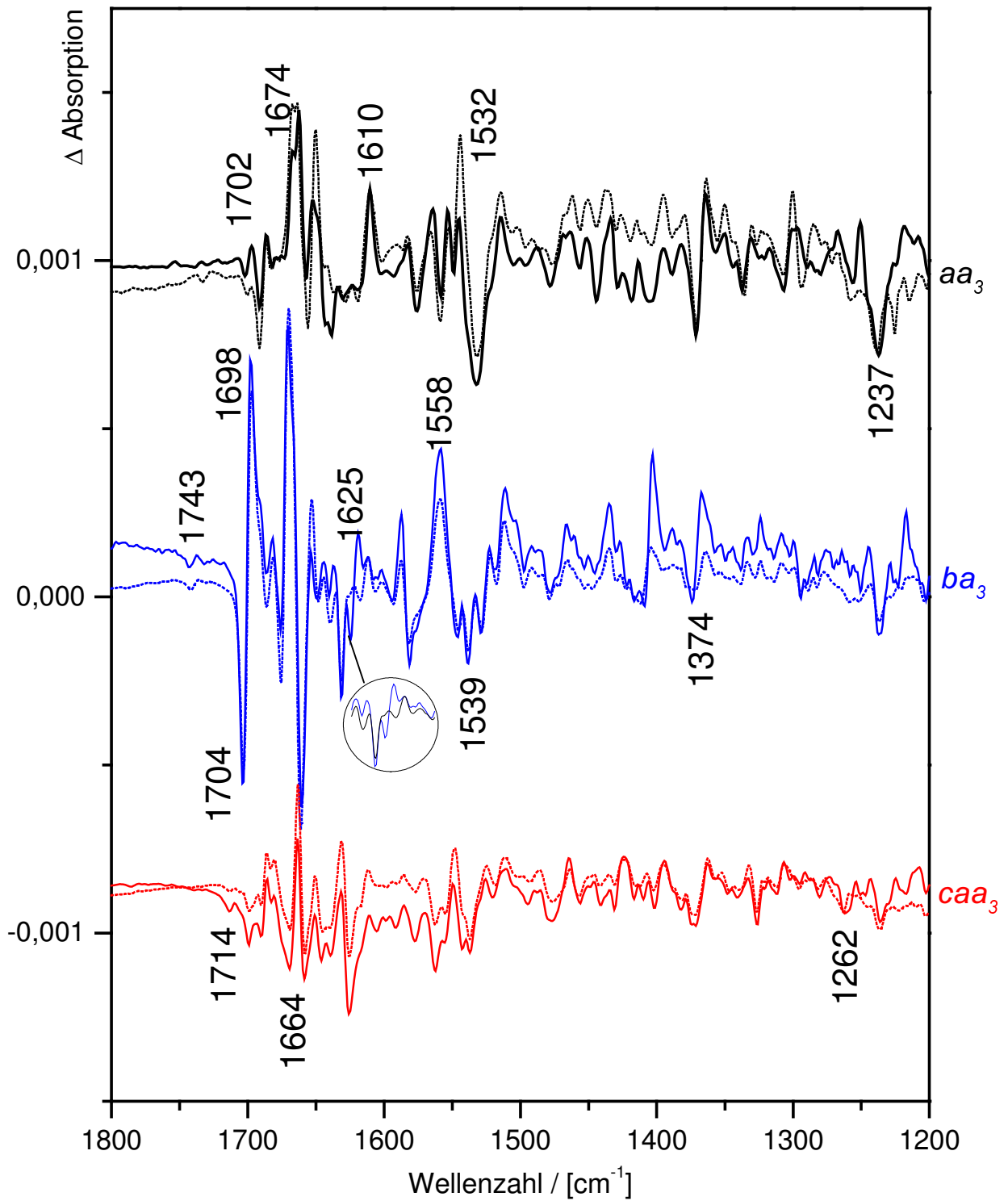


Abbildung 3-5: IR-Differenz Spektren im Spektralbereich von 1800–1200 cm^{-1} (gestrichelt: entsprechendes Enzym in D_2O , $\text{pD}=7,4$); gleiche Bedingungen wie in Abbildung 3-4.

Schwingungen von Aminosäure-Seitenketten

a) Aspartat- und Glutamat- Seitenketten. Die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Moden von Asparaginsäuren und Glutaminsäuren absorbieren im Bereich oberhalb 1710 cm^{-1} . Diese Moden können auf Protonen-Transfer Prozesse zu/von diesen Resten oder Änderungen der lokalen Umgebung einer schon protonierten Gruppe hinweisen. Für das vollreduzierte *Paracoccus* Enzym wird hier über den ganzen Temperaturbereich kein Signal festgestellt.

Bei FT-IR Blitz-Photolyse Experimenten an der vollreduzierten Rinderherz *aa*₃ Oxidase ist ein starkes negatives Differenzsignal bei 1737 cm^{-1} zu sehen [Kitagawa 2000]. Auch die halbreduzierte *P. denitrificans* Oxidase zeigt eine Absorptionsabnahme bei 1746 cm^{-1} [Rost et al. 1999]. Dies ist in Übereinstimmung mit elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen an *P. denitrificans* Oxidase von Hellwig et al. (1998), welche bei $1746/1734\text{ cm}^{-1}$ ein Differenzsignal zeigen. Mit Hilfe von ortsgerechter Mutagenese konnte dieses Signal der Aminosäure Glu 278 zugeordnet werden, die bei dieser Oxidase in der Nähe des binuklearen Zentrums liegt. Das Differenzsignal wurde als „Protonen-Schalter“ interpretiert.

Es besteht die Möglichkeit, daß das dazu analoge Signal in der mitochondrialen Oxidase eine andere Ursache hat. Dies führte Kitagawa (2000) zu einer allgemeineren Schlußfolgerung: eine COOH Gruppe von Häm-Propionaten, Aspartat- oder Glutamat-Seitenkette konvertiert in ein COO^- , wenn CO vom Häm *a*₃ photodissoziiert wird. Ein möglicher Kandidat könnte Asp 51 (Rinderherz Oxidase Numerierung) sein, welches nur in der Rinderherz Oxidase konserviert ist. Andererseits wiederum ist diese Aminosäure zu weit entfernt vom binuklearen Zentrum, weshalb es unwahrscheinlich ist, daß diese Seitenkette bei CO Photolyse überhaupt angesprochen wird. Angesichts dessen ist eine präzise Interpretation problematisch.

Anders bei der *ba*₃ Oxidase aus *T. thermophilus*: hier scheint sich entweder der Protonierungszustand einer Aspartat- oder Glutamat- Seitenkette bei Photolyse zu ändern, oder eine strukturelle Umorganisation dieser Seitenkette findet statt: ein negatives Signal bei $1743,5$ und eine kleine positive Bande bei $1737,7\text{ cm}^{-1}$ wird beobachtet, dessen Position sich bei D₂O Austausch nach $1741,7$ respektive $1736,3\text{ cm}^{-1}$ verschiebt. Aufgrund dieser Änderung könnte dieses Signal zu einer Aminosäuregruppe in einer Art Kanal gehören, da es für D₂O zugänglich ist. Kein entsprechendes Differenzsignal kann sowohl in elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen [Hellwig et al. 1999b] als auch in Photoreduktions-Experimenten mit Tris-(bipyridin)-Ruthenium-Chlorid (siehe Anhang) beobachtet werden. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ein entsprechendes Glu 278 in dieser Oxidase nicht konserviert und durch ungeladenes Asparagin und Isoleucin ersetzt ist. Folglich muß das

Signal von einer anderen, in der Nähe vom Reaktionszentrum lokalisierten Asp- oder Glu-Seitenkette herrühren.

Dieser auffällige Unterschied wird auch für Rinderherz Oxidase beobachtet: die vollreduzierte, CO gebundene Form zeigt das gleiche Differenz-Signal bei Photolyse, während es bei Photoreduktion [Heitbrink et al. 2002] oder elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen [Hellwig et al. 1999c] nicht auftaucht.

Ein negatives Signal, das in den anderen Oxidasen fehlt, ist bei 1714 cm^{-1} für die *caa*₃ Oxidase zu beobachten, welches ebenfalls an der selben Position in elektrochemisch induzierten FT-IR Differenz-Spektren zu sehen ist [Hellwig et al. 2002]. Aufgrund seiner Verschiebung nach 1716 cm^{-1} bei H/D Austausch ist die damit verbundene Gruppe für das Lösungsmittel zugänglich. Wie in Kapitel 1.1.3.2 erwähnt, ist auch hier das entsprechende Glu 278 nicht konserviert; deshalb muß dieses Signal einen anderen Ursprung haben.

b) Tyrosin-Seitenketten. An isolierten Tyrosinen können Ringschwingungen ($\nu_{19}(\text{CC})$) der protonierten Form in IR-Experimenten bei 1516 cm^{-1} zugeordnet werden; für das ionisierte Tyrosin bei 1560 und von 1496 bis 1486 cm^{-1} [Venyaminov et al. 1990]. Die Strukturauflösung der Oxidase sowohl von *P. denitrificans* [Ostermeier et al. 1997] als auch von Rinderherz [Yoshikawa et al. 1998] zeigt ein Tyrosin (Tyr280), das kovalent an ein Histidin gebunden ist, welches das Cu_B im binuklearen Zentrum koordiniert (siehe Abb. 1.8). Diese kovalente Verbindung wurde für alle hier diskutierten Oxidasen nachgewiesen [Buse et al. 1999]. Es wird angenommen, daß dieses Tyrosin als vorübergehender Elektronenspeicher im katalytischen Prozess fungiert.

IR-Banden, die einer Tyrosin-Ring C=C Mode zugeordnet werden können, werden in allen hier untersuchten Oxidasen im Bereich von 1511 bis 1514 cm^{-1} und von 1558 bis 1564 cm^{-1} beobachtet. Im letzteren Fall muß zusätzlich die Beteiligung anderer Signale (Häm-Schwingungs-Moden) in Betracht gezogen werden und die Tatsache, daß Tyrosine in Lösung ein anderes Absorptionsverhalten zeigen, als kovalent gebundene Tyrosine im Protein. Auch ist es generell fraglich, ob die CO Dissoziation eine Veränderung des Redoxpotentials oder der strukturellen Umgebung dieser Aminosäure induziert.

Im speziellen Fall der *caa*₃ Oxidase nimmt man an, daß ein Tyr-Ser-Motiv anstelle der nicht konservierten Aminosäure Glu 278 eine Rolle beim Protonenpumpen spielt [Pereira et al. 2001]. In reduziert-minus-oxidiert FT-IR Spektren konnten Hellwig et al. (2002) ein Signal bei 1515 im reduzierten und bei 1498 cm^{-1} im oxidierten Zustand zuordnen. Hier sind die Absorptionsmoden nicht so deutlich ausgeprägt. Auch die $\nu_{7a}(\text{CO})$ und $\delta(\text{COH})$ Schwingung

von Tyrosin-Seitenketten bei $1265/1245\text{ cm}^{-1}$ im protonierten Zustand wurden nur vorläufig zugeordnet: hier kann die entsprechende Mode mit einem negativen Signal bei $1262,3\text{ cm}^{-1}$ assoziiert werden, welches sich bei D_2O Austausch nach $1263,3\text{ cm}^{-1}$ verschiebt. Nichtsdestoweniger ist diese Korrelation nur vorläufig in Anbetracht dessen, daß dieses Motiv zu weit weg vom Reaktionszentrum ist und/oder keiner redox-aktiven Veränderung bei Photolyse unterliegt.

c) Bei der ba_3 Oxidase verschwindet interessanterweise bei D_2O Austausch eine Mode bei 1625 cm^{-1} , während bei 1612 cm^{-1} die Intensität eines Signals zunimmt. Infrarotspektren von isoliertem Lysin zeigen eine Bande bei 1629 cm^{-1} und 1527 cm^{-1} [Venyaminov et al. 1990]. Jedoch ist hier keine zugehörige Verschiebung in der Region um 1527 cm^{-1} zu sehen. Deshalb ist ein Beitrag von protoniertem Histidin wahrscheinlicher, dessen Extinktionskoeffizient in dieser Region höher ist [Hienerwadel et al. 1997].

Tabelle 3-4: FT-IR Banden-Positionen (cm^{-1}) aus CO Photolyse-Experimenten (schattierte Spalte) im Vergleich mit elektrochemisch induzierten FT-IR Experimenten (weiße Spalte).

<i>P.d.</i> <i>aa</i> ₃	Hellwig et. al. 1999a	<i>T.th.</i> <i>ba</i> ₃	Hellwig et. al. 1999b	<i>T.th.</i> <i>caa</i> ₃	Hellwig et. al. 2002	mögliche Zuordnung
	1746	-1744			1744	v(C=O) Asp/Glu
	1734	+1738	1738		--	
				-1714	1714	
	1708			+1710	1708	
-1702		-1703	1708	-1699 -1690		v(C=O) Häm <i>a</i> ₃ -Propionate Amid I (β-Faltblatt)
+1697		+1698	1698			
-1691			1692			
+1687	1688		1688	+1686	1684	
	1684			+1681	1682	Amid I (β-Faltblatt, Schleifen)
-1674,4 (nicht bei pH 8)	1676	-1676	1678		1678	v(C=O) Häm-Propionat; v(C=O) CHO-Häm <i>a</i> ₃ v(CN ₃ H ₅) ^{as} Arg; v(C=O) Asn/Gln
+1667 +1663 -1658	1662	+1670 -1661	1668	-1669 +1664 -1659	1660	v(C=O) CHO-Häm <i>a</i> ₃ (Formyl) Amid I (α-helikale); v(CN ₃ H ₅) ^{as} Arg
+1652	1656/ 1644	+1653	1656	+1651	1650	Amid I (α-helikale) v(C=O) CHO Häm <i>a</i> ₃
		-1649	1646	-1646	1646 / 1636	Amid I (α-helikale) Amid I (β-Faltblatt)
-1639	1632	-1640			1626	δ(NH ₂) Asn/Gln; v(CN ₃ H ₅) ^{sym} Arg Amid I (β-Faltblatt)
		-1632	1630	+1632		v(CN ₃ H ₅) ^{sym} Arg; Lys/His-H Amid I (β-Faltblatt)
			1618	-1625		v(C _α =C _β) Vinyl Gruppe (Häm <i>a</i> ₃) Amid I (β-Faltblatt)
		-1625				His ⁺
1610	1618	+1619	1610	+1610		v ₁₀ (C=C) Vinyl Gruppe; v ₃₇ Häm <i>a</i> ₃ v(C=O) CHO Häm <i>a</i> ₃
			1590			Ring O ⁻ Tyr; His
	1588	+1587		+1586	1580	v ₃₇ Häm <i>a</i> ₃

+1583	1580			-1578		$\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Häm-Propionat ν_{37} Häm a_3 ; ν_{38x} Häm a_3 Ring O ⁻ Tyr; $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Asp/Glu
-1576	1572	-1582	1570	+1570	1562	
+1564	1568/			-1562		
-1558	1564					
+1554	1548/	+1558	1554	+1550	1546	$(\nu_{38y}$ Häm a)*; (resp. ν_{37} Häm b)*
-1549	1546					
+1545						ν_{38y} Häm a_3 ; $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Häm-Propionat
-1532	1564	-1546		-1543	1562	ν_{38x} Häm a/a_3 *; $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Häm-Propionat $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Asp/Glu; $\nu(\text{CC})$ Ring O ⁻ Tyr
	1528	-1529			1530	ν_{38y} Häm a_3 ; $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Häm a_3 Propionat
		-1519	1518	-1520	1515	$\nu_{19}(\text{CC})$ Tyr-OH; Ring Tyr -OH
+1514	1512	+1511	1504	+1512		Ring O ⁻ Tyr
-1478		-1478		-1478		ν_{28} , ν_{39} Häm a_3
+1469		+1466		+1465		
+1464						
-1457				-1456		ν_{39} Häm a_3 ; $\delta(\text{CH}_2)$ -Ring Häm-Propionat; $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
-1444		-1445		-1441		ν_{40} Häm a_3 ; $\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_3)$
+1434		+1435	1434	+1435		$\nu(\text{COO}^-)^{\text{sym}}$ Asp/Glu
	1424		1418	+1424		
+1395		+1403		-1402		$\nu(\text{COO}^-)^{\text{sym}}$ Häm a_3 Propionat $\nu(\text{H}_2\text{C}=\text{C})$ Vinyl Gruppe
				+1394		
-1371	1380	-1374	1380	-1374		ν_{41} Häm a/a_3 * $\nu(\text{COO}^-)^{\text{s}}$ Häm-Propionat
				-1371		
+1365	1364/	+1367		+1363		
	1362					
-1337		+1324		+1333		$\delta_{\text{sym}}(\text{CH}_2=\text{C})$ Vinyl Gruppe
				-1326		
-1307						$\delta(\text{CH}=\text{C})$ Vinyl Gruppe
+1301		-1294		+1307		
+1297						
	1280	-1282	1280	-1281		$\nu(\text{CO}^-)^{\text{s}}$ Tyr
				-1262	1265	$\nu_{7a}(\text{CO})$ Tyr O ⁻
+1251		+1245		+1243	1245	$\nu_{7a}(\text{CO})$ und $\delta(\text{COH})$ Tyr-OH
-1237		-1236		-1236		Ring His-Fe-CO

* Zuordnungen zu Häm a oder Häm b betreffen nur die elektrochemisch induzierten FT-IR Daten

3.2 CO Banden: pH-, thermodynamische und kinetische Eigenschaften

3.2.1 CO Banden von *Paracoccus denitrificans aa₃* Oxidase

3.2.1.1 pH-Abhängigkeit der CO Moden

In Abbildung 3-6 ist die pH-Abhängigkeit der verschiedenen CO Konformere der *aa₃* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* bei 140 K dargestellt. Erstmals beschrieben wurde diese Eigenschaft von Mitchell et al. (1996b) an der *aa₃* Oxidase von *R. sphaeroides*: ein sogenanntes α -Konformer mit der C=O Mode bei 1965,5 / 2063 cm^{-1} wird bei hohem pH bevorzugt besetzt, wohingegen das β -Konformer mit der C=O Mode bei 1952,2 / 2042,6 cm^{-1} bei tiefem pH dominiert. Dies ist offenbar auf eine oder mehrere protonierbare Gruppen in der Nähe des binuklearen Zentrums zurückzuführen, die entweder die Orientierung des CO-Moleküls bzgl. der Hämebene oder die Umgebung selbst leicht ändert.

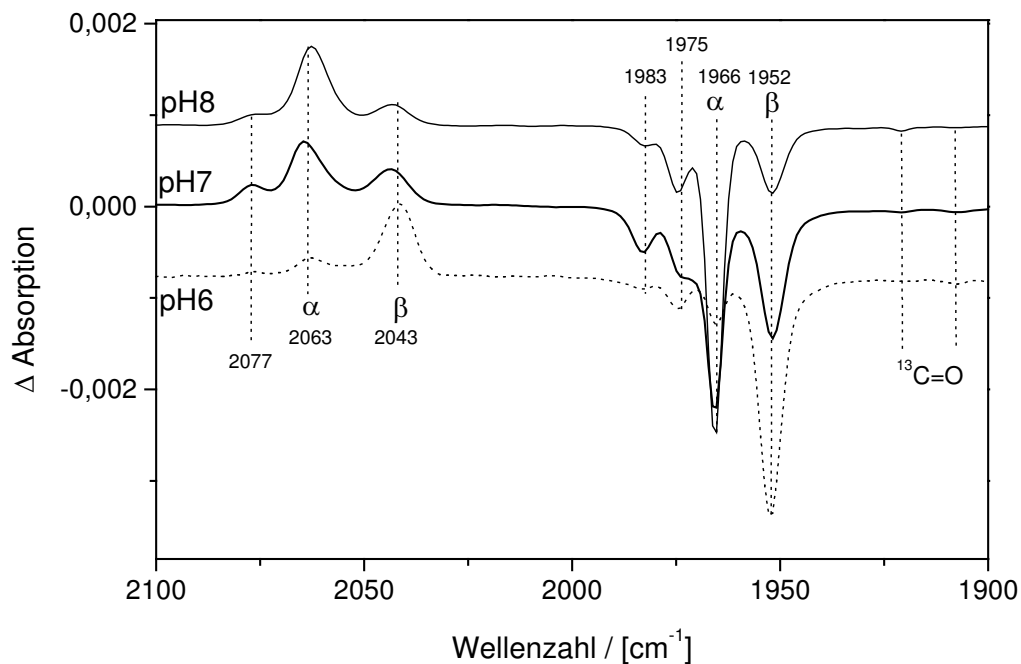


Abbildung 3-6: pH-Abhängigkeit der CO Banden von *P. denitrificans aa₃* Oxidase (140 K): das α -Konformer wird bei hohem pH, das β -Konformer bei tiefem pH bevorzugt populierte. Die entsprechenden Anteile der Konformere am Häm *a₃* gebunden entsprechen denen am *Cu_B* gebundenen.

Den kleineren Banden bei 2077 cm^{-1} (*Cu_B*-Seite) und 1983,2 bzw. 1974,6 cm^{-1} (Häm *a₃*-Seite) ist keine pH-abhängige Systematik zuzuordnen (ihre Population kann vom

Trocknungsgrad der Probe (vgl. Mitchell et al. 1996a) und eventuell auch von der Menge an Reduktionsmittel abhängig sein).

Weder für Rinderherz-Oxidase im Bereich von pH 6.8 bis pH 9.2 [Kitagawa 2000], noch für andere, hier untersuchte Oxidasen im Bereich von pH 6 bis pH 8 (siehe folgende Kapitel) ist solch eine pH-abhängige Population der Konformere zu beobachten.

3.2.1.2 Temperaturabhängigkeit der CO Banden

Eine interessante Verbindung zu den pH-Abhängigkeiten findet sich in der Temperaturabhängigkeit der CO-Bandenpositionen wieder, wie in Abbildung 3-7 dargestellt (siehe auch Tabelle 3-5).

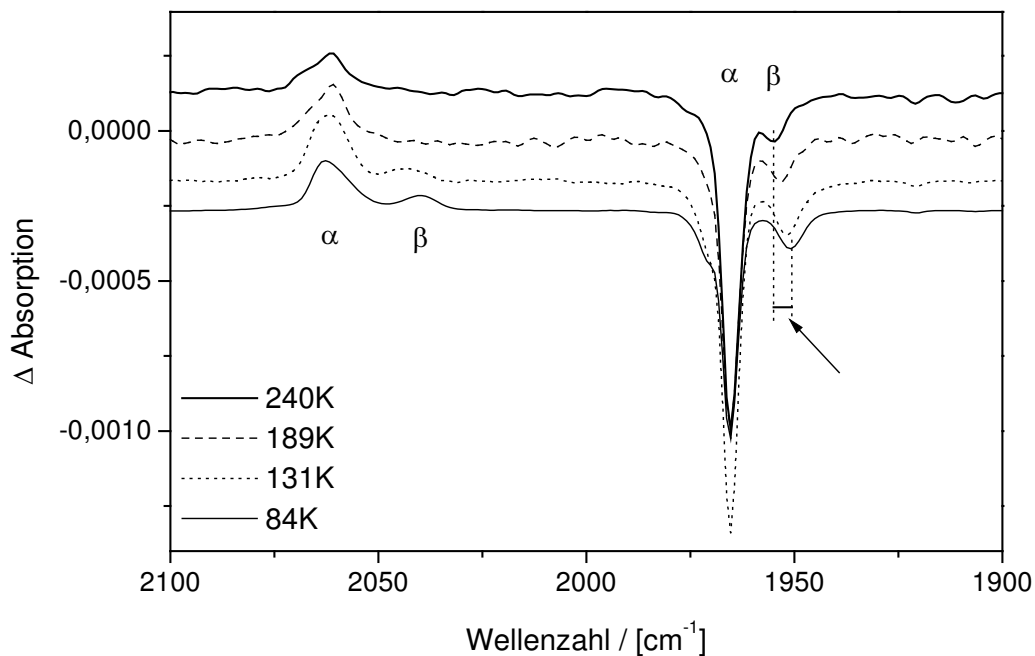


Abbildung 3-7: Temperaturabhängigkeit der CO-Banden: Es sind nur Veränderungen bzgl. der Bandenposition zu sehen; die relative Verteilung der Population der Konformere bleibt hingegen nahezu unverändert; (alle Spektren wurden mit derselben Probe aufgenommen; H₂O; pH=8).

Entsprechend der Nomenklatur nach Mitchell et al. (1996b) und analogen Messungen an der *R. sphaeroides* Oxidase [Mitchell et al. 1996a] werden unterschiedliche Konformere entsprechend ihrer Population bei unterschiedlichen pH-Werten als CO α- und CO β-Form benannt. Auch hier ist eine Korrelation zwischen diesen Konformeren und der Temperaturabhängigkeit ihrer Absorptionsmaxima zu sehen: während das sogenannte CO (β)-Konfor-

mer bei ca. 1952 / 2043 cm^{-1} eine beachtliche Temperaturverschiebung zeigt, was auf eine flexible, bewegliche Umgebung der Bindungsstelle hinweist, bleibt das CO (α)-Konformer bei 1965,6 / 2063 cm^{-1} unverändert auf der selben Banden-Position. Dies läßt auf eine die Bewegungsfreiheit des CO stark einschränkende Umgebung schließen.

<i>P. denitrificans aa₃ Oxidase</i>		
Temperatur	140 K	268 K
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Cu}_B\text{-CO}$	2077	--
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Cu}_B\text{-CO} (\alpha)$	2063	2063
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Cu}_B\text{-CO} (\beta)$	<i>2042,6</i>	---
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Häm } a_3\text{-CO}$	1983,2	
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Häm } a_3\text{-CO}$	1974,6	1975,2
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Häm } a_3\text{-CO} (\alpha)$	1965,6	1965,6
$\nu(\text{C}=\text{O}) \text{Häm } a_3\text{-CO} (\beta)$	<i>1952,2</i>	<i>1955,4</i>
$\nu(^{13}\text{C}=\text{O}) \text{Häm } a_3\text{-CO} (\alpha)$	1921	
$\nu(^{13}\text{C}=\text{O}) \text{Häm } a_3\text{-CO} (\beta)$	1907,5	

Tabelle 3-5: Vergleich der verschiedenen CO Schwingungsmoden und ihre Temperaturabhängigkeit:
fett gedruckt: (α -Konformer); **temperaturstabile Bandenposition**
kursiv gedruckt: (β -Konformer); *Verschiebung der Bandenposition*

Rost (1999) stellt bei Untersuchungen an *P. denitrificans* sogar eine temperaturabhängige Population fest, welche offenbar durch falsches Mitteln der Kinetiken herrührt (wie in Kap. 3.2.1.3 noch dargelegt wird, zeigt das 1955 cm^{-1} -Konformer eine sehr schnelle Rückbindung; bei Mittelung über große Zeitintervalle werden diese Anteile relativ zum 1965 cm^{-1} Konformer falsch gewichtet und erscheinen dadurch unterbesetzt).

Absorptionsbande(n) des ^{13}C O-Isotops

Aus den Abschätzungen für Frequenzverschiebungen, wie sie in Kap. 2.3.2 (Gleichung 2.12) für Isotopen abgeleitet wurden, kann man schließen, daß die Banden bei 1921 und 1907,5 cm^{-1} der um ca. 45 cm^{-1} verschobenem $^{13}\text{C}=\text{O}$ Isotopen-Population des 1965,6 und 1952,2 cm^{-1} Konformers entsprechen, welches zu ca. 1,1% den Anteil an natürlichem CO bildet.

3.2.1.3 Kinetiken der CO Rückbindung bei der *P. denitrificans aa₃* Oxidase

Wie in Kap. 1.2.4 eingeführt, kann man für die Rekombination des Liganden unterhalb der Glastemperatur des Lösungsmittels ein vereinfachtes Zwei-Zustandsmodell annehmen, das erst bei höheren Temperaturen davon abweicht, wenn der Ligand ins Lösungsmittel diffundiert. Die Rückbindung von dort über das Kupfer zurück zum Häm a_3 überlagert sich der direkten („geminalen“) Rückbindung. Für tiefe Temperaturen ergeben sich folgende zwei Zustände:

Der Ligand ist entweder an das Häm a_3 gebunden (A-Zustände), oder er ist am Kupfer-Zentrum gebunden (B-Zustände). Beide Zustände sind durch die Enthalpiebarriere H_{BA} getrennt. Mit dieser ist die Reaktionsrate k_{BA} verbunden.

Prinzipiell sollte der zeitliche Verlust in den B-Zuständen gleich dem Zuwachs in A sein. Man sieht jedoch deutlich, daß die Kinetiken im Falle der aa_3 Oxidase von *Paracoccus denitrificans* davon abweichen, ja sogar die Form der Rückbindung sich mit steigender Temperatur ändert.

Ligandenbindung unterhalb 240 K

Der Rückbindungsprozeß wird über ein Zwei-Zustandsmodell beschrieben. Die Photolyse bricht die Bindung zwischen Eisen und Liganden auf und bewegt diesen zur freien Koordination des Cu_B (B-Zustand). Aufgrund dieser Bindungsstelle ist ein Verlassen des Proteins für den Liganden bei diesen Temperaturen kaum möglich, unterhalb 180 K ausgeschlossen. Aus diesem B-Zustand bindet der Ligand dann unter Überwindung einer Energiebarriere wieder an das Häm-Eisen an. Die zeitliche Entwicklung der Population des A-Zustands ist gegeben durch:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -N(t)k_{BA} + \{1 - N(t)\}k_{AB} \quad \text{Gln. 3.1}$$

oder, da die Rate der Reaktion von A nach B vernachlässigbar ist, als Näherung

$$\frac{dN(t)}{dt} = -N(t)k_{BA} \quad , \quad \text{mit} \quad N(t) = N(t_0) \cdot e^{-k_{BA}t} \quad \text{Gln. 3.2}$$

[Waschipky 2003].

Aufgrund von Konformationsheterogenitäten innerhalb eines Subzustands zeigt die zeitliche Entwicklung einer A-Bande kein exponentielles Verhalten. Das Rückbinden eines Ensembles von Proteinen kann deshalb in der Regel nicht mit einer einzelnen Barriere, sondern nur mit einer Barrierenverteilung beschrieben werden [Johnson et al. 1996] (vgl. Gln. 1.2 und 1.3):

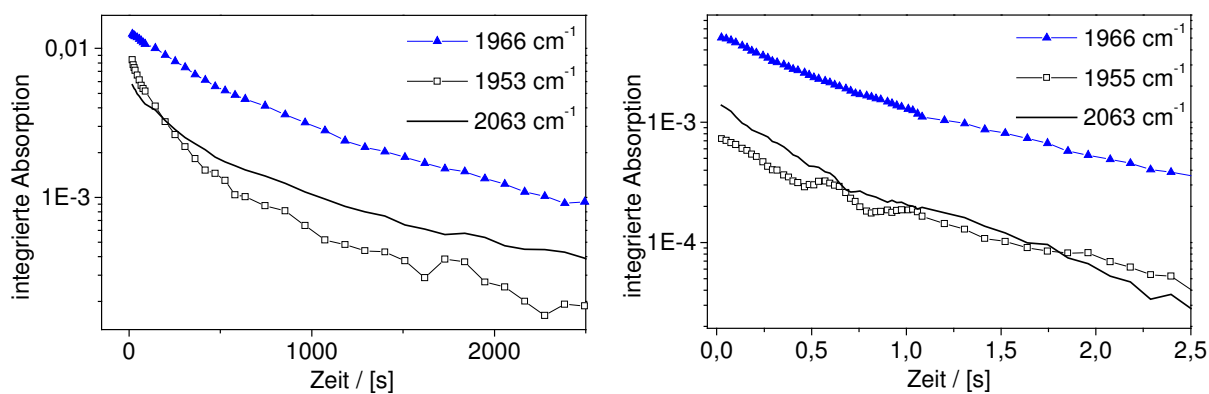
$$N(t) = \int g(H_{BA}) \cdot e^{-k(H_{BA})t} dH_{BA} \quad \text{Gln. 1.2}$$

mit der Arrheniusbeziehung:

$$k_{BA} = A_{BA} \cdot \frac{T}{T_0} \cdot e^{-\frac{H_{BA}}{RT}} \quad \text{Gln. 1.3}$$

Hierbei ist $g(H)$ die Verteilungsfunktion der Energiebarrieren. Im allgemeinen ist diese Verteilungsfunktion temperaturunabhängig, da mit dem Einfrieren der Proteinstrukturen auch die für das Protein charakteristische Rückbindungsenergie festgehalten wird [Waschipyk 2003].

Wie man aus den Rückbindungskinetiken für beide Häm a_3 – CO Konformere (1966 und 1953 cm^{-1}) als auch für die Dissoziation zurück vom Cu_B (2063 cm^{-1}) aus der halb-logarithmischen Auftragung in Abbildung 3-8 sieht, liegt im Falle der *P. denitrificans* Oxidase solch ein heterogenes Ensemble vor. Jedoch zeigt sich in dieser Darstellung für die ersten 30-40% der rückbindenden Population eine gute Annäherung an einen exponentiellen Zusammenhang.



a) 180 K

b) 230 K

Abbildung 3-8: Rückbindungskinetiken der verschiedenen CO Konformere bei 180 und 230 K.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auf eine Analyse über eine Barrierenhöhenverteilung verzichtet und in erster Näherung der Anteil der Kinetiken analysiert, der einer Rückbindung erster Ordnung entspricht (ohne Berücksichtigung von Ensemble-Heterogenitäten und Protein-Relaxationen).

Aus der Ausschnittvergrößerung von Abbildung 3-8a) ist ersichtlich, daß das „Wiederauftauchen“ der CO-Fe-Bindung nicht eindeutig mit dem Verschwinden der CO-Cu_B Population korreliert ist: die Anfangssteigungen weichen klar voneinander ab. Die Bande bei 2045 cm⁻¹ für T=140 K ist bei 180 K nicht detektierbar (vgl. Abb. 3-7). Um eine sehr schnelle Rückbindung dieses Konformers auszu-

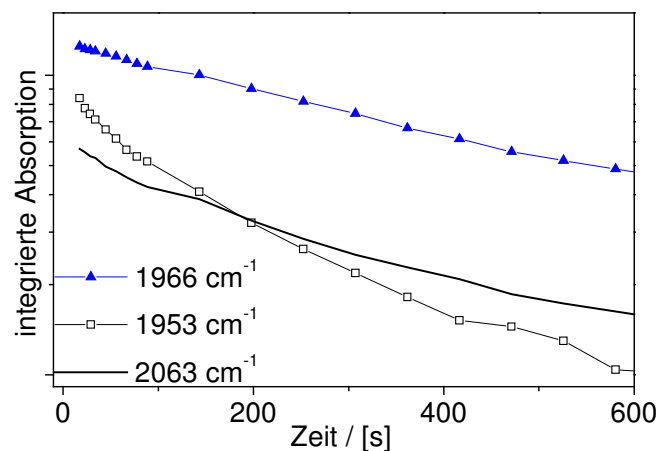


Abbildung 3-9: Ausschnittvergrößerung von Abb. 3-8a): Rückbindung der CO Konformere für 180 K

zuschließen bzw. einzuschränken wurde ein „hell-über-dunkel“ – Spektrum (mit den gegebenen experimentellen Möglichkeiten) mit der Photolyse bei 20 Hz Blitzfrequenz gemessen. Da es auch unter dieser Bedingung nicht auftrat, liegt die Annahme nahe, daß diese Population entweder die Cu_B-Seite innerhalb 50 ms verläßt, ohne sofort an das Häm a₃ zurückzubinden, oder daß sich das Absorptionsmaximum dieser Population bei höherer Temperatur verschiebt und zu einem verbreiterten 2061 cm⁻¹ Konformer wird, wie Abbildung 3-7 andeutungsweise zeigt. So könnte man jene zwei auf der Häm Seite auftauchenden Konformere als Überlappung oder Superposition zwischen einem „dissoziierenden“ 2061 cm⁻¹-CO-Anteil und einer 2045 cm⁻¹ Population interpretieren, welche entweder „unterwegs vom Cu zum Häm“, oder mit der 2061 cm⁻¹ Bande gekoppelt ist. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum das Auftauchen der Fe-CO 1953 cm⁻¹ um so viel schneller ist: sie ist nicht direkt an das gemessene Cu_B-CO Verschwinden gekoppelt.

Daß der Mechanismus der Rückbindung unabhängig von der Temperatur ist, sieht man in Abbildung 3-10: die Form der CO Rückbindungskinetik zeigt über alle Temperaturen keine wesentliche Abweichung.

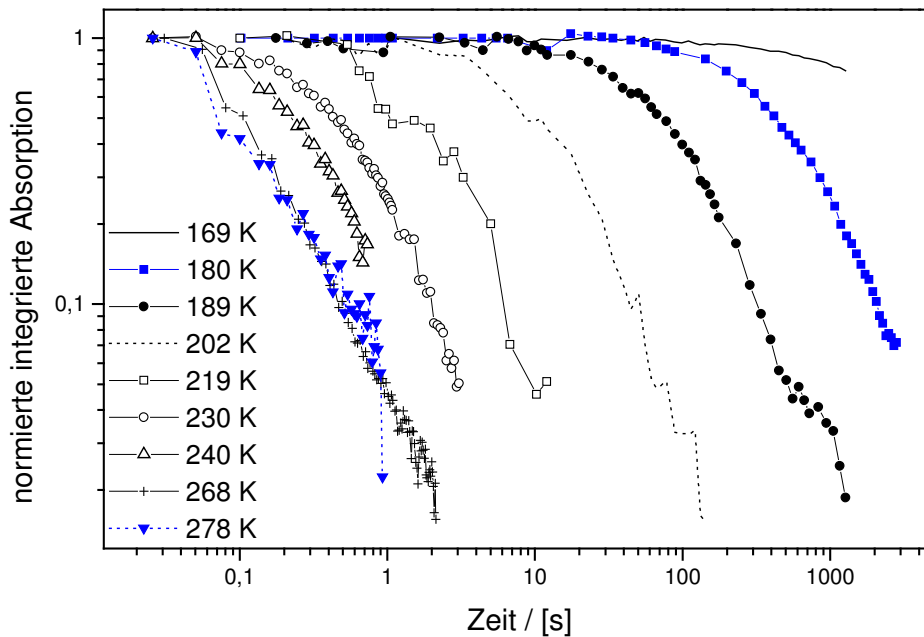


Abbildung 3-10: CO Rückbindungskinetiken für das 1965 cm^{-1} -Konformer bei verschiedenen Temperaturen. Die Normierung erfolgte bzgl. des ersten gemessenen Spektrums.

Der Glasübergang des verwendeten Lösungsmittels liegt im Bereich von 180 K. In diesem Temperaturbereich müssten Veränderungen der Kinetiken beobachtet werden, da das Protein nicht mehr eingefroren ist, sondern der Ligand dieses auch verlassen kann.

Ferner kann das Enzym nach der Photolyse relaxieren und einen energetisch günstigeren Zustand annehmen. Damit ändert sich aber auch gleichzeitig die Energiebarriere für die Ligandenrückbindung, so daß hier nicht länger von einer temperaturunabhängigen Barrierenhöhenverteilung ausgegangen werden kann.

Ligandenbindung oberhalb 240 K

Bei Temperaturen, die oberhalb der Glastemperatur liegen, setzt normalerweise auch der Lösungsmittelprozeß ein. Fluktuationen des Proteins lassen zu, daß der Ligand ins Lösungsmittel entweicht. Dadurch müßte eine Abweichung in den Rückbindungskinetiken zu verzeichnen sein, die auf ein 3-Zustandsmodell hindeuten [Steinbach et al. 1991].

Wie aus der doppeltlogarithmischen Darstellung ersichtlich, ergeben sich bei Temperaturen über 240 K deutlich sichtbare Abweichungen in der Form der Kinetik. Dies ist jedoch in

erster Linie auf die ungenügende Zeitauflösung des Spektrometers zurückzuführen, da die Rückbindung bei hohen Temperaturen nicht mehr schnell genug gemessen werden kann. Das macht auch eine Normierung unmöglich, da man nicht 100% photolysiertes CO messen kann, sondern die Datenaufnahme erst dann beginnt, wenn schon ein Teil des CO zurückgebunden hat. Eine Veränderung der Energiebarriere kann somit nicht quantifiziert werden. Die Enthalpie-Barrierenverteilung müßte bei höheren Temperaturen in eine Delta-Funktion übergehen, da energetisch eine Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Sub-Zuständen möglich wird und das gesamte Proteinensemble schnell genug relaxieren kann. In der Kinetik sieht man infolgedessen nur eine Überlagerung dieser „Eigenschaften“.

Arrhenius-Darstellung

Dem schnellen exponentiellen Prozeß zu Anfang der Kinetiken entspricht jener Anteil CO-Moleküle, deren Energiebarriere für die Rückbindung am niedrigsten ist. Sie können direkt vom Kupfer-Zentrum zurückbinden, ohne von Relaxationen des Proteins selbst beeinflußt zu werden.

In der logarithmischen Darstellung kann man diesen Anteil separieren und mathematisch anpassen. Für Temperaturen über 230 K wird aufgrund der fehlenden Zeitauflösung dieser exponentielle Anteil sehr klein. Dies sieht man deutlich an der Abweichung der Arrhenius-Auftragung für hohe Temperaturen.

Für die Reaktionsrate gilt nach dem Arrheniusgesetz:

$$k = A \cdot e^{-\frac{H}{RT}}$$

$$\Leftrightarrow \underbrace{\ln k}_y = \ln A - \frac{H}{RT} = \underbrace{\ln A}_c - \underbrace{\frac{H}{R}}_m \cdot \underbrace{\frac{1}{T}}_x \quad \text{Gln. 3.3}$$

Somit entspricht der Achsenabschnitt der Regressionsgeraden dem Logarithmus des Arrheniusvorfaktors und aus der Steigung läßt sich bei entsprechender Auftragung die Barrierenhöhe berechnen.

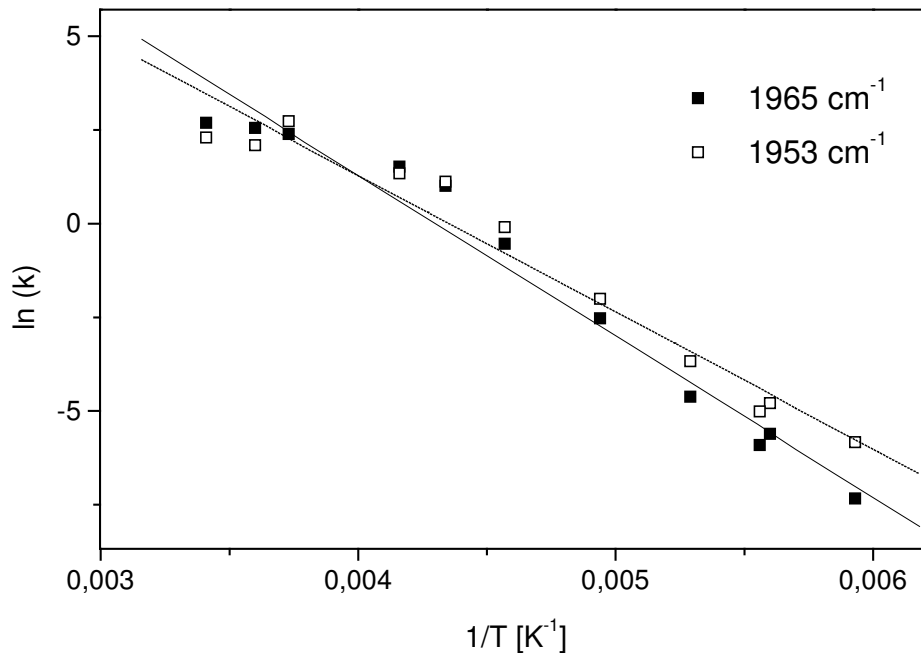


Abbildung 3-11: Arrheniusplot mit Regressionsgeraden für die beiden unterschiedlich schnellen CO Konformere bei 1953 cm⁻¹ und 1965 cm⁻¹. Die Abweichung für höhere Temperaturen wird verursacht durch die limitierte Zeitauflösung der Messung

Aus der Auftragung in Abbildung 3-11 ergeben sich die in Tabelle 3-6 angegebenen Werte. Die zwei CO Konformere mit unterschiedlicher Rückbindungsgeschwindigkeit korrelieren mit unterschiedlichen Barrierenhöhen. Ebenfalls angegeben sind die Werte für das Konformer bei 1975 cm⁻¹, das eher mit einer Unsicherheit behaftet ist, insofern es sich um eine Schulter der 1965 cm⁻¹ Mode handelt und nicht klar separiert werden kann. Ebenfalls aufgeführt in Tabelle 3-6 sind entsprechende Parameter für *R. sphaeroides* und Rinderherz Oxidase.

Klammert man für hohe Temperaturen die auftretenden Meßfehler der Ratenkonstanten in der Arrhenius-Auftragung aus, so ergeben sich Energiebarrieren, die bis zu 8 kJ/mol höher sind. Dies spiegelt den Einfluß der Annahme wider, nicht mit Energiebarrierenhöhen-Verteilungen zu rechnen, sondern nur die schnellsten rückbindenden CO-Populationen zu berücksichtigen.

Oxidase	<i>P. denitrificans aa₃ Oxidase</i>		
$\nu(\text{C=O})$	1953 cm ⁻¹	1965 cm ⁻¹	1975 cm ⁻¹
$\ln(\text{A/s}^{-1})$	15,9±1,2	18,5±1,2	15,2±1,2
H (kJ/mol)	30,4±2,1	35,7±2,2	28,8±2,1
<i>Betrachtet man nur Kinetiken bis 240 K (hohe Temperaturen vernachlässigt):</i>			
$\ln(\text{A/s}^{-1})$	20,9±0,9	23,8±1,0	19,1±1,5
H (kJ/mol)	38,5±1,4	44,2±1,6	35,6±2,6
Vergleichswerte anderer aa₃ Oxidasen			
H (kJ/mol) [ref.]	38,5* (<i>R. sp.</i>) [Mitchell et al. 1996a]	40,1* (<i>R. sp.</i>) [Mitchell et al. 1996a] 40,3 (Rinderherz) [Fiamingo et al. 1982]	---

* berechnet mit einem angenommenen Wert von $A = 10^9 \text{ s}^{-1}$ aus Rinderherz Oxidase [Fiamingo et al. 1982]

Tabelle 3-6: Arrhenius Parameter für CO Ligandenbindung an der *Paracoccus denitrificans* Oxidase und deren Vergleich mit anderen Oxidasen.

3.2.2 CO Banden der *ba*₃ Oxidase von *Thermus thermophilus*

3.2.2.1 pH-Abhängigkeit der CO Moden

Wie in Kapitel 3.2.1.1 schon erwähnt, ist im hier untersuchten Bereich von pH 6 bis pH 8 keine pH-Abhängigkeit der CO Konformere für die thermophilen Oxidase-Typen festzustellen. Ein auffälliges Verhalten wird jedoch bzgl. einer temperaturabhängigen Veränderung der Population der zwei Häm *a*₃-CO Konformere der *ba*₃ Oxidase beobachtet. Mit sinkender Temperatur wird die Bande des 1985 cm⁻¹ Konformers bevorzugt populierte.

3.2.2.2 Temperaturabhängigkeit der CO Bandenpopulationen

Die Fe-CO-Konformere der Cytochrom *ba*₃ Oxidase interkonvertieren sehr schnell (bzgl. der Zeitskala der FT-IR Messungen). Sie liegen energetisch sehr nahe beieinander, wie die Veränderung ihrer relativen Populationen zwischen 140 K und 290 K zeigt (Abb. 3-12). Die Berechnung des thermodynamischen Parameters ΔH für die Interkonversion der zwei Häm *a*₃ Konformere ist aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten möglich, da dies den relativen Flächen der Absorptionsbanden zueinander entspricht.

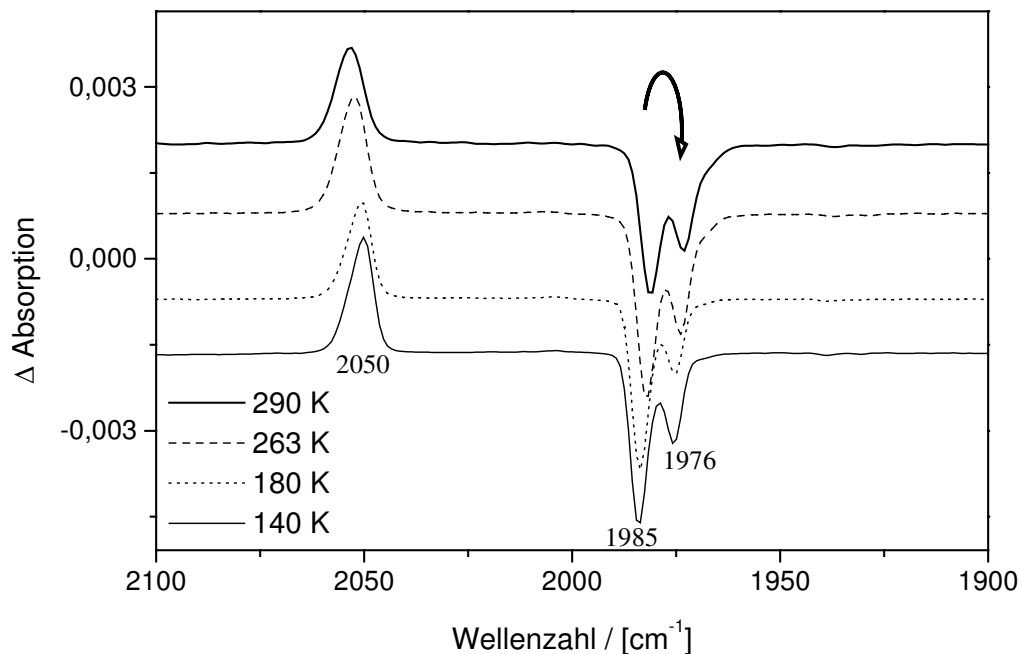


Abbildung 3-12: Infrarot Absorptions-Differenz Spektrum (‘hell-über-dunkel’) der vollreduzierten, CO vergifteten *ba*₃ Oxidase als Funktion der Temperatur.

Die Berechnung führt zu einem Wert für ΔH von $0,4 \pm 0,2$ kcal/mol ($1,7 \pm 0,7$ kJ/mol) und liegt damit in der Größenordnung wie der von Einarsdóttir et al. (1989) ermittelte Wert von $0,3$ kcal/mol, bezogen auf die Konversion der 1983 cm^{-1} – Population in das 1974 cm^{-1} Konformer. Dies bedeutet, daß die Energiebarriere, die im Konformationsraum diese beiden Konformere voneinander trennt, relativ niedrig ist und eine starke molekulare Wechselwirkung begünstigt.

Analog zur aa_3 Oxidase von *P. denitrificans* gibt es auch hier Verschiebungen der Bandenpositionen mit der Temperatur. Diese sind in Tabelle 3-7 aufgeführt, können aber nicht entsprechend voriger Nomenklatur ebenfalls als α/β – Konformer bezeichnet werden, da zu große Abweichungen gegenüber den Bandenpositionen aus *R. sphaeroides* bestehen.

<i>T. thermophilus ba₃</i> Oxidase		
Temperatur	140K	268K
$\nu(\text{C=O}) \text{ Cu}_B\text{-CO}$		
$\nu(\text{C=O}) \text{ Cu}_B\text{-CO} (\alpha)$		
$\nu(\text{C=O}) \text{ Cu}_B\text{-CO} (\beta ?)$	2050,2 2004*	2052,2
$\nu(\text{C=O}) \text{ Häm } a_3\text{-CO}$	1984,6	1982,5
$\nu(\text{C=O}) \text{ Häm } a_3\text{-CO}$	1975,5	1973,9
$\nu(\text{C=O}) \text{ Häm } a_3\text{-CO} (\alpha)$		
$\nu(\text{C=O}) \text{ Häm } a_3\text{-CO} (\beta)$		
$\nu(^{13}\text{C=O}) \text{ Häm } a_3\text{-CO}$	1939	
$\nu(^{13}\text{C=O}) \text{ Häm } a_3\text{-CO}$	1931	
* $\nu(^{13}\text{C=O})$		

Tabelle 3-7: Vergleich der verschiedenen CO Schwingungsmoden und ihre Temperaturabhängigkeit:
fett gedruckt: temperatur-unabhängige Bandenpositionen
kursiv gedruckt: temperaturabhängiges Konformer

Aus diesen Betrachtungen kann man schließen, daß die CO Bindung (und ihr Rückbindungs-Mechanismus (siehe unten)) der aa_3 Oxidasen von *R. sphaeroides* und *P. denitrificans* bzgl. der ba_3 Oxidase sehr unterschiedlich ist: Bei Ersteren bleibt die CO Bandenpopulation

unbeeinflusst von der Temperatur. Daraus kann man folgern, daß eine mögliche Interkonversion durch eine unbekante (strukturelle oder pH-kontrollierte) Eigenschaft unterbunden wird, welche in den thermophilen Systemen fehlt. Auch aus dem Spektral-Bereich, in dem Häm-Propionate absorbieren, kann man aufgrund ausgeprägter Signale auf einen unterschiedlichen Bindungsmechanismus bzw. Abweichungen an der Bindungsstelle schließen.

3.2.2.3 CO Rückbindungskinetiken an der ba_3 Oxidase

Die größten Abweichungen sieht man in der CO-Rückbindungskinetik dieser thermophilen Oxidase in Abbildung 3-13a) bei 180 K, bei der sich das Protein im Glasübergang befindet: Während CO bei den aa_3 Oxidasen von *P. denitrificans* (Kap. 3.2.1.3), *R. sphaeroides* [Mitchell et al. 1996a] und Rinderherz [Fiamingo et al. 1982] in endlicher Zeit zurückbinden, ist der photolysierte Zustand hier stabil.

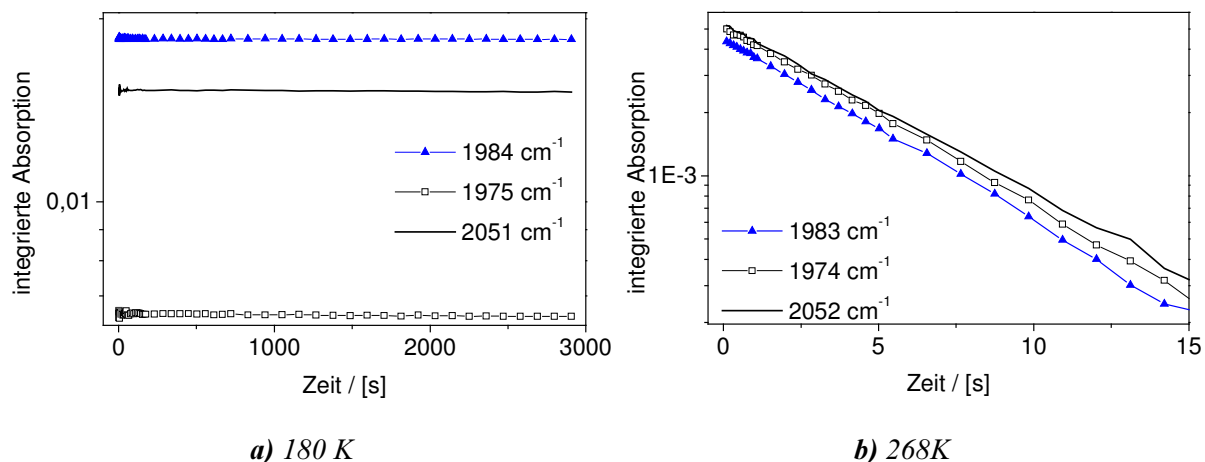


Abbildung 3-13: CO Rückbindungskinetiken bei der ba_3 Oxidase für entsprechende Banden-Positionen bei jeweils angegebenen Temperaturen

Aus Abbildung 3-13b) sieht man, daß das CO Molekül bei 268 K vollständig an das Cu_B bindet: kein CO-Anteil verläßt das Reaktionszentrum und geht ins Lösungsmittel, wie aus der Äquivalenz der Ratenkonstanten für Cu-CO Dissoziation und Fe-CO Rekombination ersichtlich wird. Für die ba_3 Oxidase ist dies bis 310 K der Fall.

Zwei mögliche Gründe sind denkbar:

1) Die Konzentration von an Cu_B -gebundenem CO ist viel kleiner als das freie CO in der Lösung, so daß die Cu-CO Bildung thermodynamisch bevorzugt wird, oder:

2) die Diffusion von CO aus Cu-CO in das Lösungsmittel ist viel langsamer als die kinetisch bevorzugte Bindung zurück zum Häm a_3 . Ergebnisse von Giuffrè et al. (1999) lassen den Schluß zu, daß das Cu_B^+ als effiziente „Falle“ für O_2 wirkt: aufgrund der physiologischen Umgebung des thermophilen Bakteriums - die geringe Löslichkeit von Gas bei höheren Temperaturen - muß eine stärkere Sauerstoff-Affinität den Mangel an „Katalyse-Edukten“ ausgleichen. Ein Analogieschluß bzgl. erhöhter Affinität gegenüber Liganden im allgemeinen und CO im besonderen ist evident.

Arrhenius-Darstellung

Für verschiedene Temperaturen wurden die Rückbindungskinetiken gemessen und die Rückbindungsrate k bestimmt. Dies ist hier einfacher als im Falle der aa_3 Oxidase aus *P. denitrificans*, da – wie aus Abb. 3-13 ersichtlich - die Rückbindung über den ganzen Zeitbereich und für alle Temperaturen streng exponentiell erfolgt. Für das Protein heißt das, daß der Ligand vom Kupfer direkt an das Hämeisen zurückbindet und die Energielandschaft im Konformationsraum des Reaktionszentrum sehr homogen ist. Lediglich eine schnelle Interkonversion zwischen den zwei Häm-CO Konformeren findet statt, charakterisiert durch deren äquivalente Rückbindungsrate.

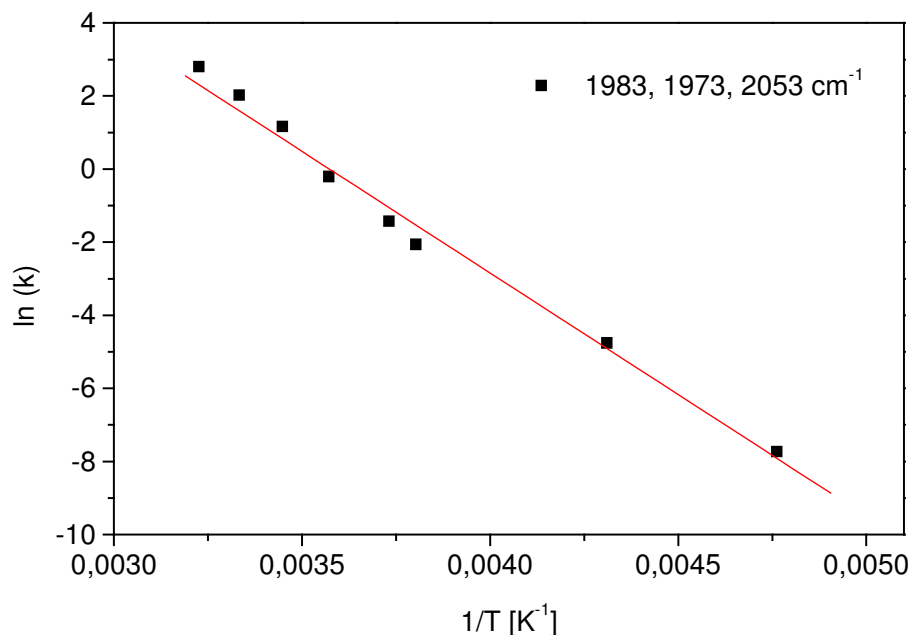


Abbildung 3-14: Arrheniusplot mit Regressionsgeraden für die CO Konformere der ba_3 Oxidase: alle Konformere zeigen die selbe Reaktionsrate, was auf eine schnelle Interkonversion zwischen den Häm-CO Populationen hinweist.

Aus der Regressionsgeraden in Abbildung 3-14 ergeben sich die in Tabelle 3-8 angegebenen Werte. Ebenfalls angegeben sind die aus bereits publizierten Experimenten ermittelten Werte, die in guter Übereinstimmung mit den hier ermittelten liegen.

Oxidase	<i>T. thermophilus ba₃</i>
Moden	1984, 1974, 2053 cm ⁻¹
ln(A/s⁻¹)	24,3±1,0
H (kJ/mol)	56,3±2,2
H (kJ/mol)	62,4 [Einarsdóttir et al. 1989]
[ref.]	53,2±2,5 [Giuffrè et al. 1999]

Tabelle 3-8: Arrhenius-Parameter für die CO Rückbindung an die ba₃ Oxidase. Vergleich mit früher publizierten Ergebnissen.

3.2.3 CO Banden der *caa*₃ Oxidase von *Thermus thermophilus*

3.2.3.1 pH-Abhängigkeit der CO Moden

Wie schon im vorhergehenden Kapitel an der *ba*₃ Oxidase festgestellt, ist auch im Falle der *caa*₃ Oxidase aus *T. thermophilus* keine pH-Abhängigkeit im Bereich von pH 6 bis pH 8 auszumachen. Dies scheint für Oxidasen dieses thermophilen Systems eine spezifische Eigenschaft zu sein.

3.2.3.2 Temperaturabhängigkeit der CO Bandenpopulation

Auch für die *caa*₃ Oxidase kann man eine temperaturabhängige Population der Absorptionsbanden feststellen (Abb. 3-15), wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der *ba*₃ Oxidase: Die Population des 1972 cm⁻¹ Konformers nimmt mit der Temperatur geringfügig zu, die des 1957 cm⁻¹ Konformers wird weniger dominant.

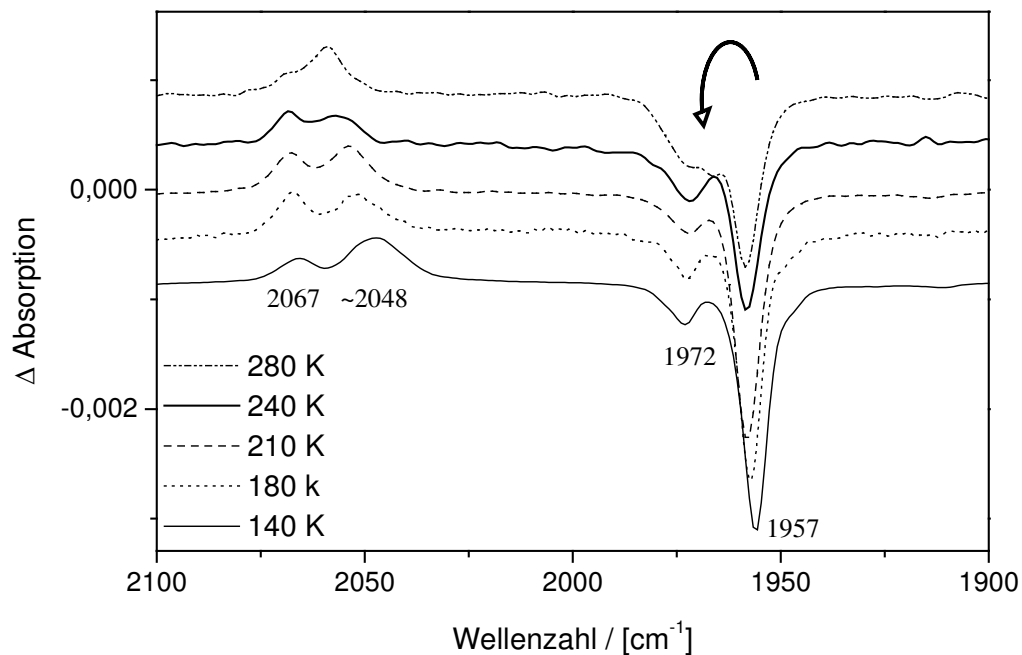


Abbildung 3-15: Infrarot Differenzspektren („hell-über-dunkel“) der vollreduzierten, CO vergifteten *caa*₃ Oxidase als Funktion der Temperatur. (alle Spektren wurden mit derselben Probe aufgenommen; H₂O; pH=8)

Die Energiebarriere, die überwunden werden muß, um vom 1957 cm^{-1} Konformer in das 1972 cm^{-1} Konformer zu konvertieren, wird wie in Kap. 3.2.2.2 über deren relative Bandenflächen ermittelt und liegt bei $\Delta H = 7,2 \pm 4,3\text{ kJ/mol}$, ist also bedeutend höher als im Fall der ba_3 Oxidase; deshalb ist dieser Effekt vermutlich auch nicht so ausgeprägt, wengleich auch eine Interkonversion auf schnellen Zeitskalen möglich ist (siehe unten: CO Rückbindungskinetik).

Die Schlußfolgerungen entsprechen denen zur ba_3 Oxidase: Der CO Bindungsmechanismus ist verschieden von dem der aa_3 Oxidasen aus *R. sphaeroides* und *P. denitrificans*. Die Verteilung der Konformere hat ein Gleichgewicht bei einer bestimmten Temperatur und deren Interkonversion wird durch keine strukturellen oder protonierbaren „Eigenschaften“ behindert.

Analog zu den anderen hier untersuchten Oxidasen gibt es auch hier Verschiebungen der Bandenpositionen mit der Temperatur, welche auf eine flexible bzw. starre (temperaturunabhängige) Umgebung der Bindungsstelle schließen lassen. Diese sind in Tabelle 3-9 aufgeführt und werden entsprechend der Nomenklatur ebenfalls als α/β – Konformer bezeichnet, soweit diese mit analogen Wellenzahlen der CO Konformere aus *R. sphaeroides* übereinstimmen.

<i>T. thermophilus caa₃ Oxidase</i>		
Temperatur	140K	268K
$\nu(\text{C=O})\text{ Cu}_B\text{-CO}$		
$\nu(\text{C=O})\text{ Cu}_B\text{-CO} (\alpha)$	2066	2068,8
$\nu(\text{C=O})\text{ Cu}_B\text{-CO} (\beta)$	2048	2058,7
$\nu(\text{C=O})\text{ Häm } a_3\text{-CO}$		
$\nu(\text{C=O})\text{ Häm } a_3\text{-CO}$	1973	1972
$\nu(\text{C=O})\text{ Häm } a_3\text{-CO} (\alpha)$		
$\nu(\text{C=O})\text{ Häm } a_3\text{-CO} (\beta)$	1956	1958,2
$\nu(^{13}\text{C=O})\text{ Häm } a_3\text{-CO}$	1927,3	
$\nu(^{13}\text{C=O})\text{ Häm } a_3\text{-CO} (\beta)$	1910,6	

Tabelle 3-9: Vergleich der verschiedenen CO Schwingungsmoden und ihre Temperaturabhängigkeit:
fett gedruckt: temperatur-stabile Konformere
kursiv gedruckt: temperaturabhängige Konformere

3.2.3.3 CO Rückbindungskinetiken an der *caa3* Oxidase

Wie in den bisher untersuchten Fällen, kann man auch hier ein vereinfachtes Zwei-Zustandsmodell annehmen und auf langen Zeitskalen den Lösungsmittelprozess (auch bei Temperaturen oberhalb 180 K) außer Acht lassen.

Vergleicht man das Binden des Liganden auf der Häm a_3 -Seite und das Dissoziieren von der Cu_B -Seite, so stellt man eine direkte Rückbindung fest, die mögliche Zwischenzustände ausschließt.

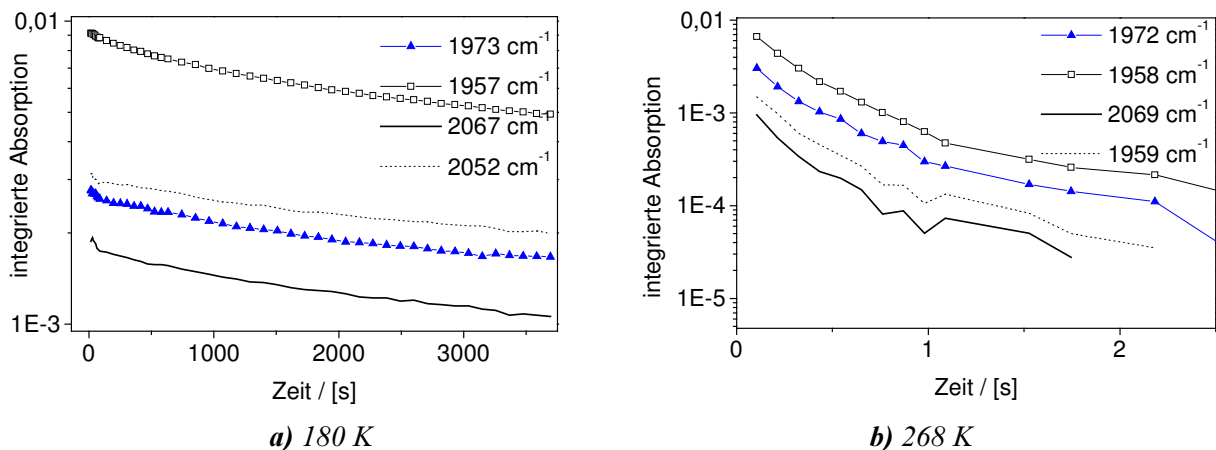


Abbildung 3-16: CO Rückbindungskinetiken an die *caa3* Oxidase.

Abbildung 3-16a) zeigt, daß im Gegensatz zur *ba3* Oxidase die Rückbindung bei der Glastemperatur von ca. 180 K in endlicher Zeit abläuft. Die *caa3* Oxidase ähnelt darin der *aa3* Oxidase von *P. denitrificans*. Eine weitere Übereinstimmung ist bei 268 K zu sehen, bei der für beide Enzyme 97 % der Rückbindung des Liganden innerhalb der ersten zwei Sekunden erfolgen. Aus der unterschiedlichen Form der Kurven ist ein unterschiedlicher Mechanismus anzunehmen. Für tiefere Temperaturen sind diese Abweichungen stärker.

Für die „ersten“ 90% ist ein exponentielles Verhalten sichtbar, das erst auf längeren Zeitskalen davon abweicht. Entweder bindet hier der Ligand aus dem Lösungsmittel zurück, oder interne Protein Übergangs-Zustände und/oder konformelle Reorganisationen finden statt. Eine schwach ausgeprägte Heterogenität des Protein-Ensembles könnte ebenfalls eine Ursache für die Abweichung von einer Reaktion 1. Ordnung sein.

Durch die äquivalenten Rückbindungsraten der verschiedenen Konformere jeweils von *ba3* und *caa3* Oxidase kann auf eine schnelle Interkonversion bzgl. der Zeitskala der FT-IR-Messung geschlossen werden, die sich in einer konstanten Relation der Population der Konformere äußert [Einarsdóttir et al. 1989]. Im Gegensatz dazu wird kein Austausch der *aa3*-CO Konformere beobachtet. Diese sind über den ganzen hier untersuchten Temperatur-

bereich (140-293 K) streng voneinander getrennt und jeder von ihnen zeigt seine spezifischen Aktivierungs-Parameter.

Arrhenius-Darstellung

Da alle CO Moden dieselbe Rückbindungsgeschwindigkeit zeigen, können sie im Arrhenius-Plot zusammengefasst werden. Zur Analyse und Bestimmung der thermodynamischen Parameter wurde das exponentielle Verhalten ausgewertet und die übrigen, sich überlappenden Prozesse für "lange Zeiten" vernachlässigt.

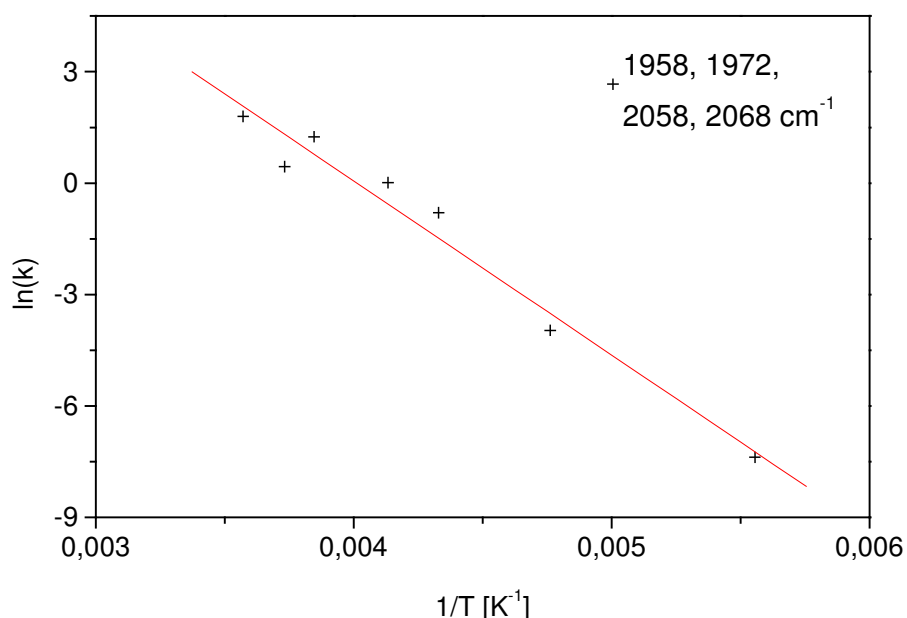


Abbildung 3-17: Arrheniusplot für CO Rückbindung an die *caa₃* Oxidase. Alle auftretenden CO-Konformere, sowohl von der Häm *a₃*-Seite als auch von der *Cu_B*-Seite, zeigen die jeweils für eine Temperatur spezifische Reaktionsrate *k* und können deshalb zusammengefasst werden.

Aus dem Arrheniusplot ergeben sich durch Anpassung mit einer Regressionsgeraden die in Tabelle 3-10 zusammengestellten Parameter. Im Moment sind noch keine aus der Literatur veröffentlichten Vergleichswerte verfügbar.

Oxidase	<i>T. thermophilus caa₃</i>
Moden	1958, 1972, 2058, 2068 cm ⁻¹
ln(A/s ⁻¹)	18,8±1,7
H (kJ/mol)	38,9±3,2

Tabelle 3-10: Arrhenius-Parameter für CO Ligandenbindung. (Bisher liegen noch keine Literaturwerte vor)

3.2.4 Vergleichende Betrachtung der verschiedenen Oxidasen und Resümeec

Abgesehen von strukturellen Ähnlichkeiten und funktioneller Übereinstimmung, wie z. B. bezüglich der Eigenschaft des Protonenpumpens, zeigten die hier untersuchten Cytochrom *c* Oxidasen von *Thermus thermophilus* und *Paracoccus denitrificans* sowohl Unterschiede im Reaktionszentrum als auch Abweichungen, die die dynamischen Aspekte des Liganden betrafen.

Da bei der Photolyse des Liganden nur Strukturen in unmittelbarer Umgebung des Reaktionszentrums angesprochen werden, konnten so Informationen über das Häm a_3 und die Umgebung, in die es eingebettet ist, erhalten werden. Weitere strukturelle Korrelationen, die die Umgebung des Reaktions-Zentrums betreffen, konnten bestimmt werden. Der Vergleich mit elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen und veröffentlichten Daten aus der Resonanz-Raman Spektroskopie erlaubte Zuordnungen zu (de-)protonierten Amino-Säuren wie Aspartat- oder Glutamat- Seitenketten, Häm a_3 und dessen Propionatgruppen sowie des Polypeptid-Rückgrats. Die Auswirkungen des Protonierungsgrades auf das Reaktionszentrum und somit auf den Liganden, Temperaturabhängigkeiten der verschiedenen CO Schwingungsbanden, und die Rückbindungseigenschaften des Liganden nach der Photolyse wurden miteinander verglichen.

Bei Temperaturen oberhalb von 180 K konnten thermodynamische Größen wie Enthalpie-Barrieren und Arrhenius-Vorfaktoren bestimmt werden. Aus dem Verlauf der Rückbindungskinetik ließen sich Rückschlüsse auf die Konformations-Heterogenität ziehen.

Vergleich von CO Moden und Banden im Protein-Bereich

Für die untersuchte ba_3 und caa_3 Cytochrom *c* Oxidase aus *T. thermophilus* zeigte sich, daß eine Änderung des externen pH-Wertes keine Auswirkung auf die Protonierung von Aminosäuren in der Nähe des binuklearen Zentrums hatte, ganz im Gegensatz zu den aa_3 Oxidasen aus *P. denitrificans* oder *R. sphaeroides* (letztere hier nicht untersucht). Dort änderten sich die relativen Populationen von verschiedenen Liganden-Konformationen, was den Einfluß einer protonierbaren Gruppe nahelegt. Titrations an *R. sphaeroides* zeigten anhand einer Henderson-Hasselbalch Analyse (siehe Abb. 3-18), daß es sich sogar um mehrere protonierbare Gruppen handeln muß, die miteinander wechselwirken [Mitchell et al. 1996b].

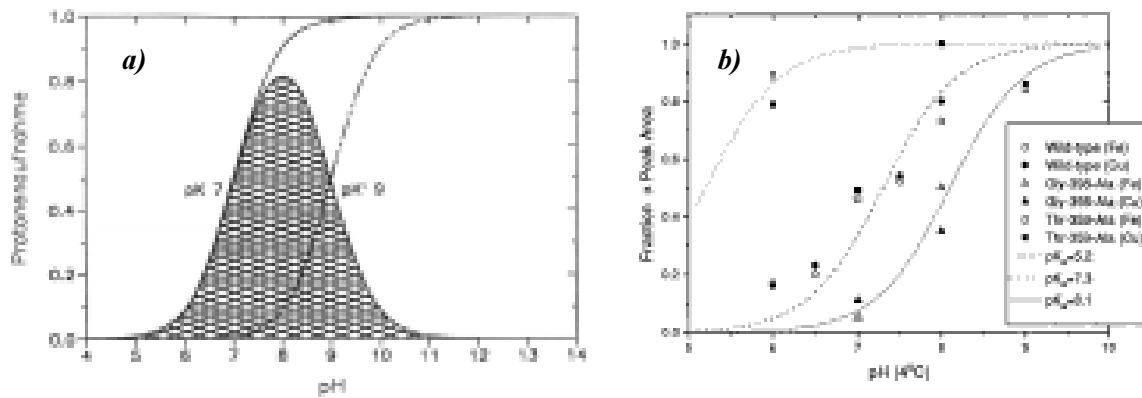


Abbildung 3-18: a) Einfaches (Henderson-Hasselbalch) Modell für die Protonenaufnahme einer protonierbaren Gruppe infolge einer pK -Verschiebung ($pK\ 7 \rightarrow pK'\ 9$). Die pH -abhängige Protonenaufnahme der Gruppe wird durch die Kurve beschrieben, welche die schraffierte Fläche begrenzt [Abb. aus Hienerwadel 1993].

b) Die Angleichung der Meßdaten des CO - α -Konformers aus *R. sphaeroides* an das Modell für nur eine protonierbare Gruppe ist unzureichend [Mitchell et al. 1996b]. Dargestellt sind hier Daten für Wildtyp und diverse Mutanten.

Bei verschiedenen Temperaturen blieb das Verhältnis der Konformer-Populationen der aa_3 Cytochrom c Oxidase von *P. denitrificans* konstant. Frühere Messungen an *R. sphaeroides* führten zu einem gleichen Resultat [Mitchell et al. 1996a]. Offenbar läßt eine Energiebarriere keine Wechselwirkung zwischen diesen möglichen (strukturellen) Zuständen zu.

Bei Oxidasen des thermophilen Systems änderte sich die Population der vorkommenden CO Konformere über den hier untersuchten Temperaturbereich. Es scheint, daß das Enzym (sowohl im ba_3 als auch im caa_3 Oxidase System) eine Gleichverteilung der Besetzungszustände der Konformere bei höheren Temperaturen anstrebt. Bei tieferen Temperaturen (<300K) wird ein ungleiches Besetzungsverhältnis thermodynamisch bevorzugt.

Kinetik

Die Rückbindungskinetiken der Oxidasen aus *Thermus thermophilus* zeigten in beiden Fällen ein Arrhenius-Verhalten mit einer Rückbindung erster Ordnung. Alle Konformere banden bei definierter Temperatur mit gleicher Geschwindigkeit zurück. Dieses Verhalten galt bei allen Temperaturen. Eine mögliche Ursache ist ein schneller Konformationsaustausch zwischen den vorkommenden Populationen, der das Enzym (thermodynamisch) zwingt, ein bestimmtes Verhältnis dieser Anteile aufrechtzuerhalten, bzw. verhindert, daß diese zwei Populationen getrennt voneinander „agieren“.

Im Konformationsraum des Reaktionszentrums kann dies durch zwei Zustände veranschaulicht werden, die durch eine niedrige Potentialschwelle voneinander getrennt sind und einen Austausch erlauben. Die mono-exponentielle Rückbindung weist ferner auf zwei

globale Minima dieser Konformations-Subzustände hin, die ein sehr homogen verteiltes Protein-Ensemble repräsentieren und die stark miteinander interagieren, da das Rückbindungsverhalten der gesamten photolysierten Liganden über den gemessenen Zeitbereich äquivalent war (siehe Abb. 3-19).

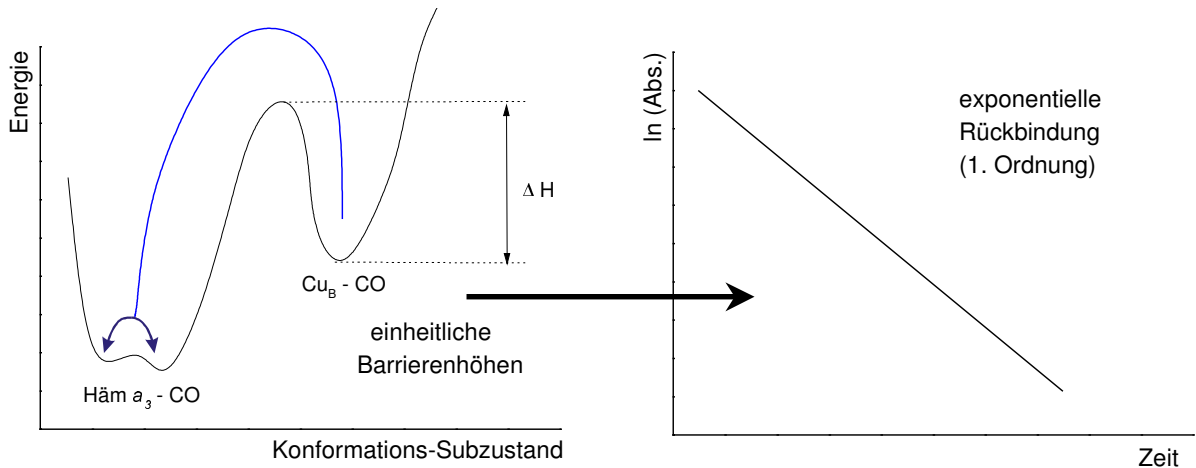


Abbildung 3-19: schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Energiebarrieren-höhen/Konformations-Zuständen und Rückbindung/Zeit für thermophile Oxidasen.

Die nicht-exponentielle Rückbindungskinetik für die aa₃ Oxidase von *Paracoccus denitrificans* komplizierte die Interpretation des Rückbindungsprozesses, wie es bereits vom Myoglobin und seinen Übergangs-Zuständen bekannt ist [Frauenfelder et al. 1989]. Mögliche Erklärungen dafür sind die Liganden-Rückbindung in einen nicht relaxierten Konformationsraum des Proteins bzw. die Betrachtung eines Protein-Ensembles, welches inhomogen verteilt ist [Nienhaus et al. 1994].

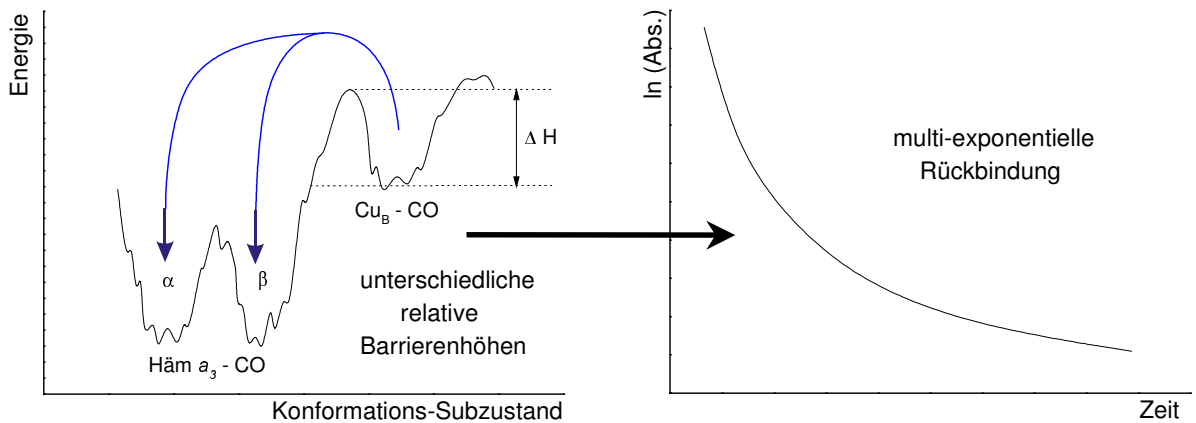


Abbildung 3-20: schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Energiebarrieren-höhen/Konformations-Zuständen und Rückbindung/Zeit für „kanonische“ Oxidasen.

Auffallend war ferner, daß alle vorkommenden CO-Konformere unterschiedlich schnell zurückbanden. Hier war keine Interkonversion festzustellen und qualitativ blieb dieses Verhalten über den gesamten Temperaturbereich erhalten.

Diese Ergebnisse deuten auf eine „rauhe Energieoberfläche“ im Konformationsraum hin, der durch eine hohe Potentialbarriere die Konformere getrennt hält (vgl. Abb. 3-20). Diese besetzen jedoch nur „lokale Minima“ im Konformationsraum, dessen Rauigkeit eine energetische Verteilung (und damit eine Verteilung der Reaktionsraten) innerhalb des jeweiligen Konformers zuläßt.

Die thermodynamischen Parameter für *aa₃*, *ba₃* und *caa₃* Cytochrom *c* Oxidasen sind sehr verschieden voneinander und hängen eventuell mit ihren jeweiligen „Wachstumsbedingungen“ zusammen. Die Energiebarrieren der thermophilen Systeme mit 38,9 kJ/mol (*caa₃*) und 56,3 kJ/mol (*ba₃*) sind wesentlich höher als diejenige für *P. denitrificans* mit ~30-36 kJ/mol, welches bei niedrigeren Temperaturen „arbeitet“. Dies kann auch eine stärkere Bindung an Cu_B widerspiegeln.

Resümee

Die temperaturunabhängige Verteilung der CO-Konformere in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Rückbindungs-Raten der vorkommenden CO-Konformere in der *P. denitrificans* Oxidase verweist auf strukturelle Eigenschaften in der Nähe des binuklearen Zentrums, die den Populationsaustausch unterbinden. Eine pH-Abhängigkeit dieser Oxidase deutet ferner auf eine oder mehrere protonierbare Gruppen hin, welche die unterschiedlichen Konformere in einer definierten Position innerhalb des binuklearen Zentrums fixieren. So könnten beispielsweise verschobene Ladungen oder strukturelle Veränderungen der Umgebung die Bindung des Liganden beeinflussen. Diese strukturell involvierten oder (de-) protonierbaren Aminosäuren scheint es in der entsprechenden thermophilen *ba₃* und *caa₃* Oxidase nicht zu geben.

Die ungewöhnlichen Eigenschaften der *ba₃* Oxidase von *T. thermophilus* könnten eine phylogenetisch bedingte ursprüngliche Adaption des Organismus an extreme Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen und niedrige Sauerstoff-Konzentrationen widerspiegeln, die sich heute als weiterführende Evolution von Energie-Erhaltenden Mechanismen darstellt [Kannt et al. 1998].

3.3 Messungen an Mutanten der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* und ^{13}C -isotopenmarkierten Häm-Propionaten

Wie die Röntgenstrukturanalyse der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* zeigte [Iwata et al. 1995; Ostermeier et al. 1997], liegen die vier Häm-Propionate in Untereinheit I im Wasserstoff-Brückenbindungs-Abstand zu den Aminosäuren-Seitenketten von W87, W164, D399, H403, Y406, R473 und R474 und zu drei Wassermolekülen (siehe Abbildung 3-21). In Tabelle 3-11 sind die Donor-Akzeptor-Abstände der möglichen Wasserstoffbrücken zu den Häm a_3 -Propionaten angegeben.

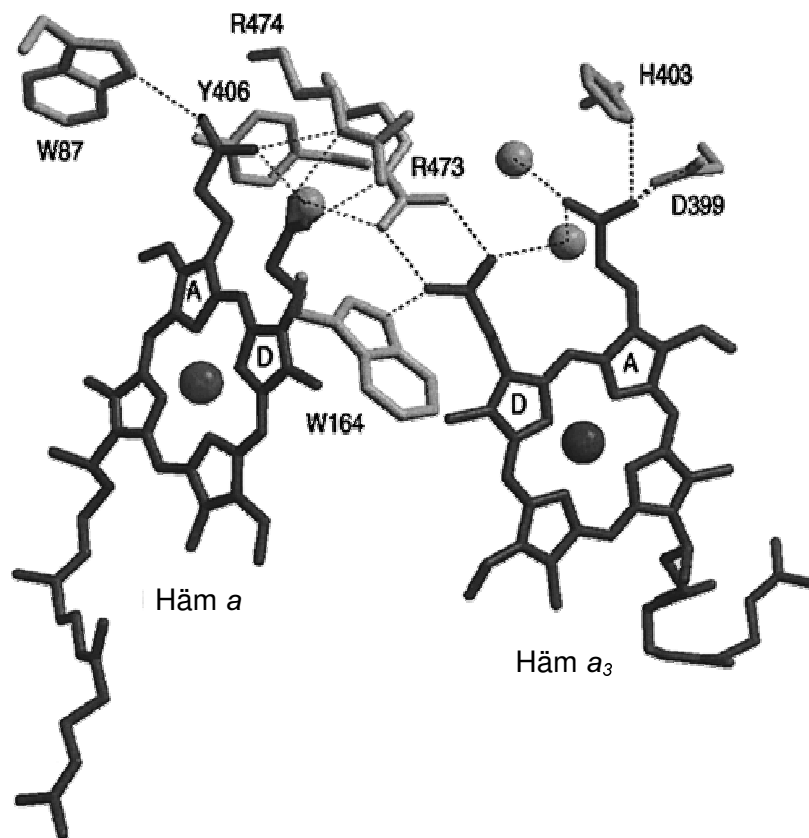


Abbildung 3-21: Die vier Häm-Propionate und deren mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zu den sie umgebenden Aminosäuren-Resten und (drei) Wassermolekülen [Behr et al. 2000].

Um in CO Photolyseexperimenten Absorptionsbanden eindeutig diesen Gruppen zuordnen zu können, wurden verschiedene Strategien angewandt: in bakteriellen Systemen bieten die ortsgerechte Mutagenese und die Isotopenmarkierung die Methoden der Wahl, um Änderungen im Differenzspektrum diesbezüglich zu analysieren und zuzuordnen.

Bei Ersatz einer Aminosäureseitenkette verschwinden deren Beiträge im Spektrum und können deshalb auf diese Gruppe zurückgeführt werden. Jedoch tritt dabei die

Problematik auf, daß a) die eingeführte Aminosäure wiederum zu Absorptionsbanden führt und daß b) aufgrund der Wechselwirkung mit der Umgebung größere strukturelle Änderungen auftreten können, so daß sich nicht nur Beiträge dieser Aminosäure im FT-IR Spektrum ausmachen lassen, sondern zusätzliche Absorptionsbanden auftreten, deren Ursache in Konformationsänderungen oder bei geladenen Aminosäureresten sogar in elektrostatischen Veränderungen des Proteins zu suchen sind*.

Die Isotopenmarkierung verändert hingegen die biochemischen Eigenschaften des Enzyms bzw. die Umgebung einer Aminosäure nicht; je nach Wellenzahl und Isotop führt die Markierung zu einer Verschiebung der jeweiligen Banden, da sich die reduzierte Masse μ der beteiligten Atome und damit die Schwingungsfrequenz ν ändert (Kap. 2.3.2, Gln. 2.11 & 2.12).

Da man in guter Näherung davon ausgehen kann, daß bei diesem Experiment nur Häm a_3 angesprochen wird, wurden nur Messungen an Mutanten vorgenommen, die mit diesem Häm in Zusammenhang stehen. Das Enzym mit isotopenmarkierten Häm-Propionaten sowie die Mutanten R473K und H403A wurden von J. Behr, Arbeitskreis Hartmut Michel, Max-Planck-Institut für Biophysik, zur Verfügung gestellt. Die Mutationen an D399 stammen von Dr. Ute Pfitzner, Arbeitskreis Bernd Ludwig, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt/Main.

Häm-Propionat von Häm a_3	Aminosäure-Rest / Wasser-Molekül	Abstand (Å)
Ring A (O1)	D399 (O δ 1)	3,1
	D399 (O δ 2)	2,7
	H403 (N δ 1)	2,89
Ring A (O2)	H ₂ O	3,09
	H ₂ O	2,65
Ring D (O1)	W164 (N ϵ 1)	3,04
	R473 (NH2)	2,91
Ring D (O2)	R473 (NH1)	3,09
	H ₂ O	3,09

Tabelle 3-11: Abstände der möglichen Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen Häm a_3 - Propionaten und umgebende Gruppen (Tabelle aus [Behr et al.2000]).

* siehe auch Glossar: ortsgerichtete Mutation

Um die Häm-Propionate im IR-Spektrum zuzuordnen, wurden CO-Blitzphotolyse-Experimente (bei 140K, pH=7) an *Paracoccus denitrificans* Cytochrom *c* Oxidase mit isotonenmarkierten Propionaten sowie Mutationen von R473, H403 und D399 durchgeführt. Die erhaltenen Differenzspektren wurden mit denen des Wildtyps verglichen.

3.3.1 Vergleich der Differenzspektren nach CO Photolyse an der vollreduzierten Cytochrom *c* Oxidase vom „Wildtyp“ und dem ¹³C-isotopenmarkierten Enzym

Wie in Kap. 2.3.2 dargelegt, ergibt sich bei Veränderung einer Masse eines schwingenden Systems eine Frequenzverschiebung für die entsprechende Absorptionsbande: eine Erhöhung der reduzierten Masse führt zu einer Verringerung der Schwingungsfrequenz. Diese Eigenschaft wurde dazu benutzt, um über eine Änderung des Absorptionsverhaltens der ¹³C-isotopenmarkierten Hämpropionate auf eine Bandenzuordnung im IR-Spektrum des Wildtyp-Enzyms zurückzuschließen.

Die Hämpropionate sind mögliche Kandidaten, um bei Reduktion des binuklearen Zentrums protoniert zu werden bzw. Protonen zu übertragen und sind damit unter Umständen wichtige Elemente des Protonenwegs. In elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektren mit ¹³C- isotonenmarkierten Paracoccus-Enzym konnte schon gezeigt werden, daß mindestens zwei der vier Propionat-Reste redox-abhängige Veränderungen zeigen [Behr et al. 1998].

Die Differenzspektren nach CO Photolyse des vollreduzierten Enzyms bei 140K und pH=7 sind in Abbildung 3-22a) für die „unmarkierte“ („Wildtyp“) und für die ¹³C-markierte Cytochrom *c* Oxidase dargestellt. In Abbildung 3-22b) ist das Doppeldifferenzspektrum (WT minus ¹³C-markiertes Enzym) für ausgewählte Bereiche gezeigt, in denen mit Verschiebungen von Absorptionsbanden durch Isotopenmodifikation der Häm-Propionate zu rechnen ist. Wie bereits erwähnt, ist bei diesem Experiment aufgrund der CO-Bindung überwiegend mit Veränderungen der Häm *a*₃-korrelierten (zwei) Häm-Propionate zu rechnen.

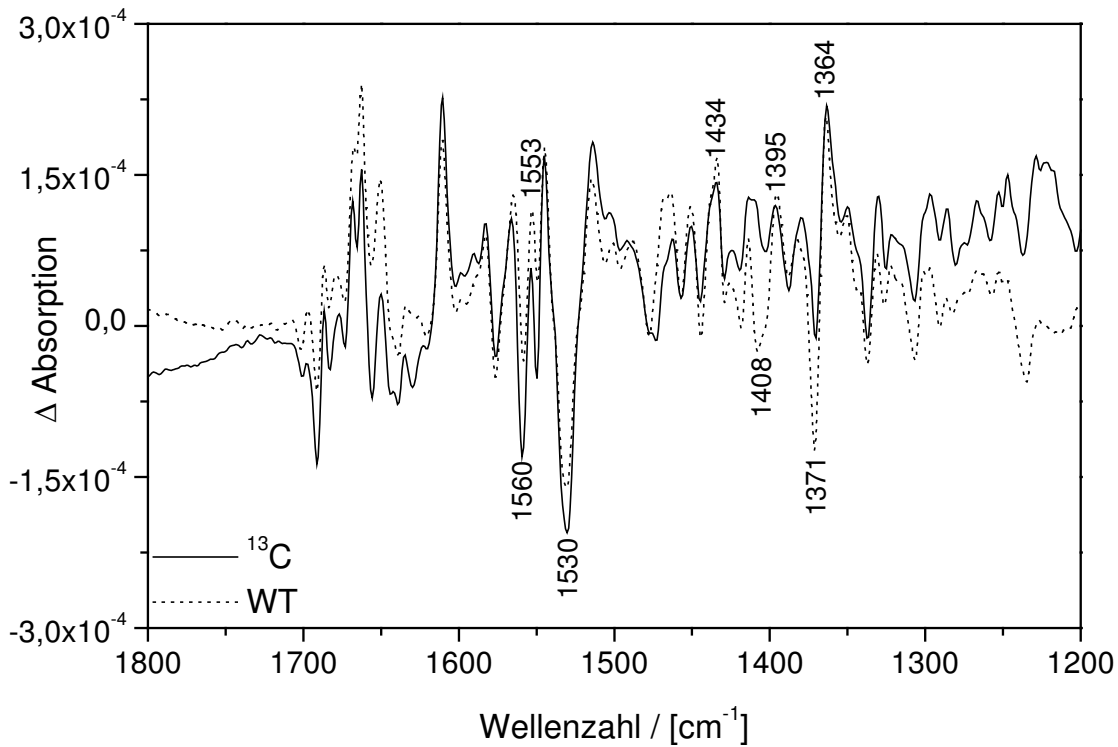


Abbildung 3-22a): FT-IR Differenzspektrum der ^{13}C markierten und der Wildtyp-Oxidase von *Paracoccus denitrificans* bei Photolyse von CO , $\text{pH}=7$, $T=140\text{K}$.

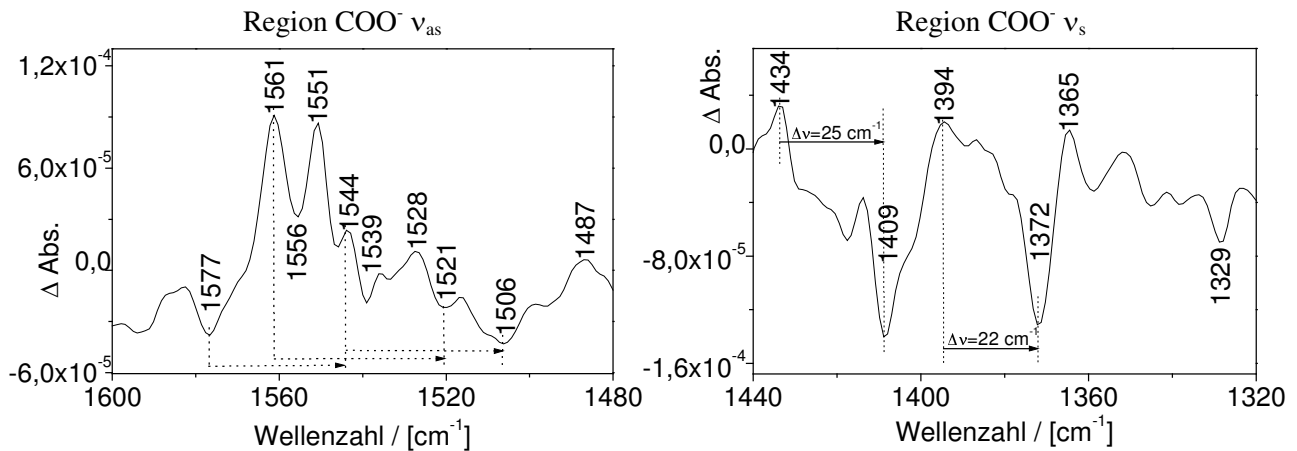


Abbildung 3-22b): Doppeldifferenzspektren (WT minus ^{13}C -markiertes Enzym) von a).

Für einen Austausch von $^{12}\text{COO}^-$ zu $^{13}\text{COO}^-$ läßt sich im spektralen Bereich der ν_{as} eine Verschiebung der Signale um $34\text{-}40\text{ cm}^{-1}$ zu niedrigeren Wellenzahlen berechnen; es sind verschiedene Überlagerungen möglich und mit gestrichelten Pfeilen angedeutet. So könnten sich Absorptionsbanden von 1577 nach 1544 cm^{-1} ($\Delta\nu=33\text{ cm}^{-1}$), von 1561 nach 1521 cm^{-1} ($\Delta\nu=40\text{ cm}^{-1}$) und von 1544 nach 1506 cm^{-1} ($\Delta\nu=38\text{ cm}^{-1}$) verschieben.

Im spektralen Bereich der ν_{s} betragen die Verschiebungen ca. 25 respektive 22 cm^{-1} . Theoretisch ergibt sich ein Wert von $\Delta\nu\sim 31\text{ cm}^{-1}$. Hierbei sind jedoch Wechselwirkungen mit der Umgebung nicht berücksichtigt, die aber innerhalb eines Enzymkomplexes nicht vernachlässigbar sind.

Die Differenzbildung in Abb. 3-22b) (und für alle folgenden Doppeldifferenzspektren (3-23b, 3-24b)) erfolgte nach Normierung auf die Absorptionsbanden bei 1610 und 1687 cm^{-1} . Im Fall der symmetrischen COO^- - Schwingung (Absorption im Bereich von 1420 – 1310 cm^{-1}) ist eine deutliche Verkleinerung der Signale bei 1408 und 1371 cm^{-1} zu sehen, die im Doppeldifferenzspektrum mit einer Zunahme der Moden bei 1434 und 1394 cm^{-1} korrelieren. Die beobachteten Verschiebungen aufgrund des schwereren Isotops liegen bei 25 respektive 22 cm^{-1} (aus Gln. 2.12 ergibt sich theoretisch ein Wert von $\Delta\nu \sim 31 \text{ cm}^{-1}$. Hierbei sind jedoch Wechselwirkungen mit der Umgebung nicht berücksichtigt, die aber innerhalb eines Enzymkomplexes nicht vernachlässigbar sind).

Für den Bereich der antisymmetrischen Schwingung deprotonierter Propionate sind im Bereich 1610 bis 1530 cm^{-1} ebenfalls Veränderungen sichtbar. Diese korrelieren jedoch nicht mit den Verschiebungen der zwei symmetrischen Schwingungen. Möglicherweise verschieben sich hier mehrere Linien ineinander und können so nicht separat zugeordnet werden. Da sich für einen Austausch von $^{12}\text{COO}^-$ zu $^{13}\text{COO}^-$ in diesem spektralen Bereich eine Verschiebung der Signale um 34-40 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen berechnen läßt [Herzberg 1962], sind in Abb. 3-22b) verschiedene Kombinationen möglich und mit gestrichelten Pfeilen angedeutet.

Absorptionsbanden für die protonierte Form der Hämpropionate ($\text{C}=\text{O}$ – Mode der COOH Schwingung) zwischen 1710 und 1693 cm^{-1} konnten nicht näher analysiert werden. Die Schwankungen der Basislinie waren im Bereich der Wasserbande zu stark und überlagerten eventuell vorkommende schwache Moden der Hämpropionate (Im reduzierten Zustand müßten alle Hämpropionate protoniert sein und dürften diesen Redox-Zustand bei CO Photolyse auch nicht ändern).

3.3.2 Vergleich der Differenzspektren nach CO Photolyse an der vollreduzierten Cytochrom *c* Oxidase vom „Wildtyp“ und der Mutante Arg473Lys (R473K)*

Aufgrund von Gen-Sequenz-Vergleichen stellte man fest, daß Arginin 473 (und 474) innerhalb der Familie der Häm/Kupfer-Oxidasen hoch konserviert ist. Eine mögliche Beteiligung am Elektronentransport vom Cu_A zum Häm *a* wird noch diskutiert. Die Mutation von Arginin zu Lysin an dieser Gruppe (Arg473Lys) zeigte jedoch weder einen Einfluß auf die Oxidase-Aktivität noch auf das Pumpen von Protonen [Behr et al. 2000]. Vermutlich kann eine Ausbildung der Wasserstoff-Brücke auch durch den Lysinrest erfolgen.

In Abbildung 3-23a) ist das FT-IR Differenzspektrum nach CO Photolyse bei 140K der R473K Mutante im Vergleich mit dem Spektrum des Wildtyp-Enzyms dargestellt. Mehrere Bereiche, in denen Hämpropionate absorbieren, weisen deutliche Veränderungen auf: Signale bei 1553, 1545 und 1515 cm⁻¹ zeigen eine Abnahme der Intensität. Da Arginine bei ca. 1673 und 1633 cm⁻¹ und Lysinseitenketten bei 1629 und 1526 cm⁻¹ absorbieren, kann die Substitution des Argininrestes nicht die Ursache für die spektralen Veränderungen sein. Eine starke molekulare Wechselwirkung des Lysins mit dem Hämpropionat könnte eine mögliche Interpretation sein. In elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektren wurde analoges Verhalten beobachtet [Behr et al. 2000]. Die Zuordnung erfolgte hier entsprechend zu einem Ring D Propionat von Häm *a*₃.

Im Doppeldifferenzspektrum (Abb.3-23b) sind Verschiebungen für die antisymmetrische Streck-Schwingung der COO⁻-Gruppe analog zum ¹³C-markierten Enzym vorhanden, die eher auf eine Veränderung des Hämpropionats hindeuten. Eine Störung der Struktur in der Umgebung ist angesichts der enzymatischen Aktivität unwahrscheinlich.

Symmetrische Schwingungen der COO⁻-Gruppe absorbieren im spektralen Bereich von 1420 bis 1300 cm⁻¹; dort sind ebenfalls Änderungen auszumachen: Eine Absorptionsbande bei 1383 cm⁻¹ (WT) verschiebt sich nach 1378 cm⁻¹ und nimmt an Intensität zu, während sich eine Bande von 1364 nach 1363 cm⁻¹ und von 1371 nach 1370 cm⁻¹ verschiebt. Im Doppeldifferenzspektrum taucht dies als steile Absorptionsbanden-Kante auf (1366/1373 cm⁻¹ und 1377/1383 cm⁻¹). Es sei hier hervorgehoben, daß im Gegensatz zur oben (Kap. 3.3.1) besprochenen ¹³C-isotopenmarkierten Variante, bei der die Doppel-Differenzsignale an ähnlicher Stelle zu finden sind, dort die Banden nicht aufgrund einer Verschiebung entstehen, sondern einer tatsächlichen Populations-Änderung entsprechen!

* siehe auch Glossar: Mutanten

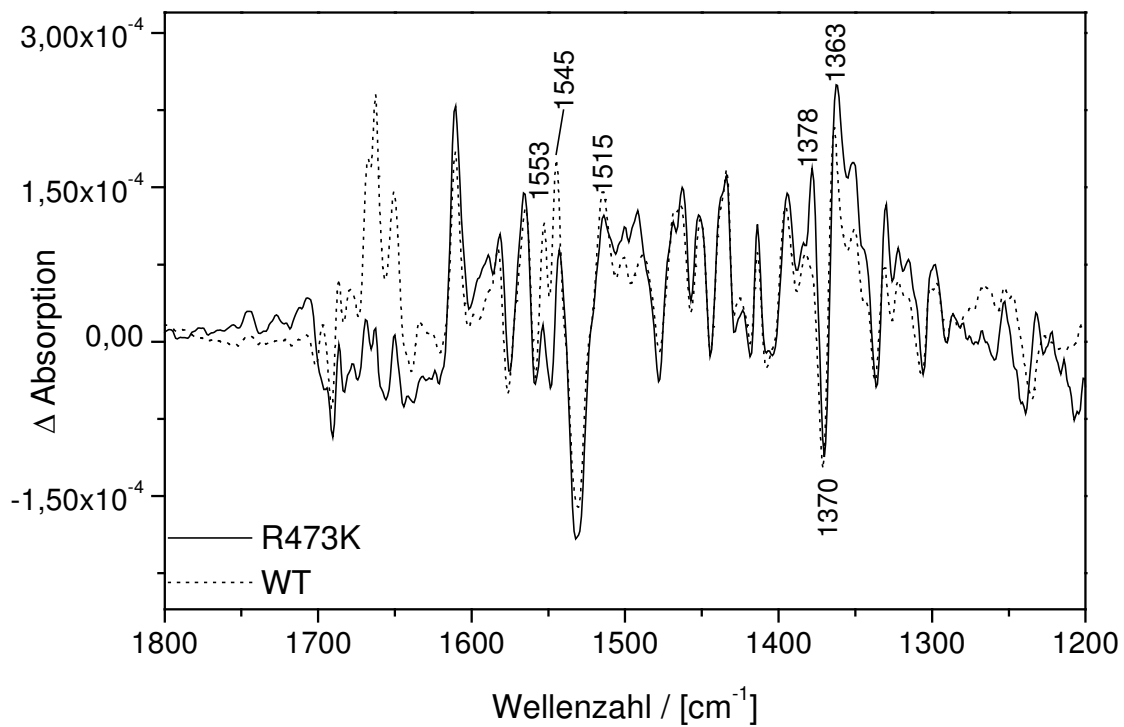


Abbildung 3-23a): FT-IR Differenzspektrum der R473K Mutante und der Wildtyp-Oxidase von *Paracoccus denitrificans* bei Photolyse von CO, pH=7, T=140K.

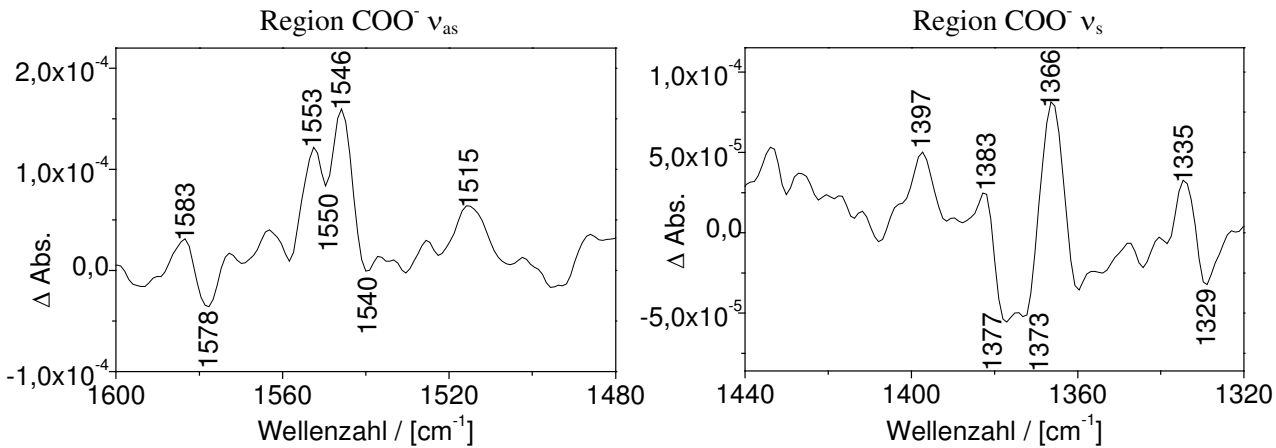


Abbildung 3-23b): Doppeldifferenzspektren (WT minus R473K Mutante) von a). Dargestellt sind ausgewählte Bereiche der deprotonierten Häm-Propionat-Schwingungen.

3.3.3 Vergleich der Differenzspektren nach CO Photolyse an der vollreduzierten Cytochrom *c* Oxidase vom „Wildtyp“ und der Mutante His403Ala (H403A)*

Eine Substitution von Histidin 403 durch ein Alanin zeigte bei Aktivitäts-Messungen an der Cytochrom *c* Oxidase eine enzymatische Aktivität von 59 %, aber eine unveränderte Effizienz des Protonenpumpens. His 403 scheint also für den Mechanismus des Protonentransfers nicht essentiell zu sein [Behr et al. 2000].

Das FT-IR Differenzspektrum nach CO Photolyse bei 140K ist für das Wildtyp-Enzym und die H403A Mutante aus *Paracoccus denitrificans* in Abbildung 3-24a) dargestellt. Veränderungen der Signale bei 1532 cm^{-1} und 1515 cm^{-1} (WT) sind ersichtlich und werden im Doppeldifferenzspektrum verdeutlicht (Abb. 3-24b). Für Hämpropionat-Moden sind diese Absorptionen jedoch zu niederfrequent: Vielmehr deuten diese Banden auf Veränderungen der Häm-Moden selbst hin. Eine Verschiebung der Bande bei 1522 cm^{-1} um 7 cm^{-1} könnte zusätzlich auf eine starke strukturelle Störung der gesamten Umgebung des Häms hindeuten.

Ebenfalls große Unterschiede sind für den Bereich der symmetrischen COO^- -Streck-Schwingung zu sehen: Hier könnte eine Verschiebung der Bande bei 1408 cm^{-1} nach 1395 cm^{-1} (um 13 cm^{-1}) auf eine gestörte, vielleicht aufgebrochene Wasserstoffbrückenbindung hinweisen, ebenso das Auftauchen von zwei Doppeldifferenz-Banden bei 1372 und 1365 cm^{-1} , die aufgrund der "Form einer Ableitung einer Absorptionsbande" von der Verschiebung einer Mode bei 1369 cm^{-1} um $3\text{-}4\text{ cm}^{-1}$ herrühren könnten.

* siehe auch Glossar: Mutanten

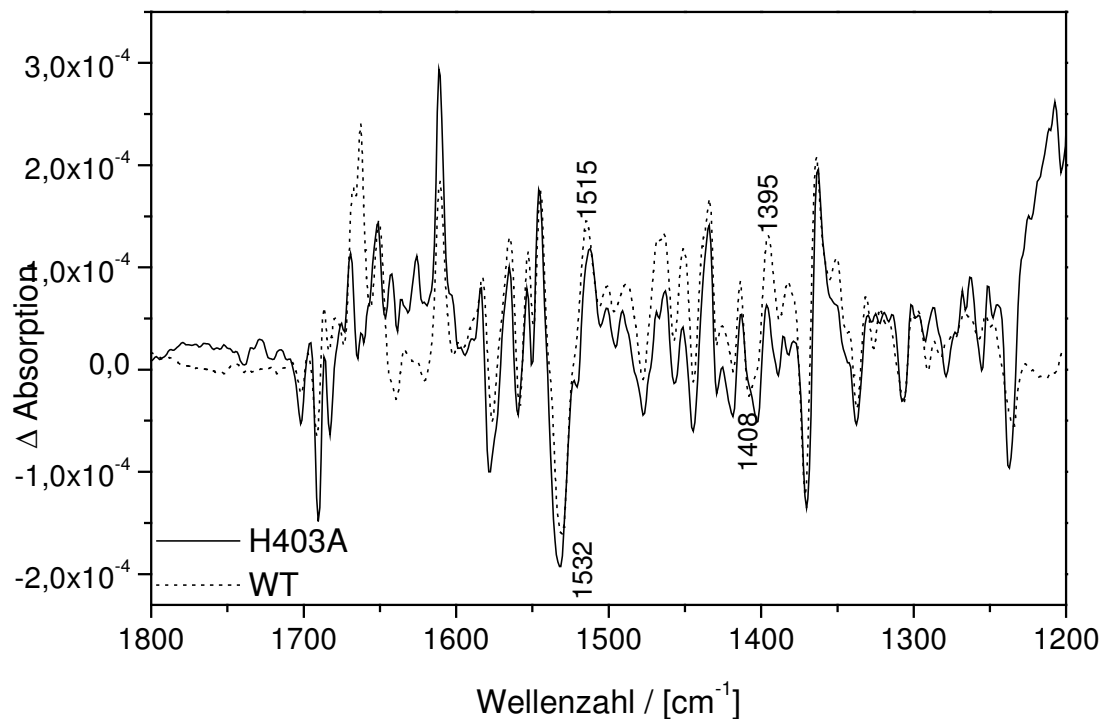


Abbildung 3-24a): FT-IR Differenzspektrum nach CO Photolyse bei 140K, pH=7. Vergleich von Wildtyp mit der His403Ala Mutante

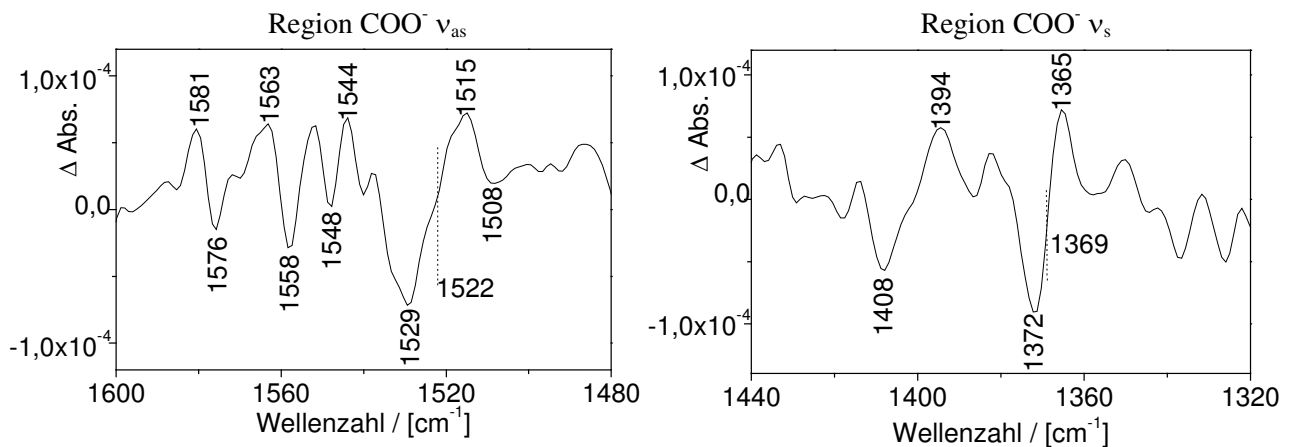


Abbildung 3-24b): Doppeldifferenzspektrum von den in a) dargestellten Spektren.

ν_{as} : Veränderungen bei 1529 und 1515 cm^{-1} deuten hier auf Störungen der Häm-Moden selbst hin. Die Interpretation einer Verschiebung einer Absorptionsbande bei 1522 cm^{-1} um 7 cm^{-1} könnte zusätzlich auf eine strukturelle Störung der gesamten Umgebung des Häms hindeuten.

ν_s : Die Verschiebung der Bande bei 1408 cm^{-1} nach 1395 cm^{-1} um 13 cm^{-1} weist auf eine aufgebrochene Wasserstoffbrückenbindung hin, ebenso zwei Doppeldifferenz-Banden bei 1372 und 1365 cm^{-1} , die aufgrund ihrer Form von der Verschiebung einer Mode bei 1369 cm^{-1} um 3-4 cm^{-1} herrühren könnten.

3.3.4 Mutanten an der Aminosäure Aspartat 399*

FT-IR Differenzspektren nach CO Photolyse

Die Aminosäuren Aspartat und Glutamat sind in isolierter Form bei pH=7 negativ geladen. Innerhalb von Proteinen können sie als Zwischenakzeptoren für Protonen dienen und besetzen auch im Falle der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans* Schlüsselpositionen im Protonen-Kanal (vgl. Kap. 1.1.3.1). Die Aminosäure Asp 399 (*P. denitrificans* Numerierung) befindet sich sowohl im Wasserstoff-Bindungsabstand zum Ring A Propionat von Häm a_3 , als auch in unmittelbarer Nähe zu den Cu_B Liganden His 325 sowie His 326 und an der Schnittstelle von Untereinheit I und II. Aufgrund dessen nimmt man an, daß diese Aminosäure Teil des Ausgangs vom vermuteten Protonenkanal ist [Iwata et al. 1995]. Über ortsgerichtete Mutagenese untersuchte man bereits die Relevanz dieser Aminosäure für die katalytische Aktivität bzw. das Protonenpumpen für Cytochrom *c* Oxidasen von *R. sphaeroides* [Qian et al. 1997] und *P. denitrificans* [Pfitzner et al. 1998; 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurde FT-IR Differenz-Spektroskopie kombiniert mit ortsgerichteter Mutagenese benutzt, um die strukturelle Bedeutung von Asp 399 in der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* zu untersuchen. CO Photodissoziation (bei Temperaturen von 140K) spiegelt ausschließlich die Veränderungen des katalytischen Zentrums der Oxidase wider und war somit eine geeignete Methode, um Störungen gegenüber dem Wildtyp zu analysieren.

Für die Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* wurden drei unterschiedliche Mutationen an dieser Stelle untersucht: Aspartat 399 jeweils substituiert durch Asparagin, Glutamat und Leucin. Einige Angaben zur Charakterisierung der Mutanten seien hier aufgeführt [Pfitzner et al. 1998; 2000]:

Asp399Asn: Die enzymatische und die Protonenpump-Aktivität sind voll erhalten; dies ist auch schlüssig hinsichtlich der Beobachtung, daß in einer Reihe von Oxidasen diese Position durch ein Asn besetzt ist [Pereira et al. 2001].

In der **Asp399Glu** Mutante ist die Seitenkette verlängert und in der **Asp399Leu** Mutante ist die Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbindung vollständig eliminiert. Die Mutanten zeigen einen Rückgang der Aktivität auf 38% respektive 8% relativ zum Wildtyp.

* siehe auch Glossar: Mutanten

Während bei Asp399Glu das Protonenpumpen mit der Stöchiometrie des Wildtyps erhalten bleibt, zeigt die Asp399Leu Mutante kein Protonenpumpen mehr. Somit kann gefolgert werden, daß eine Veränderung der Wasserstoffbrückenbindung auch die Struktur auf signifikante Weise ändert bzw. im Fall von Asp399Leu zu einer massiven Störung oder Aufbrechen des Wasserstoffbrückennetzwerks im Bereich der Häm-Propionate führt [Pfitzner et al. 2000].

FT-IR Differenzspektren im Spektralbereich von 2100-1900 cm⁻¹, induziert durch CO Blitzlichtphotolyse

In Abbildung 3-25 ist das „hell über dunkel“ FT-IR Differenzspektrum bei 140 K dargestellt. Spektren jeweils für pH=6 (durchgezogene Linie) und pH=8 (gepunktete Linie) sind für Wildtyp, Asp399Asn, Asp399Glu und Asp399Leu -Mutanten zu sehen.

Die Streckschwingungen von Häm a_3 gebundenem CO sind als negative Banden bei 1966 und 1953 cm⁻¹ für Wildtyp und an ähnlichen Positionen für die Mutanten zu finden. Die entsprechende Streckschwingung von Cu_B gebundenem CO sieht man analog für alle aufgeführten Fälle bei ca. 2063 und 2043 cm⁻¹. Interessanterweise hatten die 399Glu und 399Leu – Mutanten eine wesentlich geringere Affinität bzgl. Kohlenmonoxid, was wahrscheinlich durch einen Abfall des Mittelpunkts-Potentials des Häm a_3 -Zentrums und/oder strukturellen Änderungen in diesen Mutanten erklärt werden kann: die Reduktion mittels Dithionit erfolgte nur unvollständig und dadurch sank der Anteil der Bindung von CO an die vollreduzierte Form. Die Photolyse des kleinen Anteils tatsächlich gebundenen Kohlenmonoxids reichte nicht aus, um im Differenzspektrum im Proteinbereich ausgeprägte Absorptionsbanden zu verursachen. Nur der Bereich der CO-Absorptions-Banden konnte hier verglichen werden.

Im Gegensatz zum Wildtyp und zur Asp399Asn Mutante kann das photolysierte CO in den anderen hier gezeigten Mutanten das Protein verlassen, was man aus dem Auftauchen von Absorptions-Banden des freien CO bei 2134 cm⁻¹ schließen kann (hier nicht gezeigt). Verbreiterte Banden weisen auf eine flexible Struktur in der Umgebung der Cu_B Seite hin, besonders ausgeprägt in der Asp399Leu Mutante; auch an der Häm a_3 Bindungsstelle zeigen sich erhebliche Störungen.

Die pH-Abhängigkeit der Populationen der CO Konformere ist hier gänzlich unterbunden. Diese Unabhängigkeit der CO Konformere bei unterschiedlichen pH-Werten weist auf eine

Störung in der Nähe des binuklearen Zentrums hin, die durch diese Mutationen (ca. 8 Å vom Histidin-Liganden des Cu_B) induziert werden.

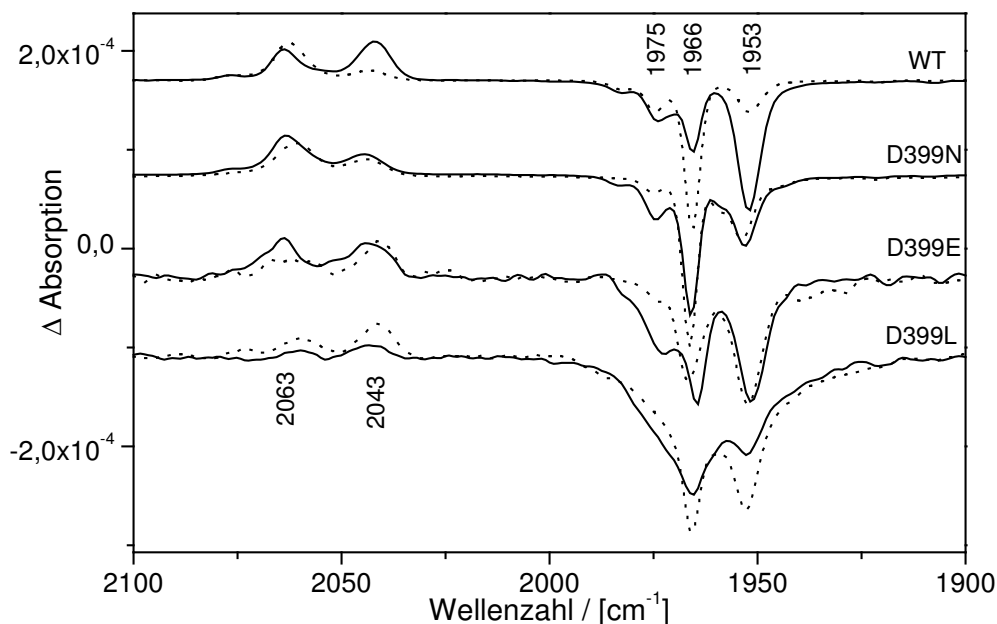


Abbildung 3-25: FTIR Differenzspektrum bei CO Photolyse, 140 K, von Wildtyp, Asp399Asn, Asp399Glu und Asp399Leu Mutanten der Cytochrom c Oxidase aus *P. denitrificans* für pH=6 (durchgezogene Linie) und pH=8 (gepunktete Linie). Gegeneinander verschoben dargestellt ist der Bereich der CO-Streck-Schwingung, normiert auf die Absorption der Häm CO-Moden der Mutanten.

Für weitere Betrachtungen seien hier in Tabelle 3-12 grundsätzliche Parameter der substituierten Aminosäuren einander gegenübergestellt (siehe auch Anhang).

Vergleicht man den strukturellen Parameter der H-Brücken-Bindung mit den Differenzspektren in Abb. 3-25, so sieht man, daß für Aminosäuren, die die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung gewährleisten, jeweils drei Moden der Häm-CO Streck-Schwingung klar ausgebildet sind (WT; E und N – Substituent); bei der Leucin-Mutante ist die 1975 cm⁻¹ Bande erheblich verbreitert. Für einen zusätzlichen Zusammenhang dieses Konformers mit dem CO-Anteil, der das Protein verläßt, bedarf es jedoch weiterer Experimente. Das Auftauchen dieses Konformers scheint jedoch mit der Ausbildung einer H-Brücke zum Häm α_3 -Propionat korreliert zu sein.

Interessanterweise ist dieses CO Konformer generell unabhängig vom pH-Wert, worauf in Kap. 3.2.1.1 schon hingewiesen wurde. Dies ist auch in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß es auch im Falle der D399N Mutante auftaucht, da das eingeführte Asparagin keine geladene Seitenkette hat, die elektrostatisch mit der Umgebung wechselwirken könnte.

	Kettenlänge der eingeführten Aminosäure bzgl. Wildtyp	geladen	Ladung am richtigen Ort	H-Brücken möglich
Wildtyp	(identisch)	ja	ja	ja
D399N	gleich, andere Seitenkette	-	-	ja
D399E	länger	ja	nein	ja
D399L	“größer” und länger; andere Seitenkette	-	-	-

Tabelle 3-12: strukturelle und elektrostatische Parameter der behandelten Mutanten (qualitativ).

Was den Einfluß auf die pH-Abhängigkeit betrifft, so können einige grundsätzliche Punkte zur Diskussion gestellt werden:

Ersetzt man das geladene Aspartat im Wildtyp durch die ungeladene Aminosäure Asparagin, so ist eine Änderung des “Protonierungsverhaltens” (p_K -Wert) nicht nur dieser Gruppe, sondern auch der mit ihr wechselwirkenden Umgebung (da Wasserstoff-verbrückt!) naheliegend (vgl. Abb. 3-18). Gleiches trifft auch auf die Glutamat-Mutation zu, die “alle Voraussetzungen” (H-Brücke, Ladung) erfüllt; aufgrund der längeren Seitenkette ist diese Ladung aber bzgl. ihrer Umgebung anders positioniert.

Der erhöhte Platzbedarf der Leucin-Seitenkette gegenüber dem Aspartat muß starke strukturelle Störungen zur Folge haben, da sich sowohl die Abstände zueinander, als auch die molekularen Wechselwirkungen mit den sie umgebenden Resten völlig verändern.

Trotz der strukturellen und elektrostatischen Abweichungen dieser Mutanten vom Wildtyp ist es dennoch erstaunlich, daß das binukleare Zentrum und dessen Umgebung weitestgehend intakt bleibt, da die CO-Bandenpositionen nur geringfügig voneinander abweichen.

FT-IR Differenzspektren im Spektralbereich von 1800-1200 cm^{-1} , induziert durch CO Blitzlichtphotolyse

Abbildung 3-26 zeigt das FT-IR Differenzspektrum bei CO Photolyse für Wildtyp (gepunktete Linie) und für die Asp399Asn Mutante der Cytochrom *c* Oxidase (durchgezogene Linie) jeweils bei pH=6 und pH=8 von 1800 bis 1200 cm^{-1} . Absorptionsänderungen in diesem Spektralbereich spiegeln Veränderungen im Protein und der Hämumgebung wider.

Der Vergleich der Spektren mit denen des Wildtyps zeigt einige markante Veränderungen. Diese betreffen vor allem den Bereich, in dem Häm-Moden absorbieren (1590 – 1500 cm^{-1}). Aber auch Schwingungsmoden von Asparagin können möglicherweise beitragen.

Ein direkter Vergleich mit Spektren an isoliertem Asparagin zeigt eine potentielle Zuordnung bei 1668 cm^{-1} für die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Mode, bei 1615 cm^{-1} für die $\delta(\text{NH}_2)$ Schwingung und bei 1418 cm^{-1} , die möglicherweise einer $\nu(\text{CN})$ Schwingung zugeordnet werden kann [Venyaminov und Kalnin 1990].

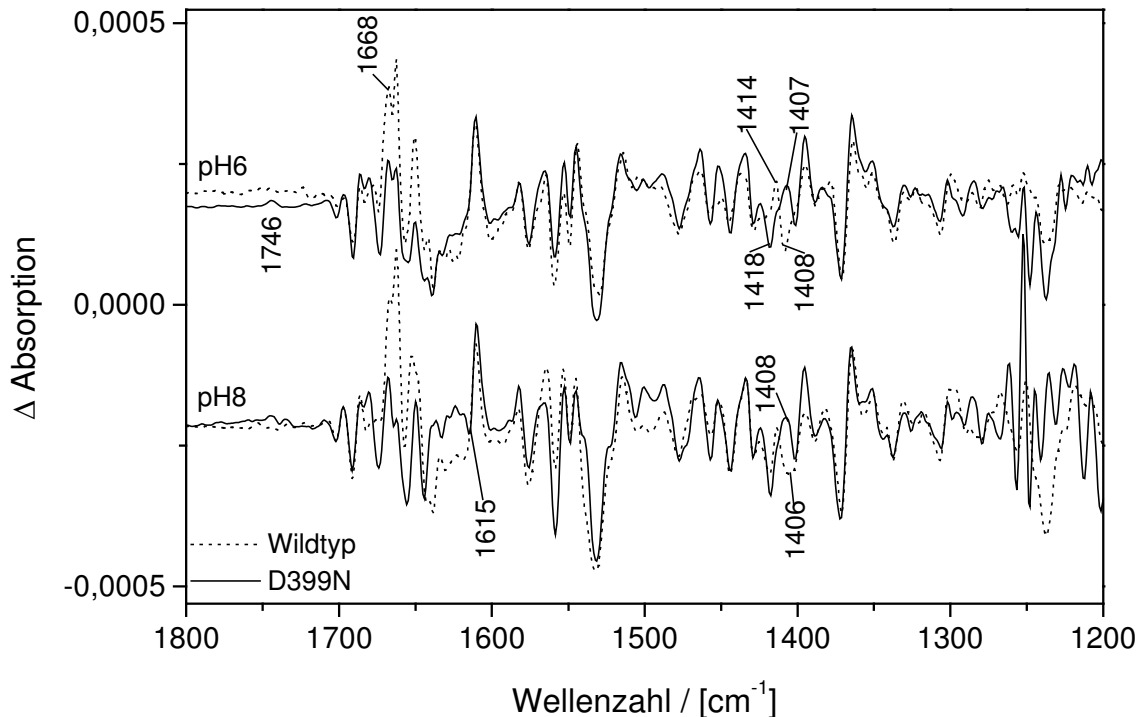


Abbildung 3-26: “hell über dunkel” FT-IR Differenzspektren aufgrund CO Photolyse bei 140K vom Wildtyp (gepunktete Linie) und der Asp399Asn Mutante der Cytochrom c Oxidase (durchgezogene Linie) bei $\text{pH}=6$ und $\text{pH}=8$.

Interessant ist auch das Auftauchen einer Mode bei 1746 cm^{-1} . Dieses Signal gehört offenbar zu einem Aspartat bzw. Glutamat, das im Wildtyp nicht angesprochen wird. Durch die Einführung der Mutante kann dieses nun entweder eine Änderung der Orientierung bzgl. seiner Umgebung vornehmen, die die entsprechende Aminosäure im Wildtyp nicht ausführen kann, oder es findet eine Änderung des Protonierungs-Zustandes statt. Diese Abweichungen sind sowohl im Hinblick auf die hohe enzymatische und die Protonenpump-Aktivität überraschend, als auch im Vergleich zu den eher kleinen Veränderungen im elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektrum [Hellwig et al. 1998], wo Aminosäuren beitragen, die durch die Redox-Reaktion beeinflusst werden. Dies könnte ein Hinweis sein, daß nur die strukturelle Umgebung der CO-Bindungsstelle in dieser Mutante gestört ist, was jedoch keine Auswirkungen auf den Katalysezyklus des Enzyms hat.

3.3.5 Schwingungsmoden von Hämpropionaten und deren Zuordnung mittels Mutanten und ^{13}C -Markierung; Schlußbetrachtung

Um Schwingungsmoden der Hämpropionate im IR-Differenzspektrum zuordnen zu können, wurden sowohl ortsgerichtete Mutationen in deren Umgebung als auch die Auswirkung einer ^{13}C -markierten Variante untersucht und miteinander verglichen.

Bei CO Blitzphotolyse der vollreduzierten Form werden im Gegensatz zur elektrochemisch induzierten Methode keine redoxaktiven Veränderungen initiiert. Deshalb kann man davon ausgehen, daß die gemessenen Signale nur einer strukturellen Umordnung zuzuschreiben sind. Diese Tatsache hat außerdem zur Folge, daß, wenn sich alle Hämpropionate im deprotonierten Zustand befinden, sie das nach Photolyse des Liganden vermutlich auch bleiben. Da der Bereich, in dem die C=O Bindung der COOH Streck-Schwingung absorbiert ($\nu(\text{C}=\text{O})$: 1695-1740 cm^{-1}), von starken Basislinien-Schwankungen überlagert war, konnte diesbzgl. keine Aussage getroffen werden.

Für die deprotonierte Form der Propionate konnten jedoch entsprechende Veränderungen im Bereich für die antisymmetrische Streckschwingung ν_{as} zwischen 1610 cm^{-1} und 1550 cm^{-1} , sowie für die symmetrische Form ν_{s} von 1420 bis 1300 cm^{-1} ausgemacht werden.

Im Falle der ^{13}C -isotopenmarkierten Hämpropionate wurden eindeutige Veränderungen, die Intensität von Absorptionsbanden betreffend, in diesen Spektralbereichen nachgewiesen und konnten zugeordnet werden. Im Bereich der antisymmetrischen COO^- -Streckschwingung überlagerten sich jedoch mehrere Verschiebungen, die für die isotopenmarkierte Form zwischen 34 und 40 cm^{-1} betragen, zu einem komplizierten Muster. Prinzipiell hätten den für die symmetrische Schwingung beobachteten zwei Verschiebungen ebenfalls zwei Verschiebungen im antisymmetrischen COO^- Spektralbereich entsprechen müssen.

Bei den untersuchten Mutanten, die in der Umgebung der Häm a_3 Propionate liegen, ergaben sich weitestgehend Verschiebungen von Banden (Bsp.: R473K), die im Falle von H403A jedoch von deutlich größeren strukturellen Störungen überlagert wurden.

Die Änderungen der strukturellen oder elektrostatischen Eigenschaften an der Position von Asp399 in der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* führten zur Inhibierung der pH-Abhängigkeit der Population der CO Konformere. Diese Abhängigkeit, die über eine protonierbare Gruppe im Wiltyp-Enzym gesteuert wird, war hier unterbunden. Aufgrund struktureller und/oder elektrostatischer Eigenschaften der eingeführten Mutationen ist wahrscheinlich die Wechselwirkung der Cu_B Liganden His 325 oder His 326 mit dieser Gruppe beeinflusst, was anzeigt, daß dieser Rest protonierbar ist. Dies war interessant in

Hinblick auf den in Kap. 1.1.3.1 angedeuteten "Histidin-Zyklus" eines vormals vorgeschlagenen Protonenwegs basierend auf der Lokalisation protonierbarer Gruppen in der Nähe des binuklearen Zentrums [Iwata et al. 1995]. Ferner wurde in früheren Publikationen die Möglichkeit diskutiert, ob eine mögliche protonierbare Gruppe in der Nähe des Reaktionszentrums in die katalytische Funktion involviert oder ob die pH-Abhängigkeit der CO Konformere gar katalytisch relevant sei [Das et al. 2001]. Die vollständig erhaltene enzymatische und Protonenpump-Aktivität der Asp399Asn Mutante und der Verlust der pH-Abhängigkeit zeigten hier jedoch eindeutig, daß unterschiedliche CO Konformere als solches keine Auswirkung auf die Funktion des Enzyms haben.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, daß die Auswirkungen der CO Photolyse am Häm α_3 auf die entsprechenden Hämpropionate wohl eher gering, aber dennoch nachweisbar sind. Kleine strukturelle Veränderungen bei der Photolyse des Liganden wirken sich auch auf deren Umgebung aus, insbesondere, da die Propionate wasserstoffverbrückt sind und mit der Umgebung starke molekulare Wechselwirkung zeigen (was aufgrund der angenommenen Beteiligung bei Prozessen des Ladungs-Transfers naheliegend ist).

Mit den hier vorgelegten Daten wurde letztendlich geklärt, daß Hämpropionate bei der Liganden-Bindung angesprochen werden. Ferner konnten Zuordnungen von Absorptionsbanden in den entsprechenden Spektralbereichen gemacht werden.

3.4 Cytochrom *bd* Oxidase aus *Escherichia coli*

Cytochrome *bd* Oxidase ist wie die bisher behandelten Häm-Kupfer Oxidasen ebenfalls eine terminale Oxidase in vielen Bakterien (Überblick in [Jünemann 1997; Mogi et al. 1998]). Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser über Ubichinol oder Menachinol als natürlichen Elektronen-Donor [Poole et al. 1988; Anraku et al. 1987; Trumpower und Gennis 1994] und zeigt keinerlei Sequenzhomologie zu Häm-Kupfer Chinol Oxidasen. Im Gegensatz zu diesen enthält es kein Kupfer-Zentrum und pumpt keine Protonen [Puustinen et al. 1991].

Cytochrom *bd*-Typ Oxidasen von *Escherichia coli* (oder *Azotobacter vinelandii*) bestehen aus zwei Untereinheiten und beinhalten drei Eisen-Porphyrin Gruppen: ein low-spin Häm *b*₅₅₈, ein high-spin Häm *b*₅₉₅ und ein (Chlorin-Typ) high-spin Häm *d* [Mogi et al. 1998]. Da bisher keine Röntgenstruktur dieses Enzymes vorliegt, gibt es über die Anordnung der redoxaktiven Gruppen nur Vermutungen.

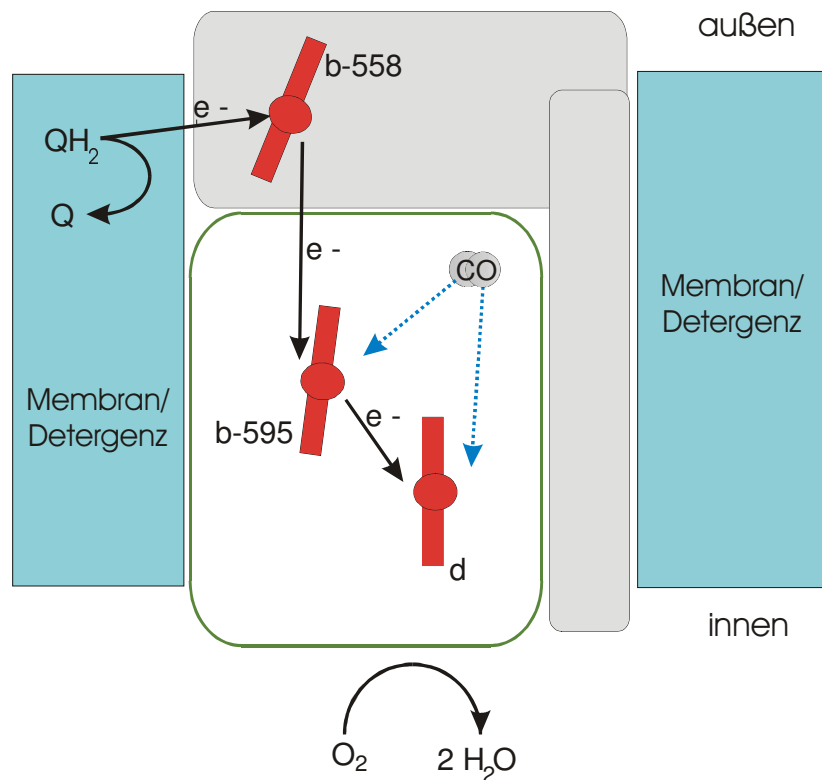


Abbildung 3-27: Schematische Darstellung der Cytochrom *bd* Oxidase. Abgebildet sind die drei Häme, die Chinol-Bindungsstelle und der CO-Ligand.

In Abb. 3-27 ist der schematische Aufbau dieser Oxidase dargestellt: die genaue Lage der Häme ist bisher noch unklar. Häm *b*₅₅₈ ist der erste Elektronen-Akzeptor vom Chinol [Green et al. 1986; Dueweke und Gennis 1991] und Häm *d* ist involviert in die Bindung und

Reduktion von Sauerstoff [Poole 1988]. Die Rolle von b_{595} ist noch nicht geklärt. Die wahrscheinlichste Rolle ist der Transfer von Elektronen von Häm b_{558} zu Häm d [Poole und Williams 1987; Hata-Tanaka et al. 1987; Kobayashi et al. 1999]. Da Häm b_{595} jedoch ebenfalls high-spin ist, ist es möglich, daß es ebenfalls an der O_2 Reduktion beteiligt ist. Es wird angenommen, daß Häm b_{595} und Häm d eine Art binukleares Zentrum analog zu Häm-Kupfer Oxidasen bilden [Rothery et al. 1987; Krasnoselskaya et al. 1993; Hill et al. 1993; Tsubaki et al. 1995]. In diesem Fall ist zu erwarten, daß Häm b_{595} auch mit anderen exogenen Liganden wie CO oder NO reagiert, so, wie es für die meisten high-spin Häm-Proteine typisch ist. Noch widersprechen sich diesbezüglich die bisher publizierten Daten. Sie beruhen zudem auf Experimenten bei verschiedenen Temperaturen und Präparationsmethoden und erschweren dadurch zusätzlich einen direkten Vergleich.

3.4.1 VIS - Spektrum

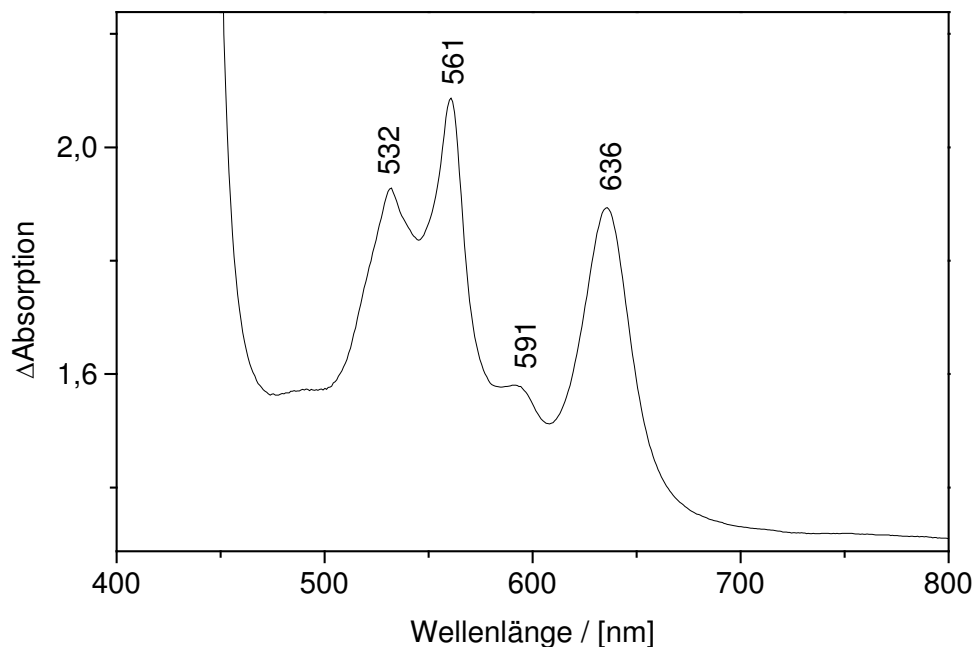


Abbildung 3-28: Absorptionsspektrum der vollreduzierten, CO vergifteten Cytochrom bd Oxidase bei 295 K (H_2O , $pH=7$)

Abbildung 3-28 zeigt das Absorptionsspektrum der CO vergifteten bd Oxidase im sichtbaren Spektralbereich. Deutlich zu sehen sind die von Yamazaki et al. (1999) beschriebenen elektronischen Anregungen des reduzierten Häm b_{558} bei 532 (β -Bande) und 561 nm (α -Bande), sowie des reduzierten Häm b_{595} (ebenfalls) bei 561 nm. Häm b_{595} sollte (dem Namen

nach) auch eine Absorption bei 595 nm haben, die aber, vermutlich aufgrund einer (in Kap. 3.4.2 diskutierten) CO-Bindung, zu 591 nm verschoben ist.

Reduziertes Häm *d* absorbiert bei 628 nm und verschiebt sich bei CO-Bindung zu 636 nm (Hill et al. 1994). Die Banden von 532/636 entsprechen dem Q_x/Q_y Band-Übergang von Häm *d* [bei Borisov et al. 2001: 538/~630nm, (erstere assoziiert wohl eher mit Häm *b*)]. Für 173 K ordnet Borisov et al. (2001) nach CO Blitzphotolyse VIS-Differenz-Banden bei +595/-571 und +556 nm einem high-spin Häm *b* zu, das bei dieser Temperatur den einzigen Effekt zeigt, da die Rückbindung an Häm *d* zu schnell ist, als daß diesbzgl. ein Differenzsignal meßbar wäre.

3.4.2 CO Blitzlicht Photolyse bei 84 K an der vollreduzierten *bd* Oxidase

Da im Gegensatz zu Häm-Kupfer Oxidasen der zweite Bindungspartner fehlt, ist die Geschwindigkeit der Rückbindung des abgeblitzten CO deutlich höher; diese Tatsache ist bereits vom Myoglobin bekannt, wo das CO in eine sogenannte Häm-Tasche „geschossen“ wird, von dort aus es „geminal“ zurückbindet.

Die folgenden Messungen wurden bei einer Temperatur von 84 K unter quasi-kontinuierlicher Photolyse mit Laserblitzen bei 20 Hz gemacht. Damit verschiebt man das Gleichgewicht zwischen abgeblitzter und rekombinierter CO Population in Richtung des photolysierten Anteils und erhält eine „quasi-stationäre Besetzung“ des photodissoziierten CO Anteils.

Abbildung 3-29 zeigt einen Überblick über die CO Differenz-Bande bei verschiedenen pH Werten von 6 bis 8,7. Nach der ersten Photolyse erhält man als Differenzbanden immer zwei Konformere: bei 1984,6 und 1964,4 cm^{-1} , deren Verhältnis im untersuchten Bereich jedoch pH unabhängig ist. Da der zweite Bindungspartner fehlt, findet man die Streckschwingung von CO nach der Photolyse in der Nähe der des ungebundenen CO: bei 2113,9 und 2133,1 cm^{-1} . Aus dem Verhältnis der Populationen zueinander kann man annehmen, daß das 1985 cm^{-1} Konformer mit dem 2133 cm^{-1} und das 1964 cm^{-1} mit dem 2114 cm^{-1} Konformer korreliert ist.

Da die Rückbindung von CO auch bei diesen Temperaturen sehr schnell ist, kann nach Abschalten des Lasers nun ein neues Referenz-Dunkelspektrum genommen werden.

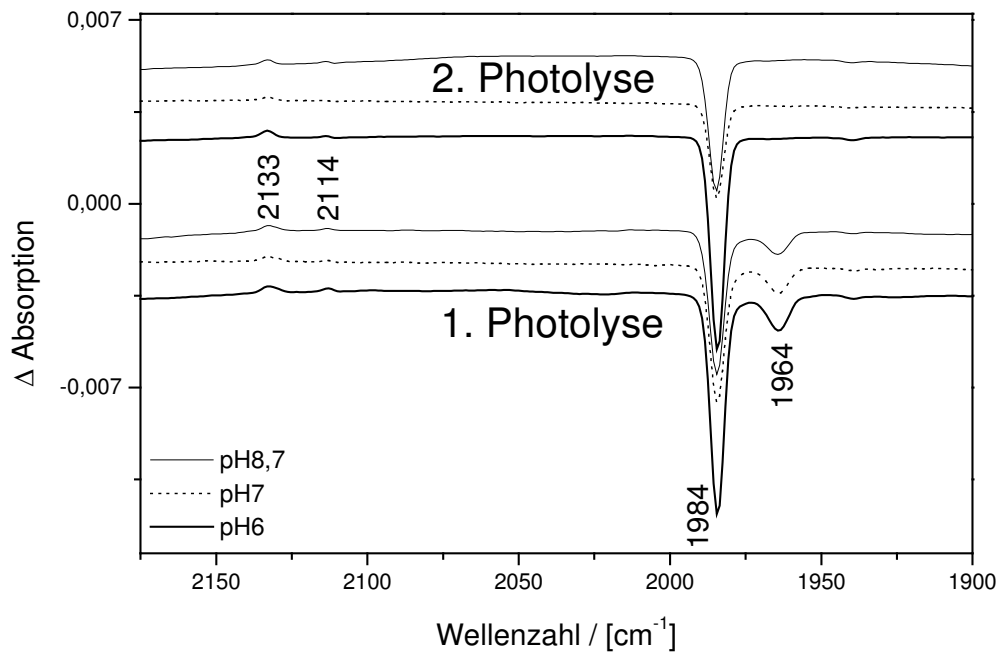


Abbildung 3-29: CO Differenz-Banden bei 84 K. Die Spektren von pH 6 bis pH 8,7 sind gegeneinander verschoben dargestellt.

Bei nochmaliger Photolyse zeigt sich jedoch, daß das $1964,4 \text{ cm}^{-1}$ Konformer vollständig fehlt! Diese Population bindet also bei diesen Temperaturen (84 K) nicht zurück. Die Beobachtung legt nahe, daß diese CO Bindung einen anderen Bindungspartner hat als das $1984,6 \text{ cm}^{-1}$ Konformer, von dem es aus an eine Stelle innerhalb des Proteins gelangt, von wo es erst bei höherer Temperatur zurückbinden kann (wiederholt man das Experiment, indem man die Probe auf Raumtemperatur heizt und erneut abkühlt, so ist dieses zweite Konformer bei der ersten Photolyse wieder zu beobachten). Was ebenfalls dafür spricht, ist die zugehörige Schwingung des ungebundenen CO bei $2113,9 \text{ cm}^{-1}$, die auf eine Koordinierung oder Wechselwirkung dieser photolysierten Population hindeutet: freies CO würde im Bereich von 2140 cm^{-1} absorbieren. Eine weitere Möglichkeit ist, daß dieses Konformer dieselbe Bindungsstelle besetzt, jedoch die Energiebarriere für die Rückbindung zu hoch ist.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an der vollreduzierten CO vergifteten *bd* Oxidase im Bereich der Soretbande zeigen, daß CO an beide Häme, *d* und b_{595} bindet [Poole 1994; Jünemann und Wrigglesworth 1995; Borisov et al. 1999]. Die Bindung an Häm b_{595} könnte hierbei aber auch durch eine Verschiebung von unligandiertem Häm b_{595} herrühren, die durch CO Interaktion mit dem nahegelegenen Häm *d* zustande kommt [Vos et al. 2000].

Messungen mittels FT-IR Spektroskopie bei kryogenen Temperaturen an membran-gebundener *bd* Oxidase von *E. coli* deuteten darauf hin, daß CO zu ca. 15% an das Häm *b*₅₉₅ bindet, jedoch wurde keine solche Bindung im isolierten Enzym beobachtet. Bei den FT-IR Untersuchungen wurde eine Bande bei 1985 cm⁻¹ der Bindung an das Häm *d* zugeschrieben; das in der vorliegenden Arbeit gemessene 1964 cm⁻¹ Konformer wurde gar nicht beobachtet. Allerdings wird dort eine Bande bei 1974 cm⁻¹ einer CO-Häm *b* Schwingung zugeordnet, die beim Rückbinden des photolysierten CO aus einer „Häm-Tasche“ transient besetzt werden soll, bevor der Ligand zum Häm *d* zurückbindet [Hill et al. 1993]; dies kann hier nicht verifiziert werden (vgl. unten: CO Rückbindungskinetik). Unterschiede in der Präparation könnten die Ursache sein. Borisov et al. (2001) schließt aus Messungen im UV/VIS bei 173 K daß der Bruchteil von CO gebundenem Häm *b*₅₉₅ nur ca. 5% des (isolierten) Enzyms beträgt.

Bildet man ein Doppeldifferenzspektrum zwischen der ersten und zweiten Photolysereaktion, so zeigt sich, wie aus Abbildung 3-30 ersichtlich, daß nicht nur das 1964 cm⁻¹ Konformer fehlt, sondern auch ein Anteil des 1984 cm⁻¹ Konformers. Zudem zeigen die damit korrelierten ungebundenen Moden des CO eine Verschiebung von 2 – 3 cm⁻¹, was auf kinetisches Lochbrennen* hindeutet: das Doppeldifferenzspektrum repräsentiert somit den Anteil der kinetisch „langsamen“ Populationen, die offenbar zu einem kleinen Prozentsatz auch die Bindungsstelle an Häm *d* betrifft.

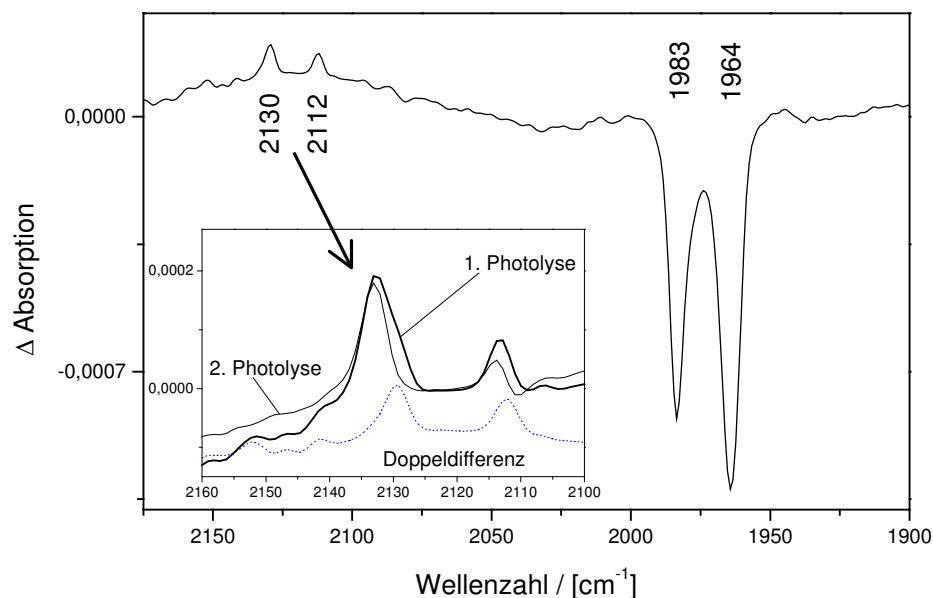


Abbildung 3-30: Doppeldifferenzspektrum zwischen 1. und 2. Photolyse: Für beide Konformere binden CO Anteile nicht zurück. Ausschnitt: Moden des ungebundenen CO zeigen ebenfalls „langsame“ Anteile für beide Populationen im Doppeldifferenzspektrum.

* siehe auch Glossar: kinetisches Lochbrennen

Zur Beschreibung des CO Anteils innerhalb des *b-d* Zentrums gibt es zwei Modellvorstellungen nach Borisov et al. (2001):

- a) beide Häme sind high-spin und nahe zueinander lokalisiert; das CO Molekül ist zwischen diesen beiden Hämen verteilt mit einer höheren Affinität zu Häm *d* [Borisov et al. 1999]. Seine Messungen zeigen ein Verhältnis von ca. 95% CO an Häm *d* und ca. 5% an Häm *b* (der Ligand verbringt „seine Zeit“ nur zu max. 5% an Häm *b*).
- b) die Verteilung des Cytochrom *bd* Oxidase Ensembles ist heterogen derart, daß ca. 95% des Liganden ausschließlich an Häm *d* binden, wobei die restlichen 5% mit Häm *b*₅₉₅ reagieren.

VIS-Messungen von Borisov et al. (2001) sind konsistent mit Modell b), da die Rekombination mit Häm *b* bedeutend langsamer ist als die Rekombination mit Häm *d*. Läge eine Wechselwirkung vor, so würde eine Rückbindung an Häm *d* ebenfalls ein Wiederauftauchen des Liganden an Häm *b* implizieren.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten sprechen ebenfalls für Schlußfolgerung b).

Um eine Abschätzung über die Rückbindungsgeschwindigkeit und Anteile der jeweiligen Konformer-Population zu erhalten, wurden die Differenzspektren von CO gebundenem bzw. photolysiertem Enzym relativ zum „leeren“ Einkanalspektrum ausgewertet (vgl. Abb. 3-31). Die CO Absorptionsmode bei 1964/1984 cm⁻¹, die die Bindung an Häm repräsentiert, muß bei Photolyse vollkommen verschwinden.

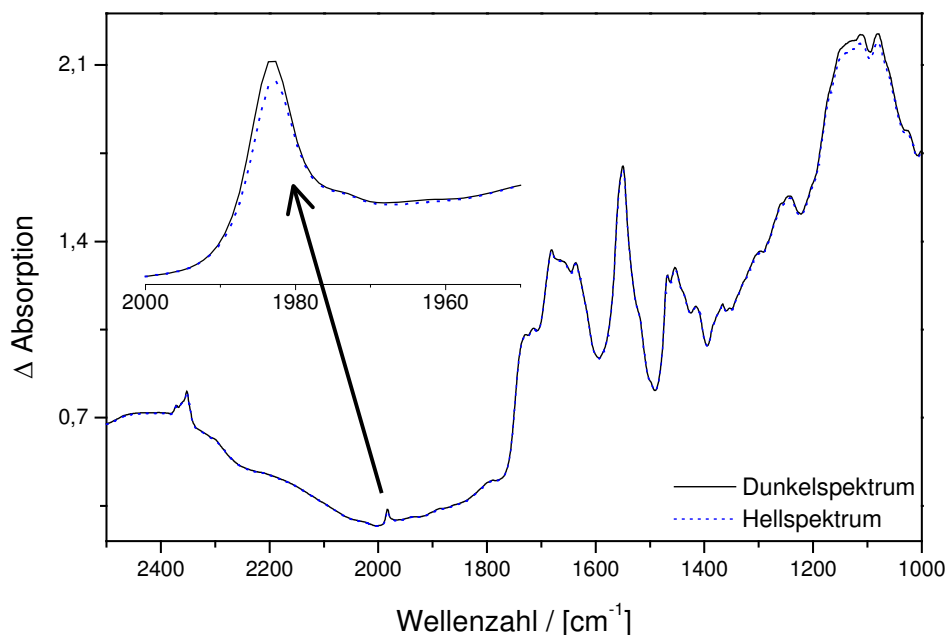


Abbildung 3-31: Absorptionsspektrum über den gesamten Messbereich des CO vergifteten Proteins. Die Ausschnittvergrößerung zeigt den Bereich, in dem das ans Häm (*b/d*) gebundene CO absorbiert. Bei Photolyse verschwindet diese Bande an dieser Stelle nur zu 10% (Hellspektrum).

Über die Analyse dieser Bande wurde berechnet, daß bei einer Photolyserate von 20 Hz., d. h. 50 ms nur 10% dieser Absorption fehlen, d. h. das Differenzspektrum repräsentiert nur 10% des gesamten „Ereignisses“. Das Reaktionsgleichgewicht liegt also zu 90% auf der Seite des bereits zurückgebundenen CO. Über Integration der Moden im IR ergeben sich die Anteile des CO Konformers an Häm *b* danach zu 2 – 3 %.

3.4.3 Protein Bereich bei CO Photolyse

Bei Photolyse des CO sind sowohl Reorganisationen des gesamten Proteins beteiligt, als auch die Protonierung/Deprotonierung von einzelnen Aminosäuren. In Abbildung 3-32 sind Veränderungen im Amid I Bereich ($1690 - 1620 \text{ cm}^{-1}$) zu sehen, die dem Polypeptid Rückgrat zuzuordnen sind. Die Amid II Region ($1570 - 1520 \text{ cm}^{-1}$) spiegelt gekoppelte C-N Streck- und N-H Biege-Moden sowie Banden von aromatischen Aminosäuren und Häm C=C Moden vom Porphyrin-Ring wieder. Die Häm-Moden sind hier jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den bisher untersuchten Oxidasen.

Aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten mit Resonanz-Raman Daten sind hier genauere Zuordnungen weitaus schwieriger, als im Falle von *Paracoccus denitrificans* oder *Thermus thermophilus* in Kap. 3.1.3. Auffällig ist jedoch das große Signal bei $1754/1749 \text{ cm}^{-1}$, das COOH-Moden repräsentiert. Diese werden ausführlich im nächsten Kapitel diskutiert.

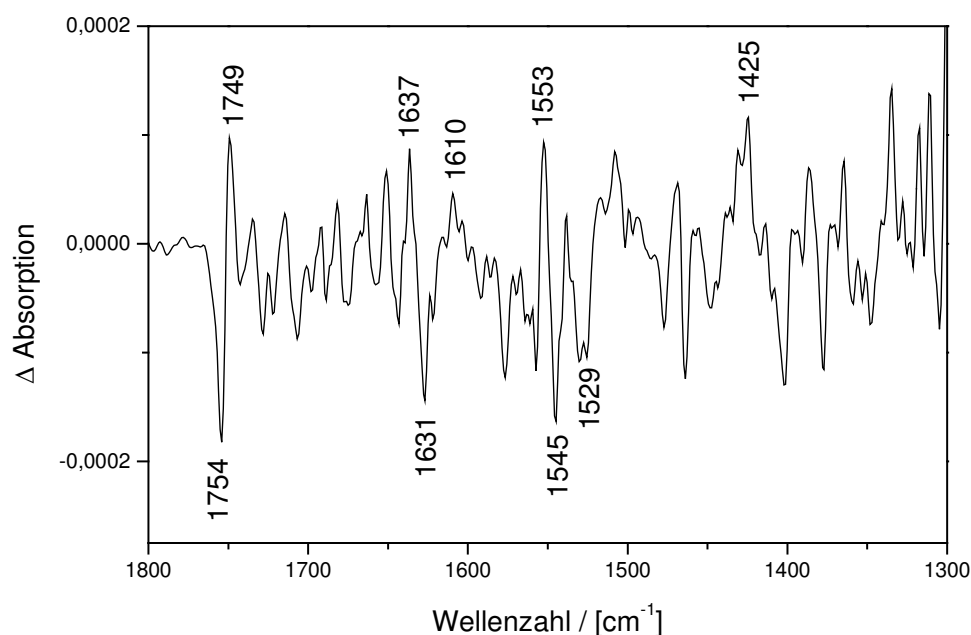


Abbildung 3-32: Spektrum des Proteinbereiches bei CO Rückbindung an die vollreduzierte Cytochrom *bd* Oxidase bei 84 K in H_2O , pH 6 (Bedingungen wie in Abb. 3-35). Es wurde über einen Zeitbereich von 50 bis 500 ms nach der Photolyse von CO gemittelt.

3.4.4 Infrarotsignale im Bereich der –COOH Gruppen von Aspartat und Glutamat

Wie Photoreduktions-Experimente von Yamazaki et al. (1999) und elektrochemisch induzierte FT-IR Daten von Zhang et al. (2002) zeigen, sind bei der Veränderung des Redox-Zustandes des Enzyms auch mehrere protonierbare Säuregruppen bei der Reorganisation des Proteins involviert.

Abbildung 3-33 zeigt deutliche Signale bei 1754, 1749, 1742, 1736 cm^{-1} und mehrere kleinere Absorptionsbanden in diesem Bereich. Wie aus Abbildung 3-32 zu sehen ist, sind dies die stärksten Signale überhaupt und trotz eines schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses gut reproduzierbar. Die Messungen der Differenzbanden und deren Zuordnung erfolgte nach der 2. Photolyse und korreliert demzufolge mit Veränderungen in der Umgebung von Häm *d*. Ein Vergleich mit entsprechenden Moden nach der 1. Photolyse war nicht möglich, da dort, wie in 3.4.2 erläutert, nur Veränderungen von ca. 3% zu sehen sind.

Nach H/D–Austausch kann man charakteristische Verschiebungen dieser Linien von 4–10 cm^{-1} erwarten, wie man es von anderen Systemen her kennt [Pinchas und Laulicht 1977; Siebert et al. 1982]. Verschiebungen der Signale von 1736 cm^{-1} nach 1727 cm^{-1} und von 1730 cm^{-1} nach 1718 cm^{-1} im Differenzspektrum der Cytochrom *bd* Oxidase in Abb. 3-33 können Moden von protonierten Asp- oder Glu- Seitenketten zugeordnet werden, die aufgrund ihrer Position über eine starke Wasserstoffbrücke koordiniert sind.

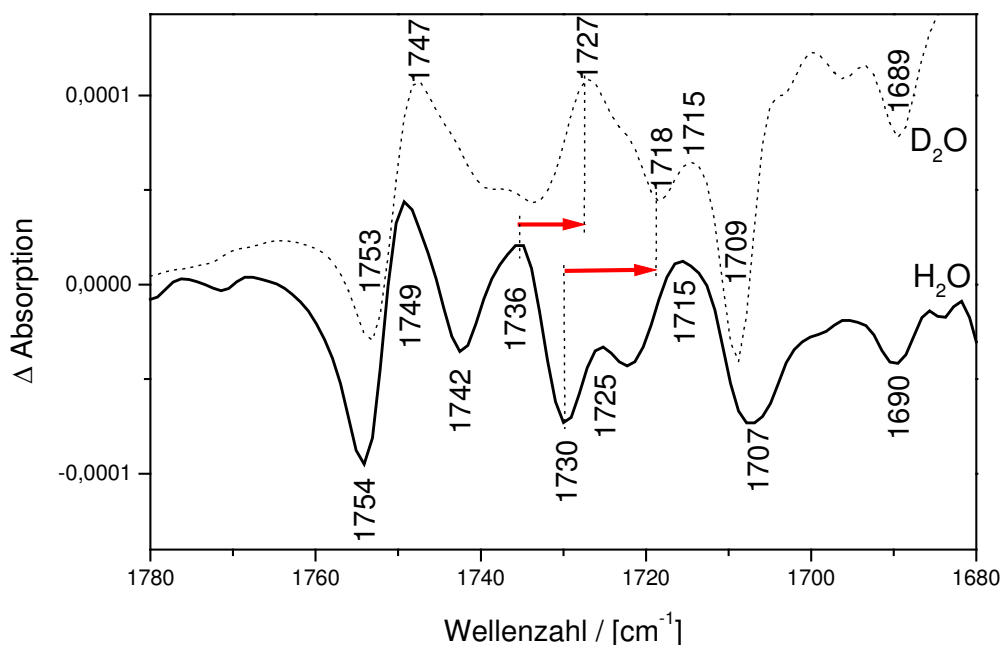


Abbildung 3-33: Differenzspektrern bei 20 Hz „kontinuierlicher“ CO Photolyse bei 84 K; Vergleich des „quasi-stationären“ Zustandes der CO Photodissoziation jeweils in H_2O und D_2O , pH=7; pD=7,4.

Interessanterweise verschieben sich die Linien bei 1754 und 1749 cm^{-1} bei H/D Austausch kaum. Möglicherweise repräsentieren diese Moden Asparagin- oder Glutaminsäuren, welche für das Lösungsmittel unzugänglich sind. Dies wird auch durch die Bandenposition unterstützt, welche auf eine geringe Wechselwirkung der COOH Gruppe mit der Umgebung hinweist, wie man sie für Säurereste findet, die in eine hydrophobe Umgebung des Proteins eingebettet sind.

3.4.5 CO Rückbindungs-Kinetik bei 84 K

Die Rückbindung des photolytierten CO (Bande bei 2133 cm^{-1}) an das Häm *d* (Bande bei 1984 cm^{-1}) erfolgt direkt und ohne Zwischenschritt (im Gegensatz zu FT-IR Experimenten von Hill et al. 1993), wie aus dem Vergleich beider Kinetiken aus Abb. 3-34 und der Mittelung über den Zeitbereich der ersten 1000 ms der Differenzspektren aus Abb. 3-35 ersichtlich ist. Normiert ist die Rückbindungskinetik durch die vorangegangene Abschätzung, daß nur noch ca 10% der anfänglichen CO Population nach dem Blitz messbar sind (entsprechend auch der Zeitauflösung des Spektrometers).

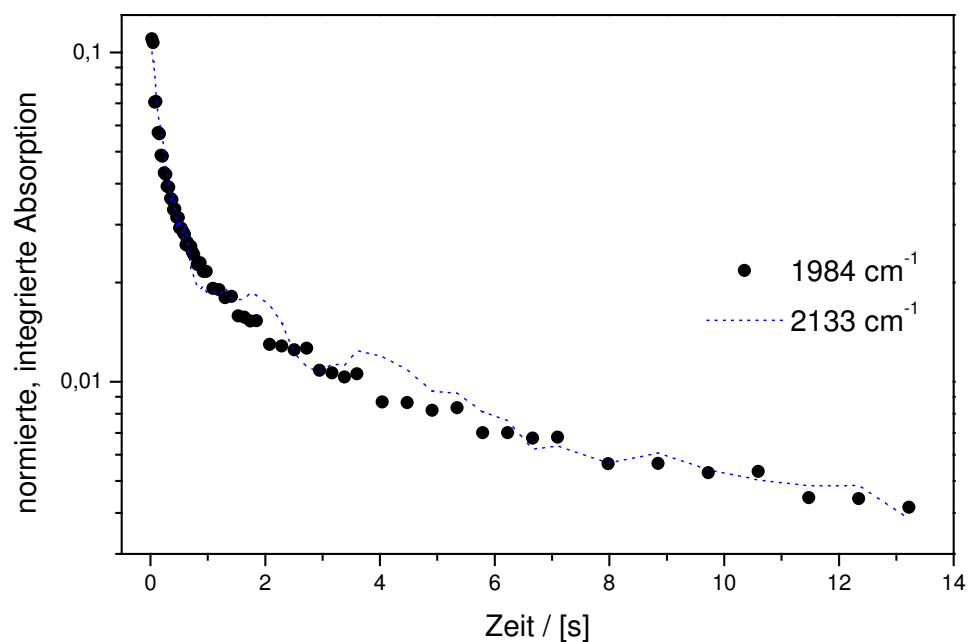


Abbildung 3-34: Rückbindungskinetik von CO aus der Häm-Tasche (2133 cm^{-1}) zurück zum Häm *d* (1984 cm^{-1}). Die Normierung erfolgte entsprechend der Zeitauflösung des Spektrometers. Beide Banden zeigen äquivalentes kinetisches Verhalten. (pH=6, 84 K).

Aus der halblogarithmischen Darstellung ist ersichtlich, daß es sich um ein stark heterogenes Ensemble handelt, da keine mono-exponentielle Beziehung vorliegt. Rein qualitativ läßt sich sagen, daß es eine sehr große Verteilung von Rückbindungsgeschwindigkeiten gibt. Analoge FT-IR Experimente an Myoglobin [Johnson et al. 1996], wo der Ligand ebenfalls in eine „Häm-Tasche“ gelangt, von der aus er an das Häm zurückbindet, zeigen eine ähnlich breite Verteilung aufgrund ihrer Heterogenität.

Für detailliertere Analysen über das Rückbindungsverhalten müßte man bei tieferen Temperaturen bzw. mit höherer Zeitauflösung (vgl. Kap. 2.2.2: Step-Scan Technik) messen.

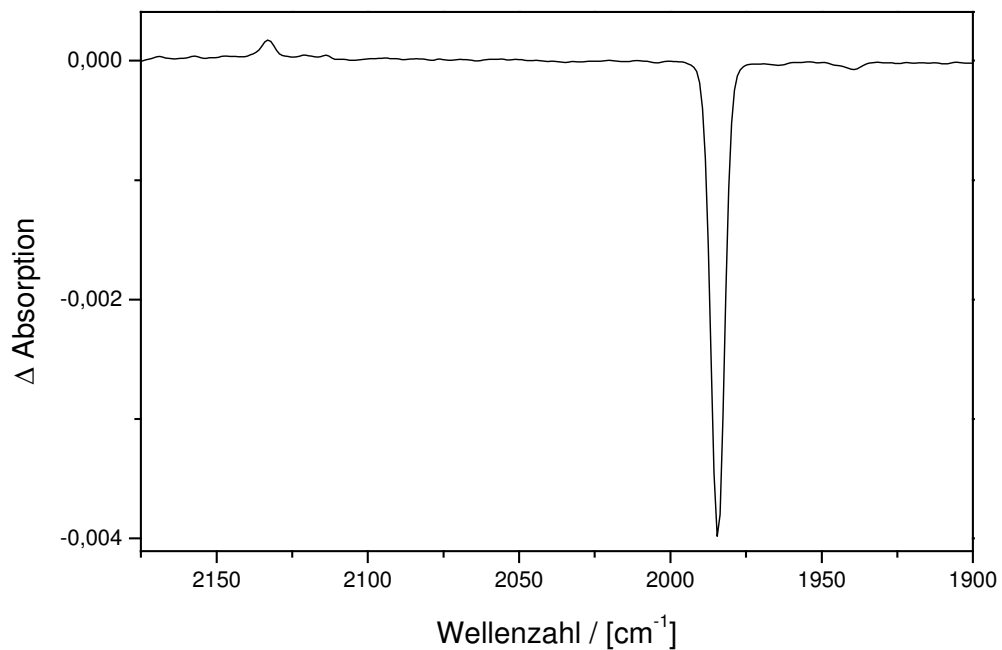


Abbildung 3-35: CO Differenzspektrum der bd Oxidase, gewonnen aus der ersten Sekunde der Kinetik; es ist keine transiente Bindung an das Häm b bei Rekombination auszumachen; pH=6, 84 K (gleiche Bedingung wie Kinetik Abb. 3-34).

3.4.6 Photoreduktion der Cytochrom *bd* Oxidase mittels Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid

VIS - Spektrum

Das VIS – Spektrum in Abbildung 3-36 zeigt die Absorption der Häme vor (oxidiert) und nach der Photoreduktion (reduziert). Man sieht die bekannten Banden und deren Verschiebung nach der Reduktion bei T=259 K. Deutlich zu sehen ist, daß sowohl Häm *d* als auch Häm *b* Absorptionsänderungen zeigen; bei 454 nm zeigt der Ruthenium-Komplex eine breite Bande [Rost 1999]. Die Kontrollspektren wurden vor und nach dem Experiment bei 295 K aufgenommen.

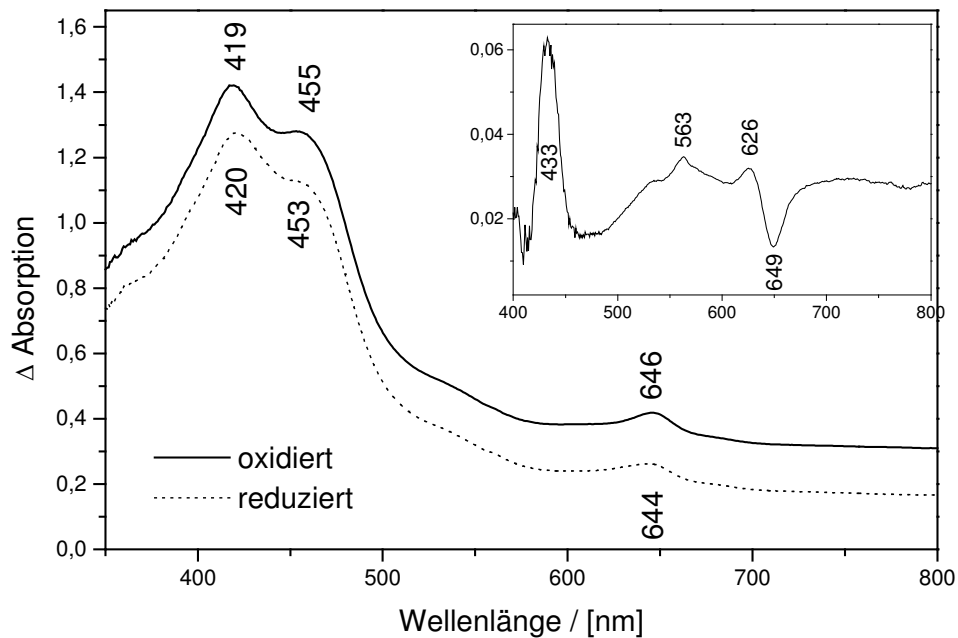


Abbildung 3-36: VIS – Spektren der *bd* Oxidase, oxidiert und nach Photoreduktion, pH=7. Die Ausschnittvergrößerung zeigt die Differenz der Spektren (reduziert minus oxidiert).

Yamazaki et al. (1999) zeigte ebenfalls FT-IR Differenz-Spektren von photoreduzierter Cytochrom *bd* Oxidase von *E. coli* und beobachtete ähnliche spektroskopische Eigenschaften.

FT-IR Differenz-Spektren bei Photoreduktion im Bereich der Asp- und Glu- COOH Gruppen

In Abbildung 3-37 ist das reduziert-minus-oxidiert IR-Differenzspektrum der *bd* Oxidase nach Photoreduktion bei 84 K und 259 K zu sehen. Gezeigt ist hier die Region oberhalb 1680 cm^{-1} , in der (de-)protonierte Aspartat- und/oder Glutamat- Aminosäuren-Seitenketten absorbieren. Da bei der Reduktion das gesamte Protein angesprochen wird, lassen sich beim Vergleich mit CO Photolyse Experimenten auf diese Weise Aminosäuren zuordnen, die in unmittelbarer Nähe des Reaktionszentrums liegen.

So wird die Aminosäure, die bei 1743 cm^{-1} absorbiert, bei der Reduktion nicht angesprochen. Sie liegt offenbar in unmittelbarer Umgebung des binuklearen Zentrums und verändert wahrscheinlich nur ihre Orientierung, wenn CO abgeblitzt wird. Diese Bande zeigte ebenfalls auffälliges Verhalten bei Messung in D_2O (vgl. Abb. 3-33), woraus man schließen kann, daß diese Aminosäure aufgrund der Position in einer nicht für das Lösungsmittel zugänglichen Tasche liegt und stark wasserstoffverbrückt ist. Eine genauere Interpretation ist ohne ortserichtete Mutation nicht möglich.

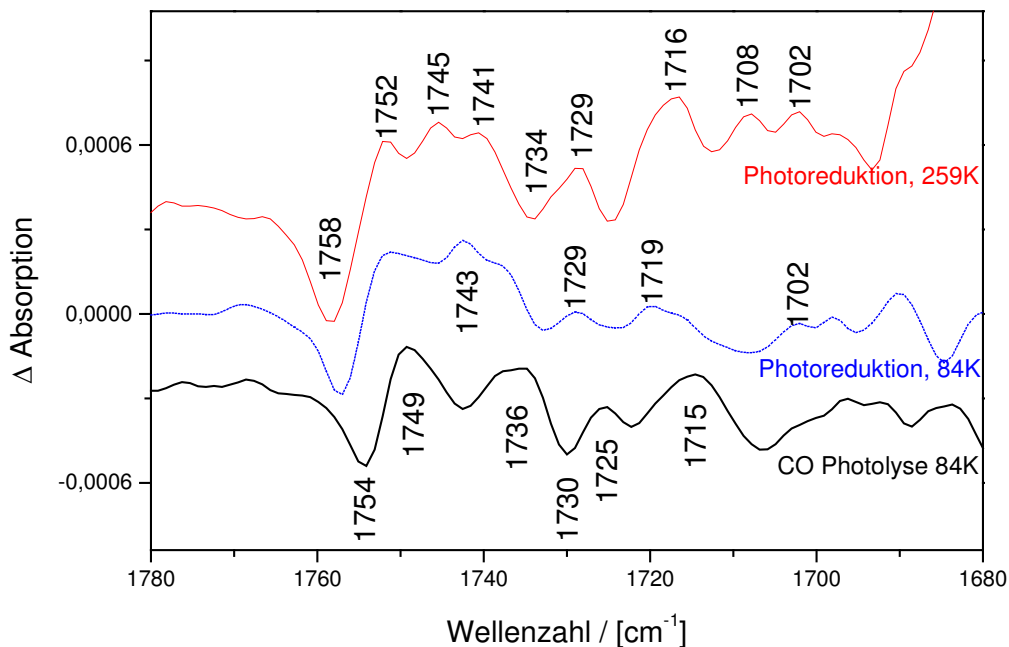


Abbildung 3-37: Photoinduzierte Spektren bei 84 K und 259 K im Vergleich mit CO Photolyse (84 K); alle drei pH 7; Darstellung für Photoreduktion: reduziert-minus-oxidiert Differenzspektrum.

Alle anderen im Enzym vorkommenden Aspartat- oder Glutamat- Seitenketten können aufgrund des Vergleiches der photoreduzierten Probe mit der CO photolysierten Probe jedoch in der Umgebung des binuklearen *bd*-Zentrums vermutet werden.

Interessanterweise zeigen elektrochemisch induzierte FT-IR Messungen an diesem Enzym ein deutliches Signal bei 1761 cm^{-1} [Zhang et al. 2002], das auch in FT-IR Photoreduktions-Experimenten nachgewiesen wird [Yamazaki et al. 1999]. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Daten hier und einer offensichtlichen Übereinstimmung der Bandenstruktur bei 84 K und bei 259 K, die nur durch temperaturbedingte minimale Linienverschiebungen gekennzeichnet ist, muß diese Abweichung präparative Ursachen haben.

3.4.7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit an der *bd* Oxidase liefert einen Beitrag zur seit langem bestehenden Kontroverse, ob und inwiefern das high-spin Häm b_{595} in Cytochrom *bd* Oxidase mit exogenen Liganden wie CO reagiert. Die durch Photolyse von CO erhaltenen Daten mittels FT-IR Differenzspektroskopie bei kryogenen (84 K) Temperaturen konnten, konsistent mit Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich [Borisov et al. 2001] und anderen Experimenten [Poole et al. 1981, 1983; D'mello et al. 1994, 1996], die Existenz dieses *bd*-CO Komplexes bestätigen. Jedoch ist nur ein kleiner Anteil der Häme betroffen, hier ca. 3% (Borisov et al. (2001): 2-5%), so daß es gut möglich ist, daß dieser Anteil in anderen Präparationen [Hill et al. 1993] oder mit anderen Methoden wie Magnetfeld-induziertem Circular-Dichroismus [Borisov et al. 1999] nicht festgestellt werden kann.

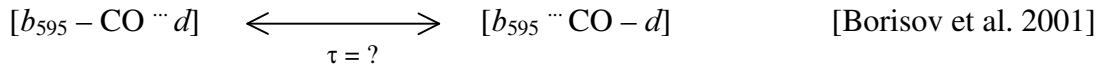
Weiterhin ist unklar, ob sich a) der CO Ligand zwischen den beiden Hämen verteilt, wobei die höhere Affinität auf Seiten des Häm *d* liegt [Borisov et al. 1999], oder ob b) die Heterogenität der Cytochrom *bd* Oxidase Population so beschaffen ist, daß an 95% des Enzyms der Ligand ausschließlich an Häm *d* binden kann und nur 5% mit Häm *b* reagieren.

Aus dem Doppeldifferenzspektrum war ersichtlich, daß gleichzeitig mit den 2% an Häm *b* auch dieselbe CO Population an Häm *d* nicht zurückband. Ob dies mit einer „Verteilung des Liganden“ erklärt werden kann, ist jedoch fragwürdig.

Die Häm *b* assoziierten Protein-Relaxationen waren deutlich langsamer, bei diesen Temperaturen sogar gänzlich unterbunden, als die Differenzspektren, die mit Häm *d*-CO korreliert waren. Würde Modell a) zutreffen (CO zwischen Hämen verteilt), so würde aufgrund schneller Relaxationen das Gleichgewicht der CO – Verteilung (innerhalb der Häm-

Bindungs-Tasche) zwischen den Hämen wieder eine 95%/5% Verteilung annehmen, so daß letztendlich die Rückbindungskinetik an Häm *d* synchron zu der an Häm *b* wäre.

Jedoch schließen sich beide Modelle auch gegenseitig nicht aus, so lange man keine Aussage über die Gleichgewichtskonstanten und deren Raten zwischen beiden Zuständen machen kann:



Für Raumtemperatur und kleine Zeiten τ wäre bzgl. der Messzeit Modell a) relevant, da die Wechselwirkung schnell genug ist, um die Konformere miteinander ins Gleichgewicht zu bringen und umgekehrt.

Es sieht jedoch so aus, als wären beide „Konformere“ deutlich durch eine Energiebarriere getrennt, die eine Interkonversion, zumindest bei diesen tiefen Temperaturen, ausschließt. Somit ist Modell b) der Vorschlag der Wahl. Der Häm *b*-CO Komplex bezeichnet in diesem Sinne also kein „Konformer“, sondern eine andere Bindungsstelle.

(Nota bene: Im Falle von Cytochrom *bd* Oxidase von *Bacillus stearothermophilus* bindet bei Raumtemperatur der Großteil von *b*₅₉₅ das CO [Sakamoto et al. 1999]).

Die Daten zeigten auch explizit, daß viele Säuregruppen sowohl bei der CO Blitzlicht-Photolyse als auch bei Photoreduktion angesprochen werden. Veränderungen im FT-IR Differenz-Spektrum zeigten dabei Störungen, die von protonierten Carboxyl Gruppen sowohl bei Photodissoziation als auch bei Reduktion herrühren (vgl. dazu auch [Yamazaki et al. 1999]). Aufgrund des Vergleiches dieser Messungen untereinander konnten spezifische Linien der unmittelbaren Umgebung des di-Häm-Zentrums zugeordnet und von denen separiert werden, die „auf dem Weg des Elektrons zum Reaktionszentrum liegen“.

Tabelle 3-13 gibt zusammenfassend eine Übersicht über Positionen der Absorptionsbanden und deren Veränderungen, die in dieser Studie relevant waren.

pH7	pD7,4	pH7	pD7,4	pH7	pH7
Bandenposition /[cm ⁻¹] bei 2. Photolyse		Bandenposition /[cm ⁻¹] bei 1. Photolyse		Bandenposition /[cm ⁻¹] bei Photoreduktion (84K)	Bandenposition /[cm ⁻¹] bei Photoreduktion (259K)
+2133,1	+2133,1	+2133,1	+2133,1		
+2113,8		+2113,9	+2113		
-1984,6	-1984,3	-1984,6	-1984,1		
		-1964,4	-1965,7		
(-1940)	(-1940,2)	(-1939)	(-1940)	¹³ C	
		(-1920)	(-1919)	¹³ C	
-1754	-1753	-1754	-1754	-1757	-1758
+1749	+1747	+1749	+1748	+1752/-1746	+1752/-1749
-1742		-1743		+1743	+1745/+1741
+1736		+1738/ +1734	-1734	-1732,9	-1734
-1730	+1727	-1730	+1726	-1724,2	-1725
+1725		+1725		+1729	+1729
-1722	-1718	-1722			
+1715	+1715	+1715	-1718	+1719	+1716
-1707	-1709	-1707	-1709	-1707,8	+1708
				-1695	-1693
-1690	-1689	-	-1691	+1690	+1689
-1674	-1674	-	-1673	-1685	
+1669	+1668	-			

Tabelle 3-13: Übersicht über die diskutierten Banden-Positionen für beide CO-b/d-Häm „Konformere“ und über den Asp/Glu-Aminosäuren-Absorptionsbereich. Die Notationen betreffen CO Photolyse bei 84 K und die Photoreduktion mit Tris-Ruthenium-Chlorid bei 84 und 259 K.

4. Zusammenfassung

Fourier-Transform Infrarot Differenz Spektroskopie ist eine empfindliche Methode, um kleinste konformelle Änderungen in der Umgebung der katalytischen Stellen in Enzymen selektiv und mit hoher Zeitauflösung zu messen.

In dieser Arbeit wurde diese Technik an vollreduzierten, CO-ligandierten Oxidasen von *Paracoccus denitrificans*, *Thermus thermophilus* und *Escherichia coli* angewandt, um einen Einblick in strukturelle und molekulare Prozesse der Bindung und Dynamik von Liganden am binuklearen Zentrum zu erhalten. Die pH- und Temperatur-Abhängigkeit der CO Schwingungsmoden sowie deren Verhalten nach der Photolyse konnten zeitaufgelöst untersucht und miteinander verglichen werden.

Bei kryogenen Temperaturen $>180\text{K}$ war die Bestimmung von thermodynamischen Parametern wie Enthalpie-Barrieren und Arrhenius-Vorfaktoren möglich. Aus dem Verlauf der Rückbindungskinetiken ließen sich ferner Rückschlüsse über die konformelle Heterogenität der Bindung ziehen. Für Temperaturen um 140K konnte das Protein im „quasistationären“ Zustand vermessen werden, da Rückreaktionen des Liganden an die Bindungsstelle des Häm a_3 unterbunden waren.

Die Differenzspektren der CO-Photolyse wurden mit elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektren, mit Raman- und IR- Daten aus der Literatur verglichen. Dadurch konnten Zuordnungen von IR-Moden zu einzelnen Aminosäuren-Seitenketten, zur Häm a_3 -Gruppe sowie zu Sekundär-Strukturmerkmalen erhalten werden, die konformelle Änderungen während der CO Photolysereaktion widerspiegeln. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit und analoger Funktion wie z. B. Protonenpumpen zeigten diese typischen Oxidasen beträchtliche Unterschiede sowohl im Reaktionszentrum als auch im kinetischen Verhalten des Liganden.

Die kinetischen Parameter für alle hier untersuchten Oxidasen weichen deutlich voneinander ab und spiegeln unter anderem die Stärke der Bindung am Cu_B wider. Die Temperaturabhängigkeit der Populationen der CO-Konformere und die äquivalente Rückbindungs-Kinetik der unterschiedlichen Konformere im thermophilen System weisen auf ein strukturelles Merkmal in der Nähe des binuklearen Zentrums hin, das den Populations-Austausch in anderen Oxidasen unterbindet. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der entsprechenden Oxidasen kann man schließen, daß diese Eigenschaft durch eine oder mehrere protonierbare Gruppen bewirkt wird, die die unterschiedlichen Konformere in bestimmten Positionen fixiert hält.

Die Rückbindungsdaten des Liganden zeigen für die *T. thermophilus* Oxidasen eine Rückbindung erster Ordnung, was auf eine homogene Verteilung der zwei Konformer-Populationen im Enzym deutet. Hingegen zeigen Oxidasen aus *R. sphaeroides*, *P. denitrificans* oder Rinderherz für die

Rückbindung eine Verteilung der Reaktionsraten. Ursache dafür ist ein sehr heterogenes Ensemble an Proteinen, das minimale strukturelle Unterschiede im Konformationsraum des Reaktionszentrums aufweist.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war die Zuordnung von Absorptionsbanden der Häm-Propionate an Cytochrome *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans*. Sowohl über ¹³C-isotopenmarkierte Hämpropionate als auch über ortsgerichtete Mutagenese in deren unmittelbarer Umgebung konnten definierte Banden-Zuordnungen im IR-Differenzspektrum erhalten werden. CO Photolyse Experimente an Asp 399 Mutanten zeigten, daß die strukturellen Eigenschaften des Häm a_3 -Cu_B Zentrum im wesentlichen von dieser Veränderung nicht beeinflußt werden. Jedoch war die pH Abhängigkeit der CO Konformere hier unterbunden, was auf deren Einfluß auf eine Protonierbarkeit im Wildtyp-Enzym hinweist. Anhand dieser Mutante, die eine hohe enzymatische- und Protonenpump-Aktivität aufweist und auch in Anbetracht, daß in vielen Häm-Kupfer Oxidasen statt Aspartat Asparagin konserviert ist, zeigt der Verlust der pH-Abhängigkeit ganz klar, daß alle unterschiedlichen CO-Konformere funktionell intakt sind. Die Substitution von Aspartat 399 durch Leucin- oder Glutamat- Aminosäuren hingegen zeigte die Wichtigkeit der Wasserstoff-Brückenbindung in der Häm-Propionat Umgebung, da diese Mutationen maßgeblich die Funktion des Enzyms beeinträchtigten.

FT-IR Messungen an der isolierten Cytochrom *bd* Oxidase aus *E. coli* zeigten bei einer Untersuchung der CO Rückbindungs-Eigenschaften bei 84K die ausschließliche Rückbindung an das Häm *d*, der möglichen Sauerstoff-Bindungsstelle. Die Bindungsstelle an Häm *b*, die zu ca. 5% ebenfalls CO bindet, kann bei diesen Temperaturen nicht wiederbesetzt werden. Die Rückbindungskinetik von CO an Häm *d* weist zusätzlich auf eine extrem große Verteilung von Subzuständen im Konformationsraum dieses Enzyms hin.

Im typischen Spektralbereich von 1680 bis 1760 cm⁻¹ konnten eindeutig die Absorptionsbanden von protonierten Aspartat- oder Glutamat- Aminosäuren-Seitenketten identifiziert werden. Über einen direkten Vergleich der Spektren, die über Redox-Reaktion und CO Rückbindung erhalten wurden, konnten diese Signale als klar in der direkten Umgebung des binuklearen Zentrums lokalisiert zugeordnet werden. Eine Rolle als vorübergehender Protonen-Akzeptor/Donor auf dem Weg zur Sauerstoff-Bindungsstelle ist naheliegend.

Anhang A

Photoreduktion mit Tris(2,2'-Bipyridin)-Ruthenium(II)-Chlorid

Über die Zuordnung von Moden, die bei Photoreduktion angesprochen werden, läßt sich feststellen, welche Strukturelemente des Enzyms bei Veränderungen des Redox-Potentials angesprochen werden. Dies sollte analoge Information wie bei der elektrochemisch induzierten FT-IR Differenzspektroskopie geben, jedoch mit der Möglichkeit zur zeitaufgelösten Messung. Kritischer Faktor bei der Photoreduktion ist, daß aufgrund der geringen Quantenausbeute (~3%) die Anfangs- und Endzustände nicht ausreichend definiert sind:

- Nur für den ersten Blitz, wo ein Elektron an die Oxidase abgegeben wird, ist deren Anfangs- und Endzustand eindeutig definiert: oxidiertes und einfach-reduziertes Zustand; im Differenzspektrum sieht man nur den einfach-reduzierten Anteil.
- Für den nächsten Blitz kann entweder ein oxidiertes in den einfach-reduzierten Zustand, ein einfach-reduzierter in den vollreduzierten Zustand übergehen („double hits“) oder überhaupt keine Reduktion stattfinden („misses“). Werden diese undefinierten Zustände gegen das vorherige Spektrum verrechnet, bekommt man im Differenzspektrum „Mischanteile“ von allen möglichen Permutationen dieser vorkommenden Zustände.

Die Reaktion wird, wie in Kap. 1.3 eingeführt, photolytisch initiiert, wobei der verwendete Rutheniumkomplex sein Mittelpunktspotential ändert und als Elektronendonator für die Cytochrom *c* Oxidase dient.

IR - Spektren

In Abbildung A-1 sind die Differenzspektren bei Reduktion der verschiedenen hier untersuchten Cytochrom *c* Oxidase-Typen (*aa*₃ aus *Paracoccus denitrificans* sowie *ba*₃ und *caa*₃ aus *Thermus thermophilus*) dargestellt.

Die Zeitauflösung des Spektrometers erlaubte nicht, daß man eine sukzessive Reduktion über einzelne Aminosäuren bis zu den Häm-Gruppen hätte zeitlich verfolgen und zuordnen können. Deshalb wurden jeweils drei Spektren (â 300 Interferometer-Scans) vor (oxidiertes Zustand des Enzyms) bzw. nach dem Blitz einer Xenon-Lampe (reduziertes Zustand (?)) gemessen und daraus das Differenzspektrum reduziert-minus-oxidiert berechnet. Nach ca. 15 Blitzen zeigte sich keine merkliche Veränderung in den Differenzspektren mehr, so daß die Reduktion als abgeschlossen betrachtet werden konnte. Nun wurden die einzelnen Spektren addiert und so die spektralen Veränderungen bei Gesamtreduktion erhalten.

Aufgrund der Gegenüberstellung mit Spektren aus dem CO Photolyse Experiment sollte man nun Hinweise erhalten, welche Absorptionsbanden bei Reduktion unmittelbar der Hämumgebung zuzuordnen sind. Über den gesamten Spektralbereich ist dieser Vergleich jedoch sehr kritisch, da sich hier im Vergleich zur CO Photolyse die Häm-Koordinierung (6-fach auf 5-fach-koordiniert) nicht ändert, als auch Beiträge von Gruppen überlappen können, die zwar Moden in einem bestimmten Spektralbereich zeigen, diese aber nichts mit äquivalenten Banden bei CO Photolyse zu tun haben.

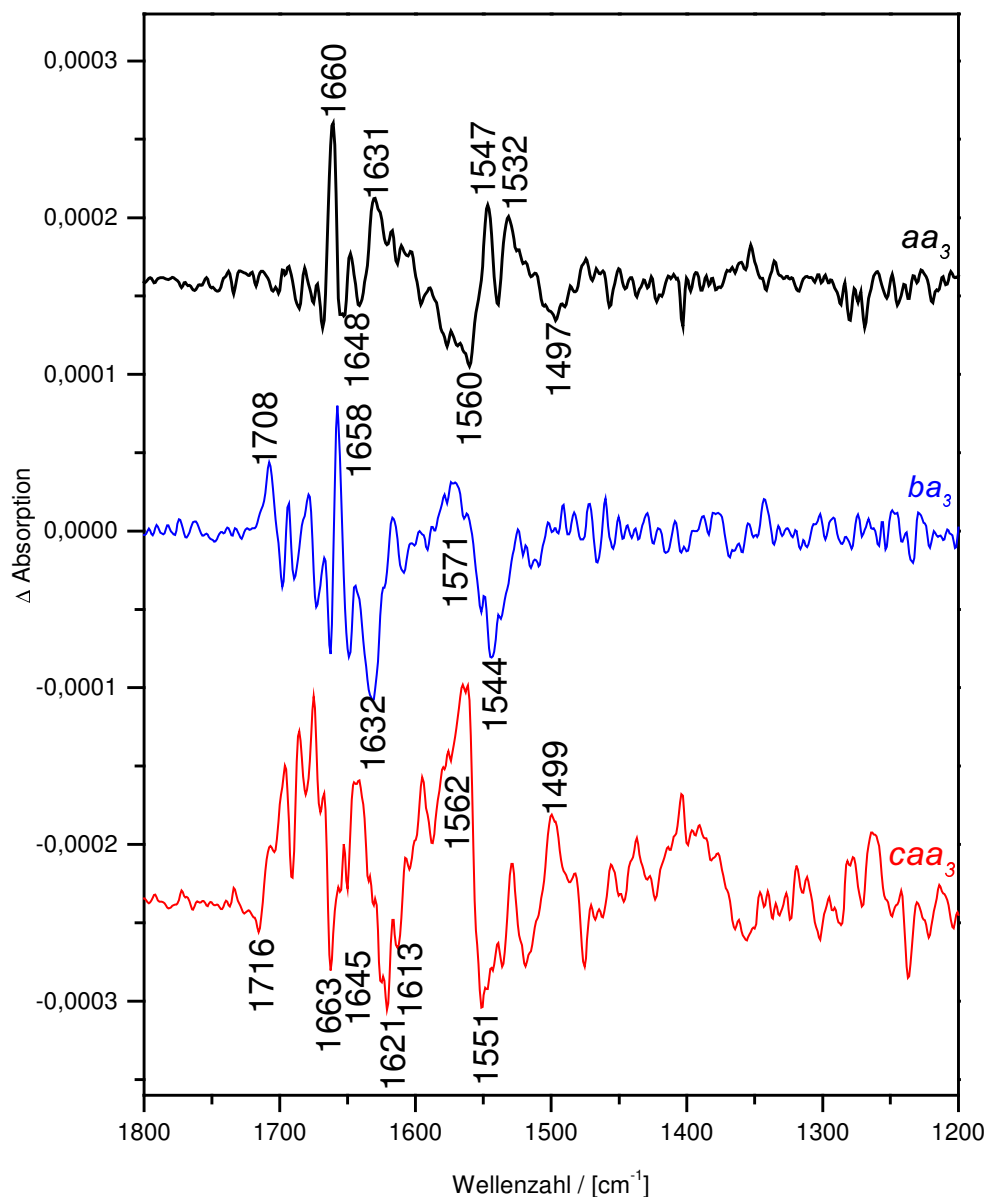


Abbildung A-1: FT-IR Differenzspektren (reduziert-minus-oxidiert) der Photoreduktion der verschiedenen Cytochrom c Oxidasen bei 268 K in H₂O bei pH=7.

Die Differenzspektren im Proteinbereich von 1800 – 1200 cm^{-1} decken sich weitestgehend mit den Differenzspektren, wie sie aus elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen von Hellwig et al. (1998, 1999a, 1999b, 1999c, 2002) an den entsprechenden Oxidasen erhalten wurden. Dort findet man eine detaillierte Beschreibung der Banden, auf die auch im Rahmen der Interpretation der Spektren aus den CO Photolyse Experimenten zurückgegriffen wurde. Zur Gegenüberstellung sei hier auch auf Tabelle 3-4 (Zuordnung von Proteinbanden) hingewiesen, in der die entsprechenden Banden aus den elektrochemischen Experimenten angeführt sind. Auf eine detaillierte Diskussion wird an dieser Stelle deshalb verzichtet.

Die größten Abweichungen bemerkt man im Bereich von 1710 cm^{-1} bis 1630 cm^{-1} , ein Spektralbereich, in dem, wie in Kapitel 3.1.3 (Proteinbandendiskussion) ausführlich analysiert und beschrieben, hauptsächlich Sekundär-Struktur-Elemente (Amid I) als auch Beiträge der Häme und deren entsprechenden Seitenketten (Propionsäure, Vinyl- und Formylgruppe) als auch einzelne Aminosäureseitenketten absorbieren.

Wegen der Irreversibilität des Meßverfahrens kann das Experiment an derselben Probe nur einmal durchgeführt werden. Dies resultiert in einem schlechteren Signal/Rausch Verhältnis der Photoreduktions-Spektren. So ist im Falle der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* ein Differenz-Signal bei 1746/1737 cm^{-1} nicht eindeutig nachweisbar. Dieses Signal wird sowohl in anderen photoreduktions- oder elektrochemisch induzierten FT-IR Messungen, als auch bei Untersuchungen an der halbreduzierten Form der Oxidase angesprochen [Hellwig, 1998; Rost 2000; Rost et al. 1999]. Es kann einer strukturellen Änderung oder (de-) Protonierung der Aminosäure Glu 278 in der Nähe des binuklearen Zentrums zugeordnet werden, und wurde durch entsprechende Messungen an verschiedenen Mutanten eindeutig identifiziert.

Wahrscheinlich ist dieses Signal bei 1746/1737 cm^{-1} nicht sichtbar, weil nur Häm *a* reduziert ist. Für die Reduktion von Häm *a*₃ konnten offenbar nicht mehr ausreichend Elektronen vom Rutheniumkomplex zur Verfügung gestellt werden.

Anhang B

CO Photolyse an Rinderherz-Oxidase im Vergleich zu *Paracoccus denitrificans* Oxidase; Differenzspektren

Neben den in Kapitel 3 untersuchten bakteriellen Oxidase Systemen wurde auch CO Blitzphotolyse am mitochondrialen System aus dem Rinderherzen gemacht. In Abbildung B-1 ist das Ergebnis der *P. denitrificans* Oxidase gegenübergestellt. Man sieht die typischen CO Banden: von 1951 cm^{-1} bis 1982 cm^{-1} am Häm a_3 gebunden; nach der Photolyse: von 2043 cm^{-1} bis 2077 cm^{-1} am Cu_B gebunden. Auch hier zeigen sich Unterschiede sowohl in der Banden-Anzahl als auch in der Position. Für die CO Konformere aus dem Rinderherzen ist im Bereich von $\text{pH}=6$ bis $\text{pH}=8$ kein Unterschied in der Population der CO Konformere auszumachen.

Für eine genauere Diskussion vgl. die entsprechenden Kapitel zur Gegenüberstellung der bakteriellen Oxidasen (Kapitel 3.1 und 3.2).

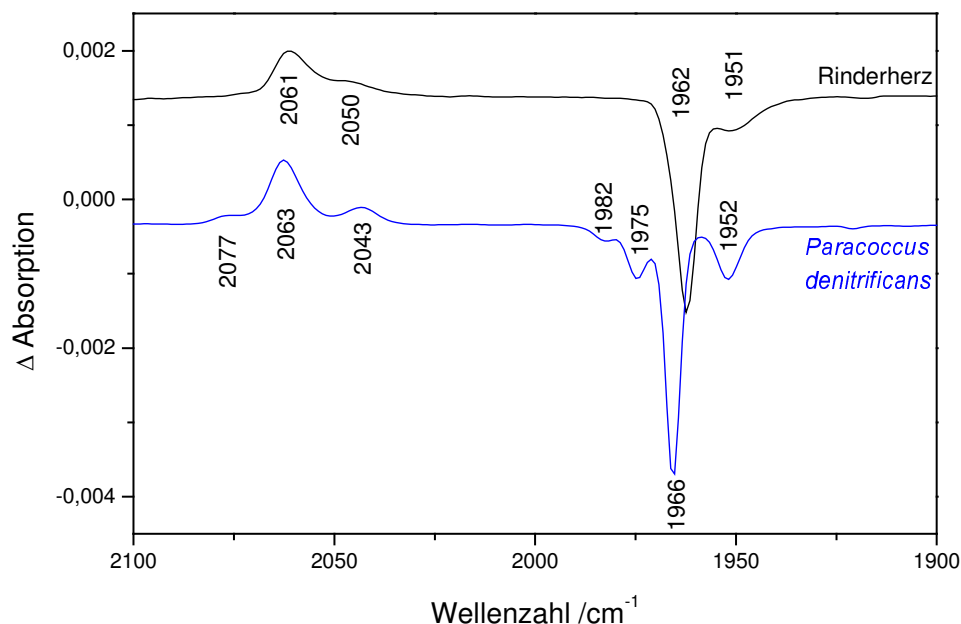


Abbildung B-1: Vergleich der „hell über dunkel“ FT-IR Differenzspektren der vollreduzierten, CO vergifteten aa_3 Cytochrom *c* Oxidasen aus Rinderherz und *P. denitrificans* bei 140 K, $\text{pH}=8$. Gezeigt ist die IR-Region, in der die C O Schwingung absorbiert. Negative Banden repräsentieren CO gebunden an Häm a_3 , positive(nach der Photolyse) die Bindung an Cu_B .

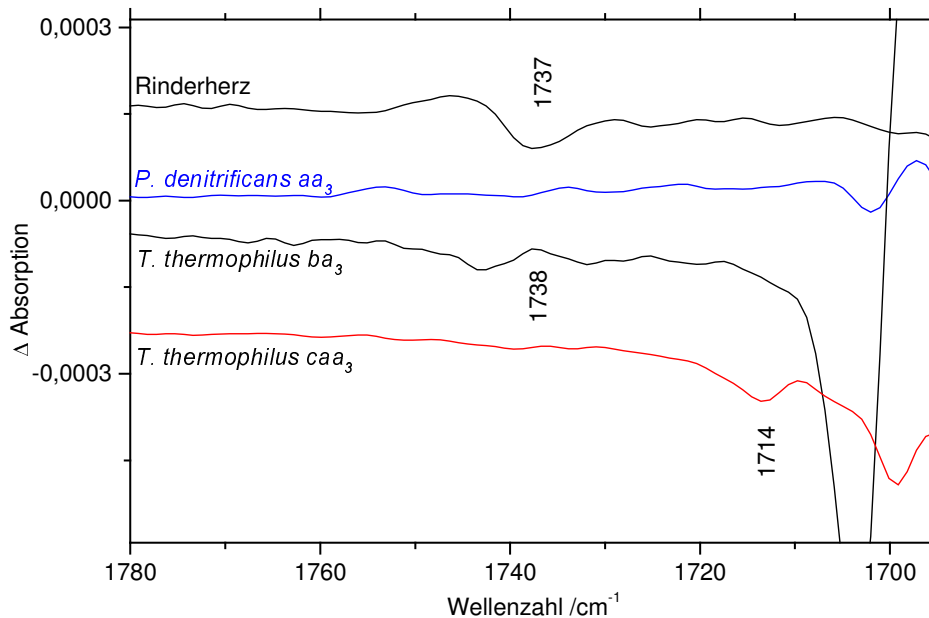


Abbildung B-2: Vergleich der „hell über dunkel“ FT-IR Differenzspektren der vollreduzierten, CO vergifteten aa₃ Cytochrom c Oxidasen aus Rinderherz und *P. denitrificans* sowie ba₃ und caa₃ Oxidase aus *T. thermophilus* bei 140 K, pH=8. Gezeigt ist die IR-Region, in der protonierte C=O Moden von Aspartat- und Glutamat- Seitenketten absorbieren.

Ein interessantes Merkmal in Abb. B-2 ist ein negatives Absorptionssignal bei 1737 cm⁻¹ für Rinderherz Oxidase, welche für andere hier untersuchte Oxidasen bei dieser Temperatur nicht auftritt. Dieses Signal wird im charakteristischen Spektralbereich für C=O Schwingungen von protonierten Asp- oder Glu- Aminosäuren-Seitenketten beobachtet. Diese Moden zeigen Protonen-Transfer-Prozesse zu/von diesen Resten oder Veränderungen in der unmittelbaren Umgebung einer schon protonierten Gruppe an. Hinsichtlich der Ähnlichkeiten von *P. denitrificans* Oxidase und Rinderherz Oxidase ist dieser markante Unterschied bemerkenswert.

Eine zusätzliche Mode bei 1714 cm⁻¹ für die caa₃ Oxidase aus *T. thermophilus* verweist vermutlich ebenfalls auf einen solchen COOH-Rest, der entweder seine Entsprechung zum 1737 cm⁻¹ Signal aus Rinderherz hat, oder einen Aminosäurenrest repräsentiert, der in Rinderherzoxidase nicht angesprochen wird.

Im Fall der ba₃ Oxidase sind in diesem Bereich nur kleine Absorptionsmoden zu beobachten, die jedoch bei Deuterierung ein Verschiebung von 1,5-2 cm⁻¹ (vgl. Kap. 3.1.3) aufweisen.

Als Schlußfolgerung ergibt sich daraus, daß in der Nähe des Reaktionszentrums in allen Oxidasen Asp oder Glu-Aminosäuren vorkommen, die jedoch in eine deutlich unterschiedene Umgebung eingebettet sind, bzw. sich an anderen Positionen befinden.

Anhang C

Temperaturen, für die CO Rückbindungskinetiken bestimmt wurden und daraus ermittelte Relaxationszeiten τ für die Arrhenius-Darstellung der entsprechenden Oxidasen

Angeführt sind die entsprechenden Temperaturen und die ermittelten Relaxationszeiten für die CO Rückbindung an die verschiedenen hier untersuchten Cytochrom *c* Oxidasen. Diese Daten wurden gemäß Gln. 3.3 aufgetragen und aus dem Arrhenius Plot die thermodynamischen Parameter ermittelt.

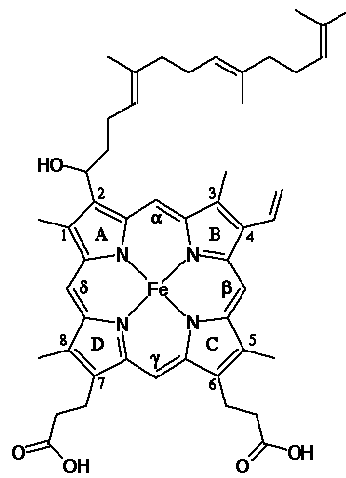
<i>Paracoccus denitrificans aa₃ Oxidase</i>			
Temperatur	τ [s] für 1974 cm ⁻¹	τ [s] für 1965 cm ⁻¹	τ [s] für 1955 cm ⁻¹
168,6	---	---	342,78
178,5	112,31	273,77	120,32
179,9	181,77	368,88	150,46
189,2	30,77	101,96	39,30
202,3	4,29	12,51	7,45
218,9	---	1,71	1,10
230,3	0,57	0,36	0,33
240,2	0,36	0,22	0,26
268,1	0,09	0,09	0,07
277,8	0,13	0,08	0,12
293,3	0,03	0,07	0,10

<i>Thermus thermophilus ba₃ Oxidase</i>			
Temperatur	τ [s] für 1983 cm ⁻¹	τ [s] für 1974 cm ⁻¹	τ [s] für 2053 cm ⁻¹
210	2385,6	2290,72	2231,71
232	113,39	116,58	113,87
263	7,27	7,86	7,54
268	4,09	4,16	4,15
280	1,22	1,23	1,21
290	0,32	0,31	0,32
300	0,14	0,13	0,14
310	0,07	0,06	0,06

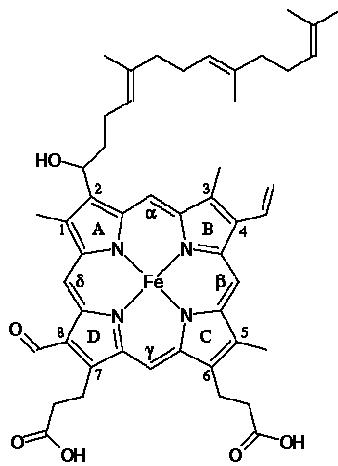
<i>Thermus thermophilus caa₃ Oxidase</i>			
Temperatur	τ [s] für 1974 cm ⁻¹	τ [s] für 1957 cm ⁻¹	Mittelwert τ [s]
180	1640,9	1566,85	1603,9
210	50,88	50,3	52,6
231	2,19	2,24	2,21
242	1,03	0,95	0,99
260	0,30	0,28	0,29
268	0,95	0,33	0,64
280	0,17	0,17	0,17

Anhang C

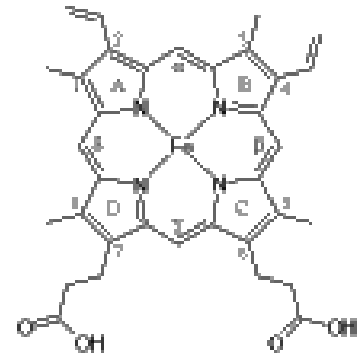
Struktur verschiedener Häm - Typen



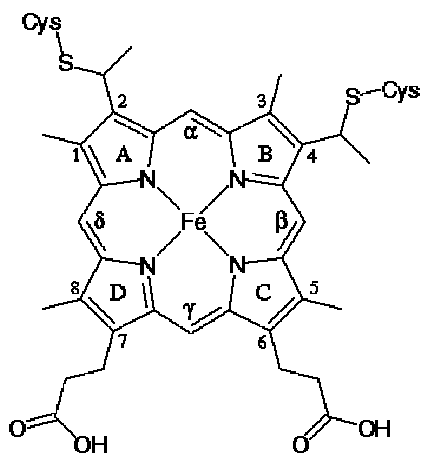
Häm *o*



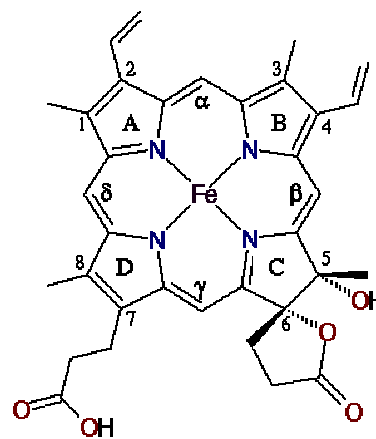
Häm *a*



Häm *b*



Häm *c*



Häm *d*

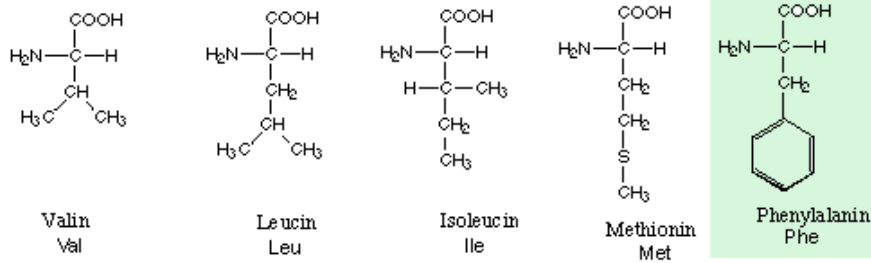
[Quelle: <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/HAEMMAIN.html>]

Anhang D

Aminosäuren

Die 20 (+2) Aminosäuren unterscheiden sich einzig im Rest R, dessen Struktur, Grösse, Polarität, elektrische Ladung und damit auch Wasserlöslichkeit variiert. Damit unterteilt man Aminosäuren nach den chemischen Eigenschaften der Seitenkette in fünf Hauptklassen: unpolare und aliphatische, aromatische, polar-ungeladene, polar-negativ geladene und polar-positiv geladene.

Aminosäuren mit hydrophoben Resten



Aminosäuren mit hydrophilen Resten

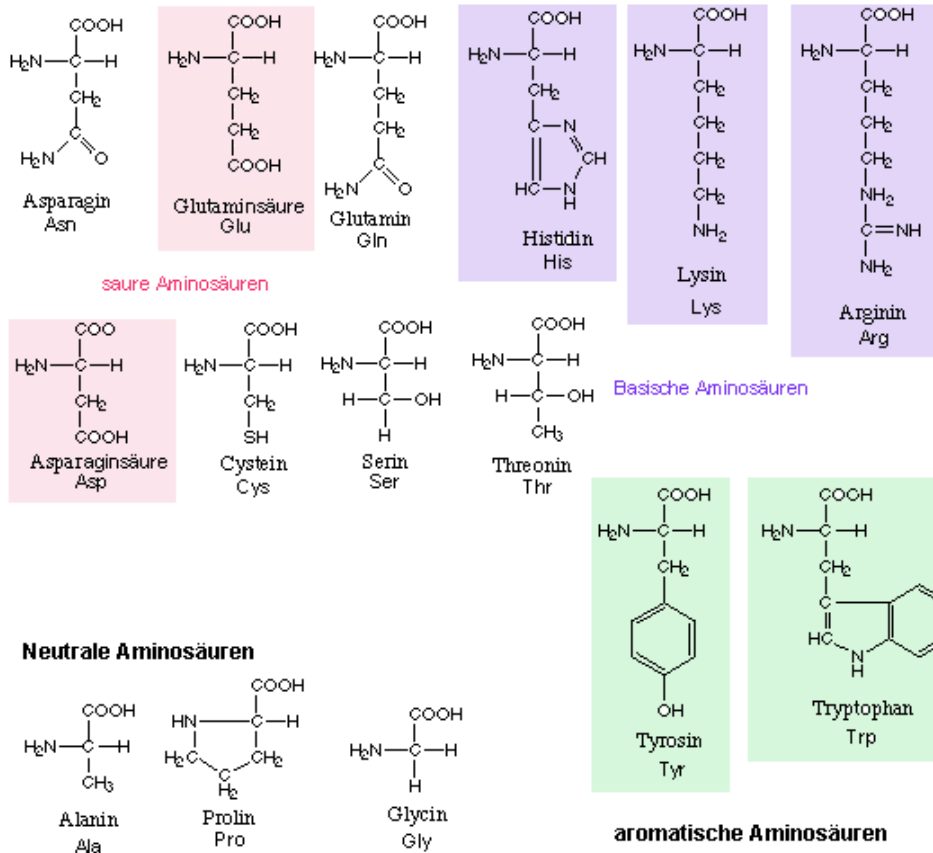
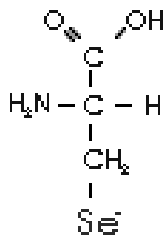


Abbildung D-1: Die 20 Aminosäuren

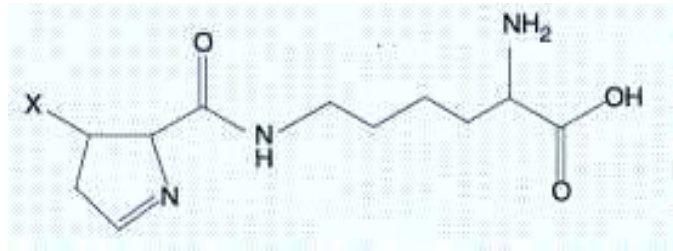
[Quelle: <http://www.merian.fr.bw.schule.de/Beck/skripten/bilder!/aminoac.gif>]

Aktuelle Fußnote:

Der 1986 entdeckte und in der DNA codierte 21. Eiweißbaustein, das Selenocystein (Abbildung D-2a), kommt zwar nur in wenigen Proteinen vor, lässt sich aber in vielen Organismen bis hin zu Säugetieren finden. Bis heute sind ca. 20 eukaryotische Selenoproteine bekannt, bei denen Selen in Form der Aminosäure Selenocystein vorkommt. Die Existenz weiterer Selenoproteine wird jedoch angenommen.



a)



b)

Abbildung D-2: a) Die Aminosäuren Selenocystein und b) Pyrrolysin

Als aktuellen Neuzugang fand man das Pyrrolysin (Abbildung D-2b), das Hao et al. (2002) in der Mikrobe *Methanosarcina barkeri* fand, die im Verdauungstrakt von Rindern lebt. Das Archaeobakterium zersetzt organische Verbindungen und produziert dabei Methan.

Glossar

Chinol = Hydrochinon	stark reduzierende organische Verbindung (protoniertes Chinon)
Chinon	Oxidationsprodukt arom. Verbindungen mit Doppelbindungssystem; Oxidationsmittel
COX	Cytochrome <i>c</i> Oxidase
Cytoplasma/cytosolisch	die Seite der Zellmembran, die dem Zellkern zugewandt ist
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure; wird hier als Quencher = Elektronendonator verwendet
Eubakterium	eine bestimmte Klasse von Prokaryoten (wie Archae-Bakterium)
Eukaryot	Organismen, deren Zellen durch einen typischen Zellkern charakterisiert sind, der die Erbinformation (DNA) enthält; enthält zusätzlich Mitochondrien, die ebenfalls DNA besitzen
FAD	Flavin Adenin Dinucleotid
FT-IR Spektroskopie	Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie
gram-negativ	Methode zur Charakterisierung von Bakterien. Durch Färben und Entfärben können <i>gramnegative</i> und <i>grampositive</i> Bakterien unterschieden werden; grampositiv (d.h. den Farbstoff festhaltend)
hell über dunkel	Absorptionsspektrum vor der Reaktion wird vom Absorptionsspektrum nach der Reaktion (Photolyse) subtrahiert
Differenz-Spektrum	
kanonische Oxidase	bezieht sich eigentlich auf „kanonische Aminosäure-Reste“ = essentielle Aminosäuren; sind in den wichtigsten Mitgliedern der Oxidase-Familie konserviert
Mutante	Eine Mutation kann durch Angabe der nativen Aminosäure und ihre Stellung in der Polypeptidkette, sowie durch die statt ihrer neu eingefügten Aminosäure genau spezifiziert werden. So wird der Ersatz der Aminosäure Arginin an Position 473 durch Lysin als Arg473Lys oder in der Kurzschreibweise als R473K bezeichnet.
NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinucleotid, Koenzym wasserstoffübertragender Enzyme des Energiestoffwechsels z.B. der Atmungskette und der Glykolyse
ortsgerichtete Mutation	ein Eingriff in ein Enzym an einer definierten Aminosäure, die durch eine andere Aminosäure ersetzt wird: Je nach Forschungsgebiet mit dem Ziel, Einfluß zu nehmen auf die Struktur → Proteinfaltung, auf die Funktion (Molekularbiologie, Biochemie) → Aktivitätsmessungen als Marker (Infrarotspektroskopie) → keine Störung
periplasmatische Seite	die Seite der Zellmembran, die auf der vom Zellkern abgewandten Seite liegt („Außen“)
Prokaryont	Organismen, deren Zellen keinen durch eine Membran getrennten Zellkern aufweisen. Die DNA schwimmt frei im „Inneren“
prosthetische Gruppen	werden in Proteine eingebaut, sind nicht aus Aminosäuren zusammengesetzt und nicht in der DNA codiert; z. B. Häm
kinetisches	Die Absorptionsbande für ein Protein-Ensemble ist durch
Lochbrennen	Strukturheterogenität inhomogen verbreitert; nach Anregung mit Laserlicht binden die Übergänge mit den kleinen Barrierenhöhen schneller zurück.
thermophile Bakterien	diese Bakterien wachsen bevorzugt bei hohen, eigentlich unphysiologischen Temperaturen (~75 °C)
VIS	„visible“ = Spektrum im sichtbaren Spektralbereich

6. Literaturverzeichnis

- Ädelroth P., Gennis, R.B., Brzezinski, P. (1997) *Biochemistry* 37, 2470-2476
- Ahmad, I., Cusanovich, M.A., Tollin, G. (1982) *Biochemistry* 13, 3122-8
- Alben, J.O., Moh, P.P., Fiamingo, F.G., and Altschuld, R.A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 234-237
- Anraku, Y., and Gennis, R. B. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 262-266
- Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., Goni, F. M. (1993) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56
- Atkins P. W. (1988) *Physikalische Chemie*; 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, 716ff
- Babcock, G.T. (1988) in "Raman Scattering by Cytochrome Oxidase and by Heme *a* Model Compounds", Kapitel 7 aus: "*Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy*", Editor: T. Spiro, Wiley and Sons, New York.
- Babcock, G.T. & Wikström, M. (1992) *Nature* 356, 301-309
- Barth, A. (2001) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141-173
- Baymann, F., Dissertation, Freiburg, 1995
- Beece, D., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Good, D., Marden, M.C., Reinisch, L., Reynolds, A.H., Sorensen, L.B., Yue, K.T. (1980) *Biochemistry* 23, 5147-57
- Behr, J., Hellwig, P., Mäntele, W. and Michel, H., (1998) *Biochemistry* 37, 7400-7406
- Behr, J., Michel, H., Mäntele, W., and Hellwig, P. (2000) *Biochemistry* 39, 1356-63
- Berthomieu, C., Boussac, A., Mäntele, W., Breton, J., Navedryk, E. (1992) *Biochemistry* 31, 11460-11471
- Borisov, V., Arutyunyan, A. M., Osborne, J. P., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (1999) *Biochemistry* 38, 740-750
- Borisov, V.B., Sedelnikova, S.E., Poole, R. K., Konstantinov, A. A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 22095-22099
- Bratton, M.R., Pressler, M.A., Hosler, J.P. (1999) *Biochemistry* 49, 16236-45

-
- Bresser, A.H. und Buse, G. (1993) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 736.
- Brzezinski, P., Ädelroth, P. (1998) *J. of Bioenergetics and Biomembr.* 30(1), 99-107
- Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., Bluggel, M. (1999) *Protein Sci.* 8(5), 985-90
- Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Gennis, R.B. (1994) *Trends biochem. Sci.* 19, 325-330
- Castresana, J. and Saraste, M., (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 443-448
- Choi, S., Spiro, T.G., Langry, K.C., Smith, K.M., La Mar, G.N. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4345-4357
- Das, T.K., Tomson, F.L, Gennis, R.B., Gordon, M. and Rousseau D.L. (2001) *Biophys. J.* 80, 2039-45.
- D'mello, R., Palmer, S., Hill, S., and Poole, R. K. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 115-120
- D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. (1996) *Microbiology* 142, 755-763
- Dodson, E.D., Zhao, X.J., Caughey, W.S., Elliott, C.M. (1996) *Biochemistry* 35(2), 444-52
- Drosou, V., Malatesta, F., Brunori, M., Ludwig, B. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269, 2980-2988
- Dueweke, T. J., and Gennis, R. B. (1991) *Biochemistry* 30, 3401-3406
- Einarsdóttir, Ó., Choc, M. G., Weldon, S., Caughey, W. S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 13641-13654
- Einarsdóttir, Ó., Killough, P. M., Fee, J. A. and Woodruff, W. H. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 2405-2408
- Einarsdóttir, Ó., Dyer, R.B., Lemon, D.D., Killough, P.M., Hubig, S.M., Atherton, S.J., Lopez-Garriga, J.J., Palmer, G., Woodruff, W.H. (1993) *Biochemistry* 32(45):12013-24
- Engel, M., Staatsexamensarbeit, Abteilung Biophysik, Universität Ulm, 1998
- Fabian, M., Wong, W.W., Gennis, R.B., Palmer, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96(23):13114-7
- Fee, J. A., Choc, M. G., Findling, K. L., Lorence, R., Yoshida, T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 147-151
- Fee, J.A., Yoshida, T., Surerus, K.K., Mather, M.W. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* 25(2), 103-14
-

-
- Ferguson-Miller, S. and Babcock, G.T. (1996) *Chem. Rev.* 96 2889-2907.
- Fiamingo, F. G., Altschuld, R. A., Moh, P. P., Alben, J. O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1639-1650
- Florens, L., Schmidt, B., McCracken, J., Ferguson-Miller, S. (2001) *Biochemistry* 40(25), 7491-7
- Follmann, K. K., Dissertation, Marburg/Lahn 1998
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A., Tsernoglou, D. (1979) *Nature* 280(5723), 558-63
- Frauenfelder, H., Steinbach, P. J., Young, R. D. (1989) *Chem. Scr.* 29A, 145-150
- Frauenfelder, H., Sligar, S. G., Wolynes, P. G. (1991) *Science* 254(5038), 1598-603
- Frauenfelder, H., McMahon, B. H., Austin, R. H., Chu, K., Groves, J. T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(5), 2370-4
- Garcia-Horsman, J.A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R.B. (1994) *J. Bacteriol.* 176(18), 5587-600
- Gennis, R.B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95(22), 12747-9
- Geren, L., Hahm, S., Durham, B. und Millett, F. (1991) *Biochemistry* 30, 9450-9457.
- Gerscher, S., Hildebrandt, P., Soulimane, T., Buse, G., (1998) *Biospectroscopy*, 4(6), 365-377
- Gerthsen, C., Vogel, H. (1993) *Physik*; 17. Auflage, Springer Verlag Berlin, 886ff
- Giuffré, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T., Buse, G. (1999) *Biochemistry* 38, 1057-1065
- Glasoe, P.K., and Long, F.A. (1960) *J. Phys. Chem.* 64, 188
- Green, G. N., Lorence, R. M., and Gennis, R. B. (1986) *Biochemistry* 25, 2309-2314
- Günzler, H., Heise, H. M. „IR-Spektroskopie – Eine Einführung“ VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996
- Haltia T., Finel, M., Harms, N., Nakari, T., Raitio, M., Wikström, M., Saraste, M. (1989) *EMBO Journal* 8(12), 3571-3579
- Handbook of Chemistry and Physics* (1996), Editor: Lide D.R., 77. Auflage, CRC Press, Boca Raton

-
- Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J.A., Chan, M.K. (2002) *Science* 296(5572), 1462-6
- Harrenga, A., Michel, H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(47), 33296-9
- Hata-Tanaka, A., Matsuura, K., Itoh, S., and Anraku, Y. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 893, 289-295
- Haustein, Elke, Diplomarbeit, Abteilung Biophysik, Universität Ulm, 2000
- Heibel, G. E., Hildebrandt, P., Ludwig, B., Steinrücke, P., Soulimane, T., Buse, B. (1993) *Biochemistry* 32, 10866-10877
- Heitbrink, D., Sigurdson, H., Bolwien, C., Brzezinski, P., Heberle, J. (2002) *Biophys. J.* 82, 1-10
- Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H. and Mänteles, W. (1996) *FEBS Lett.* 385, 53-57
- Hellwig, P., Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, 1998
- Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O.-M. H., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., Mänteles, W. (1998) *Biochemistry* 37, 7390-7399
- Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., Mänteles, W. (1999a) *Biochemistry* 38, 1685-1694
- Hellwig P., Soulimane, T., Buse, G., Mänteles, W., (1999b) *Biochemistry* 38, 9648-9658
- Hellwig P., Soulimane, T., Buse, G., Mänteles, W. (1999c) *FEBS Letters* 458, 83-86
- Hellwig P., Soulimane, T., Mänteles, W., (2002) *Eur. J. Biochem.* 269(19), 4830-8
- Herzberg, G.: „Molecular Spectra and Molecular Structure; II. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules“, (1962), 10. Auflage, D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, 227-238
- Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., Diner, B., and Berthomieu, C. (1997) *Biochemistry* 36, 14712-23
- Hienerwadel, Rainer; Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Freiburg i. B., 1993
- Hill, J. J., Alben, J. O., and Gennis, R. B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5863-5867
- Hill, B. C. (1994a) *J. Biol. Chem.* 269, 2419-2425
-

-
- Hill, B. C. (1994b) *FEBS Lett.* 354; 284-288
- Hill, B. C., Hill, J. J., Gennis, R. B. (1994) *Biochemistry* 33, 15110-15115
- Iwata S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H., (1995) *Nature* 376, 660-669
- John, P., Whatley, F.R. (1975) *Nature* 254, 495-498
- Johnson, J. B., Lamb, D. C., Frauenfelder, H., Müller, J. D., McMahon, B., Nienhaus, G. U., Young, R. D. (1996) *Biophys. J.* 71, 1563-1573
- Jünemann, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1321, 107-127
- Jünemann, S., and Wrigglesworth, J. M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16213-16220
- Kadenbach, B., Jaraus, J., Hartmann, R. and Merle, P. (1983) *Anal. Biochem.* 129, 517-21.
- Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E., Michel, H. (1998) *FEBS Lett.* 434, 17-22
- Keightley, J.A., Zimmermann, B.H., Mather, M.W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D.M., Fee, J.A. *J. Biol. Chem.* (1995) 270(35), 20345-58
- Kitagawa T. (2000) *J. Inorg. Biochem.* 82, 9-18
- Klein, Oliver, Diplomarbeit, Abteilung Biophysik, Universität Frankfurt/Main 1999
- Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., Michel, H. (1995), *Biotechnology* (N. Y.);13(2), 155-60
- Kobayashi, K., Tagawa, S., and Mogi, T. (1999) *Biochemistry* 38, 5913-5917
- Konstantinov, A.A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., Gennis, R. B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9085-9090
- Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., Varotsis, C. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(36), 32860-6
- Krasnoselskaya, I., Arutjunjan, A. M., Smirnova, I., Gennis, R., and Konstantinov, A. A. (1993) *FEBS Lett.* 327, 279-283
- Lappalainen, P., Aasa, R., Malmstrom, B.G., Saraste, M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(35), 26416-21
- Lappalainen, P., Watmough, N.J., Greenwood, C., Saraste, M. (1995) *Biochemistry* 34(17), 5824-30
-

-
- Li, X.-Y., Czernuszewicz, R. S., Kincaid, J. R., Su, Y. O., Spiro, T. G. (1990) *J. Phys. Chem.* 94, 31-47
- Ma, J., Tsatsos, P.H., Zaslavsky, D., Barquera, B., Thomas, J.W., Katsonouri, A., Puustinen, A., Wikstrom, M., Brzezinski, P., Alben, J.O., Gennis, R.B. (1999) *Biochemistry* 38(46), 15150-6
- Mather, M. W., Springer, P., Hensel, S., Buse, G., Fee, J. A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(8), 5395-408
- Michel, H. (1998a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12819–12824
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A. (1998b), *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 329 – 356
- Michel, H. (1999a) *Biochemistry* 38, 15129-15140.
- Mitchell, P. (1966) *Biol. Rev.* 41, 445-502
- Mitchell, R., Rich, P. R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1186, 19-26..
- Mitchell, D.M., Müller, J.D., Gennis, R.B., Nienhaus, G.U. (1996a) *Biochemistry* 35, 16782-16788
- Mitchell, D.M., Shapleigh, J.P., Archer, A.M., Alben, J.O., Gennis, R.B. (1996b) *Biochemistry* 35, 9446-9450
- Mitchell, D.M., Fetter, J.R., Mills, D. A., Ädelroth, P., Pressler, M. A., Kim, Y., Aasa, R., Brzezinski, P., Malmström, B. G., Alben, J. O., Babcock, G. T., Ferguson-Miller, S., Gennis, R. B. (1996c) *Biochemistry* 35, 13089-13093
- Mogi, T., Tsubaki, M., Hori, H., Miyoshi, H., Nakamura, H., and Anraku, Y. (1998) *J. Biochem., Mol. Biol. Biophys.* 2, 79-110.
- Moore, G. R. und Pettigrew, G. W. (1990): *Cytochromes c*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Moss, D.A., Nabedryk, E., Breton, J. and Mäntele, W. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 565-572.
- Nienhaus, G.U., Mourant, J.R., Chu, K., Frauenfelder, H. (1994) *Biochemistry* 33, 13413-13430
- Nienhaus, G.U., Young, R.D. (1996) „Protein Dynamics“ in: *Encyclopedia of Applied Physics*, Vol. 15, 163-184
- Nilsson, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6497-6501.
- Oertling, W. A., Surerus, K. K., Einarsdóttir, O., Fee, J. A., Dyer, R. B., Woodruff, W. H. (1994) *Biochemistry* 33, 3128-3141
-

-
- Ogoshi, H., Saito, Y., Nakamoto, K. (1972) *J. Phys. Chem.* 57, 4194-4202
- Ostermeier C., Harrenga, A., Ermler, U., Michel, H. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10547-10553
- Park, S., Pan, L.P., Chan, S.I., Alben, J.O. (1996) *Biophys. J.* 71, 1036-1047
- Pdb-Code: Brookhaven Proteindatenbank, <http://www.rcsb.org/pdb/>
- Pereira, M.M., Santana, M., Teixeira, M. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 185-208
- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O.-M.H. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 89-97
- Pfützner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O.-M., Ludwig, B. (2000) *Biochemistry* 39, 6756-62.
- Pinchas, S., Laulicht, I. (1977) *Infrared Spectra of Labelled Compounds*, Academic Press, London.
- Poole, R.K., Scott, R.I., Chance, B. (1981) *J. Gen. Microbiol.* 125, 431-438
- Poole, R.K., Salmon, I., Chance, B. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129, 1345-1355
- Poole, R.K., Williams, H.D. (1987) *FEBS Lett.* 217, 49-52
- Poole, R.K. (1988) in 'Bacterial Energy Transduction' (Anthony, C., ed.) 231-291, Academic Press, London
- Poole, R.K. (1994) *Antonie Van Leeuwenhoek* 65, 289-310
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., Wikström, M. (1991) *Biochemistry* 30, 3936-3942
- Qian, J., Shi, W., Pressler, M., Hoganson, C., Mills, D., Babcock, G.T. and Ferguson-Miller, S. (1997) *Biochemistry* 36, 2539-43.
- Ray, G.B., Li, X.-Y., Ibers, J.A., Sessler, J.L., Spiro, T.G.J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 162-176
- Rödig, C., Weidlich, O., Siebert, F. (1994) Springer Proceedings in Physics, Vol. 74, (Ed.: A. Lau, F. Siebert, W. Werncke) Time-Resolved Vibrational Spectroscopy VI, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 227-230
- Roundhill, D.M. (1994). Photochemistry and photophysics of metal complexes. In: *Modern Inorganic Chemistry* (ed. J. P. Fackler), Plenum Press, New York, 165-215
-

-
- Rost, B., Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Erlangen-Nürnberg, 1999
- Rost B., Behr, J., Hellwig, P., Richter, O.-M. H., Ludwig, B., Michel, H., Mäntele, W. (1999) *Biochemistry* 38, 7565-7571
- Rothery, R.A., Houston, A.M., Ingledew, W.J. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133, 3247-3255
- Ruitenberg, M., Dissertation, Chemische und pharmazeutische Wissenschaften, Universität Frankfurt/Main, 2001
- Ruitenberg, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H. und Fendler, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4632-4636.
- Ruitenberg, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., Michel, H. (2002) *Nature* 417 (6884), 99-102
- Sakamoto, J., Koga, E., Mizuta, T., Sato, C., Noguchi, S., and Sone, N. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 147-158
- Saraste, M.Q. (1990) *Rev. Biophys.* 23,331-366
- Schell, A., Dissertation, RWTH-Aachen, 2000
- Schlegel, H.G. (1985) „Allgemeine Mikrobiologie“, 6. Überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Siebert, F. (1995) *Methods Enzymol.* 246, 501-26.: Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems.
- Siebert, F., Mäntele, W., Kreutz, W. (1982) *FEBS Lett.* 141, 82-87
- Skript zur Vorlesung Biophysik, bearbeitet von PD Dr. Alwin Kienle, http://www.uni-ulm.de/biophys/german/lehre/biophysI_vorl/biophI.html, Universität Ulm
- Solioz, M., Carafoli, E., Ludwig, B. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1579-82.
- Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., Than, M. E. (2000) *EMBO Journal*, Vol. 19, No. 8, 1766-1776
- Soulimane, T., Than, M. E., Dewor, M., Huber, R., Buse, G. (2000) *Protein Sci.* 9(11), 2068-73
- Soulimane, T., Kiefersauer, R. and Than, M. E. (2002) “*ba₃*-Cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*: purification, crystallisation and crystal transformation.” Contribution for academic press. A Practical Guide to Membrane Protein Purification and Crystallization, 229-251
-

-
- Spiro, T.G.J., Stong, J.D., Stein, D. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* 101, 2648-2655
- Spiro, T. G., Li, X.-Y. (1988) *Resonance Raman Spectroscopy of Metalloporphyrins*. Kapitel 1 in *Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy*, Wiley and Sons, New York
- Steffens, G.C.M., Soulimane, T., Wolff, G., Buse, G. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 1149-1157
- Steinbach, P. J., Ansari, A., Berendzen, J., Braunstein, D., Chu, K., Cowen, B.R., Ehrenstein, D., Frauenfelder, H., Johnson, J. B., Lamb, D.C., Luck, S., Mourant, J.R., Nienhaus, U.G., Ormos, P., Phillip, R., Xie, A., Young, R.D. (1991) *Biochemistry*, Vol. 30, No. 16, 3988
- Steinbach, P.J., Chu, K., Frauenfelder, H., Johnson, J.B., Lamb, D.C., Nienhaus, G. U., Sauke, T.B., Young, R.D. (1992) *Biophys. J.* 61, 235
- Stryer, L., *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1994, Kap. 13, S. 328
- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., Iwata, S. (2002) *J. Mol. Biol.* 321(2), 329-39
- Than, M.E. und Soulimane, T. (2001) "ba₃-Cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*." Handbook of Metalloproteins. Edited by A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulous and K. Wieghardt, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 363-378
- Thomas, J.W., Puustinen, A., Alben, J.O., Gennis, R.B., Wikström, M. (1993) *Biochemistry* 32, 10923-10928
- Trumpower, B.L., Gennis, R.B. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63, 675-716
- Tsubaki, M., Hori, H., Mogi, T., and Anraku, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28565-28569
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. (1996) *Science* 272, 1136-1144
- Uhmann, W., Becker, A., Taran, C., Siebert, F. (1991) *Appl. Spectros.* Vol 45(3), 390-397
- Vaneste, W.H. (1966) *Biochemistry* 5(3), 838-848
- Venyaminov, S. Y., Kalnin, N. N. (1990) *Biopolymers* 30, 1259-1271
- Verkhovskiy, M.I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M.L., Morgan, J.E. und Wikström, M. (1999) *Nature* 400, 480-483.
- Von Jagow, G. und Engel, W.D. (1980) „Struktur und Funktion des energieumwandelnden Systems in Mitochondrien“ *Angew. Chem.* 92, 684-700
-

-
- Vos, M.V., Borisov, V.B., Liebl, U., Martin, J.-L., Konstantinov, A.A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1554-1559
- Waschipky, R., Dissertation, Abteilung Biophysik, Universität Ulm (in Vorbereitung), 2003
- Wikström, M., Krab, K. and Saraste, M. (1981) *Cytochrome Oxidase: A Synthesis*. Academic Press, New York, USA.
- Wikström, M., Saraste, M. (1984) *Bioenergetics* (Ernester, L., Eds.), Elsevier, Amsterdam, 49-94.
- Wikström, M., Bogachev, A., Finel, M., Morgan, J.E., Puustinen, A., Raitio, M., Verkhovskaya, M., Verkhovsky, M. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 106-111
- Wikström, M. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* 1230, 74-76
- Wikström, M. (Ebec 2002, Vortrag)
- Wilmanns, M., Lappalainen, P., Kelly, M., Sauer-Eriksson, E., Saraste, M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92(26):11955-9
- Woodruff, W. H. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 177-188
- Yamazaki, Y., Kandori, H., Mogi, T. (1999) *J. Biochem.* 125, 1131-1136
- Yoshikawa S, Caughey W.S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 412-420
- Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., Tsukihara, T. (1998) *Science* 280, 1723-1729
- Zaslavsky, D., Kaulen, A.D., Smirnova, I.A., Vygodina, T. und Konstantinov, A.A. (1993) *FEBS Lett.* 336, 389-393.
- Zhang, J., Oettmeier, W., Gennis, R. B., Hellwig, P. (2002) *Biochemistry* 41, 4612-4617
- Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F., Münck, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5779-5783
- Zscherp, C., Barth, A. (2001) *Biochemistry* 40(7), 1875-1883

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Werner Mäntele, der es mir ermöglichte, an seinem Lehrstuhl auf diesem interessanten Gebiet zu arbeiten und der nicht nur für fachliche Fragen stets ein offenes Ohr hatte, sondern auch durch seine freundschaftliche Art so manchen Umgang erleichterte.

Besonderer Dank gilt vor allem aber auch:

- ... meiner Betreuerin PD Dr. Petra Hellwig für aufschlußreiche Diskussionen und ihre "Proteinkompetenzen", die sie mir geduldig zu vermitteln suchte und mit ihrem Wissen zur Aufklärung so mancher Ungereimtheiten beitrug, die man in keiner Veröffentlichung der Welt findet
- ... Dr. Ute Pfitzner für ihre Oxidasen und den Humor dazu
- ... Ernst Winter für all den professionellen technischen Kleinkram, ohne den auch „große Männer“ nicht viel auszurichten imstande sind
- ... dem Arbeitskreis, der mir mein mitunter exzentrisches Benehmen nachsah, nichtzuletzt deswegen, weil es ein Radio ersparte
- ... Carsten Krejtschi für so manche Begleitung zur Kaffeepause
- ... unserer „Pufferfee“ Mark Böhm
- ... allen Webmastern dieser Welt, besonders dem unsrigen, Oliver Klein, selten gewürdigt und immer gebraucht, der im Hintergrund so manchem Gau den Garaus machte und das Geschäft immer am Laufen hielt
- ... der „International Max Planck Research School“ für das Stipendium und dem wunderbaren Austausch zwischen deren fächerübergreifenden „Einheiten“
- ... Tewfik Soulimane und dessen Arbeitskreis für die großzügige Bereitstellung der Oxidasen aus der *Thermus thermophilus* sowie die Korrekturen am entsprechenden Manuskript
- ... einigen ehemaligen Mitarbeitern der Universität Ulm, die ebenfalls zu einem breiten Basiswissen beitrugen: Robert Waschipky, Elke Haustein und Oleksandr Minkow
- ... dem Großmeister im „Kinetik-lesen“ Robert Waschipky, dessen Wurzeln die wunderbare Einführung in Kapitel 3.2.1.3 entstammt und der immer für eine Diskussion bereitstand
- ... Dipl. Phys. Elke Haustein, die mir freundlicherweise diverse Abbildungen aus ihrer Diplomarbeit zur Verfügung gestellt hat, sowie maßgeblich die Struktur der Kapitel 1.2.2 bis 1.2.5 inspiriert hat (...wie oft sollte man das Rad neu erfinden?....)
- ... Herrn Prof. Schubert für seinen stillen, weisen Humor
- ... allen Sekretärinnen dieses Planeten
- ... meinen Eltern und meinem Freundeskreis für verbale Unterstützung aller Art
- ... meiner Freundin Nicole für die Anstrengungen, die so eine Wochenendbeziehung mit sich bringt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andreas Böhm
Geburtsdatum	18. Juli 1968
Geburtsort	Eichstätt
Eltern	Josef und Gabriele Böhm Metzgermeister (selbständig), in Rente Verkäuferin, in Rente

Bildungsweg

1979 – 1985	Knabenrealschule, Rebdorf (Abschluß der mittleren Reife)
1985 – 1987	Berufsausbildung als Fleischer, Ingolstadt (Abschluß mit Gesellenprüfung)
1987 – 1989	Berufsoberschule, Ingolstadt (Abschluß mit der fachgebundenen Hochschulreife)
12/1989 – 2/1991	Zivildienstleistender, Ingolstadt
1991 – 8/1997	Studium der Physik, Universität Regensburg Schwerpunkte im Hauptstudium: Festkörper-, Tieftemperatur-, Halbleiter-, Magnetismusphysik Diplomarbeit im Bereich der Festkörperphysik Thematik: <i>‘Grenzflächen-Untersuchungen in Fe/Tb – Viellagenschichten mit verschiedenen Zwischenlagen’</i> (mittels AES- und XPS- Tiefenprofilanalyse) Abschluß: Diplom Physik
11/1997 – 9/2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Biophysik der Universität Ulm
11/ 2000 – 1/2003	Promotion als Stipendiat der „International Max Planck Research School“ an der Universität Frankfurt/Main, Abteilung Biophysik Thematik: <i>„Untersuchungen zur Dynamik von Proteinen, Korrelationen zwischen Struktur und Funktion“</i>
21. Februar 2003	Disputation im Fachbereich Physik über <i>„Ligandenbindung und -Dynamik bei Oxidasen. IR-spektroskopische Untersuchungen kinetischer und thermodynamischer Eigenschaften“</i>

Tagungen und Posterpräsentationen/Konferenzbeiträge

- 21.-23. Sept. 1998 Deutsche Gesellschaft für Biophysik, Jahrestagung, Frankfurt/Main
Poster, Co-Autor
- 13.-16. Mai 1999 Structural Heterogeneity and Dynamics of Biological Macromolecules, Hünfeld
Treffen der holländischen und deutschen biophysikalischen Gesellschaft und der biochemischen und molekularbiologischen Gesellschaft
Poster, Co-Autor
- 3.-6. Okt. 1999 Deutsche Gesellschaft für Biophysik, Jahrestagung, Ulm
Mitorganisation, Poster
- 26./27. Nov. 1999 Hierarchic Structure Formation and Function of Organic-Inorganic Hybrid Systems, Ulm
Graduiertenkolleg „Molekulare Organisation und Dynamik an Grenzflächen“
Poster, Co-Autor
- 24.-27. Mai 2001 Biophysical Aspects of Electron and Proton Transfer, Hünfeld
Treffen der französischen und deutschen biophysikalischen Gesellschaft
Poster, Co-Autor
- 8.-13. Sept. 2001 9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Prag
Poster, Manuskript
- 26.-28. Sept. 2001 Mauloff Konferenz 2001, Mauloff
SFB Molecular Bioenergetics (SFB 472)
Poster
- 15.-17. Okt. 2001 MPI für Biophysik und International Max Planck Research School Meeting, Mauloff
Vortrag
29. Aug. 2002 SFB 472 Molekulare Bioenergetik (P21), Frankfurt/Main
Poster
- 10.-15. Sept. 2002 12th European Bioenergetics Conference, Arcachon, Frankreich
Poster

Publikationen in Vorbereitung

- Andreas Boehm, Ute Pfitzner, Bernd Ludwig, Werner Mänteles and Petra Hellwig
“The structural properties of Asp399 in the cytochrome c oxidase from P. denitrificans lead to the inhibition of the pH dependency of the CO conformers in light-minus-dark FTIR difference spectra”, in Vorbereitung
- Andreas Boehm, Petra Hellwig, Tewfik Soulimane and Werner Mänteles
„Fourier Transform Infrared Spectroscopic studies on the photodissociation of the ba₃ and caa₃ cytochrome c oxidase CO complex from Thermus thermophilus“, in Vorbereitung
- Andreas Boehm, Tatsushi Mogi, Werner Mänteles and Petra Hellwig
„FTIR spectroscopic evidence for the presence of acidic residues in the vicinity of the quinone and the CO binding site in cytochrome bd oxidase from E. coli“, in Vorbereitung

Lehrtätigkeiten

(jeweils Sommer- und Wintersemester)

1997 bis 1998	Betreuung eines begleitenden Seminars zur Vorlesung „Physik für Naturwissenschaftler“
1999	Betreuung eines Versuchs im Biophysikpraktikum für Physikstudenten
2000	Betreuung eines begleitenden Seminars zur Vorlesung „Physik für Naturwissenschaftler“
2001 bis 2002	Semester-Praktikumsbetreuung „Vorklinischer Kurs, Physik für Mediziner“

Praktika im Rahmen des ‚MPI Research School‘-Stipendiums

8.-12. Okt. 2001	3D crystallization and x-ray crystallography, Prof. H. Michel, MPI für Biophysik, Frankfurt
26.-30. Nov. 2001	site-directed mutagenesis, Prof. B. Ludwig, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt
14.-18. Jan. 2002	advanced microscopy, Prof. J. Bereiter-Hahn, Institut für Zoologie, Universität Frankfurt