

Charakterisierung der *ba*₃ Chinoloxidase aus *Paracoccus denitrificans*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

von Thomas Schröter
aus Mannheim-Neckarau

Frankfurt am Main, 2000
(DF1)

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

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig, Prof. Dr. W. Mäntele

Datum der Disputation: _____

„Die Natur ist unerbitterlich und unveränderlich, und es ist ihr gleichgültig,
ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns dem Menschen
verständlich sind oder nicht.“

Galileo Galilei (1564-1642)

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Paracoccus denitrificans</i> und die Endosymbiontentheorie	1
1.2	Die Atmungskette von <i>P. denitrificans</i>	2
1.3	Die Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen	3
1.4	Die <i>ba</i> ₃ Chinoloxidase aus <i>P. denitrificans</i>	5
1.5	Der Reaktionszyklus der Häm-Kupfer-Oxidasen	10
1.6	Problemstellung, Zielsetzung	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Verwendete Mikroorganismen, ihre Kultivierung und Lagerung	17
2.1.1	Escherichia coli-Stämme	17
2.1.2	Paracoccus denitrificans-Stämme	18
2.1.3	Medien	19
2.1.4	Antibiotika	20
2.1.5	Anzucht und Lagerung	20
2.2	Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1	Plasmide	21
2.2.2	Plasmidisolierung im kleinen Maßstab - Minipräp	23
2.2.3	Restriktion von DNA	23
2.2.4	Klenow-Fragment-Behandlung	24
2.2.5	Dephosphorylierung von DNA	24
2.2.6	Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten	24
2.2.7	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	25
2.2.8	Ligation	25
2.2.9	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen	25
2.2.10	Transformation	26
2.2.11	Triple mating	26
2.2.12	Blue white Screening	27
2.2.13	Gerichtete Mutagenese	27
2.2.13.1	Präparation von Phagen-Einzelstrang-DNA	28

2.2.13.2	Konstruktion von Oligonukleotiden	29
2.2.13.3	Phosphorylierung der Oligonukleotide	30
2.2.13.4	Mutagenese-Reaktion	30
2.2.14	DNA-Sequenzierung und Autoradiographie	31
2.2.14.1	DNA-Sequenzierung	31
2.2.14.2	Alkalische Denaturierung	32
2.2.14.3	Sequenzier-Primer	32
2.2.14.4	Autoradiographie	33
2.2.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.15.1	Reaktionsbedingung	34
2.2.15.2	PCR-Primer	35
2.2.16	Dot-Blot	35
2.3	Proteinchemische Arbeiten	38
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
2.3.2	Western-Blot	38
2.3.3	Membranpräparation	40
2.3.4	Proteinpräparation der Chinoloxidase	41
2.3.4.1	Präparation mittels Strep-Tag II	41
2.3.4.2	Präparation mittels His-Tag	43
2.3.4.3	Präparation ohne Affinitätstag	44
2.3.5	Enzymatischer Test	44
2.3.6	Häm-Extraktion und HPLC	45
2.3.7	Ganzzellpumpen	46
2.4	Spektroskopische Techniken	47
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	47
2.4.2	Optische-Spektren	47
2.4.2.1	Redox-Spektren unter nativen Bedingungen	48
2.4.2.2	Redox-Spektren unter denaturierenden Bedingungen	48
2.4.2.3	CO-Differenzspektren	49
2.4.2.4	CN-Differenzspektren	49
2.4.2.5	Redox-FTIR-Spektren	50
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
3.1	Chinoloxidase, Optimierung der Expression	51
3.1.1	Konstruktion eines aa ₃ /ba ₃ -Deletionsstamms – TSP24/26	52
3.1.2	Promotorstudien	57
3.1.2.1	Porinpromotor	58
3.1.2.2	<i>cta</i> -Promotor – TSP27	60
3.1.3	Diskussion	62

3.2	Reinigung und Charakterisierung der <i>ba</i>₃ Chinoloxidase	66
3.2.1	Reinigung der <i>ba</i> ₃ Chinoloxidase mittels Streptavidintag	66
3.2.2	Reinigung der <i>ba</i> ₃ Chinoloxidase mittels Histidintag	69
3.2.3	Reinigung der <i>ba</i> ₃ Chinoloxidase ohne Affinitätstag	71
3.2.4	Kinetische Parameter	73
3.2.5	Diskussion	75
3.3	Expression des <i>Escherichia coli cyo</i>-Operons in <i>Paracoccus denitrificans</i> und Charakterisierung der Chinoloxidase	78
3.3.1	Konstruktion von ORI2K31	78
3.3.2	Charakterisierung	80
3.3.3	Diskussion	83
3.4	Heterogenität der Untereinheit II der <i>ba</i>₃ Chinoloxidase	85
3.4.1	Konstruktion der verkürzten Fragmente	85
3.4.2	Reinigung und Charakterisierung	86
3.4.3	Diskussion	87
3.5	Protonen-Ausgangskanal, Rolle der Arginine 490/491 und Aspartat 416	89
3.5.1	Konstruktion der Arginin- und Aspartat-Mutanten	89
3.5.2	Ganzzellpumpen	90
3.5.3	Diskussion	93
3.6	Untersuchungen am binukleären Zentrum - Tyrosin 297	97
3.6.1	Konstruktion der Tyrosin-Mutanten	97
3.6.2	Charakterisierung	98
3.6.3	Diskussion	103
4	ZUSAMMENFASSUNG	106
5	LITERATURVERZEICHNIS	108
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
7	LEBENS LAUF	122
8	PUBLIKATIONEN	124
9	DANKSAGUNG	125

1 Einleitung

1.1 *Paracoccus denitrificans* und die Endosymbiontentheorie

Paracoccus denitrificans ist ein gram-negatives, unbewegliches Bodenbakterium, das basierend auf einem Vergleich der 16S-rRNA taxonomisch zur α_3 -Untergruppe der Purpurbakterien gehört (Woese, 1987). Als Bodenbakterium muß *P. denitrificans* in der Lage sein, auf verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen zu leben, da der Lebensraum Boden eng benachbart unterschiedliche Mikrobiotope aufweisen kann. Innerhalb kleinster Distanzen kann die Sauerstoffsättigung um 100% variieren (Brock und Madigan, 1988). Die Sauerstoff- und Nitratkonzentrationen können sich in Abhängigkeit von klimatischen Bedingungen innerhalb kurzer Zeit drastisch ändern.

In Anpassung an verschiedene Nährstoffquellen im Boden kann *P. denitrificans* auf ein heterotrophes Wachstum mit Succinat zurückgreifen bzw. C1-Substrate wie Methanol oder Methylamin als Kohlenstoffquelle nutzen. Desweiteren können anorganische Verbindungen wie Wasserstoff, Sulfit und Thiosulfat zur Energieumwandlung verwendet werden. Unter anaeroben Bedingungen verfügt *P. denitrificans* über die Möglichkeit, Nitrat anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu benutzen (Haddock und Jones, 1977; van Verseveld und Bosma, 1987), wobei eine Nitrat-, Nitrit-, N₂O- und NO-Reduktase eingesetzt werden (van Verseveld und Bosma, 1987; Snyder und Hollocher, 1987; Carr und Ferguson, 1990).

Besonderes Interesse erlangte *P. denitrificans* als Modellorganismus für die mitochondriale Atmungskette, da unter heterotrophen, aeroben Bedingungen eine Atmungskette exprimiert wird, die große Ähnlichkeit mit der aus Mitochondrien eukaryotischer Zellen aufweist. Zu fast allen Atmungskettenenzymen sind in *P. denitrificans* Homologe, z. T. auch deren Gene, bereits isoliert worden (Ludwig und Schatz, 1980; Yagi, 1986; Yang und Trumppower, 1986; Kurowski und Ludwig, 1987; Richter et al., 1994; Baker et al., 1998). Nach der Endosymbiontentheorie des evolutionären Ursprungs der eukaryotischen Zelle (Margulis, 1970) läßt sich die große Homologie dadurch erklären, daß für die Mitochondrien ein Vorläufer aus der Gruppe der α -Untergruppe der Purpurbakterien angenommen wird (Yang et al., 1985).

1.2 Die Atmungskette von *P. denitrificans*

Während der Glykolyse, des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation entstehen reduzierte Elektronenüberträger, hauptsächlich NADH, welche aufgrund ihres begrenzten Pools wieder oxidiert werden müssen. Unter aeroben Bedingungen werden die Elektronen auf Sauerstoff als terminalen Akzeptor unter Bildung von H₂O übertragen. Dies geschieht schrittweise mittels membranständiger Redoxproteine. Mit NADH als primärem und H₂O als terminalem Elektronendonator kann eine freie Enthalpie von $\Delta G_0' = 220 \text{ kJ/Mol}$ genutzt werden. Diese bei der Elektronenübertragung freiwerdende Energie ist mit dem Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die Membran gekoppelt, der sich aus einem chemischen Konzentrationsgradienten und einem elektrischen Membranpotential zusammensetzt. Der elektrochemische Gradient wird schließlich genutzt, um ATP durch Phosphorylierung aus ADP zu produzieren.

Die für diese Prozesse notwendigen Enzyme bilden die Atmungskette und befinden sich in Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran und in Prokaryoten in der Cytoplasmamembran. Zu diesen Atmungskettenenzymen gehören die integralen Membranproteine NADH : Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), die Succinat : Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), die Ubichinol : Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III oder *bc*₁-Komplex), sowie die *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV). Alternativ zur *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase (Ludwig und Schatz, 1980) als terminaler Oxidase können in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung zwei weitere Oxidasen exprimiert werden (de Gier et al., 1994). Dabei handelt es sich um eine *cbb*₃ Cytochrom *c* Oxidase und eine Chinoloxidase vom *ba*₃-Typ. Letztere kann unter Umgehung des *bc*₁-Komplexes direkt von Ubichinol reduziert werden (Richter et al., 1994).

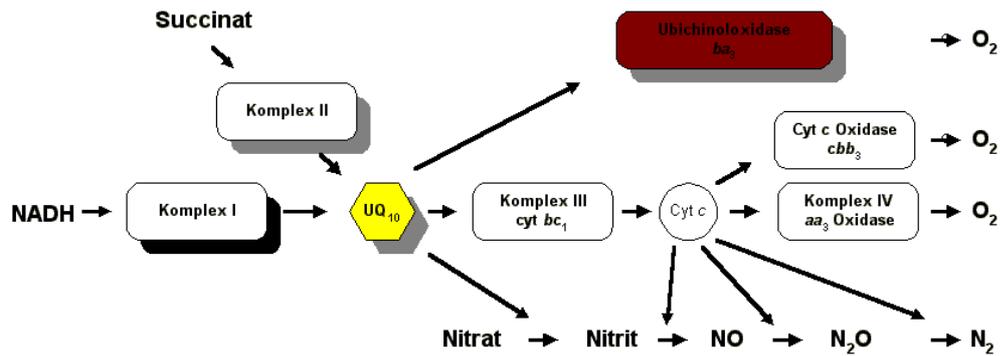


Abb. 1: Anaerobe und aerobe Elektronentransferwege in *P. denitrificans*. Komplex I, Komplex III sowie die drei terminalen Oxidasen sind zur Protonentranslokation über die Membran vom Cytoplasma ins Periplasma befähigt.

In *Paracoccus* besitzen die Komplexe I, III sowie die drei terminalen Oxidasen neben ihrer Funktion als Elektronenüberträger noch die für den Aufbau des Protonengradienten notwendige Eigenschaft der Protonentranslokation über die Membran. Als mobile Elektronenüberträger zwischen den Komplexen dienen das lipidlösliche Ubichinol, ein Benzochinon mit langer Isoprenoid-Seitenkette, sowie lösliches Cytochrom *c* in den Mitochondrien bzw. membrangebundene *c*-Typ Cytochrome als Elektronenüberträger in *P. denitrificans*.

1.3 Die Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen

Alle drei terminalen Oxidasen haben als gemeinsame Merkmale die Existenz eines binukleären Zentrums in Untereinheit I sowie die Fähigkeit zur Protonentranslokation (Saraste et al., 1991) und gehören ebenso wie die NO-Reduktase der Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen an. Das binukleäre Zentrum der drei terminalen Oxidasen aus *P. denitrificans* wird aus einem fünffach koordinierten high-spin Häm und dem Cu_B gebildet und ist der Ort der Sauerstoffreduktion. In der gleichen Untereinheit befindet sich weiterhin ein sechsfach koordiniertes low-spin Häm. Die Zuordnung von Proteinen in diese Superfamilie ist mittels Sequenzanalyse möglich, da für die Bindung der beiden Häm-Komponenten sowie für die Bindung von Cu_B insgesamt sechs Histidine in typischen Positionen vorhanden sein müssen.

Die größten Sequenz-Homologien zwischen den terminalen Oxidasen liegen mit dem binukleären Zentrum und dem low-spin Häm in der Untereinheit I vor, wobei jedoch die low- und high-spin Häm-Bindungstaschen durch unterschiedliche Häm-Typen besetzt sein können. Zu ihnen gehören Häm *a*, *b* und *o* sowie ungewöhnliche Häm *a*-Derivate in Archaeobakterien (Lübben et al., 1994).

<i>P. denitrificans</i>	UE	Chinoloxidasen			Cytochrom <i>c</i> Oxidasen
		<i>E. coli</i> <i>bo</i> ₃	<i>A. aceti</i> <i>ba</i> ₃	<i>B. subtilis</i> <i>aa</i> ₃	<i>P. denitrificans</i> <i>aa</i> ₃
<i>ba</i> ₃					
QoxA	II	43	43	26	19
QoxB	I	65	61	49	35
QoxC	III	55	51	38	28
QoxD	IV	52	41	25	- ^a

Tab. 1: Aminosäurehomologien zwischen verschiedenen Häm-Kupfer Oxidasen. Die Zahlen geben die prozentuale Übereinstimmung mit der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* an (Richter et al., 1994).
a: Zwischen Chinoloxidasen und Cytochrom *c* Oxidasen sind für die UE IV keine Aminosäurehomologien feststellbar.

Untereinheit II ist zwar innerhalb einer Gruppe der Oxidasen recht gut konserviert, unterscheidet sich jedoch im Vergleich der Gruppen miteinander. So tragen die Cytochrom *c* Oxidasen im Vergleich mit den Chinoloxidasen ein weiteres Metallzentrum. Im Falle der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* handelt es sich dabei um ein binukleäres Cu_A-Zentrum, dem eine Rolle beim Elektronenfluß vom Substrat Cytochrom *c* zum Reaktionszentrum in Untereinheit I zukommt. Sieht man von den *cbb*₃ Oxidasen und den NO-Reduktasen ab, so sind in diesen beiden Untereinheiten alle redox aktiven Zentren lokalisiert.

Unterschiede zwischen den einzelnen Häm-Kupfer-Oxidasen liegen vor allem in der Zusammensetzung der Untereinheiten und der genetischen Organisation. So besitzt die *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* vier Untereinheiten, die Cytochrom *c* Oxidase aus Rind jedoch 13 Untereinheiten. Während im Falle der *Paracoccus aa*₃ Cytochrom *c*

Oxidase die vier Untereinheiten auf 3 Genloci vorliegen, sind im Fall der Chinoloxidase aus dem selben Bakterium alle Untereinheiten in einem Operon kodiert.

1.4 Die *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans*

Die *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans*, eine von drei terminalen Oxidasen im aeroben Elektronentransferweg, wird durch das *qox*-Operon kodiert. Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigen, daß die Strukturgene für die vier Untereinheiten II, I, III und IV direkt aufeinander folgen und durch Abstände von maximal 12 Nukleotiden getrennt sind.

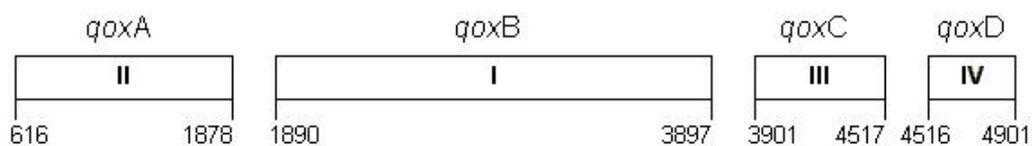


Abb. 2: Das *qox*-Operon aus *P. denitrificans*. Arabische Zahlen geben die Nukleotidpositionen der Strukturgene auf dem Operon an. Römische Zahlen charakterisieren die Untereinheit.

Das erste Gen *qoxA* kodiert für die 379 Aminosäuren der reifen Untereinheit II mit einer berechneten Masse von 42 kD. Die im Anschluß folgenden Operonregionen *qoxB*, C und D kodieren für die Untereinheiten I, III und IV mit 668, 205 bzw. 127 Aminosäuren und berechneten Massen von 75, 23 bzw. 14 kD.

Durch Sequenzanalyse, Hydropathieplot und durch Fusionsprotein-Analyse (Winterstein, 1997) konnte ein Topologiemodell für die Chinoloxidase aufgestellt werden (Abbildung 3). Für die Untereinheit I ergibt sich eine membranständige Domäne mit 15 Transmembranhelices, deren aminotermiales Ende im Periplasma und carboxyterminales Ende im Cytoplasma liegt. In Analogie zu anderen Häm-Kupfer-Oxidasen befinden sich in dieser Untereinheit die für diese Proteinspezies typischen sechs Histidine in invarianter Position. Sie fungieren als Liganden für die prosthetischen Gruppen des binukleären

Reaktionszentrums. Dieses besteht aus einem high-spin Häm a_3 und dem Cu_B , sowie ein weiteres low-spin Häm b in unmittelbarer Umgebung. Am binukleären Zentrum wird molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Gekoppelt an diesen Prozeß werden Protonen über die Membran transloziert. Die Häm b und a Gruppen führen zu einem Redox-Spektrum mit zwei Maxima im α -Bereich bei 564 nm und 609 nm, deren Verhältnis bei 1:1 nach Pyridinhämochrom-Spektren liegt. CO-Differenzspektren identifizieren Häm a als das Sauerstoff-bindende high-spin Häm.

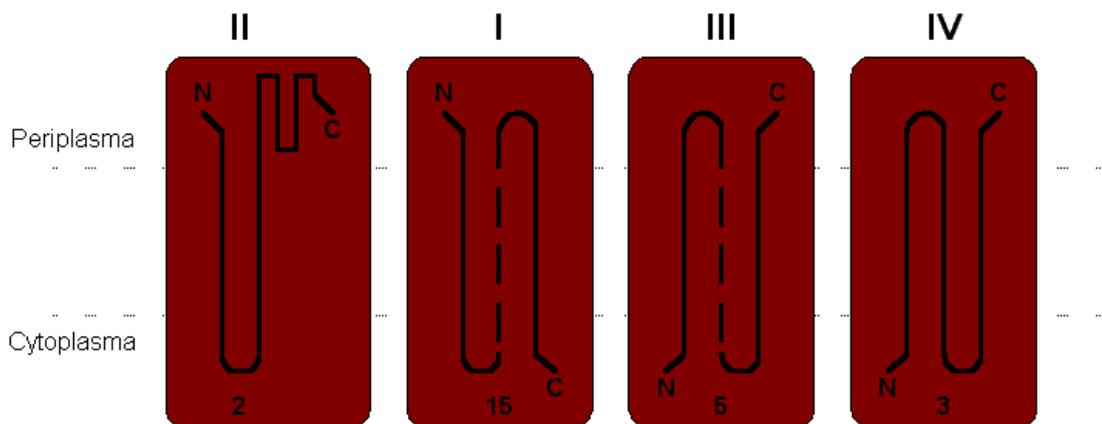


Abb. 3: Topologiemodell der *Paracoccus* Chinoloxidase. Untereinheiten sind mit römischen Zahlen angedeutet, die arabischen Ziffern geben die Anzahl der Transmembranhelices an.

Definierte Aminosäuren, welche in den Cytochrom c Oxidasen aus Rinderherz und *P. denitrificans* wichtig für die katalytische Funktion sind bzw. sogenannte Protonenkanäle bilden, sind ebenfalls in der Chinoloxidase konserviert. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem D- und einem K-Kanal, benannt nach den Aminosäurepositionen D124 und K354 (*Paracoccus aa₃* Nomenklatur). Diese Kanäle haben die Aufgabe, die für die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser notwendigen Protonen zu liefern, und fungieren darüber hinaus noch als Transportweg für die über die Membran zu translozierenden Protonen. Bisher ist über den Protonenaustritt aus der Oxidase ausgehend vom binukleären Reaktionszentrum noch wenig bekannt. Im Falle der *E. coli* Chinoloxidase werden jedoch zwei benachbarte Arginine diskutiert, die für die Weiterleitung der Protonen unmittelbar nach dem Reaktionszentrum eine wichtige Rolle spielen sollen (Puustinen und Wikström, 1999). Anzumerken ist hierbei, dass diese beiden Arginine sowohl in der aa_3 als auch in der ba_3 Oxidase aus *P. denitrificans* konserviert sind.

Neue Strukturdaten der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* (Abramson et al., 2000) weisen in Übereinstimmung mit FTIR-Daten eine mögliche Chinol-Bindungsstelle in Untereinheit I auf. Diese würde durch in Chinoloxidasen konservierte Bereiche der Helices I und II gebildet. Die Aminosäuren R71, D75, H98 und Q101 (*E. coli bo*₃ Nomenklatur) würden die Bindung eines Chinols durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisieren. Der Elektronentransfer zum binukleären Zentrum könnte dann direkt über das low-spin Häm geschehen.

Untereinheit II besteht aus zwei Transmembranhelices, deren beide Enden im Periplasma liegen, sowie einer globulären periplasmatischen Domäne. Im Gegensatz zu den Cytochrom *c* Oxidasen fehlt hier jedoch das binukleäre Cu_A-Zentrum. Auf Grundlage der Kristallstrukturdaten der *P. denitrificans aa*₃ Oxidase und der *E. coli bo*₃ Oxidase findet man eine Schleife, deren Position, Größe und Orientierung weitgehend identisch ist und sich in unmittelbarer Nähe zum binukleären Cu_A-Zentrum befindet (siehe Abbildung 4). Im Falle der *bo*₃ Chinoloxidase soll sich an dieser Position eine Chinol-Bindungsstelle befinden (Tsatsos et al., 1998). Diese könnte ein Chinon enthalten, welches die Funktion des Cu_A-Zentrums übernehmen soll. Eine Analyse der Kristallstrukturdaten der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* weist jedoch darauf hin, daß der für die Bindung von Chinon benötigte Raum in dieser Region nicht vorhanden ist. Die im Falle der Cytochrom *c* Oxidase benutzte Aminosäure Tryptophan 121, welche als primärer Elektroneneintrittsorts charakterisiert wurde, ist hier ebenfalls konserviert, obwohl die *ba*₃ Oxidase das hydrophobe Ubichinol und nicht das hydrophile Cytochrom *c* als Substrat verwendet und demzufolge auch einen anderen primären Elektronenakzeptor benutzt. Strukturvergleiche zwischen dem löslichen Fragment der Untereinheit II der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* und der zweiten Untereinheit der *Paracoccus* Cytochrom *c* Oxidase des *aa*₃ Typs zeigen bei einer Sequenzhomologie von 15% eine nahezu identische Struktur in weiten Bereichen dieser Untereinheit (siehe Abb. 4). Auch hier zeigt sich wieder eine Sequenzhomologie und Verwandtschaft innerhalb der Familie der Häm-Kupfer Oxidasen.



Abb. 4: Vergleich der löslichen Domäne der Untereinheit II der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* (links) und der Untereinheit II der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* (rechts). Strukturell homologe Bereiche sind farblich hervorgehoben. In Blau sind die beiden Cu-Atome des binukleären Cu_A-Zentrums der Cytochrom Oxidase eingezeichnet. Die konservierte Aminosäure Tryptophan 121 (*Paracoccus aa*₃ Nomenklatur) ist hervorgehoben.

Für die Translation der Untereinheit II stehen zwei potentielle Startpunkte im Abstand von 20 Aminosäuren zur Verfügung (Richter et al., 1994). Da für *P. denitrificans* bis dato noch keine Promotor-Konsensussequenz ermittelt wurde, läßt sich keine klare Aussage darüber treffen, welches der beiden Methionine als Translationsstart benutzt wird. Die Bestimmung des Transkriptionsstarts durch S1-Mapping spricht jedoch eindeutig für das zweite Methionin als Translationsstart (Zickermann et al., 1997).

Eine Analyse der Laufeigenschaften der Untereinheit II mittels Gelelektrophorese sowie Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen die Untereinheit II zeigen ein ungewöhnliches Laufverhalten dieser Untereinheit. Man beobachtet drei distinkte Banden mit aus dem

Laufverhalten berechneten molekularen Massen von 43,5 sowie 37 und 34 kD. Die unterschiedlichen Größen sind jedoch nicht auf einen proteolytischen Abbau des aminoterminalen Endes zurückzuführen (Zickermann et al., 1996). Alle drei Formen dieser Untereinheiten beginnen mit den Aminosäuresequenz KAEV bzw. AEV, also der fünften bzw. sechsten Aminosäure nach dem Startmethionin. Auch konnte wie im Falle der Chinoloxidase aus *E. coli* (Ma et al., 1997) oder der *aa*₃ Chinoloxidase aus *Bacillus subtilis* (Santana et al., 1992) bisher noch keine Lipidmodifikation des aminoterminalen Endes gezeigt werden.

Über die Funktion der Untereinheit III ist bis zum heutigen Tage wenig bekannt. Sie besteht im Falle der *Paracoccus* Chinoloxidase aus 205 Aminosäuren, die zusammen 5 Transmembranhelices bilden. Eine mögliche Funktion dieser Untereinheit wird im Falle der Cytochrom *c* Oxidasen im Erhalt der strukturellen Integrität des Cu_B-Zentrums in der Untereinheit I gesehen (Bratton et al., 1999) bzw. für den richtigen Zusammenbau der Untereinheiten (I und II) zu einem aktiven Komplex diskutiert (Haltia et al., 1989).

Bei Untereinheit IV findet man sowohl strukturell als auch funktionell Diskrepanzen zwischen Cytochrom *c* Oxidasen und Chinoloxidasen. Das Gen der vierten Untereinheit der Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* wurde erstmals 1997 sequenziert (Witt und Ludwig, 1997). Diese Untereinheit besteht aus 49 Aminosäuren und bildet eine Transmembranhelix aus. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Deletion dieser Untereinheit keinen Einfluß auf den Zusammenbau und die Funktion der Oxidase hat. Die Untereinheit IV der Chinoloxidasen sowohl aus *E. coli* als auch aus *P. denitrificans* wird von 3 Transmembranhelices gebildet und soll einen Einfluß auf den korrekten Zusammenbau des Holo-Enzyms haben. So konnte im Falle der *E. coli* Oxidase gezeigt werden, daß eine Deletion der beiden C-terminalen Helices zu einem Verlust des Cu_B-Einbaus führten (Saiki et al., 1997; Saiki et al., 1996). Um diese Funktion erfüllen zu können, soll die Untereinheit IV in einer Spalte zwischen den Untereinheiten III und I liegen (Saiki et al., 1997) (siehe Abbildung 5). Im Falle der *Paracoccus aa*₃ Oxidase konnte jedoch gezeigt werden, daß ein Ablösen der Untereinheit III und IV nach erfolgtem Assembly zu keinem Aktivitätsverlust führt (Ludwig und Schatz, 1980).

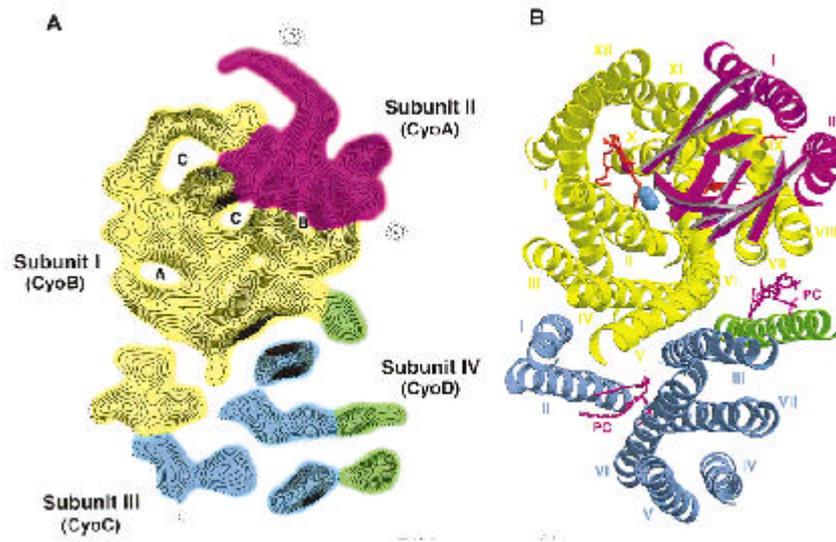


Abb. 5: Strukturvergleich der 6 Å Projektion der *cyo bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* (A), sowie der 2,8 Å Struktur der Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* (B). aus (Gohlke et al., 1997); Aufsicht auf die Membran.

1.5 Der Reaktionszyklus der Häm-Kupfer-Oxidasen

Im Gegensatz zur *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* für die eine Substrat-Bindeposition und deren primärer Elektroneneintrittsort durch die Aminosäure Tryptophan 121 (*P. denitrificans* Nomenklatur) definiert wurde (Witt et al., 1998a; Witt et al., 1998b), ist bis heute noch keine Chinol-Bindungstasche für die Chinoloxidase aus dem selben Organismus bestimmt. In der Chinoloxidase stellt Häm *b* den ersten bekannten Elektronenakzeptor dar. Für die Sauerstoffreduktion werden die Elektronen ausgehend vom Ubichinol über das low-spin Häm zum binukleären Zentrum übertragen. Parallel dazu werden die für diese Reaktion benötigten Protonen auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins aufgenommen.

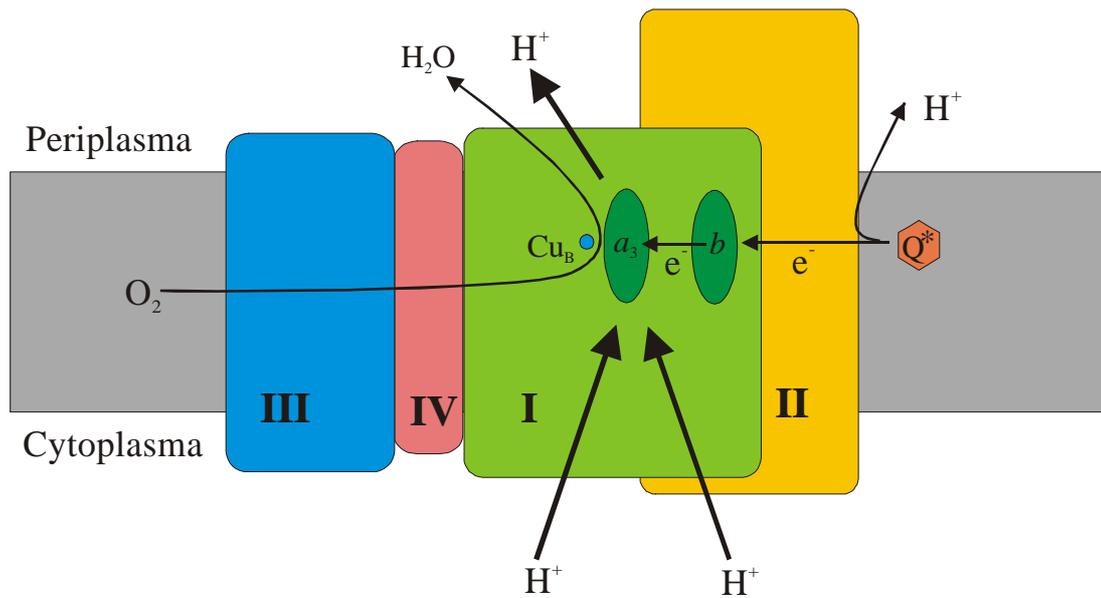


Abb. 6: Schematische Darstellung der Elektronen- und Protonentransferwege in der Chinoloxidase aus *P. denitrificans* (ohne Berücksichtigung der Stöchiometrie).
Q*: Chinol

Gekoppelt an diesen Prozeß wird pro übertragenem Elektron noch ein „vektorielles“ Proton von der cytoplasmatischen Seite über die Membran transloziert. Für den Transfer der chemischen und vektoriellen Protonen werden der D- bzw. der K-Kanal genutzt. Das Zusammenspiel der bei der Sauerstoffreduktion ablaufenden Prozesse ist sehr komplex und wird, bezogen auf Sauerstoffintermediate, Nutzung der Protonenkanäle und Zeitpunkt der Protonentranslokation über die Membran kontrovers diskutiert (Morgan et al., 1994; Iwata et al., 1995; Konstantinov et al., 1998; Michel, 1998; Wikström et al., 1998; Michel, 1999; Verkhovsky et al., 1999; Wikström, 2000).

Ausgehend von einem oxidierten binukleären Zentrum entsteht nach der Übertragung von zwei Elektronen über das **E**-Intermediat (Ostermeier et al., 1997; Michel, 1998; Michel, 1999) das sogenannte **R**-Intermediat. Durch die Reduzierung des binukleären Zentrums kann nun molekularer Sauerstoff am high-spin Häm a_3 binden (**Compound-A**) (Chance et al., 1975). Ohne weitere Aufnahme von Elektronen oder Protonenbewegung kommt es zur Spaltung der O-O-Bindung (Michel, 1998; Michel, 1999), so daß nun beide Sauerstoffe in der Oxidationsstufe von Wasser vorliegen und es sich bei der Häm a_3 -Sauerstoffverbindung um

eine Oxoferryl-Spezies handelt (Weng und Baker, 1991). Dieser Zustand wird als \mathbf{P}_M -Intermediat bezeichnet.

Für die vollständige Reduktion des Sauerstoffmoleküls bis zur Oxidationsstufe von Wasser werden vier Elektronen benötigt. Da jedoch aus den beiden Metallzentren des binukleären Zentrums nur drei Elektronen geliefert werden können, wird die Entstehung eines Aminosäureradikals diskutiert, welches das nötige vierte Elektron liefern soll. Es könnte sich in Analogie zur Cytochrom *c* Peroxidase um ein Tyrosin (Y280 in der aa₃ Oxidase aus *Paracoccus*; Analog zu Y297 in der ba₃ Oxidase aus *Paracoccus*) handeln (Ostermeier et al., 1997; Michel, 1998; Michel, 1999), welches kovalent an Histidin 276, eines von drei Cu_B-Liganden, gebunden ist. Ein solches Radikal konnte im \mathbf{F}' -Intermediat (Moody und Rich, 1994) aufgrund antiferromagnetischer Kopplung durch das an Cu_B gebundene Hydroxidion (Weng und Baker, 1991), mittels ESR sichtbar gemacht werden und durch den Einsatz von Isotopen-markiertem Tyrosin eben einem solchen zugewiesen werden (MacMillan et al., 1999). Das \mathbf{F}' -Intermediat entsteht direkt aus dem \mathbf{P}_M -Intermediat durch die Aufnahme eines weiteren Protons.

Durch die Aufnahme eines dritten Elektrons entsteht nun aus dem \mathbf{F}' -Intermediat das \mathbf{P}_R -Intermediat. Dieses unterscheidet sich vom \mathbf{P}_M -Intermediat dadurch, daß aus dem Tyrosinradikal wieder ein Tyrosin entsteht (Michel, 1999). Ohne weitere Elektronenaufnahme kann nun das \mathbf{F} -Intermediat (Wikström und Morgan, 1992) gebildet werden, wobei das an Cu_B gebundene Hydroxidion protoniert wird. Durch Reduktion des binukleären Zentrums mittels eines vierten Elektrons entsteht eine Fe³⁺-Hydroxid Verbindung am high-spin Häm. Durch die Umlagerung der beiden Liganden, ein Hydroxidion am Fe³⁺ und ein Wassermolekül am Cu_B entsteht wieder der oxidierte Ausgangszustand (Michel, 1998; Michel, 1999).

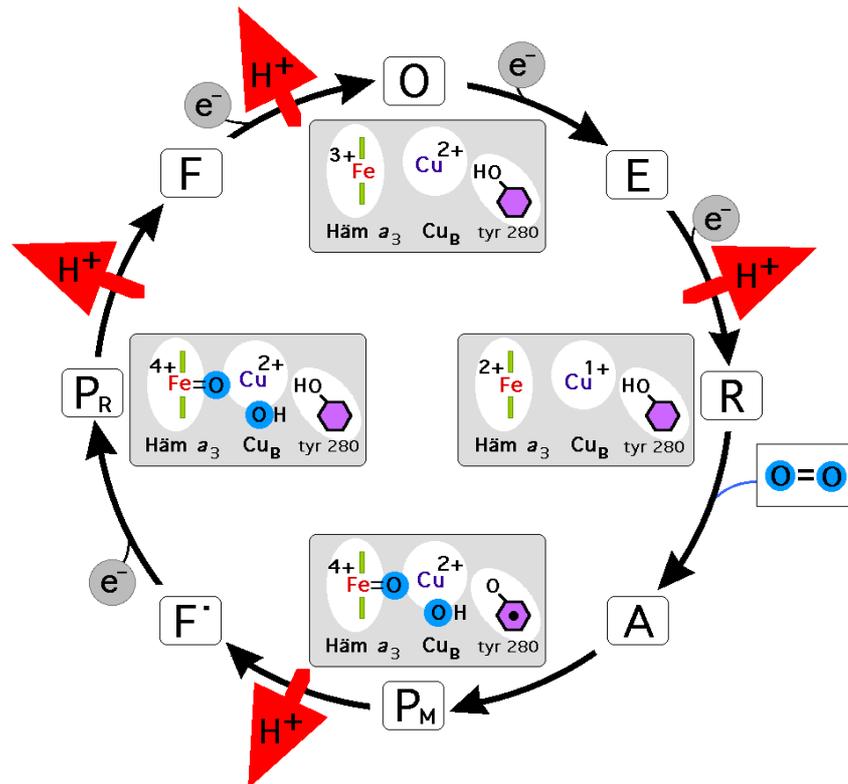


Abb. 7: Reaktionszyklus der Sauerstoffreduktion am binukleären Zentrum. Das in der Abbildung dargestellte Tyr280 (*Paracoccus aa*₃ Oxidase-Nomenklatur) ist ein Analog zu Tyr297 (*Paracoccus ba*₃ Oxidase). Die Abbildung lehnt sich an das Modell von Michel an (Michel, 1999); graphisches Layout: B. Ludwig.

Ein kritischer Punkt ist der Zeitpunkt des Protonentransfers über die Membran. Aufgrund der Forderung der Ladungsneutralität am binukleären Zentrum muß jeder Elektronentransferprozeß mit einer Ladungskompensation einhergehen (Mitchell und Rich, 1994). Es ergab sich daher die Schlußfolgerung, daß jeder Elektronentransfer am Reaktionszentrum durch die Aufnahme eines Protons ausgeglichen wird (Rich, 1995).

In dem hier dargestellten Modell geht man davon aus, daß schon während der Reduktion des binukleären Zentrums vor der Bindung eines Sauerstoffmoleküls das erste Proton über die Membran gepumpt wird. Nach diesem Modell würden dann während des Übergangs von P[⊗]F zwei weitere und zwischen F[⊗]O ein Proton über die Membran transloziert (Michel, 1998; Michel, 1999).

In einem früheren Modell nahm man an, daß die Translokation der vektoriellen Protonen ausgehend von einem vollständig reduzierten Enzym zwischen den Phasen **P@F** und **F@O** stattfinden würde (Wikström, M und Babcock, G. T., 1990). Ausgehend von dieser Vorstellung sollte ein Histidinrest am Mechanismus der Protonentranslokation über die Membran beteiligt sein und in diesem Zusammenhang ein wichtiges Bindeglied zwischen Elektronenfluß und Protonentranslokation darstellen. Je nach Modell spricht man von einem Histidin-Shuttle (Iwata et al., 1995) oder Histidin-Zyklus (Wikström et al., 1994). Ein weiteres Modell schlägt vor, daß die Protonentranslokation ausgehend vom reduzierten binukleären Zentrum in zwei Teilschritten abläuft. Zwei Protonen werden während der oxidativen Phase **R@O** über die Membran transloziert, die beiden anderen während der re-reduktiven Phase **O@R**. Die Protonentranslokation während der re-reduktiven Phase ist dabei energetisch an die während der oxidativen Phase entstehenden Spezies $O\sim$ des Enzyms gekoppelt (Verkhovsky et al., 1999).

Mit Hilfe von Kristallstrukturen der Cytochrom *c* Oxidasen aus Rinderherz und *Paracoccus* (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1996) sowie durch Mutagenesestudien (Gennis, 1992; Garcia-Horsman et al., 1995; Jünemann et al., 1997; Ädelroth et al., 1998; Pfitzner et al., 1998) konnten zwei Protonentransferwege vom Cytoplasma bis hin zum binukleären Zentrum postuliert werden, der sogenannte D- und K-Kanal. Die Frage jedoch, über welchen Protonenkanal die jeweiligen chemischen bzw. vektoriellen Protonen transportiert werden, ist bis heute nicht geklärt. Abweichend von der ursprünglichen Annahme, daß der D-Kanal die vektoriellen Protonen transloziert und der K-Kanal die chemischen Protonen zum binukleären Zentrum transportiert, ist man sich heute einig, daß zumindest das erste Proton (Michel, 1999; Michel, 1998), möglicherweise auch noch das zweite (Konstantinov et al., 1997) über den K-Kanal transportiert wird.

1.6 Problemstellung, Zielsetzung

Durch die Kristallstrukturanalyse von Cytochrom *c* Oxidasen aus verschiedenen Organismen sowie durch zahlreiche Mutagenesestudien ist es gelungen, zwei Protonenkanäle zu definieren, den D- und K-Kanal, durch die Protonen zum binukleären Zentrum transportiert werden können. Diese werden dort entweder zur Sauerstoffreduktion als „chemische“ Protonen verbraucht bzw. können als „vektorielle“ Protonen über die Membran transloziert werden. Der genaue Ablauf dieser Reaktionen, die darin involvierten Aminosäuren sowie der weitere Weg der vektoriellen Protonen über das binukleäre Zentrum hinaus ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Zum Zeitpunkt der Planung und Durchführung der Experimente gab es noch keine dreidimensionale Struktur von Chinoloxidasen mit Ausnahme des löslichen Fragments der Untereinheit II der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli*. Jedoch ist auf der Grundlage dieses Strukturvergleichs, der Aminosäurehomologie zwischen Cytochrom- und Chinoloxidasen, sowie Mutagenesestudien und Protonentranslokations-Experimenten davon auszugehen, daß beide Oxidase-Typen nach einem gleichen strukturellen und funktionellen Prinzip arbeiten. Basierend auf der dreidimensionalen Struktur der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* können somit Aminosäuren in der *ba*₃ Chinoloxidase gewählt werden, um sie mittels Mutagenesestudien und weiterführenden spektroskopischen Methoden hinsichtlich ihrer Funktion am binukleären Zentrum und Protonentranslokation zu charakterisieren. Im Idealfall würde eine Mutante, die an der Protonentranslokation über die Membran beteiligt ist, zu einem entkoppelten Phänotyp führen. In diesem Fall würden keine Protonen mehr über die Membran transloziert, der Elektronentransfer und damit die Sauerstoffreduktion wären aber nicht betroffen. Im speziellen soll die Funktion der benachbarten Arginine 490 und 491 hinsichtlich der Protonentranslokation untersucht, sowie die Rolle von Tyrosin 297 als Elektronendonator am binukleären Zentrum geklärt werden. Um eine für spektroskopische Untersuchungen ausreichende Menge an Protein zu erhalten, soll im Vorfeld der Mutagenesestudien die Expressionsrate und Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* optimiert werden.

Der Vergleich der Untereinheit II der Chinoloxidase aus *E. coli* und *P. denitrificans* weist eine 43%ige Aminosäurehomologie auf. Ein besonderes Merkmal der Untereinheit II der Chinoloxidase aus *P. denitrificans* ist es, daß diese am C-Terminus zusätzliche 85 Aminosäuren enthält. Es soll untersucht werden, ob es sich bei dieser carboxyterminalen Verlängerung um ein evolutionäres Relikt oder um einen strukturell bzw. funktionell

notwendigen Bereich der globulären Domäne handelt. Aus diesem Grund sollen C-terminale Verkürzungen diese Untereinheit hergestellt werden.

1997 wurde beschrieben, daß eine Deletion des *ctaB* Gens in *Paracoccus* zu einer inaktiven bb_3 Chinoloxidase führt (Zickermann et al., 1997). Das *ctaB* Gen kodiert für eine Farnesyltransferase, die die Synthese von Häm *o* aus *b* katalysiert. Darüber hinaus ist es bekannt, daß *Paracoccus* mit Ausnahme der cbb_3 Oxidase nur Häm *a* als high-spin Häm einbaut, obwohl es durchaus denkbar wäre, Häm *o* zu verwenden, welches eine Zwischenstufe bei der Synthese von Häm *b* zu *a* darstellt. Im Gegensatz dazu ist *E. coli* nicht in der Lage, Häm *a* zu synthetisieren, und die exprimierte Chinoloxidase ist vom bo_3 -Typ. Es stellt sich daher die Frage, ob die Besetzung der high-spin Position mit für jedes Enzym charakteristischen Häm-Gruppen (Häm *a* im Falle der Chinoloxidase aus *P. denitrificans* und Häm *o* im Falle der Chinoloxidase aus *E. coli*), strukturelle und funktionelle Relevanz hat oder es sich bei diesem Phänomen um eine Frage der Häm-Verfügbarkeit bzw. des Häm-Einbaus handelt. Um dies zu untersuchen, soll die *E. coli* Chinoloxidase in *Paracoccus* exprimiert werden, da Experimente, das *Paracoccus* Enzym in *E. coli* zu exprimieren, bislang fehl schlugen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen, ihre Kultivierung und Lagerung

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi supE</i> $\Delta(lac-pro AB)$ [<i>mutS</i> ::Tn10] [<i>F'</i> <i>pro A</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ M15]	Zell und Fritz, 1987; Kramer et al., 1984
ER1451	<i>F'</i> [<i>TraD36lacI</i> ^q $\Delta(lacZ)$ M15] <i>proAB</i> / <i>e14</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻) <i>thi D(lac-proAB)gyrA96(Nal</i> ^r) <i>endA1hsdR17(r</i> _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺) <i>relA1 supE44</i>	Raleigh und Wilson, 1986
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\phi 80lac\Delta$)ZM15 <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983; Bethesda Res. Lab., 1986
JM109	<i>F'</i> <i>traD36 lac</i> ^q $\Delta(lacZ)$ M15 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>e14</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻) $\Delta(lac-proAB)$ <i>thi gyrA96 (Nal</i> ^r) <i>endA1 hsdR17(r</i> _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺) <i>relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
MM294 RP4-7	<i>F</i> $\Delta endA1 hsdR17(r$ _K ⁻ <i>m</i> _K ⁺) <i>supE44 thi-1 relA1?</i> <i>RfbD1? SpoT1 [RP4-7:tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺ , <i>Amp</i> ^r , <i>Km</i> ^s , <i>Tc</i> ^r ::Tn7 (<i>Tp</i> ^r)]	R. Simon, Bielefeld
GO105	Δcyo , Δcyd mit pJRH <i>isA</i>	Rumbley et al., 1997

2.1.2 *Paracoccus denitrificans*-Stämme

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
ORI2/4	PD1222-Derivat; <i>qox::neo^r</i>	de Vries et al., 1989
G440	PD1222-Derivat; <i>fbc::neo^r</i>	Gerhus, 1992
ORI2K31	ORI2/4 mit pOR660/5 (<i>cyoA-E</i>); Sm ^r	Schröter et al., 1998
ORI2KK	ORI2/4 mit pREX ; Sm ^r	Richter, O.- M. H., Frankfurt
TSP24	Mr31-Derivat (Δ ctaDI::Tet ^r , Δ ctaDII::neo ^r), <i>qox (3700-4700)::Gm^r</i>	diese Arbeit
TSP3	pTS5 in ORI2/4 Strep-Tag II, UE IV, N-Terminus	diese Arbeit
TSP4	pTS8 in ORI2/4 (Porinpromotor vor <i>qoxA</i>)	diese Arbeit
TSP6	pTS10 in ORI2/4 Strep-Tag II, UE I, C-Terminus	diese Arbeit
TSP7	pTS11 in ORI2/4 His₆-Tag UE II, C-Terminus	diese Arbeit
TSP8	PTS12 in ORI2/4 (Stop412-UEII)	diese Arbeit
TSP9	PTS13 in ORI2/4 (Stop362-UEII)	diese Arbeit
TSP10	PTS14 in ORI2/4 (Stop312-UEII)	diese Arbeit
TSP11	pTS19 in ORI2/4 His₆-Tag UE I, C-Terminus	diese Arbeit
TSP16	pTS43 in ORI2/4 (R491Q)	diese Arbeit
TSP17	pTS46 in ORI2/4 (R490Q)	diese Arbeit
TSP18	pTS47 in ORI2/4 (R490/491Q)	diese Arbeit
TSP20	pTS45 in ORI2/4 (D416E)	diese Arbeit
TSP23	pTS50 in ORI2/4 (R490N)	diese Arbeit
TSP26	pTS24 in TSP24 (WT)	diese Arbeit
TSP27	pTS52 in TSP24 (<i>ctaC</i>-Promotor vor <i>qoxA</i>)	diese Arbeit
TSP28	pTS58 in TSP24 (Y297F)	diese Arbeit

Stamm	genetischer Marker	Herkunft
TSP29	pTS59 in TSP24 (Y297H)	diese Arbeit
TSP32	pTS63 in TSP24 (R491N)	diese Arbeit
TSP33	pTS65 in TSP24 (D416L)	diese Arbeit

2.1.3 Medien

Gefriermedium

2% (w/v)	Pepton
1% (w/v)	Hefeextrakt
1% (w/v)	NaCl
15% (v/v)	Glycerin

LB Medium (Sambrook et al., 1989)

1% (w/v)	Pepton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl

TY Medium (Sambrook et al., 1989)

0,8% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl

Succinat-Medium (Ludwig, 1986)

50 mM	K ₂ HPO ₄
10 mM	NH ₄ Cl
1 mM	Citrat
1mM	MgSO ₄
40 mM	Succinat
0,2 ml/l	Spurenelementlösung

Der pH wird mit KOH auf 6,2 eingestellt.

Für die Herstellung von Agar-Platten werden dem Medium 1,5% (w/v) Agar Agar zugesetzt.

Spurenelementlösung ad 1000ml (halbkonzentrierte HCl)

15 g	CaCl ₂ *2H ₂ O
1,25 g	CuSO ₄ *5H ₂ O
24,5 g	FeCl ₃ *6H ₂ O
0,6 g	H ₃ BO ₃
10 g	MnCl ₂ *4H ₂ O
2,4 g	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O
3,4 g	ZnCl ₂

TCM-Medium pH 7

10 mM	Tris/HCl
100 mM	CaCl ₂
10 mM	MgCl ₂

2.1.4 Antibiotika

Alle Antibiotika werden steril filtriert und bei -20°C, Tetracyclin bei 4°C aufbewahrt.

Antibiotikum	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml in 50% Glycerin	50 µg/ml
Kanamycin (Km)	25 mg/ml in 50% Glycerin	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	15 mg/ml in Methanol	60 µg/ml
Streptomycin (Sm)	25 mg/ml in 50% Glycerin	25 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in Ethanol (70% ig)	10 µg/ml

2.1.5 Anzucht und LagerungAnzucht

Die Anzucht aller Bakterienstämme wird stets unter der Kontrolle eines geeigneten Antibiotikums durchgeführt. Die Anzuchten von *E. coli*-Stämmen werden, sofern nicht anders beschrieben, bei 37°C durchgeführt. *P. denitrificans*-Kulturen werden stets bei 32°C kultiviert. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 500 ml werden im Luftbadschüttler (Infors TR 125, 150 rpm) angezogen.

P. denitrificans

P. denitrificans-Kulturen für Membranisolierungen im analytischen Maßstab werden in 200 ml Succinat-Medium über Nacht im Luftbadschüttler angezogen. Nach Ernte der Zellen schließt sich eine Membranpräparation an (Abschnitt 2.3.3). Für den präparativen Maßstab erfolgt die Anzucht in 5 l Erlenmeyerkolben. Zu diesem Zweck werden 2,5 l Succinat-Medium 2%ig angeimpft und für 18-20 Stunden auf einem geeigneten Schüttler (Infors-Schüttelplattform, 136 rpm) kultiviert und im Anschluß geerntet.

Lagerung

Eine Lagerung für einen begrenzten Zeitraum erfolgt auf Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum bei 4°C für *E. coli*-Kulturen und bei Raumtemperatur für *P. denitrificans*-Kulturen. Für die eine dauerhafte Lagerung werden die Zellen des entsprechenden Stammes von einer frischen Platte in 800 µl Gefriermedium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden**2.2.1 Plasmide**

Plasmid	Charakterisierung	Herkunft
pCW1	gox-Operon in pAlter; Amp ^r , Tet ^r	Winterstein, 1997
pRI2	Sm^r-Gen in pBBR1MCS Sm ^r , Cm ^r	Pfzner et al., 1998
pRvS1	Suizidvektor für <i>P. denitrificans</i> ; Amp ^r , Sm ^r	Van Spanning et al., 1991
pTS24	gox-Operon aus pCW1 in pRI2 (<i>Hind</i> III/ <i>Xba</i> I)	diese Arbeit
pQE30 His-Tev	N-terminales His-Tag mit folgender Tev-Protease-Erkennungssequenz	Anderka, O. und Maneg, O. nicht veröffentlicht
pUP 102	380 bp ctaC-Promotor vor 1630 bp <i>cta</i> DII-Fragment in pRI2	Pfzner, U., Frankfurt

Plasmid	Charakterisierung	Herkunft
pIS1	400 bp porG-upstream -Bereich vor β -Galaktosidasen in pGR1, Sm ^r	Schmitt, 1997
pTS5	N-terminales Strep-Tag II an UE IV in pRI2	diese Arbeit
pTS8	Porinpromotor vor qoxA ; pTS24 Derivat	diese Arbeit
pTS5	C-terminales Strep-Tag II an UE I in pRI2	diese Arbeit
pTS11	C-terminales His₆-Tag an UE II in pRI2	diese Arbeit
pTS12	Stop412-UEII ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS13	Stop362-UEII ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS14	Stop312-UEII ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS19	C-terminales His₆-Tag an UE I in pRI2	diese Arbeit
pTS33	MluI , Pos. 3800; pCW1-Derivat	diese Arbeit
pTS41	pUP102 <i>ctaDII::qoxA</i>	diese Arbeit
pTS43	R491Q ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS45	D416E ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS46	R490Q ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS47	R490/491Q ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS50	R490N ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS52	ctaC-Promotor vor <i>qoxA</i> ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS52	qox-Promotor::ctaC-Promotor ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS53	Gm^r::qox 1785-3800; pTS33-Derivat	diese Arbeit
pTS54	pRvS1 <i>qoxA</i> -D; Gm^r::qox 1785-3800	diese Arbeit
pTS58	Y297F ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS59	Y297H ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS63	R491N ; pTS24-Derivat	diese Arbeit
pTS65	D416L ; pTS24-Derivat	diese Arbeit

2.2.2 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab - Minipräp

Die Zellen einer 2 ml Übernachtskultur werden nach Sedimentation (13 000 rpm, 2 min, RT) in 100 µl eiskalter TEG-Lösung resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH/1% SDS-Lösung lysiert. Nach der Zugabe von 150 µl Kaliumacetat-Eisessig-Lösung erfolgt durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) eine Abtrennung von chromosomaler DNA, Proteinen und Zelltrümmern in Form eines flockig weißen Niederschlags. Die wäßrige Phase wird mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, abermals zentrifugiert und die DNA durch Zugabe von 2 Volumen EtOH abs. und Inkubation für 10 min auf Eis gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13 000 rpm, 10 min, 4°C) wird das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, abermals zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 20-100 µl H₂O aufgenommen. RNA wird durch eine 25 minütige RNase-Behandlung bei 37°C entfernt.

TEG-Lösung pH8

50 mM	Glucose
25 mM	Tris
10 mM	EDTA

Kaliumacetat-Eisessig-Lösung

60 ml 5 M	KAc
11,5 ml	Eisessig
H ₂ O ad	100 ml

RNase-Lösung

2 mg/ml in 50% Glycerin

2.2.3 Restriktion von DNA

Für die Restriktion von Plasmid-DNA werden die Restriktionsenzyme und Puffer der Hersteller Gibco BRL, Fermentas und NEB verwendet. Gemäß Herstellerangaben werden geeignete Reaktionsbedingungen für die einzelnen Restriktionsenzyme gewählt. Für analytische Zwecke werden 50-100 ng, für präparative Zwecke bis 500 ng DNA geschnitten.

2.2.4 Klenow-Fragment-Behandlung

Beim Klenow-Fragment handelt es sich um das große Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Die 5'-3'-Polymerase-Aktivität sowie die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I blieben erhalten, wohingegen die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität eliminiert wurde. Die Funktion dieses Fragments wird gebraucht, um unerwünschte Basenüberhänge nach Restriktionsverdau von DNA aufzufüllen. Die Reaktion wird gemäß der Anleitung von MBI-Fermentas durchgeführt.

2.2.5 Dephosphorylierung von DNA

Alkalische Phosphatase (CIAP) katalysiert die Hydrolyse von 5'-Phosphat-Gruppen. Durch einfachen oder „blunt end“ Schnitt eines Vektors besteht die Möglichkeit, daß dieser Vektor bevorzugt ohne Einbau von Insert religiert. Durch die Entfernung von 5'-Phosphat-Gruppen vom Vektor wird diese unerwünschte Nebenreaktion verhindert. Die Reaktion wird gemäß der Anleitung von MBI-Fermentas durchgeführt.

2.2.6 Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt nach Zugabe eines geeigneten Volumens DNA-Stopplösung üblicherweise in einem 0,5-2%igen Agarosegel in TBE-Puffer bei einer Feldstärke von 5 V/cm. Die Detektion erfolgt durch Anregung des dem Agarosegel zugefügtem Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) bei einer Wellenlänge von 254 nm. Für eine präparativen Analyse wird eine Wellenlänge von 365 nm zur Detektion verwendet.

1×TBE

1,2% (w/v)	Tris
0,6% (w/v)	Borsäure
10 mM	EDTA

DNA-Stopplösung

30% (v/v)	Glycerin
100 mM	EDTA
1×	TBE
0,25% (w/v)	Bromphenolblau

2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das zu isolierende DNA-Fragment mittels Skalpell ausgeschnitten. Nach Zugabe von 200 µl H₂O und 400 µl TE-gesättigtem Phenol wird die Agarose möglichst weitgehend mechanisch in einem Homogenisator zerkleinert. Die Suspension wird für 30 min bei -80°C eingefroren und dann in einer Tischzentrifuge (13000 rpm, 25 min, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird zur Entfernung von Phenolresten mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wie oben beschrieben wird der Überstand auf 0,3 M NaAc (pH 4,8) eingestellt und mit 1,5 µl Glykogen (2 mg/ml) versetzt. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol (20 min, -80°C). Das Pellet wird wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben weiter behandelt. Das getrocknete Pellet wird in 10 µl H₂O aufgenommen.

2.2.8 Ligation

Die Ligation wird nach der Methode von Legerski und Robberson (Legerski und Robberson, 1985) durchgeführt, wobei üblicherweise äquimolare Mengen Insert und Vektor eingesetzt werden, mindestens jedoch 20 ng Vektor. Es werden die Enzyme und Puffer der Firmen NEB und Fermentas eingesetzt. Für eine „sticky end“ Ligation reichen 2U Ligase aus, für eine „blunt end“ Ligation sollen jedoch 4U Ligase eingesetzt werden. Im Gegensatz zur „sticky end“ Ligation, bei der nur ein Produkt mit gerichteter Orientierung entstehen kann, können bei der „blunt end“ Ligation zwei Produkte mit unterschiedlicher Insert-Orientierung, sowie ein religierter Vektor entstehen. Die Religation des Vektors kann jedoch durch eine Dephosphorylierung am 5'-Ende desselben mittels der alkalischen Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas) unter geeigneten Pufferbedingungen verhindert werden (siehe Abschnitt 2.2.5). Sollen DNA-Fragmente mit nicht kompatiblen Enden ligiert werden, so müssen diese zuvor mit dem Klenow-Fragment (NEB, Fermentas) unter geeigneten Pufferbedingungen und Vorhandensein von dNTPs behandelt werden, um „blunt ends“ zu erzeugen (siehe Abschnitt 2.2.4). Im Anschluß an die Ligation erfolgt eine Inaktivierung der Ligase durch Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei 65°C.

2.2.9 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Da *E. coli*-Stämme keine natürliche Kompetenz zeigen, um DNA aufzunehmen, werden sie mittels der CaCl₂-Methode kompetent gemacht. Dazu werden die Zellen in der

logarithmischen Wachstumsphase (ca. 0,5 OD₆₀₀) auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge (6 000 rpm, 10 min, 4°C) im halben Ausgangsvolumen eiskalten TCM-Medium resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 0°C und erneuter Zentrifugation, wie oben beschrieben, wird das Pellet in 1/10 des Kulturvolumens mit 80% TCM-Medium und 20% Glycerin resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei DH5α beträgt das Volumen des Aliquots 100 µl, bei BMH 71-18 *mutS* 200 µl.

2.2.10 Transformation

Bei der Transformation wird ein Aliquot kompetenter Zellen 30 min langsam auf Eis aufgetaut und 20-50 ng der entsprechenden Plasmidlösung in Form eines Aliquots einer Minipräp bzw. eines Ligationsansatzes dazupipettiert. Nach Inkubation für 20 min im Eisbad wird der komplette Ansatz in 1 ml TY-Medium pipettiert und im Luftbadschüttler für eine Stunde inkubiert. Anschließend werden 10% bzw. 90% der Zellen auf TY-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthalten, ausplattiert.

2.2.11 Triple mating

Da bei *P. denitrificans* weder eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmiden vorhanden ist, noch eine künstliche erreicht werden kann, wird der Vorgang der parasexuellen Konjugation verwendet, um Plasmide aus *E. coli* in *P. denitrificans* ohne vorherige Isolierung einzuschleusen. Die für den Plasmidtransfer notwendige *tra* Gene sind episomal auf dem Helferstamm *E. coli* MM294 RP 4-7 kodiert und werden während des Triple matings durch diesen zur Verfügung gestellt.

Von allen drei Stämmen werden die Zellen einer 2 ml Übernachtskultur nach Zentrifugation (6000 rpm, RT, 3 min) in 1 ml frischem TY-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert. Üblicherweise werden dann 400 µl Rezipient mit je 100 µl des Donor- und Helferstammes vermischt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 100 µl TY-Medium aufgenommen und auf eine TY-Platte ohne Antibiotikum aufgetropft. Nach 6 Stunden Inkubation bei 32°C wird der Zelltropfen in 1 ml TY-Medium resuspendiert und die Suspension in TY-Medium 1:4 und 1:16 verdünnt. Von der unverdünnten sowie von den verdünnten Zellsuspensionen werden je 100 µl auf Antibiotika-haltigen TY-Platten ausplattiert. Die Antibiotika werden so

gewählt, daß ausschließlich der Rezipient nach Erhalt des Plasmids überleben kann. Nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 32°C können Einzelklone isoliert werden.

2.2.12 Blue white Screening

Dieser Test ist eine einfache Methode zur Unterscheidung von Bakterienkolonien mit rekombinanten Plasmiden und solchen, die kein Insert tragen. Bei *E. coli* ist dieser Test nur möglich bei Stämmen, die zur α -Komplementation befähigt sind. Durch Insertion eines DNA-Fragments in das auf dem Plasmid enthaltende *lacZ'*-Genfragment wird keine aktive β -Galaktosidase mehr exprimiert, um das farblosen Substrat X-Gal unter Zuhilfenahme von Luftsauerstoff zum blauen 5-Brom-4-chlorindigo abzubauen. Im Falle von *P. denitrificans* wird dieser Test genutzt, um Kointegrate von pRvS1-Plasmid-Derivaten in der genomische DNA nachzuweisen. Dieser Vektor kann in *P. denitrificans* nicht repliziert werden, trägt jedoch das vollständige Gen für die β -Galaktosidase, dessen Expression darauf hinweist, daß der Vektor in das Genom durch einfach homologe Rekombination integriert wurde.

Für den Nachweis werden TY-Platten mit 40 μ l X-Gal (20 mg/ml) behandelt. Befindet sich das Gen für die β -Galaktosidase unter Kontrolle eines durch IPTG induzierbaren Promotors, so muß für den Test der X-Gal-Lösung noch 10 μ l IPTG (50 mg/ml) hinzugefügt werden. Nach dem Trocknen der Platten können Einzelklone direkt auf die Platte ausgestrichen werden. Nach Übernachts-Inkubation ist eine Auswertung anhand der Koloniefärbung möglich. Alternativ können Einzelklone von einer Platte mittels Nitrozellulose-Membran abgezogen werden. Die Membran wird dann mit den Klonen nach oben auf der IPTG/X-Gal Platte für 1-3 Stunden inkubiert. Dies geschieht für *E. coli* bei 37°C und für *P. denitrificans* bei 32°C. Abermals ist eine Auswertung anhand der Koloniefärbung möglich

2.2.13 Gerichtete Mutagenese

Für die Mutagenese dient das pAlter-System der Firma Promega (Heidelberg). Dieses System basiert darauf, daß der Vektor pAlter (Tet^r, Amp^s), in dessen multiple cloning site (MCS) ein Zielgen inkloniert werden kann, eine Punktmutation im Ampicillin-Resistenz-Gen besitzt, welche zur Inaktivierung des Gens führt. Durch das Einbringen eines Ampicillin-Repair-Oligonukleotids während der Mutagenese-Reaktion kann diese Inaktivierung aufgehoben und die Selektion von positiven Mutageneseklonen erleichtert werden. Eine weitere

Voraussetzung dieses Mutagenesesystems ist das Vorhandensein eines f1-Oris, dem Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1. Somit liegt diese Plasmid doppelsträngig in der Zelle vor, wird jedoch einzelsträngig verpackt und aus der Zelle geschleust. Die dafür notwendigen Enzyme werden nach der Infektion durch den Helferphagen R408 von diesem zur Verfügung gestellt. Dieser Phage infiziert ausschließlich Bakterienzellen die ein F-Plasmid tragen.

Neben dem Ampicillin-Repair-Oligonukleotids wird während der Mutagenese-Reaktion noch ein mutagenes Oligonukleotid angeboten, dessen Flanken komplementär zum Zielgen sind, jedoch über den mittleren Bereich die gewünschte Mutation einführt. Voraussetzung für das „annealing“ der Oligonukleotide ist, daß das DNA-Template einzelsträngig vorliegt.

2.2.13.1 Präparation von Phagen-Einzelstrang-DNA

20 ml TY-Medium werden mit einer Vorkultur des *E. coli*-Stamms ER1451 zusammen mit Phagen-Suspensionslösung sowie der entsprechenden Menge Tetracyclin angeimpft und über Nacht im Luftbadschüttler bebrütet. Es gilt die Faustregel, daß die Phagenanzahl die Zellanzahl um den Faktor 10-20 übersteigen soll. Nach Inkubation über Nacht werden die Zellen durch zweimalige Zentrifugation (Sorvall SS34, 12 000 g, 4°C, 15 min) abgetrennt und die Phagenpartikel durch Zugabe von ¼ Vol. Phagen-Präzipitationslösung aus dem Überstand gefällt (30 min auf Eis). Das Phagenpellet wird in 400 µl TE-Puffer resuspendiert und die Phagen durch Zugabe von 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) lysiert. Nach Zentrifugation (13 000 rpm, 5 min RT) in der Tischzentrifuge wird die wäßrige, die Phagen-DNA enthaltende Phase wiederholt mit TE gesättigtem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, bis keine proteinhaltige Zwischenphase mehr zu erkennen ist. Im Anschluß an den letzten Extraktionsschritt wird die Phagen-DNA durch Zugabe eines halben Vol. 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung und 2 Vol. Ethanol abs. bei -20°C gefällt. Die weitere Behandlung des Pellets geschieht wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben. Das getrocknete Pellet wird in 20 µl H₂O aufgenommen und zur Mengenabschätzung elektrophoretisch aufgetrennt.

Phagen-Präzipitationslösung

3,75 M	Ammoniumacetat
20%	PEG 800

<u>TE-Puffer</u>	pH 8
10 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA

2.2.13.2 Konstruktion von Oligonukleotiden

Für den spezifischen Austausch einer Aminosäure gegen eine andere wurden spezielle Oligonukleotide konstruiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Basentriplets der neuen Aminosäure in *Paracoccus denitrificans* häufig verwendet werden. Folgende mutagene Oligonukleotide kamen zum Einsatz:

Mutation	Gen-Nukleotid-Position	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
<i>Mlu</i> I Position 3800	<i>qox</i> 3812-3788	ttgaaggtata acg cggtcagaccg c
<i>Bsr</i> GI im Start-Methionin	<i>qox</i> 693-667	tttcgta gtac attggactacc
Strep-Tag II UE IV, N-terminal	<i>qox</i> 4538-4506	atgtcgtgttcc g cgga cttctcga actg cggatggctccagttgctcat cagatcatcccc
Strep-Tag II UE I, C-terminal	<i>qox</i> 3909-3880	gtggctcatgtctca ctttcgaact g cggatggctccagttgcta acc cctgcgcaag
His ₆ -Tag UE II, C-terminal	<i>qox</i> 3906-3883	gctcatgtctcag tgatgg tgatgg tgatga acccctgcgc
His ₆ -Tag UE I, C-terminal	<i>qox</i> 1890-1861	gcttgcgtccgatca atgg tgatgg tgatgg tggaagtccgcgcccc
R491N	Qox 3372-3352	gacgcgcag gtt ccgggtcac
R490Q	Qox 3368-3350	cgcagccgctgggtcacgc
R491Q	Qox 3371-3353	acgcgcagct g ccgggtca
R490/491Q	Qox 3371-3353	acgcgcagct g ctgggtcacgc
R490N	Qox 3369-3349	gcgagcc ggtt gggtcacgcc

Mutation	Gen-Nukleotid-Position	5'-3' Oligonukleotid-Sequenz
D416L	<i>qox</i> 3150-3124	Gtgcagcacgaacagcgccggcg gcac
D416E	<i>qox</i> 3150-3124	gtgcagcacgaaatccgcccggcg cac
Y297Hrev	qox2767-2793 3-5 (Y297H)	caggatcaggatatggacctcggg gtg
Y297Frev	qox2767-2793 3-5 (Y297F)	caggatcaggatgaagacctcggg gtg

2.2.13.3 Phosphorylierung der Oligonukleotide

Um während der Synthese-Reaktion einen Ringschluß zu gewährleisten, müssen die Oligonukleotide der Firmen MWG und Biospring zunächst phosphoryliert werden. Dazu werden 100 pmol Primer unter geeigneten Bedingungen mit 1mM ATP und 1× Kinasepuffer (NEB, Fermentas) unter Zuhilfenahme von 5U T4-Polynukleotidkinase (NEB, Fermentas) 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 30 min bei 70°C.

2.2.13.4 Mutagenese-Reaktion

Annealing-Reaktion

1 µg einzelsträngige DNA (siehe Abschnitt 2.2.13.1) wird mit 1,1 ng phosphoryliertem Ampicillin-Repair- und 2,8 pmol mutagenem Oligonukleotid (siehe Abschn. 2.2.13.2), sowie 2 µl „Annealing-Puffer“ (Promega) auf ein Endvolumen von 20 µl mit H₂O aufgefüllt, vermischt und anschließend für 5 min auf 85°C erhitzt. Das Abkühlen der Proben bis auf RT geschieht über einen Zeitraum von einer Stunde und soll gewährleisten, daß sich die Oligonukleotide passend ihrer Sequenz an das DNA-Template anlagern.

Synthese-Reaktion

Dem Anlagern der Oligonukleotide an das DNA-Template folgt die Synthese-Reaktion. Während dieser wird das zuvor einzelsträngige DNA-Template zum Doppelstrang vervollständigt und die Enden zwischen den in der Annealing-Reaktion angelagerten Oligonukleotiden geschlossen. Zu diesem Zweck wird dem Annealing-Ansatz 3 µl „Synthese-

Puffer“ (Promega), sowie 2U T4-DNA-Ligase und 10U T4-DNA-Polymerase (beide NEB oder Fermentas) zugegeben. Nach Auffüllen auf ein Endvolumen von 30 µl mit H₂O wird der Ansatz für 90 min bei 37°C inkubiert.

15 µl des Ansatzes werden für die Transformation (siehe Abschnitt 2.2.10) in den *E. coli*-Stamm BMH 71-18 *mutS* der nicht zur Mismatch-Reparatur befähigt ist eingesetzt. Nach Übernacht-Inkubation in 2 ml Flüssigkultur (mit Ampicillin) wird das mutagene Plasmid durch Minipräp (siehe Abschnitt 2.2.2) isoliert und durch Transformation in die *E. coli*-Stämme JM109, bzw. DH5α eingebracht, welche über ein intaktes Reparatur-System verfügen. Durch dieses Verfahren sollen zusätzliche „second-site Mutationen“ ausgeschlossen werden. Die Selektion von Mutagenese-positiven Klonen geschieht auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten. Zur Identifikation der Mutation wird üblicherweise die Plasmid-DNA aus sechs Einzelklonen sequenziert.

2.2.14 DNA-Sequenzierung und Autoradiographie

2.2.14.1 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode durch Einbau von Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Die Reaktion wird nach den Vorschriften und Reagenzien der Firmen Pharmacia bzw. USB durchgeführt. Die radioaktive Markierung wird durch die Verwendung von [³⁵S]-dATP eingeführt. Zur Vermeidung von Kompressionen wird im Ansatz 7-Deaza-dGTP verwendet. Zur Vorbereitung der Sequenzierung muß das Plasmid durch das Verfahren der alkalischen Denaturierung (siehe Abschnitt 2.2.14.2) denaturiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem 6%igen Acrylamidgel mit TBE als Laufpuffer. Die Gele werden 30 min bei 60 Watt vorgeheizt und nach dem Beladen bei konstant 45 Watt gefahren. Die Laufzeit richtet sich nach der Entfernung zwischen Sequenzier-Primer und der mutagenen Stelle. Das Sequenziergel wird nach der Auftrennung unter Vakuum 3 Stunden bei 80°C getrocknet und kann für die Autoradiographie eingesetzt werden.

2.2.14.2 Alkalische Denaturierung

1,5-3 µg des zu sequenzierenden Plasmids werden mit H₂O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 1/10 Volumen 2 N NaOH bei 37°C für 30 min denaturiert. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 N NaAc und 2 Volumen Ethanol abs. gefällt (45 min, -20°C). Das Pellet wird wie in Abschnitt 2.2.2 erläutert behandelt. Das Pellet kann im getrockneten Zustand für die DNA-Sequenzierung eingesetzt werden.

2.2.14.3 Sequenzier-Primer

Mutation	Primer	5'-3'-Primersequenz
<i>Mlu</i> I Position 3800	ba4000G	ggtagaccagaagccc
<i>Bsr</i> GI im Start-Met-Nr.2	ba570 ba790G	tcgcatggcgagcttca cgcgctgtcgcgccgcc
Strep-Tag II UE IV N-terminal	ba4396 ba4628G	accggaccggctgatc gatcgcggtcaggatcac
Strep-Tag II UEI C-terminal	BA4000G	ggtagaccagaagccc
His-Tag UE II C-terminal	(Ostermann, 2000)	(Ostermann, 2000)
His-Tag UE I C-terminal	ba4000G ba3780	ggtagaccagaagccc gcatcatcgcggtctcg
R491N	ba3260 ba3450G	gcattcgggttcaagct ccaaactgcacgaacat
R490Q	ba3260 ba3450G	gcattcgggttcaagct ccaaactgcacgaacat
R491Q	ba3260 ba3450G	gcattcgggttcaagct ccaaactgcacgaacat
R490/491Q	ba3260 ba3450G	gcattcgggttcaagct ccaaactgcacgaacat
R490N	ba3260 ba3450G	gcattcgggttcaagct ccaaactgcacgaacat

Mutation	Primer	5'-3'-Primersequenz
D416E	ba3050	ggtcgcatccgctatga
D416L	ba3050	ggtcgcatccgctatga
Y297H	ba2700	atcgctatgtgggcacc
Y297F	ba2700	atcgctatgtgggcacc

2.2.14.4 Autoradiographie

Durch Autoradiographie (Röntgenfilm BioMaxTMMR, Kodak) werden die getrockneten Sequenziergele ausgewertet. Die Zeitdauer der Exponierung richtet sich dabei nach der gemessenen Radioaktivität. Zur Entwicklung werden die Filme jeweils 2 min nacheinander in folgende Lösungen getaucht: Entwickler, H₂O, Fixierer, H₂O und anschließend getrocknet. Nach dem Trocknen kann die Sequenz gelesen werden.

Entwickler: mit H₂O ad 1000 ml

2,2 g Photo-Rex
 72 g Natriumsulfit
 8,8 g Hydrochinon
 48 g Natriumcarbonat
 4 g Kaliumbromid

Fixierer: mit H₂O ad 1000 ml

250 g Natriumthiosulfat
 25 g Kaliumdisulfit

2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur schnellen Amplifikation großer Mengen von DNA-Fragmenten wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Sie beruht auf der Verwendung von sequenzspezifischen Primern und thermostabiler DNA-Polymerase. Durch einen sich wiederholenden Prozeß von Primer-Annealing, DNA-Synthese und DNA-Denaturierung können im exponentiellen Maßstab DNA-Fragmente gezielter Länge und Sequenz amplifiziert werden.

Der Reaktionsansatz von 100 µl enthält neben 0,2 mM dNTP-Mix, 10 µl 10 x *Taq* Polymerase Puffer, je 10 pmol Primer sowie 1-10 ng Template. Für die Herstellung der für den Dot-Blot benötigten DNA-Sonden wird dem Reaktionsansatz Digoxigenin-markiertes dUTP (0,01 µg/100 µl Ansatz) zugesetzt. Während des ersten Denaturierungszyklus wird dem Ansatz 1 µl *Taq* Polymerase (2U) beigelegt.

10 x *Taq* Polymerase Puffer pH 8,8

10 mM Tris/HCl
 5 mM KCl
 0,01% Triton X-100
 15 mM MgCl₂

2.2.15.1 Reaktionsbedingung

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	2 min
30	95°C	30 s
	T	30 s
	72°C	1 min/800 bp
1	95°C	30 s
	T	30 s
	72°C	1 min/800bp

Die Annealing Temperatur (T*) ist abhängig vom Primer-Design und richtet sich nach der Schmelztemperatur. Diese wird nach folgender Formel berechnet:

$$T^* = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4 - 5$$

2.2.15.2 PCR-Primer

Primer	Primer Position	5'-3'-Primer-Sequenz
<i>MluI</i> vor Gm-Gen	pBBR1MCS-5 3674-3700	cagcgg acgcgt caccttgctgccttg
<i>MluI</i> nach Gm-Gen	pBBR1MCS-5 4728-4701	ccgttg acgcgt gatatgcaggccaag
<i>XbaI</i> vor Start-Met. Nr.1	<i>qox</i> 601-624	aattt ctag agtccatggttcag
<i>XbaI</i> vor Start-Met. Nr.2	<i>qox</i> 24 Nukleotide-684	aattt ctag agtccaatgacctac
<i>HindIII</i> nach <i>MluI</i>	<i>qox</i> 1779-26 Nukleotide	gaag taagctt gtcaacgcgtggccg
<i>NcoI</i> vor Pos. 1010	Qox 26 Nukleotide-1023	ccatgtccatg gaccctatcgggcg
<i>HindIII</i> nach Pos. 1878	Qox 1861-27 Nukleotide	tgtcccaagctt cagaagttccgcgc
His-Tag-UEII312-rev	qox1534-57Nucleotide 3-5 (nach 1551 kommt His ₈ Tag- TGA- <i>MluI</i>)	gccgccacgcgt tcaatggatgggtg atggatgggtg gcagatcttgcggg ctc
Strep-Tag I-UEII312-rev	qox1534-60Nucleotide 3-5 (nach 1551 kommt Strep-Tag I-TGA- <i>MluI</i>)	gccgccacgcgt tcagccgccaact gcggatggcggcaggc gcagatcttgc ccggctc
Qox <i>BsrGI</i>	qox672-698 5-3 (<i>BsrGI</i> neu)	tccaat gtacata cgaataatcgc
Qox <i>MluI</i> -G	qox1767-1793	gtcaacgcgtggccgcgcacatcgggctc
<i>BsrGI</i> (ATG-Nr.1)	qox608-634 3-5 (<i>BsrGI</i> neu)	agtcgcagggctt gtacat ggcacggg
<i>BsrGI</i> (ATG-Nr.1/B)	qox608-640 5-3 (<i>BsrGI</i> neu)	cccgtgccat gtaca agccctgcgactc agccg

2.2.16 Dot-Blot

Der Dot-Blot ist eine schnelle Ganzzellmethode, um möglichst viele Klone ohne vorherige DNA-Präparation auf das Vorhandensein eines bestimmten DNA-Abschnittes zu untersuchen. Dafür wird mittels PCR eine sequenzspezifische Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt, die nach Lyse der Zellen an die DNA binden kann. Der Nachweis geschieht mittels einer gekoppelten Farbreaktion unter Zuhilfenahme eines mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem anti-Digoxigenin-Antikörpers.

Die zu untersuchenden Klone werden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und auf einer TY-Platte über Nacht inkubiert; *E. coli* 37°C, *P. denitrificans* 32°C. Im Anschluß

Neutralisations-Puffer pH 7,4

1,5 M NaCl
0,5 M Tris/HCl

Waschlösung pH 8

5× SSC
0,5% (w/v) SDS
1mM EDTA

Vorhybridisierung-Lösung

5 × SSC
1% (w/v) Blockierungsreagenz
0,1% (w/v) Sarkosyl
0,02% (w/v) SDS
50% (w/v) Formamid

Maleinsäurepuffer pH 7,5

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl

TNM-Lösung pH 9,5

100 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

2.3 Proteinchemische Arbeiten

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) in einer Minigelapparatur (Mini Protean II System, Bio Rad) bei einem Strom von 40 mA. Es werden 12%ige Trenngele benutzt mit einem Acrylamid:Bisacrylamid Verhältnis von 37:1. Zur Auftrennung niedermolekularer Proteine werden 10%ige Tricin-SDS-Gele (Schägger und von Jagow, 1987) verwendet.

Coomassie-Färbung

Die Färbung aller Gele wird für 10 min bei 68°C mit Coomassie-Färbelösung durchgeführt. Die Entfärbung geschieht mittels Coomassie-Entfärber bei der gleichen Temperatur

Coomassie-Färbelösung

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
10% (v/v) Essigsäure
20% (v/v) Methanol

Coomassie-Entfärber

10% (v/v) Essigsäure
20% (v/v) Methanol

2.3.2 Western-Blot

Western-Blots dienen der immunologischen Detektion von Proteinen und können sowohl auf gereinigte Proteine als auch auf Membranen und Ganzzell-Lysate angewendet werden. Bei diesem Verfahren werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (BA 85, Schleicher und Schüll) elektrophoretisch transferiert, bei 400 mA für 1 Stunde in Transferpuffer. Die Proteinstandardbanden können nach erfolgtem Transfer und Färbung mit Ponceau-S-Lösung markiert werden. Eine Absättigung von unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen erfolgt im Anschluß in NCS für 30 min. Nach

Übernacht-Inkubation mit in NCS verdünntem Antikörper (1:1000) wird die Membran zur Entfernung überschüssiger Antikörper 3× je 10 min mit NCS gewaschen.

Im Falle der Streptavidin-AP- (alkalische Phosphatase) Nutzung für den Nachweis von Strep-Tag II folgen nun mehrere Waschschritte zur Vorbereitung der Farbreaktion: 10 min in NCS, 30 min in TBS/Triton, 5 min in TBS und 5 min in TNM (Abschnitt 2.2.16). Die Farbreaktion geschieht gemäß Abschnitt 2.2.16.

Soll die Untereinheit II der Chinoloxidase mittels des Kaninchen-Antikörpers FPII nachgewiesen werden, so wird die Membran nach Entfernung überschüssiger Antikörper für 2 Stunden in NCS-Lösung inkubiert, die alkalischer Phosphatase-gekoppeltes Protein A1 in einer Verdünnung von 1/1000 enthält. Vor der Farbreaktion (Abschnitt 2.2.16) folgen nun die bei der Streptavidin-AP-Nutzung beschriebenen Waschschritte.

His-Tags werden mittels penta-Histidin-Antikörper und Ni-NTA-AP-Konjugat gemäß Anleitung (Qiagen, Qiaexpress Ni-NTA Conjugates) nachgewiesen.

Transferpuffer pH 8,3

25 mM Tris/HCl

190 mM Glyzin

0,02% (w/v) SDS

29% (v/v) Methanol

Ponceau-S-Lösung

0,2% (w/v) Ponceau S

3% (w/v) TCA

NCS

5% (v/v) Newborn Calf Serum

in TBS

<u>TBS</u>	pH 7,4
10 mM	Tris/HCl
140 mM	NaCl
0,05% (w/v)	NaN ₃

<u>TBS/Triton</u>	
1×	TBS
0,5% (v/v)	Triton

2.3.3 Membranpräparation

Analytischer Maßstab

Für analytische Zwecke werden die Zellen einer 200 ml Übernachtskultur in maximal 8 ml 100 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA resuspendiert. Anschließend werden sie mit 1/1000 Volumen Lysozymstammllösung (10 mg/ml) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Der endgültige Zellaufschluß geschieht durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250, 40% Leistung, 5 min). Die Suspension wird für 15 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abermals zentrifugiert (Beckmann UZ, 40000 rpm, 1 h, 4°C). Das rotbraune Pellet wird in 20 mM KPi pH 7, 1 mM EDTA resuspendiert und in Aliquots zu 10 µl bei -80°C gelagert.

Präparativer Maßstab

Bei größeren Zellvolumina werden die Zellen in 100 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA resuspendiert und mit dem Protease-Inhibitor Pefabloc SC versetzt (Endkonzentration 100 µM) und anschließend in der Manton-Gaulin-Presse (Firma APV Schröder, Lübeck, 5 min, 400 bar) aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer über Nacht (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 8 000 rpm, 4 °C) werden die Membranen in 20 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA aufgenommen und mittels eines Dounce-Homogenisators resuspendiert. Nach Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Beckmann, Ti45, 40 000 rpm, 1h, 4°C) werden nun die Membranen abschließend in 20 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA resuspendiert. Die Membranen werden bei -80°C gelagert.

Soll die anschließende Proteinpräparation mittels einer Metall-Affinitätssäule erfolgen, so darf zur Resuspendierung der Membranen im letzten Schritt kein EDTA hinzugefügt werden.

2.3.4 Proteinpräparation der Chinoloxidase

2.3.4.1 Präparation mittels Strep-Tag II

Zur Zeit unterscheidet man zwei Arten von Strep-Tags. Strep-Tag I besteht aus der Aminosäuresequenz AWRHPQFGG und kann aufgrund der Forderung einer freien C-terminalen Carboxylatgruppe nur am C-Terminus von Proteinen angehängt werden. Die freie Carboxygruppe wechselwirkt mit der Amidgruppe von Arg84 des Streptavidins, dem Bindungspartner. Darüber hinaus muß das Histidin des Strep-Tag-Peptids in einem deprotonierten Zustand vorliegen, um eine Bindung zu gewährleisten. Strepta Strep-Tag II stellt eine Weiterentwicklung des Strep-Tag I dar. Seine Positionierung ist aufgrund der Aminosäuresequenz SNWSHPQFEK nicht mehr auf den C-Terminus von Proteinen beschränkt, da die für die Wechselwirkung mit Streptavidin notwendige Carboxylatgruppe innerhalb des Tags liegt. Weiterhin ist der im Strep-Tag I geforderte deprotonierte Histidinrest nicht mehr notwendig, so daß dieser Tag auch in einem pH-Bereich unterhalb von pH 6 eingesetzt werden kann. Strep-Tag II-markiertes Protein kann somit affinitätschromatographisch mittels einer Streptavidinsäule gereinigt werden. Die Elution geschieht über Desthiobiotin, einem Biotinanaloga. Damit es während der Proteinreinigung nicht zu einer Konkurrenzreaktion zwischen dem getagten Protein und zelleigenem Biotin kommt, wird letzteres mittels Avidin während der Membransolubilisierung komplexiert.

Zur Solubilisierung werden die Membranen mit DM (10% n-Dodecyl- β -D-maltosid (w/v), (Biomol 50311 oder Calbiochem), 20 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA, 50 μ M Pefabloc, 50 mM Avidin und 50 mM NaCl auf ein Endvolumen von 10 mg Protein/ml gemischt. Die DM:Proteinkonzentration soll dann bei 1,5:1 (w/w) liegen. Die Suspension wird bei 4°C für 30 min gerührt. Im Anschluß werden die Membranüberreste durch Ultrazentrifugation (Beckmann, Ti45, 40000 rpm, 1h, 4°C) abgetrennt. Nach Filtration des Überstands wird dieser mit einer Flußrate von 0,8 ml/min auf die Streptavidin-Sepharose-Säule (Kleyman et al., 1995) aufgetragen, die zuvor mit zwei Säulenvolumen Äquilibrierpuffer gewaschen wurde. Es folgt ein Waschschriff mit Waschpuffer, um nicht bindende Bestandteile des Solubilisats von der Säule zu spülen. Die Elution geschieht durch zwei Säulenvolumen Elutionspuffer. Im Anschluß wird die Säule mit sechs Säulenvolumen Säulenpuffer regeneriert.

Säulenpuffer pH 8

50 mM KPi
100 mM NaCl
1 mM EDTA

Äquibrierpuffer

Säulenpuffer
0,02% (w/v) DM

Waschpuffer

Säulenpuffer
0,05% (w/v) DM

Elutionspuffer

Säulenpuffer
0,03% (w/v) DM
1mM Desthiobiotin

Präparation von Streptavidin-Sepharose

Die in *E. coli* heterolog exprimierte Einschlusskörper von Minimalstreptavidin werden bei 20000 g für 30 min und 4°C abzentrifugiert und in 6 M Guanidin/HCl pH 1,5 gelöst. Einer zweifachen Dialyse für je 4 Stunden gegen 6 M Guanidin/HCl pH 1,5 (Schmidt und Skerra, 1994) folgt eine schnelle Verdünnung in PBS, und damit zügige Rückfaltung. Nach 3 Stunden Inkubation folgt die Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wird auf 40% Ammoniumsulfat eingestellt und für 3 Stunden inkubiert. Ausgefällenen Proteinbestandteile werden wie bereits beschrieben durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird nun auf 70% Ammoniumsulfat eingestellt und über Nacht inkubiert. Tetrameres Minimalstreptavidin kann nun durch Zentrifugation für 1 Stunde, 20000 g bei 4°C abzentrifugiert werden. Dieses wird nun in PBS, 2,2 M Ammoniumsulfat resuspendiert, zur Lösung selektiver Verunreinigungen und anschließend erneut zentrifugiert. Das Minimalstreptavidin-Präzipitat wird in PBS gelöst, unlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert und die klare Proteinlösung wird zweimal gegen 100 mM Na₂CO₃ (pH 8) und 500 mM NaCl dialysiert.

N-Hydroxysuccinimid-aktivierte Sepharose 4 fast flow (Pharmacia) wird mit 10 Volumen 1 mM HCl gewaschen. Die Beladung mit Minimalstreptavidin geschieht über Nacht durch Zugabe von 5 mg Minimalstreptavidin pro 1 ml Säulenmaterial. Danach wird das Säulenmaterial mit 0,5 M Tris/HCl pH 8 versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, mit 6 Volumen 0,5 M Tris/HCl pH 8 und anschließend mit 6 Volumen 0,5 M NaAc/HAc pH 4 gewaschen. Nach Äquilibration in einem geeigneten Puffer ist das Material einsatzbereit.

<u>PBS</u>	pH 7,4
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

2.3.4.2 Präparation mittels His-Tag

Bei diesem Reinigungsverfahren nutzt man die Eigenschaft von Histidinen in ihrem deprotonierten Zustand an zweiwertige Ionen wie Cu²⁺ oder Ni²⁺ zu binden. Für die affinitätschromatographische Reinigung gibt es somit zwei Möglichkeiten, Histidin-getagte Proteine aufzureinigen. Zum einen kann man die Proteine durch Senkung des pH-Wertes von der Matrix ablösen. Eine Senkung unterhalb von pH 5 (pK von Histidin = 6,2) bewirkt, daß der Histidintag im protonierten Zustand vorliegt. Dadurch geht die Bindungseigenschaft verloren. Zum anderen kann das getagte Protein verdrängt werden. In diesem Fall benutzt man Imidazol, welches um die Bindungsplätze auf der Matrix mit dem Histidintag konkurriert.

Zur Solubilisierung werden die Membranen mit DM (10% n-Dodecyl-β-D-maltosid (w/v), 20 mM KPi pH 8, 50 μM Pefabloc und 50 mM NaCl auf ein Endvolumen von 10 mg Protein/ml gemischt. Die DM:Proteinkonzentration soll dann bei 1,5:1 (w/w) liegen. Bei diesem Reinigungsverfahren ist jedoch auf EDTA im Solubilisierungsansatz zu verzichten. Auch ist der Einsatz von Avidin nicht nötig. Nach bereits oben beschriebener Ultrazentrifugation und Filtration wird der Überstand auf einen zuvor mit Äquilibrationpuffer gewaschenen Cu²⁺-Sepharose-Säule mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach einem Waschriff mit Waschpuffer erfolgt eine Elution mittels vier Säulenvolumen eines Gradienten,

der bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM endet. Die Grundpuffer entsprechen denen, die bei der Streptavidin-Reinigung verwendet werden, es wird jedoch kein EDTA hinzugefügt. Der Elutionspuffer enthält statt Desthiobiotin 200 mM Imidazol.

2.3.4.3 Präparation ohne Affinitätstag

Die Reinigung wird im wesentlichen nach der von Zickermann et al (1996) beschriebenen Methode isoliert. Variationen liegen in der Qualität des Säulenmaterials und Wahl der Gradienten. Wie bereits beschrieben werden zur Reinigung drei Säulen benutzt. Einer Anionenaustauscher-Säule folgt eine Cu-IMAC-Säule. Abschluß bildet eine AcA34-Gelfiltrationssäule. Während nach der herkömmlichen Methode die erste Säule eine Q-Sepharose Fast Flow war und ein linearer NaCl-Gradient zwischen 100 und 500 mM gewählt wurde, wird bei der nun modifizierten Reinigung eine Q-Sepharose high Performance benutzt. Der Gradient wird aber zwischen 150 mM und 360 mM NaCl gelegt und wird bei 260 mM NaCl für 20 min gestoppt. Der Gradient hat eine Flußrate von 0,8 ml/min und eine Gesamtlaufdauer von 260 min, das entspricht ca. 4,5 Säulenvolumen. Bei der zweiten Säule (Cu-IMAC) wird bei der beschriebenen Methode ein linearer Imidazol-Gradient benutzt, von 0-100 mM. Bei der modifizierten Methode wird nun abermals der Gradient unterbrochen, bei 50 mM Imidazol für 5min. Der Gradient hat diesmal eine Flußrate von 0,6 ml/min und eine Gesamtlaufdauer von 260 min. Dies entspricht ca. 3 Säulenvolumen. Die abschließende Gelfiltration ist in beiden Methoden identisch.

2.3.5 Enzymatischer Test

Die Elektronentransferrate wird in 50 mM KPi pH 7, 1 mM EDTA und 0,15 g/l n-Dodecyl- β -D-maltosid mit 50 μ M reduziertem Decylchinon (Sigma) als Substrat bestimmt. Zur Bestimmung der Autooxidation von Decylchinol wird für eine Minute eine Grundlinie bei 275 nm aufgenommen. Nach Zugabe einer geeigneten Verdünnung der Oxidase wird die Oxidation von Decylchinol über einen Zeitraum von einer Minute verfolgt. Wird für die Bestimmung der Elektronentransfer-Rate eine Membranpräparation eingesetzt, so wird dem Meßansatz noch 10 μ M Myxothiazol beigefügt. Myxothiazol hemmt den bc_1 -Komplex, der ebenfalls Decylchinol als Substrat benutzt.

$$\Delta\epsilon_{(\text{ox-red})}(\text{Decylchinon}, 275 \text{ nm}) = 12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Reduktion von Decylchinon

25 mg Decylchinon (Sigma) werden in 1,5 ml Ethanol gelöst. 500 μl H_2O und 50 μl 1 N HCl werden dem Ansatz zugefügt, bevor Decylchinon durch wenige Körnchen NaBH_4 reduziert werden kann. Die Reduktion des Decylchinons ist am Farbumschlag von dunkelgelb nach farblos zu erkennen. In 10 μl Schritten wird solange 1 N HCl zugefügt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Der pH-Wert sollte dann unter 4 liegen. Im sauren pH-Bereich, kann Decylchinol nicht autooxidieren. Nach Zugabe von 1 ml H_2O wird die organische Phase dreimal mit je 2,5 ml Cyclohexan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden im Anschluß zweimal mit je 1 ml H_2O ausgeschüttelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt in Ethanol bei 275 nm ($\Delta\epsilon_{\text{red}}(275 \text{ nm}) = 2,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Crane und Barr, 1971; Lawford und Garland, 1972). Die Proben werden so aliquotiert, daß diese nach dem Trocknen in der Speed-Vac in 20 μl Ethanol ($+10^{-4}$ M HCl) aufgenommen werden können und dann eine Konzentration von 50 mM aufweisen. Die Dauerlagerung von reduziertem Decylchinon geschieht unter Stickstoff-Atmosphäre bei -80°C .

2.3.6 Häm-Extraktion und HPLC

Die Häm-Extraktion wird nach Weinstein und Beale (Weinstein und Beale, 1983) durchgeführt. Membranen werden zweimal mit 4 Vol. einer basischen Aceton/ NH_4OH -Lösung (90% Aceton, 10 mM NH_4OH) gewaschen. Anschließend werden die nicht kovalent gebundenen Häm-Gruppen durch zweimaliges Waschen (10 min auf Eis lagern und danach bei RT 10 min schütteln) mit einer sauren Aceton/HCl-Lösung (90 ml Aceton, 10 ml 37%ige HCl) aus dem Protein herausgelöst. Zu dem Aceton/HCl-Extrakt wird $\frac{1}{2}$ Volumen Diethylether und 1,5 Volumen H_2O geben. Die Ether-Phase wird 3 mal mit je $\frac{1}{2}$ Vol. angesäuertem H_2O gewaschen. Danach wird der Ether abgezogen und das Pellet in 1 ml Ethanol/Methylenchlorid (50/50) aufgenommen. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wird nun diese Lösung auf eine DEAE Sepharose CL 6B Säule aufgetragen. Die Säule hat ein Volumen von 1,5 ml und wird mit Ethanol/Methylenchlorid (50/50) äquilibriert. Zum Waschen der Säule dient 87%iges Ethanol (10 Säulenvolumen). Die Häme werden anschließend mit 2 Volumen Ethanol/HAc/ H_2O (70/17/13) von der Säule eluiert (Weinstein et al., 1986). Die so aufgereinigten Häme können für reverse phase HPLC-Analyse verwendet werden. Bei bereits aufgereinigten Proteinen beginnt die Häm-Extraktion mit Zugabe der Aceton/HCl Lösung.

Sämtliche HPLC-Analysen wurden von Roger Stadler (Arbeitsgruppe Prof. Fasold, Abteilung Biochemie, Universität Frankfurt/M) durchgeführt.

2.3.7 Ganzzellpumpen

Beim Ganzzellpumpen nutzt man die Eigenschaft von Bakterienkulturen, einen pH-Gradienten über der äußeren Membran zu etablieren. Dies geschieht durch die Enzyme der Atmungskette. Unter geeigneten Bedingungen kann mittels einer pH-Elektrode die Protonentransfer-Stöchiometrie bestimmt werden.

Eine Übernachtskultur von *Paracoccus*-Zellen wird 2%ig in 100 ml Succinat-Medium überimpft und bei 32°C bis zu einer $OD_{600} = 0,4-0,6$ kultiviert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt, bei 6000 rpm in der Megafuge sedimentiert und in 15 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt werden die Zellen auf $OD_{600} = 50$ in Waschpuffer eingestellt.

Der eigentliche Pumpversuch wird bei RT durchgeführt und der pH-Gradient mittels eines Kompensations-pH-Meters und eines Schreibers (Pharmacia) aufgezeichnet. Zu 1,48 ml Sauerstoff-freiem Meßpuffer werden 70 µl Zellen pipettiert. Soll die Protonentranslokations-Stöchiometrie der *Paracoccus* Chinoloxidase bestimmt werden, wird dem Meßpuffer noch 10 µM Myxothiazol zugesetzt. Unter anaeroben Bedingungen wird nun solange gewartet, bis der Sauerstoff durch die intakten, aerob lebenden Zellen verbraucht ist. Es erfolgt nun eine Zugabe von 3 µl Rotenon (Komplex I Inhibitor, 20 mM in DMSO). Nach Erreichen einer konstanten Basislinie erfolgt ein Sauerstoff-Meßpuls in Form von 5 µl Sauerstoff-gesättigtem Wasser. Dies entspricht bei 25°C einer Sauerstoffmenge von 1,29 nmol. Der dadurch entstehende pH-Sprung wird aufgezeichnet. 1,29 nmol O_2 entsprechen 5,16 nmol Elektronen, da O_2 ein 4 Elektronen-Akzeptor ist. Als Kontrollpuls dienen 5 µl 2 mM HCl. Der dadurch entstehende pH-Sprung entspricht einer Menge von 10 nmol Protonen im äußeren Medium. Aus dem Verhältnis der in der Sauerstoffreaktion verbrauchten Elektronen zu dem gemessenen pH-Sprung (geeicht durch den Säurepuls) kann der H^+/e^- -Quotient ermittelt werden. Die erwartete Stöchiometrie für vollständiges Protonenpumpen beträgt $2H^+/e^-$, wenn der eingesetzte *Paracoccus*-Stamm nur die *ba₃* Chinoloxidase als terminale Oxidase benutzen kann (durch Mutation oder Inhibierung der anderen terminalen Oxidasen). Ein Proton stammt aus der Chinol-Oxidation, das zweite aus der Protonentranslokation der Oxidase.

Waschpuffer mit KOH auf pH 6,8

1 mM Hepes

300 mM Sucrose

150 mM KCl

Meßpuffer mit KOH auf pH 6,8

1 mM Hepes

400 μ M Succinat

150 mM KCl

100 mM KSCN

2.4 Spektroskopische Techniken

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) in leicht modifizierter Form (mit 0,5% SDS) durchgeführt. Als Referenz dient eine Eichgerade aus BSA.

2.4.2 Optische-Spektren

Häm-Gruppen-tragende Proteine verändern in Abhängigkeit des Redoxzustandes ihre optischen Eigenschaften. Dies wird im Falle der Redox- und Differenzspektren ausgenutzt, um Aussagen über die Identität und Quantität der gemessenen Proben zu treffen. Die sechste Koordinationsstelle des high-spin Häms in Oxidasen kann neben seinem Substrat Sauerstoff noch weitere kleine Liganden wie CO oder CN^- binden. Durch diese Bindung ändern sich die spektroskopischen Eigenschaften des Enzyms.

Die Spektren wurden an einem U-3000 Spektrophotometer der Firma Hitachi bzw. an einem Kontron Uvikon 941 Zweistrahlphotometer gemessen.

2.4.2.1 Redox-Spektren unter nativen Bedingungen

Zur Bestimmung des Häm-Gehalts von gereinigter *Paracoccus* Chinoloxidase wird diese in geeigneter Konzentration in 50 mM KPi pH 7, 1 mM EDTA und 0,2 g/l n-Dodecyl- β -D-maltosid verdünnt. Die Proteinprobe wird mittels Kaliumhexacyanoferrat (III) oxidiert und im Anschluß mit Natriumdithionit reduziert. Von oxidiertes und reduziertes Probe wird ein Absorptionsspektrum zwischen 500 und 650 nm gemessen. Zur Kontrolle des Reduktionsgrades der Probe, kann diese mit Natriumdithionit mehrfach nachreduziert werden.

Der Häm *a* Gehalt kann anhand der Absorption bei 609 nm mit einem Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 5,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden (Ludwig, pers. Mitteilung).

Der Häm *b* Gehalt kann anhand der Absorption bei 564 nm mit einem Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden (Zickermann, 1996).

2.4.2.2 Redox-Spektren unter denaturierenden Bedingungen

Die Bestimmung der Hämkomponenten außerhalb ihrer Proteinumgebung ist durch die Aufnahme eines Redox-Spektrums in der Anwesenheit von 0,1 N NaOH und 20% Pyridin (v/v) möglich. Pyridin besetzt die fünfte und sechste Koordinationsstelle der Hämgruppen.

Der Häm *a* Gehalt kann anhand der Absorption bei 589 nm mit einem Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden (Berry und Trumpower, 1987).

Der Häm *b* Gehalt kann anhand der Absorption bei 556 nm mit einem Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{\text{red-ox}} = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden (Berry und Trumpower, 1987).

2.4.2.3 CO-Differenzspektren

Kohlenmonoxid stellt einen kompetitiven Inhibitor der Chinoloxidase dar und bindet mit stärkerer Affinität als Sauerstoff an das high-spin Häm. Durch die Bindung von Kohlenmonoxid wird das Absorptionsspektrum von Häm a_3 auf charakteristische Weise verschoben. Die Proteinprobe wird wie in den Redox-Spektren in einer geeigneten Konzentration verdünnt und mit Natriumdithionit reduziert. Nach der Aufnahme des ersten Absorptionsspektrums zwischen 400 und 650 nm wird die Probe mit CO begast und ein zweites Absorptionsspektrum im gleichen Wellenlängenbereich gemessen. Die durch Kohlenmonoxid verursachte Verschiebung wird durch den Abzug des reduzierten nicht ligandierten Spektrums vom reduzierten CO-Spektrum deutlich.

2.4.2.4 CN-Differenzspektren

Wie Kohlenmonoxid stellt Cyanid einen kompetitiven Inhibitor der Chinoloxidase dar. Cyanid bindet an das Sauerstoff-bindenden high-spin Häm a_3 und hält dieses im oxidierten Zustand. Dadurch können die Spektren von low- und high-spin Häm separiert werden. 300 μ l einer 4-6 μ M Oxidase-Lösung werden mit 10 μ l Kaliumhexacyanoferrat (III) (10 mM) oxidiert und auf zwei 100 μ l Küvetten verteilt. Sämtliche Messungen werden in einem Wellenlängenbereich zwischen 350 und 650 nm aufgenommen und nach folgendem Schema durchgeführt:

Reaktionsabfolge	Küvette I	Küvette II
1	+10 μ l KCN (350 mM) pH 7	+10 μ l Redox-Puffer
2	Inkubation (bis 2h, bei RT)	
3	Messung AI	Messung BI
4	+3,7 μ l TMPD (3 mM)	+2,6 μ l Redox-Puffer
	+1,9 μ l K-Ascorbat (200 mM)	3 μ l Natriumdithionit (200 mM)
5	Messung AII	Messung BII

TMPD (N,N,N',N',-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid)

Redox-Puffer (siehe Abschnitt 2.4.2.1)

Durch Verrechnung der einzelnen Messungen ergeben sich folgende Spektren:

AI – BI	Cyanid-Bindungsspektrum
AII – AI	Redox-Spektrum (low-spin Häm)
BII – BI	Redox-Spektrum (low- und high-spin Häm)
(BII – BI) – (AII – AI)	Redox-Spektrum (high-spin Häm)

2.4.2.5 Redox-FTIR-Spektren

Die Fourier-Transformations-Infrarot- (FTIR)-Spektroskopie ist eine moderne Anwendung der klassischen Infrarot-Spektroskopie. Bei dieser Methode werden in einem Wellenlängenbereich zwischen 3 und 30 μm Molekülschwingungen angeregt. Der Vorteil der Redox-FTIR im Gegensatz zur klassischen IR besteht in einer hohen Aufnahme-geschwindigkeit und spektralen Auflösung. Dadurch werden Funktionsuntersuchungen an Proteinen ermöglicht. Zusätzlich kann die Lösungsmittel-Absorption korrigiert werden. Ohne diese Korrektur würde Wasser aufgrund seiner starken IR-Absorption um 1600 und 3400 cm^{-1} die für Biomoleküle interessanten Resonanzen den C=N-, C=O-, NH- oder OH-Schwingungen überdecken. Die Schwingungen benachbarter Gruppen sind jedoch nicht voneinander unabhängig, so sind z. B. C=O und N-H Gruppen intensiv an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt. Somit können die Aminosäuren als schwach gekoppelte Oszillatoren dargestellt werden. Dadurch sind Frequenzlage, Intensität und Linienbreite stark von der Proteinkonformation abhängig und können bereits durch die Änderung einer Aminosäure relevant beeinflusst werden.

Für die Messung muß das Protein in einem 50 mM Tris/HCl Puffer ohne NaCl vorliegen. Sämtliche Messungen wurden von Dr. Petra Hellwig und Dr. Ute Pfitzner (Institut für Biophysik, J. W. Goethe-Universität Frankfurt/M) durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Chinoloxidase, Optimierung der Expression

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Expression der *Paracoccus* Chinoloxidase um den Faktor 2-3 gesteigert werden kann, wenn man dem Anzuchtmedium 40 mM Nitrat beifügt. Diese Daten gelten sowohl für einen *Paracoccus*-Wildtypstamm (Zickermann et al., 1997), als auch für einen Stamm, in dem das für die *ba*₃ Chinoloxidase kodierende *qox*-Operon auf einem Plasmid angeboten wird (siehe Abbildung 8).

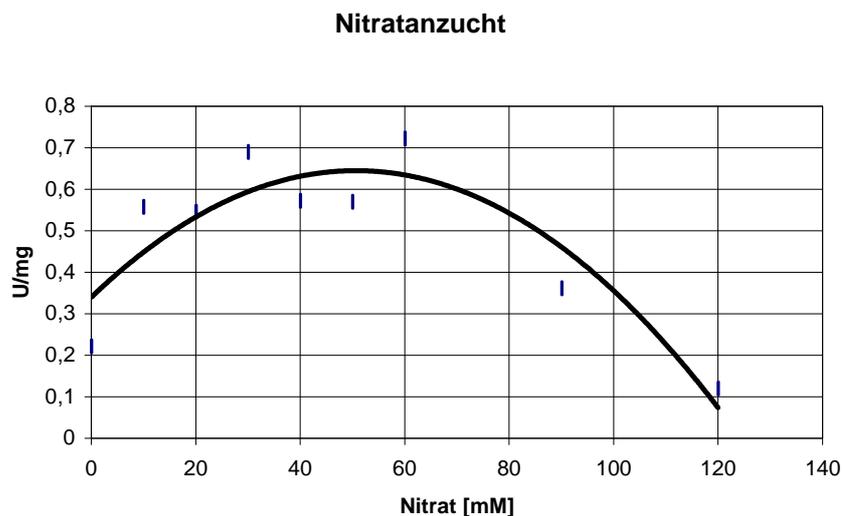


Abb. 8: Expression der *Paracoccus ba*₃ Chinoloxidase aus ORI2KK-Membranen abhängig von der Nitratkonzentration. Die Expression (U/mg) bezieht sich auf die Enzymaktivität pro mg Membranprotein. Nitrat wurde dem Medium in Form von KNO₃ zugefügt.

Ausgehend von einer Aktivität von 0,4 U/mg Membranprotein und ca. 2 g Membranprotein, die man aus einer typischen 40 l Übernachtkultur gewinnt, hat man bei einer Wildtyp-Aktivität von 70 U/mg gereinigtem Protein (Winterstein, 1997) ca. 11 mg Chinoloxidase in den Membranen. Bei einer typischen Ausbeute von 30% (Zickermann et al., 1996) entspricht dies 3 mg gereinigtem Protein. Diese Ausbeute reicht zwar aus, um mit wenigen Anzuchten

erste spektroskopische Untersuchungen zu machen. Plant man jedoch eine Reihe von Mutanten und weitergehende Experimente, so wäre es sehr vorteilhaft, die Expression noch zu steigern.

Bekannt ist, daß unter aeroben Bedingungen bevorzugt die *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase als terminale Oxidase exprimiert wird (de Gier et al., 1994). Wechselt man auf anaerobe Anzuchtbedingungen, so wird vermehrt auch die *ba*₃ Chinoloxidase exprimiert (Zickermann, 1996). Jedoch ist die Zelldichte bei anaerober Anzucht so gering, daß die relative Ausbeute an *ba*₃ Chinoloxidase gegenüber der aeroben Anzucht geringer ausfällt.

Eine Möglichkeit, die Expression der Chinoloxidase unter aeroben Anzuchtbedingungen zu steigern, besteht darin, die dominierende *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase zu inaktivieren. Würde man neben dieser noch die *ba*₃ Chinoloxidase deletieren, so hätte man einen geeigneten Stamm, um Mutanten der *ba*₃ Chinoloxidase auf einem Plasmid *in trans* anzubieten. Der Stamm wäre ohne diese beiden Oxidasen weiter lebensfähig, da noch die alternative *cbb*₃ Cytochrom *c* Oxidase zur Verfügung steht, diese jedoch nur bevorzugt unter mikroaeroben Bedingungen exprimiert wird und somit für die aerobe Anzucht keine Konkurrenz zur *ba*₃ Chinoloxidase darstellen sollte. Eine weitere Möglichkeit, die Expression der Chinoloxidase zu steigern, liegt in der Verwendung eines stärkeren Promotors. In Ermangelung eines regulierbaren synthetischen Promotors, muß hierbei auf *Paracoccus*-eigene Promotoren zurückgegriffen werden.

3.1.1 Konstruktion eines *aa*₃/*ba*₃-Deletionsstamms – TSP24/26

Die Generierung eines *aa*₃/*ba*₃-Deletionsstamms dient der Bereitstellung eines optimalen Expressionstamms für die *ba*₃ Chinoloxidase. Als Ausgangsstamm diente MR31 (Raitio, M. und Wikström, M., 1994). In diesem *Paracoccus*-Stamm sind die Gene *ctaDI* und *ctaDII* deletiert. *ctaDI* und *ctaDII* kodieren für zwei verschiedene Formen der Untereinheit I der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase. Jedoch wurde bislang nur das Genprodukt von *ctaDII* in assemblierter Cytochrom *c* Oxidase nachgewiesen (de Gier et al., 1994). In MR31 wurde *ctaDI* durch ein Tetracyclin- (*ctaDI*::Tet^r) und *ctaDII* durch ein Kanamycin-Resistenzgen ersetzt (*ctaDII*::*neo*^r). Dieser Stamm ist nicht mehr fähig, eine funktionsfähige *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase zu exprimieren. Für die Konstruktion eines *aa*₃/*ba*₃-Deletionsstamms müssen somit nur noch die Gene der *ba*₃ Chinoloxidase inaktiviert werden.

Die Vorgehensweise ist in Abbildung 9 dargestellt. Als Ausgangsplasmid diente pTS33, das auf dem Mutagenesevektor pAlter basiert (siehe Abschnitt 2.2.13). In dessen *SphI*-Schnittstelle wurde das *qox*-Operon kloniert (pCW1). Dieses kodiert für die vier strukturellen Untereinheiten der *ba*₃ Chinoloxidase einschließlich der Promotorregion. Aufgrund der Orientierung des *qox*-Operons in diesem Plasmid, mussten die für die Phagen-Einzelstrang-Mutagenese notwendigen Primer entgegen der Leserichtung des Zielgens synthetisiert werden. Durch Einführung einer *MluI*-Schnittstelle in die Position 3800 des *qox*-Operons durch den Mutageneseprimers *qox3800MluI* entstand pTS33. Die erfolgreiche Mutagenese und Auswahl des für die folgenden Schritte notwendigen Klons geschah über Restriktionsverdau. Parallel dazu wurde mit Hilfe der PCR sowie den PCR-Primern Gm-Hin und Gm-rev ein 1000 bp großer Bereich des Vektors pBBR1MCS5 amplifiziert. Das Amplifikat enthielt das auf diesem Vektor kodierte Gentamycin-Resistenzgen einschließlich Promotorbereich. Die Flanken der PCR-Primer wurden so gewählt, daß auf beiden Seiten des Amplifikats eine *MluI*-Schnittstelle vorhanden war. Wie im ersten Schritt der Abbildung dargestellt, wurde nun das PCR-Amplifikat unter Zuhilfenahme der *MluI*-Schnittstellen in pTS33 kloniert. Im entstandenen Vektor pTS53 wurde somit der *qox*-Operon-Bereich 1785-3800 durch das Gentamycin-Resistenzgen ersetzt. Der ersetzte Bereich kodiert für die 30 C-terminalen Aminosäuren der Untereinheit II sowie für 635 von 668 Aminosäuren der Untereinheit I. Im folgenden Schritt wurde nun ein *HindIII/SacI*-Genfragment aus pTS53 (enthält *qoxA-D* mit inseriertem Gentamycin-Resistenzgen) isoliert und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pRvS1 ligiert. Dazu mußten die Enden des *HindIII/SacI*-Genfragments aufgefüllt werden (siehe Abschnitt 2.2.4). Der linearisierte Vektor pRvS1 wurde dephosphoryliert (siehe Abschnitt 2.2.5), um eine Religation des Vektors zu verhindern. Da von pRvS1 keine vollständige Sequenz vorliegt, kann für den bei dieser Klonierung entstandenen Vektor pTS54 nur eine ungefähre Größenangabe gemacht werden.

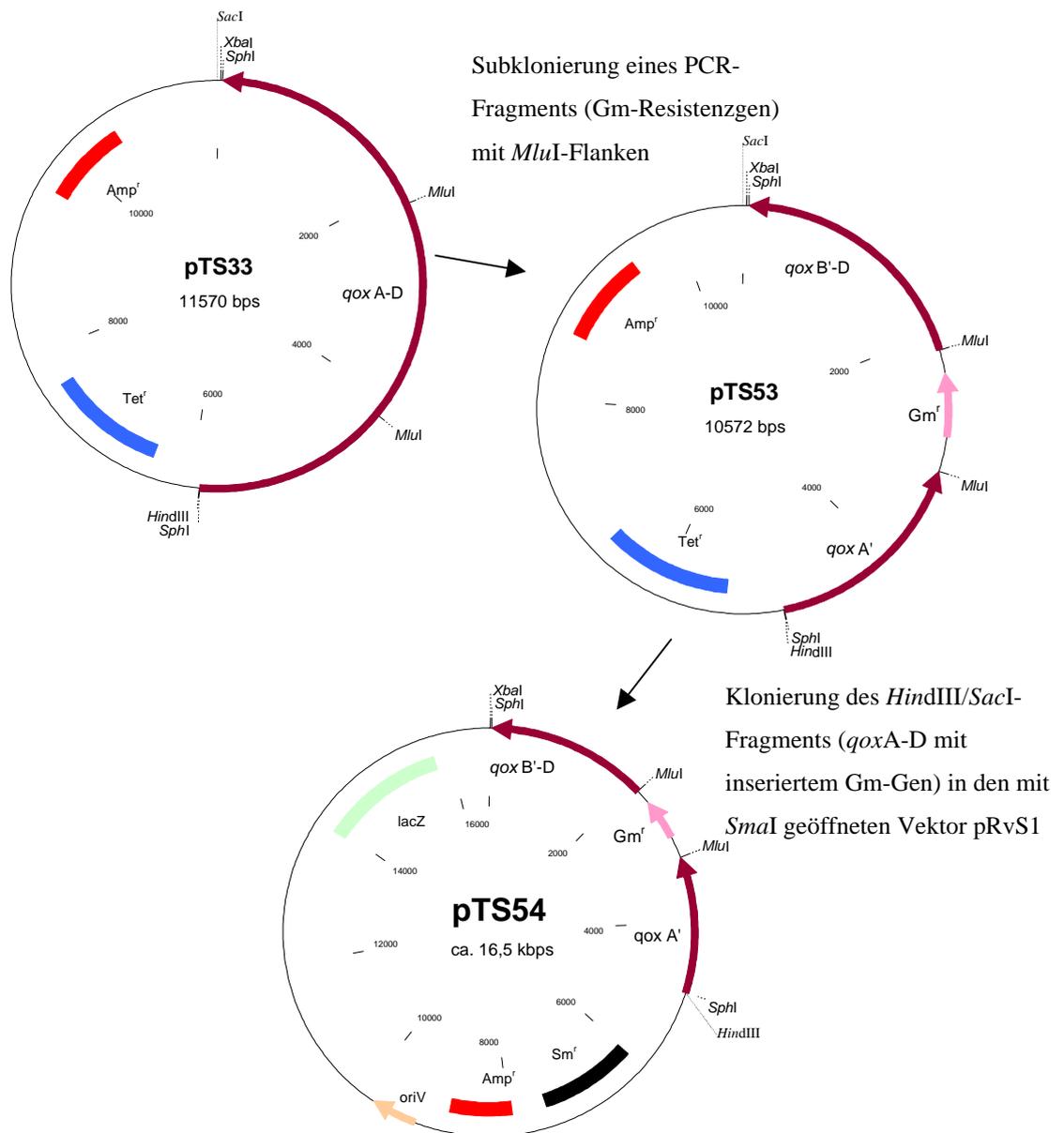


Abb. 9: Deletion eines *qox*-A'-B'-Genfragments (*Mlu*I/*Mlu*I, 2015bp) aus dem *qox*-Operon, im Austausch gegen ein Gentamycin-Resistenzgen (1kb PCR-Produkt auf pBBR1MCS5 mit *Mlu*I-Flanken). Im Anschluß erfolgt die Klonierung des *qox*-Operonfragments (*Hind*III/*Sac*I, mit Klenow-Fragment behandelt) in den Suizidvektor pRvS1 (*Sma*I geöffnet, CIAP behandelt). Da von pRvS1 keine vollständige Sequenz vorliegt, kann für pTS54 nur eine eingeschränkte Größenangabe gemacht werden.

Als nächstes folgte ein Triple mating (siehe Abschnitt 2.2.11) in den Stamm MR31. Der Vektor pRvS1 ist ein Suizidvektor und hat die Eigenschaft in *E. coli* replizierbar zu sein, nicht jedoch in *P. denitrificans*. Die einzige Möglichkeit seine Erbinformation zu übertragen, besteht durch einfach oder doppelt homologe Rekombination in das Genom der Bakterienzelle (siehe Abbildung 10). Durch die Zugabe von Gentamycin und Rifampicin konnten nach dem Triple mating nur die *Paracoccus*-Klone überleben, bei denen es nach dem Plasmidtransfer zu einer homologen Rekombination kam.

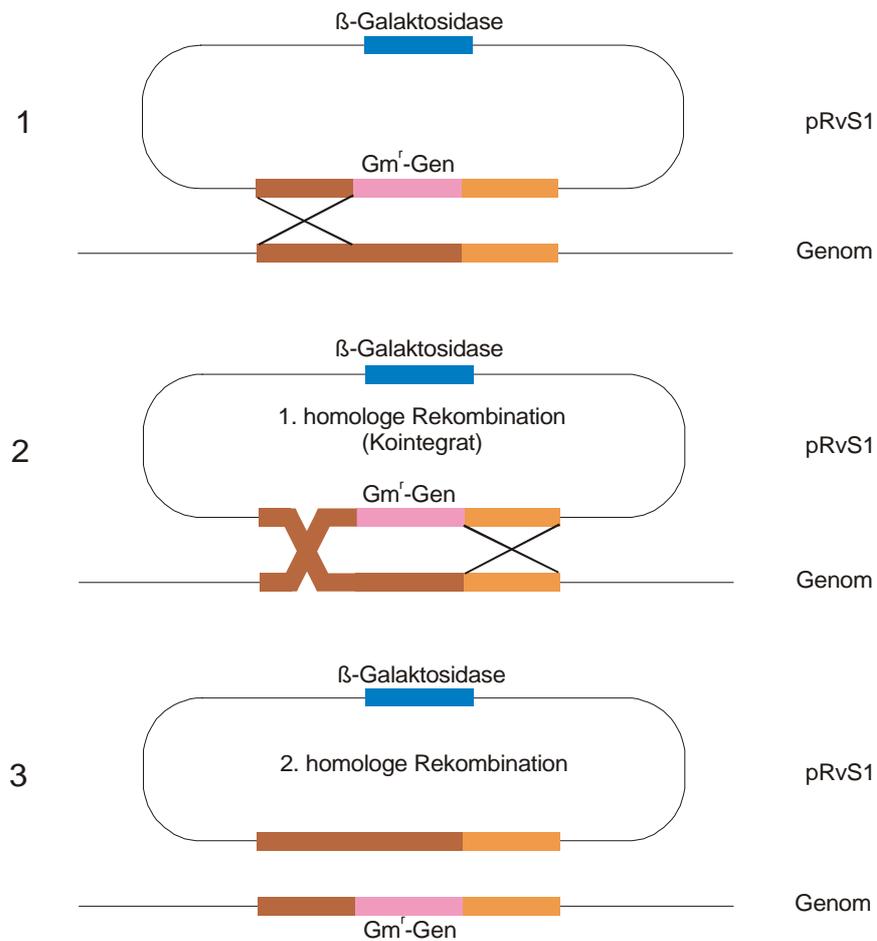


Abb. 10: Homologe Rekombination zwischen pRvS1 und dem Bakteriengenom. Nach Triple Mating liegt das Plasmid in der Zelle vor (1). Im ersten Schritt kommt es zu einer einfach homologen Rekombination im Bereich einer der beiden homologen Flanken. Das entstandene Kointegrat (2) kann sich nun durch Rekombination mittels der zweiten homologen Flanke auflösen. Dabei kommt es zum Austausch der genetischen Information zwischen dem Plasmid und dem Genom (3).

Bei der einfach homologen Rekombination kommt es zu einem Kointegrat. Dadurch wird der Vektor mit seiner gesamten genetischen Information in das Genom eingebaut. Dieses Kointegrat zeichnet sich dadurch aus, daß es bei einem „Blue white Screening“ zu einem positiven Signal kommt. Das heißt, die Klone färben sich aufgrund der auf dem Plasmid pRvS1 kodierten Information für die β -Galaktosidase blau. Kommt es jedoch zu einer doppelt homologen Rekombination, so wird nur die Information für das Gentamycin-Resistenzgen im Austausch gegen Teile des *qox*-Operons übertragen. In diesem Fall dürfen sich Klone bei einem „Blue white Screening“ (siehe Abschnitt 2.2.12) nicht blau färben. Von den getesteten Klonen blieben 50% weiß. Von diesen positiven Klonen wurden 15 mittels Dot-Blot getestet. Es wurde auf das Vorhandensein des Gentamycin-Resistenzgens gescreent. Dazu wurde mittels PCR (siehe Abschnitt 2.2.15) eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt. Die dafür notwendigen Primer sind Gm-Hin und Gm-rev und wurden auf den Vektor pBBR1MCS5 angewendet. Von den 15 getesteten Klonen färbten sich 5 positiv an. Bei diesen 5 Klonen sollte es sich also nach „Blue white Screening“ um eine doppelt homologe Rekombination handeln, mit erfolgreichem Einbau des Gentamycin-Resistenzgens. Da der Vektor pRvS1 ein Suizidvektor ist, repliziert er nicht in *Paracoccus*, eine Isolierung von Plasmid-DNA (Abschnitt 2.2.2) muß also negativ ausfallen. Aus allen 5 Klonen konnte keine Plasmid-DNA isoliert werden. Um sicherzustellen, daß es sich bei der doppelt homologen Rekombination um eine Deletion von Teilen des *qox*-Operons durch das Gentamycin-Resistenzgens handelt und nicht nur um eine Insertion des Gentamycin-Resistenzgens, wurden von allen 5 Klonen eine Membranpräparation im analytischen Maßstab vorgenommen (2.3.3). In keinem Fall konnte Chinoloxidase-Aktivität gemessen werden (2.3.6). Der resultierende Stamm wurde als TSP24 bezeichnet. Durch Transformation von pTS24 (2.2.1) in diesen Stamm erhielt man TSP26. pTS24 ist ein „broad host range“ Vektor basierend auf pRI2 (2.2.1) und enthält das komplette *qox*-Operon. TSP26 sollte also wieder in der Lage, die *ba*₃ Chinoloxidase zu exprimieren. Durch die Benutzung des *qox*-eigenen Promotors ist die Expression der Chinoloxidase ferner durch Nitrat regulierbar.

Abbildung 11 stellt die Aktivität der *ba*₃ Chinoloxidase in Membranen aus einer analytischen Präparation dar. Alle drei Stämme wurden unter Verwendung von 40 mM Nitrat unter aeroben Bedingungen in Succinat angezogen. Bei G440 ist die *ba*₃ Chinoloxidase auf dem Genom kodiert. Im Gegensatz dazu liegen die genetischen Informationen für die Chinoloxidase in ORI2KK und TSP26 auf einem Plasmid vor. Als Voraussetzung dafür wurde in beiden Stämmen die Chinoloxidase im Genom deletiert. In TSP26 wurde darüber

hinaus noch die Cytochrom *c* Oxidase inaktiviert. Die Daten zeigen, daß allein durch die Kodierung der genetischen Information auf einem Vektor (ORI2KK) die Expression der Oxidase um den Faktor 3 gesteigert werden kann. Der Grund liegt in der erhöhten Kopienzahl des Vektors gegenüber dem Genom. Wird darüber hinaus noch die konkurrierende *aa₃* Cytochrom *c* Oxidase deletiert (TSP26), so kann die Expressionsrate nochmals um etwa 50% gesteigert werden.

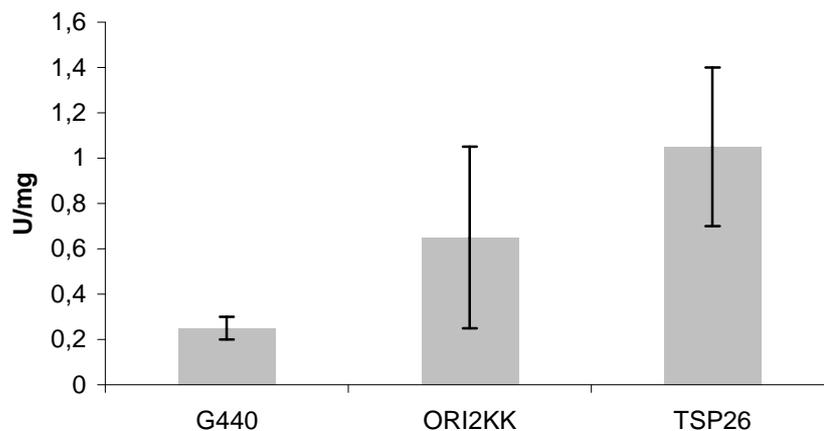


Abb. 11: Chinoloxidase-Aktivität pro Milligramm Membranprotein. Alle drei Stämme wurden unter den gleichen Wachstumsbedingungen gezogen: Übernachtskultur in Succinat-Medium unter Zugabe von 40 mM Nitrat.

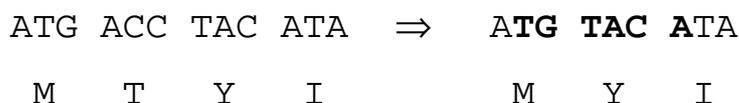
3.1.2 Promotorstudien

Da *E. coli* Promotoren in *P. denitrificans* zu keiner Expression führen, kamen für diese Versuche nur *Paracoccus*-eigene Promotoren in Frage. Gewählt wurden der upstream-Bereich von *porG*. Dieser Porinpromotor erwies sich in früheren Versuchen in Kombination mit dem Gen für die β -Galaktosidase als äußerst wirkungsvoll (Schmitt, 1997).

Als weiterer Promotor wurde der *ctaC*-Promotor gewählt, der die Expression der Untereinheiten II und III der Cytochrom *c* Oxidase kontrolliert.

3.1.2.1 Porinpromotor

Ausgangsplasmid dieser Experimente war pTS24 (siehe Abbildung 12). Durch das Mutagenese-Oligonukleotid *Bsr*GI (siehe Abschnitt 2.2.13.2) konnte im ersten Schritt eine *Bsr*GI-Schnittstelle in die zweite mögliche Startposition der Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase eingeführt werden (siehe Einleitung), welche durch frühere Experimente als Startposition favorisiert wird (Richter et al., 1994; Zickermann, 1996). Durch die Einführung der *Bsr*GI-Schnittstelle kam es darüber hinaus zu einer Änderung der Aminosäuresequenz, aus MTYI wurde MYI am N-Terminus der Untereinheit II:



Aus dem entstandenen Vektor pTS26 wurde im zweiten Schritt ein *Bsr*GI/*Xba*I-Fragment ausgeschnitten und in pIS1 (2.2.1) kloniert. Bei diesem Fragment handelte es sich um das promotorlose *qox*-Operon. pIS1 basiert wie pTS26 auf dem Expressionsvektor pRI2. Der *por*G-upstream-Bereich ist vor das β -Galaktosidasegen kloniert. Im Vergleich zum Wildtyp zeichnet sich aber dieser Porinpromotor durch das Fehlen eines Nukleotids unmittelbar vor dem Startmethionin aus. Die Wildtypsequenz AACATCATG wurde zu AA-ATCATG. Das Fehlen dieses Nukleotids führte aber zu keinem Aktivitätsverlust des Promotors (Schmitt, 1997). Der resultierende Vektor pTS8 (2.2.1) besitzt nun ein *qox*-Operon, das unter Kontrolle des Porinpromotors steht. Als abschließender Schritt folgte ein Triple mating (2.2.11) in ORI2/4 und TSP24 (3.1.1). Erfolgreiches Triple mating wurde durch einen Restriktionsverdau (2.2.3 und 2.2.6) der aus den Klonen isolierten Plasmid-DNA (2.2.2) kontrolliert. Von positiven Klonen wurden Membranen präpariert (Abschnitt 2.3.3) und die Chinoloxidase-Aktivität gemessen. Keiner der isolierten Klone zeigte Chinoloxidase-Aktivität. Ein anschließender Western-Blot (2.3.3) gegen die Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase ergab ebenfalls ein negatives Ergebnis.

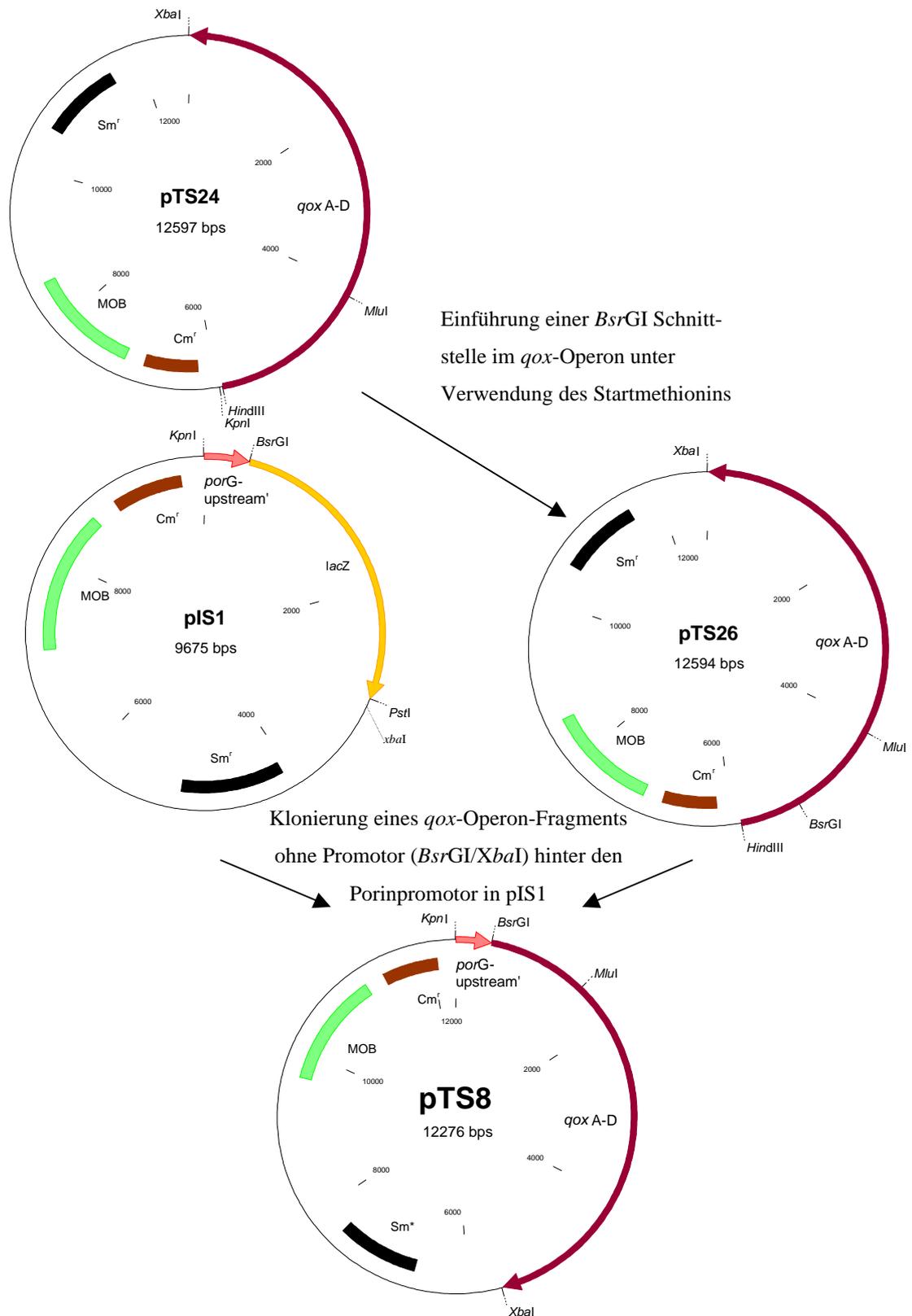


Abb. 12: Konstruktion eines *ba*₃-Expressionsplamids unter Verwendung des Porinpromotors. Zu diesem Zweck wurde eine *Bsr*GI-Schnittstelle im Startmethionin des *qox*-Operons eingeführt. Die Klonierung des promotorlosen *qox*-Operon-Fragments in den Vektor pIS1 (*Bsr*GI/*Xba*I) führte zum Austausch des *qox*-Promotors gegen den Porinpromotor.

3.1.2.2 *cta*-Promotor – TSP27

Der *ctaC*-Promotor reguliert die Expression der Untereinheiten II und III (*ctaC* und *ctaE*) und befindet sich unmittelbar vor dem *ctaC*-Gen. Wie in Abbildung 13 graphisch dargestellt, wurde zunächst ein Teil des *qox*-Operons mittels PCR (1.2.15) amplifiziert. Für die PCR kamen die Primer *xba*-ATG-Nr2 und *Hind*-*Mlu*-rev zum Einsatz (1.2.15.2). Dadurch wurde ein ca. 1200 bp großes Fragment amplifiziert, beginnend mit dem Startmethionin der Untereinheit II und endend nach der *Mlu*I-Restriktionsschnittstelle in Untereinheit II. Die Flanken wurden so gewählt, daß dem Amplifikat am 5'-Ende eine *Xba*I- und am 3'-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle angefügt wurde. Unter Verwendung der flankierenden Enden wurde das Konstrukt dann in den Vektor pUP102 (2.2.1) kloniert. Bei pUP102 handelt es sich um ein pRI2-Derivat. Unter Kontrolle des *ctaC*-Promotors liegt ein Fragment der Untereinheit I der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase. Durch die Klonierung des PCR-Amplifikats in diesen Vektor wurde dieses Fragment der Untereinheit I durch das promotorlose Fragment der Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase ausgetauscht. Aus dem resultierenden Plasmid pTS41 (2.2.1) wurde im Anschluß ein *Kpn*I/*Mlu*I-Fragment ausgeschnitten. Dabei handelt es sich um den *ctaC*-Promotor sowie die ersten 1200 bp der Untereinheit II bis zur *Mlu*I-Restriktionsschnittstelle. Dieses Fragment wurde in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pTS24 kloniert. Durch die Klonierung des pTS41-Fragments in pTS24 kommt es zum Austausch des *qox*-Promotors durch den *ctaC*-Promotor. Der resultierende Vektor pTS52 (2.2.1) wurde über ein Triple mating (2.2.11) in den *aa*₃/*ba*₃-Deletionsstamm TSP24 eingebracht. Das erfolgreiche Triple mating wurde über einen Restriktionsverdau (2.2.3 und 2.2.6) der isolierten Plasmid-DNA kontrolliert. Von positiven Klonen (TSP27) wurden Membranen (2.3.3) präpariert und diese hinsichtlich der *ba*₃ Chinoloxidase-Expression immunologisch getestet. Da der Western-Blot gegen Untereinheit II zu einem positiven Signal führte, wurde mit den Membranen ein Aktivitätstest der *ba*₃ Chinoloxidase (2.3.6) durchgeführt.

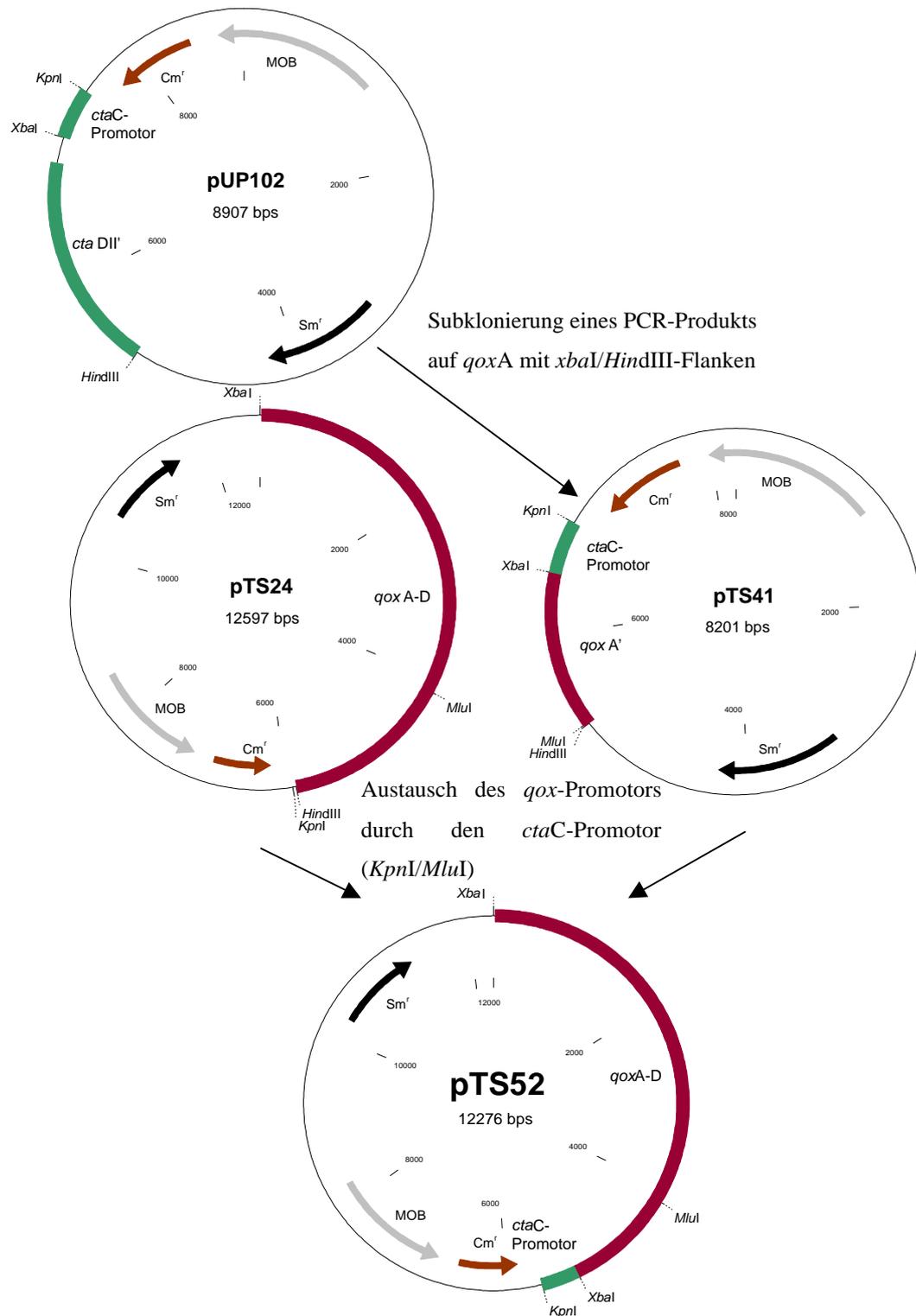


Abb. 13: Konstruktion eines *ba3*-Expressionsplasmids unter Verwendung des *ctaC*-Promotors. Zu diesem Zweck wurde das *ctaDII*-Gen auf pUP102 durch ein *qoxA*-Fragment (*XbaI/HindIII*) ausgetauscht. Im folgenden Schritt wurde das nun unter Kontrolle des *ctaC*-Promotors stehende *qoxA*-Genfragment in das Expressionsplasmid pTS 24 kloniert (*KpnI/MluI*).

Abbildung 14 zeigt einen Vergleich der Membranaktivitäten von TSP26 und TSP27, unter dem Einfluß von Nitratzugabe zum Anzuchtmedium. Beide Stämme wurden unter den gleichen Bedingungen als Übernachtskultur in Succinat-Medium angezogen. Bei TSP26 ist eine deutliche Abhängigkeit der Expression der *ba*₃ Chinoloxidase von Nitrat während der Anzucht zu erkennen. Bei Zugabe von 40 mM Nitrat läßt sich die Expressions um den Faktor 2-4 steigern. Diese Eigenschaft ist bei TSP27 nicht zu beobachten, da die Expression unter Kontrolle des *ctaC*-Promotors erfolgt. Die Expression der Chinoloxidase ist in diesem Stamm höher als bei Verwendung des *qox*-Promotors in Abwesenheit von Nitrat, erreicht aber nur ca. 60% der in beiden Stämmen maximal gemessenen Aktivität (siehe Abbildung).

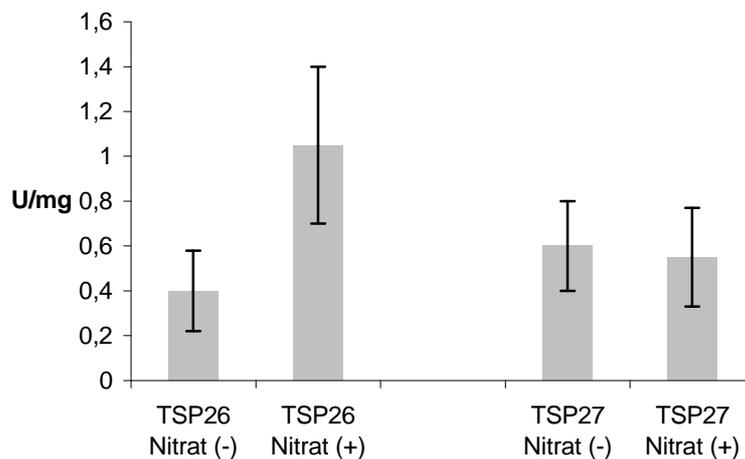


Abb. 14: *ba*₃ Chinoloxidase-Aktivität in Membranen in Abhängigkeit von Nitrat. Beide Stämme, TSP26 und TSP27, wurden unter gleichen Bedingungen als Übernachtskultur in Succinat-Medium angezogen. Nitrat wurde gegebenenfalls in einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben.

3.1.3 Diskussion

Ziel dieser Versuche war es, die Expression der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* zu steigern. Verfolgt wurden zwei Strategien. Zum einen sollte ein Stamm hergestellt werden, der die konkurrierende *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase nicht mehr enthält. Diese Oxidase wird unter aeroben Bedingungen bevorzugt exprimiert.

Der zweite Ansatz verfolgte die Strategie, die Expression durch Verwendung eines stärkeren Promotors zu steigern. Erste Wahl wären induzierbare, starke *E. coli* Promotoren, die aber in *Paracoccus* nicht funktionsfähig sind. Daher fiel die Wahl auf *Paracoccus*-eigene Promotoren. Ausgewählt wurde der *porG*-upstream-Bereich sowie der *ctaC*-Promotor.

Frühere Experimente zeigten, daß sich die Expression der *ba₃* Chinoloxidase in *Paracoccus* durch Nitrat um den Faktor 4 erhöhen läßt (Zickermann, 1996). Vor dem Transkriptionsstart finden sich unter anderem mögliche Erkennungssequenzen für den Transkriptionsfaktor NarL (Zickermann et al., 1997), wodurch sich der stimulierende Effekt von Nitrat erklären läßt. Bei *E. coli* reguliert NarL in Gegenwart von Nitrat die Expression bestimmter Gene (Li und De Moss, 1988). Das Bindemotiv besteht aus heptameren Sequenzabschnitten in direkter oder indirekter Wiederholung. Bei positiv regulierten Genen befinden sich diese Abschnitte meist um Position -200 vor dem Transkriptionsstart, wohingegen sie sich bei negativ regulierten Genen im Bereich des Promotors befinden und damit diesen nach Bindung blockieren. Im *gox*-Operon liegen diese möglichen Sequenzabschnitte im Bereich -160 bis -140, eine Position, die bei einem stimulierenden Effekt durch Nitrat typisch wäre.

Der stimulierende Effekt von Nitrat läßt sich auch beobachten, wenn das *gox*-Operon auf einem Plasmid angeboten wird (siehe Abbildung 8). Auch in diesem Fall läßt sich die Expression um den Faktor zwei bis vier steigern, wenn man dem Nährmedium 40 mM Nitrat zufügt. Die verminderte Aktivität als Maß der Expression bei höheren Nitratkonzentrationen läßt sich möglicherweise auf einen toxischen Effekt zurückführen. Die Expression ist in diesem System, in Abwesenheit von Nitrat, um den Faktor zwei bis drei höher als im Wildtyp. Eine Erklärung dürfte in der erhöhten Kopienzahl des Plasmids zu suchen sein.

Eine zusätzliche Erhöhung des Expressionslevels der *ba₃* Chinoloxidase kann beobachtet werden, wenn darüber hinaus die Expression der *aa₃* Cytochrom *c* Oxidase verhindert wird (siehe Abschnitt 3.1.1). In diesem Fall steigt die Expression nochmals um ca. 50% an (siehe Abbildung 11). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die Deletion der Cytochrom *c* Oxidase zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Häm-Gruppen für den Einbau in die Chinoloxidase führt. Dies könnte zu einer Expressionssteigerung der *ba₃* Chinoloxidase führen, reguliert durch das HAP1-Erkennungsmotiv in der upstream-Region des *gox*-Promotors. HAP1, ein „Heme Activating Protein“, gehört zu der Gruppe der „Oxygen Responsive Elements“ (ORE) und soll sowohl an der Regulation der Genexpression über die

Sauerstoffkonzentration beteiligt sein als auch eine koordinierte Synthese von Apoprotein und Kofaktoren ermöglichen (Steinrücke und Ludwig, 1993). Eine andere Erklärung wäre, daß durch die Deletion der Cytochrom *c* Oxidase der aerobe Elektronentransfer über den *bc*₁-Komplex verhindert ist. Somit kommt es zu einer Änderung des Redoxzustands der Atmungskette und dadurch zu einer Anhäufung von Chinol. Dies könnte zu einer Erhöhung der Expression bestimmter Gene, wie der *ba*₃ Chinoloxidase, führen (Otten et al., 1999).

Durch Deletion der Cytochrom *c* Oxidase und Kodierung der Information des *qox*-Operons auf einem Plasmid läßt sich die Expression der *ba*₃ Chinoloxidase um den Faktor fünf gegenüber dem Wildtyp steigern (siehe Abbildung 11). Eine weitere Erhöhung der Expression könnte durch die Verwendung der *Paracoccus*-eigenen Promotoren, dem Porinpromotor und dem *ctaC*-Promotor, möglich sein.

Das promotorlose *qox*-Operon wurde wie in Abschnitt 3.1.2.1 beschrieben anstelle des β -Galaktosidasegens in den Vektor pIS1 kloniert, so daß es unter Kontrolle des Porinpromotors steht. Die auf pIS1 vorhandene Porinpromotorregion einschließlich RBS ergab bei Messung der β -Galaktosidase in *Paracoccus*- eine um den Faktor 3 erhöhte Aktivität im Vergleich zum *qox*-Promotor (Schmitt, 1997).

Ein anschließendes Triple mating in *Paracoccus* führte jedoch zu einem Stamm, der die Chinoloxidase nicht exprimiert. Der Porinpromotor-Bereich besitzt unmittelbar vor dem Transkriptionsstart an Position -47 (Saxena et al., 1997) zwei mögliche NarL-Bindemotive, die jedoch für die Regulation keine Rolle zu spielen scheinen (Schmitt, 1997). Auch sollten Transkription und Translation des nachfolgenden Gens nicht betroffen sein, da erfolgreiche Expressionsversuche mit der β -Galaktosidase (Schmitt, 1997) und dem Grünfluoreszierenden-Protein GFP (Maneg, 1999) durchgeführt werden konnten. Die erfolgreiche Expression membranständiger Proteine scheint aber nicht möglich zu sein. Zwei Beispiele sind das hier verwendete *qox*-Operon sowie das Cytochrom *c*₅₅₂ (O. Richter pers. Mitteilung). Möglicherweise ist die Translokation der Proteine über die Membran gestört. Im Falle des *qox*-Operons könnte der Grund in der Änderung der Aminosäuresequenz des Signalpeptids durch die Einführung der *BsrGI*-Schnittstelle liegen. Dadurch kommt es zum Verlust eines Threonins an der zweiten Position.

Im Falle der Expression mittels des *ctaC*-Promotors wurde ein Teil der Untereinheit II (*goxA*) der *ba₃* Chinoloxidase durch PCR amplifiziert und in pUP102 eingebracht. Im Anschluß wurde dieses Fragment einschließlich des auf pUP102 liegenden Promotors in pTS24 kloniert. Als Resultat erhielt man die 4 strukturellen Gene der Chinoloxidase unter Kontrolle des *ctaC*-Promotors im „broad host range“ Vektor pRI2. Ein Triple mating in TSP24 (3.1.1) führte zum Stamm TSP27. Im Gegensatz zum Porinpromotor kam es bei diesem Versuch zu einer Expression der Oxidase. Vergleicht man die Membranaktivitäten der Stämme TSP26 und TSP27 (siehe Abbildung 14) unter gleichen Anzuchtbedingungen ohne Nitrat, dann zeigt TSP27 eine um ca. 40% erhöhte Expression. Eine weitere Stimulierung der Expression durch Nitrat ließ sich in TSP27 nicht erreichen (siehe Abbildung 14), da keine NarL Bindesequenz in der upstream-Region des entsprechenden Promotors vorliegt.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, dann besteht das zur Zeit beste Expressionssystem für die *ba₃* Chinoloxidase in einem *aa₃/ba₃*-Deletionsstamm (TSP24), in dem das komplette *gox*-Operon mit eigenem Promotor auf dem „broad host range Vektor“ pRI2 angeboten wird (TSP26). Die Zugabe von 40 mM Nitrat führt zu maximaler Expression.

3.2 Reinigung und Charakterisierung der *ba*₃ Chinoloxidase

Die Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* wurde 1994 beschrieben (Richter et al., 1994) und in der Folgezeit verbessert (Zickermann et al., 1996). Die beiden beschriebenen Methoden basieren darauf, die Chinoloxidase in mehreren aufeinander folgenden Säulen aufzureinigen. In der von Zickermann beschriebenen Methode wurden nacheinander eine Anionenaustauscher-, eine Cu-IMAC- und eine AcA34-Gelfiltrationssäule verwendet. Dabei erhielt man eine maximale Ausbeute von ca. 30% Chinoloxidase, bezogen auf die Enzymaktivität im Solubilisat. Das so gereinigte Enzym enthielt 4 Untereinheiten mit Molekularmassen von 51 kD für Untereinheit I, sowie 17,5 bzw. 14 kD für die Untereinheiten III bzw. IV. Untereinheit II wies 3 Fragmente auf (IIa-c) mit Molekularmassen von 43,5 sowie 37 und 34 kD. Durch Optimierung der 1996 beschriebenen Methode bzw. durch Verwendung von Affinitätsmarkern soll die Anzahl der verwendeten Säulen und damit die Zeit reduziert sowie die Reinigungseffizienz erhöht werden.

3.2.1 Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase mittels Streptavidintag

Aufgrund der höheren Affinität des Strep-Tags II gegenüber Strep-Tag I zum Streptavidin und dem breiteren Einsatzbereich des Strep-Tag II soll versucht werden, die *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* mittels dieses Tags zu reinigen. Strep-Tag II stellt eine Weiterentwicklung des Strep-Tags I dar. Seine Positionierung ist aufgrund der Aminosäuresequenz SNWSHPQFEK nicht mehr auf den C-Terminus von Proteinen beschränkt, da die für die Wechselwirkung mit Streptavidin notwendige Carboxylatgruppe innerhalb des Tags liegt. Weiterhin ist der im Strep-Tag I geforderte deprotonierte Histidinrest nicht mehr notwendig, so daß dieses Tag auch in einem pH-Bereich unterhalb von pH 6 eingesetzt werden kann. Für die Tageinführung wurde der N-Terminus der Untereinheit IV, sowie der C-Terminus der Untereinheit I gewählt.

N-Terminus, Untereinheit IV - TSP3

Für die Einführung des Strep-Tags II an dieser Position wurde das System der gerichteten Mutagenese eingesetzt (2.2.13). Basierend auf dem Vektor pCW1 (2.2.1) führt der Primer „Strep-Tag II, UE IV“ (2.2.13.2) neben dem Affinitätstag noch eine *Sac*II-Schnittstelle an Position 4525 in das *gox*-Operon ein. Somit konnte eine erste Auswahl der positiven Klone nach der Mutagenese durch Restriktionsverdau (2.2.3 und 2.2.6) getroffen werden. Die

Plasmid-DNA der positiven Klone wurde zur Kontrolle der eingeführten Mutation im Anschluß sequenziert (2.2.14). Das mit Strep-Tag II markierte *qox*-Operon wurde dann über einen *XbaI/HindIII*-Verdau ausgeschnitten und unter Verwendung der gleichen Schnittstellen in den *Paracoccus*-Expressionsvektor pRI2 kloniert. Der resultierende Vektor pTS5 wurde im Anschluß über Triple mating (2.2.11) in den Stamm ORI2/4 (2.1.2) eingebracht. Einer Kontrolle der eingebrachten DNA folgte eine Membranpräparation (2.3.3). Die in Membranen gemessene *ba*₃ Chinoloxidase-Aktivität war vergleichbar mit der aus ORI2KK (siehe Abschnitt 3.1.1, Abbildung 11). Ein Western-Blot gegen Strep-Tag II (2.3.2) zeigte ebenfalls ein positives Signal auf der Höhe der Untereinheit IV (nicht gezeigt). Somit konnte man davon ausgehen, daß im erhaltenen *Paracoccus*-Stamm TSP3 eine funktionsfähige Chinoloxidase sowie das Strep-Tag II transkribiert und erfolgreich in die Membran eingebaut wurden.

Im Anschluß wurden Membranen im präparativen Maßstab gewonnen (2.3.3) und für die Proteinreinigung solubilisiert (2.3.4.1). Gemäß der Anleitung für die Proteinreinigung mittels Strep-Tag (2.3.4.1) wurde das Solubilisat auf die Streptavidinsäule geladen, diese im Anschluß gewaschen und eluiert. Es stellte sich heraus, daß in mehreren Versuchen eine maximale Ausbeute von weniger als 8% Chinoloxidase, berechnet auf die Enzymaktivität im Solubilisat, erhalten werden konnte.

C-Terminus, UE I - TSP6

Gemäß der oben beschriebenen Methode wurde diesmal das Strep-Tag II an den C-Terminus der UE I, unter Einführung einer *BstBI*-Schnittstelle zur Kontrolle, angebracht. Es erfolgte abermals eine Ligation in den Vektor pRI2. Der so entstandene Vektor pTS10 wurde über ein Triple mating in ORI2/4 eingebracht. Aktivitätstest und immunologischer Nachweis zeigten, daß der erhaltene Stamm TSP6 die Chinoloxidase einschließlich Strep-Tag II exprimiert.

Abermals erwies sich auch hier eine affinitätschromatographische Reinigung als nicht zufriedenstellend. Bezogen auf die Enzymaktivität im Solubilisat ließen sich auch bei diesem Tag nur 10-20% der Chinoloxidase reinigen. Abbildung 15 zeigt ein entsprechendes SDS-Gel. In Bahn 1 ist das Eluat aufgetragen. Oberhalb der 46 kD Markerbande ist eine Proteinbande mit starker Intensität für Untereinheit I zu erkennen. Zwischen 46 und 31 kD sind die Proteinbanden der drei Formen der Untereinheit II zu sehen. Jedoch sind diese im direkten Vergleich mit Untereinheit I unterrepräsentiert. Knapp oberhalb der 14,5 kD

Markerbande ist die Untereinheit III zu sehen, Untereinheit IV ist nicht erkennbar. Der Säulendurchlauf wurde aufgefangen und mittels Strep-Tag I gekoppelter F_v-Fragmente abermals gereinigt (Ostermann, 2000). Die so erhaltene Probe ist in Bahn 2 aufgetragen. Abermals sind die Banden für die Untereinheiten I und II deutlich zu erkennen. Diesmal liegen diese beiden Untereinheiten in annähernd äquimolaren Verhältnissen vor. Die Bande mit hoher Intensität bei 14,5 kD enthält neben den Untereinheiten III und IV die leichte und schwere Kette der bei dieser Aufreinigung verwendeten F_v-Fragmente.

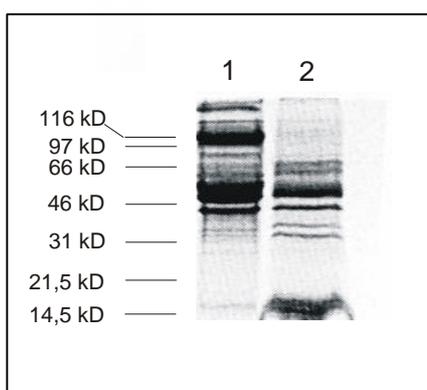


Abb. 15: SDS-Gel gereinigter Proteinproben. Bahn 1: Reinigung von TSP6 unter Verwendung des Strep-Tag II nach dem in 2.3.4.1 beschriebenen Protokoll. Bahn 2: Reinigung des Durchlaufs unter Zuhilfenahme von F_v-Fragmenten (Ostermann, 2000).

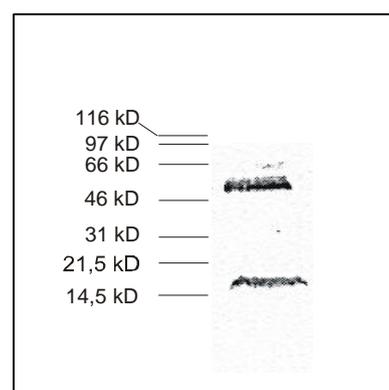


Abb. 16: Western-Blot gegen Strep-Tag mittels Streptavidin-AP. Als Probe wurde das mit F_v-Fragmenten gereinigte Enzym (Bahn 2) aus Abbildung 15 verwendet.

Die gleiche Probe wurde auch benutzt, um das Strep-Tags immunologisch nachzuweisen. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 zu sehen. Durch das in diesem Test eingesetzte Streptavidin-AP-Konjugat kann Strep-Tag I und II detektiert werden. So ist neben der Bande oberhalb von 46 kD noch eine zweite oberhalb von 14,5 kD zu sehen. Die 51 kD Bande ist ein Signal für das an Untereinheit I gekoppelte Strep-Tag II, und die 14,5 kD Bande identifiziert das an die schwere Kette der F_v-Fragmente gekoppelte Strep-Tag I.

3.2.2 Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase mittels Histidintag

Ein in der Proteinreinigung weit verbreitetes Tag ist das sogenannte His-Tag. Dieses besitzt wie Strep-Tag I den Nachteil, daß es nur im basischen Milieu funktionell ist und je nach Anzahl der verwendeten Histidinreste unterschiedlich viele Ladungen ins Protein einbringt. His-Tags haben aber den Vorteil, daß man deren Affinität durch Variation ihrer Länge beeinflussen kann. Für die folgenden Experimente kamen His-Tags mit einer Länge von 6 Resten zum Einsatz

Untereinheit II, C-Terminus – TSP7

Dieses C-terminale His-Tag an Untereinheit II wurde in Zusammenarbeit mit Thomas Ostermann (MPI für Biophysik, Frankfurt/M) konstruiert. Die Vorgehensweise entspricht denen der Strep-Tags. Für die Mutagenese kam der Primer „His₆-tag UE II, C-terminal“ (2.2.13.2) zum Einsatz. Der nach Umklonierung in pRI2 entstandene Vektor pTS11 wurde durch Triple mating in ORI2/4 überführt und ergab den Stamm TSP7. Abbildung 17 zeigt einen Western-Blot mit TSP7-Membranen. Als Kontrolle wurde ein mit His-Tag markiertes 30 kD Ran-Protein aufgetragen. Mit anti-His-Antikörpern ist eindeutig ein positives Signal in Höhe der Untereinheit IIa zu sehen. Die in Membranen gemessene *ba*₃ Chinoloxidase-Aktivität ist vergleichbar mit der aus ORI2KK (siehe Abschnitt 3.1.1, Abbildung 11).

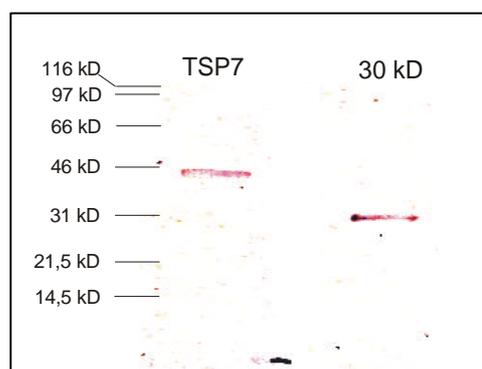


Abb. 17: Western-Blot gegen His-Tag gerichtet. Aufgetragen wurden Membranen des Stammes TSP7 sowie ein mit His-Tag markiertes 30 kD Ran-Protein.

Obwohl das His-Tag in Membranen nachgewiesen werden konnte, erwies sich die Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase mittels Cu-IMAC-Säule (2.3.4.2) als problematisch. Es konnten bei

mehreren Versuchen nur zwischen 9% und 23% Chinoloxidase aus dem Solubilisat gereinigt werden. Ein typisches Beispiel ist in Abbildung 18 wiedergegeben. In Bahn 1 wurde eine nach der in Abschnitt 2.3.4.3 beschriebenen Methode (ohne Verwendung eines Affinitätsmarkers) gereinigte Chinoloxidase aufgetragen. Bahn 2 enthält die gereinigte Chinoloxidase aus dem Stamm TSP7, isoliert nach der für His-Tag-Reinigung beschriebenen Methode (2.3.4.2). Der bei dieser Methode vor dem Elutionspeak gesammelte Proteindurchlauf wurde abermals wie in Abschnitt 2.3.4.3 beschrieben einer Chinoloxidase-Reinigung unterzogen und in Bahn 3 aufgetragen.

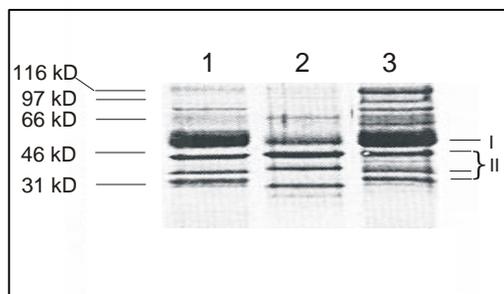


Abb. 18: SDS-Gel gereinigter Proteinproben. Bahn 1: Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase nach dem in 2.3.4.3 beschriebenen Protokoll. Bahn 2: Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase aus TSP7 unter Verwendung des C-terminalen His-Tags an UE II (2.3.4.2). Bahn 3: Reinigung des Säulendurchlaufs der Bahn 2 nach dem in 2.3.4.3 beschriebenen Protokoll

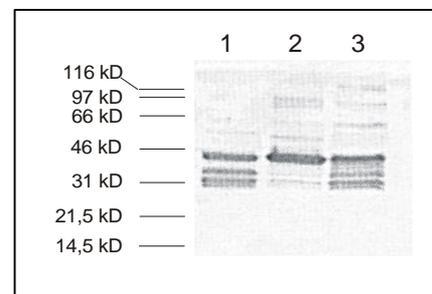


Abb. 19: Western-Blot gegen Untereinheit II. Auftrag siehe Abb. 18.

In Bahn 1 ist das für die *ba*₃ Chinoloxidase typische Bandenmuster für die Untereinheit I bei 51 kD und für IIA-c zwischen 46 und 31 kD, zu erkennen. Wurde das Protein mittels His-Tag an Untereinheit II aufgereinigt, dann sieht man im SDS-Gel nur die Banden für die Untereinheiten I und IIA. Die Banden für IIB und IIC sind nicht zu erkennen. In diesem Fall handelt es sich bei den beiden untersten Banden um Protein-Verunreinigungen. Darüber hinaus ist die Untereinheit I unterrepräsentiert. Der bei dieser Reinigung gesammelte und erneut aufgereinigte Säulendurchlauf in Bahn 3 enthält dagegen wieder die typischen Bandenmuster für die Untereinheiten I und IIA-c. Dieser Sachverhalt ist auch in Abbildung 19 wiedergespiegelt. Es handelt sich dabei um einen Western-Blot gegen Untereinheit II (2.3.2)

der selben Proben in der selben Reihenfolge. Bahn 1 und 3 zeigen die 3 charakteristischen Banden der Untereinheiten IIa-c. Bahn 2 dagegen zeigt nur eine Bande in Höhe der Untereinheit IIa.

Untereinheit I, C-Terminus – TSP11

Beim C-terminalen His-Tag an Untereinheit I kam der Primer „His₆-tag UE I, C-terminal“ (2.2.13.2) zum Einsatz. Die Klonierung des veränderten *qox*-Operons ergab das Plasmid pTS19 und nach Triple mating in ORI2/4 den *Paracoccus*-Stamm TSP11.

Die Messung von Membranen ergab, daß dieser Stamm keine funktionelle *ba*₃ Chinoloxidase exprimiert. Es konnte keine Enzymaktivität gemessen werden, obwohl eine immunologische Detektion der Untereinheit II ein positives Signal zeigte.

3.2.3 Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase ohne Affinitätstag

Die konventionelle Reinigung geschah in Anlehnung an die 1996 beschriebene Methode (Zickermann et al., 1996). Hier wurde auf die Verwendung von Affinitäts-Markern verzichtet. Wie in Abschnitt 2.1.1.3 beschrieben, wurden zur Aufreinigung 3 aufeinander folgende Säulen benutzt. Der hier erstmals verwendeten Q-Sepharose High Performance als Anionenaustauscher- folgte die Cu-IMAC-Säule. Zur Abtrennung von Imidazol kam zum Abschluß eine Gelfiltrationssäule des Typs AcA34 zum Einsatz.

Abbildung 20 zeigt ein typisches Elutionsprofil der Q-Sepharose High Performance- (links) sowie der Cu-IMAC-Säule (rechts). Mit Kreuzen ist die Volumenaktivität der *ba*₃ Chinoloxidase in U/ml angegeben. Beim Elutionsprofil der Q-Sepharose High-Performance-Säule ist deutlich ein abgesetzter Proteinpeak bei ca. 250 mM NaCl zu sehen. Die gesamte Aktivität befindet sich in diesem Peak. Weder im Durchlauf noch in den anderen Proteinfractionen ist eine *ba*₃ Chinoloxidase-Aktivität zu detektieren. Die aktiven Fraktionen wurden auf die Cu-IMAC-Säule aufgetragen. Nach einem halbstündigen Waschschrift mit 1/3 Säulenvolumen Waschpuffer wurde der in Abschnitt 2.3.4.3 beschriebene Gradient gefahren. Deutlich abgesetzt zum Haupt-Proteinpeak, mit einer Verzögerung von 1-1,5 Stunden, ist ein zweiter Proteinpeak mit geringerer Amplitude zu detektieren, der jedoch sämtliche *ba*₃ Chinoloxidase-Aktivität enthält.

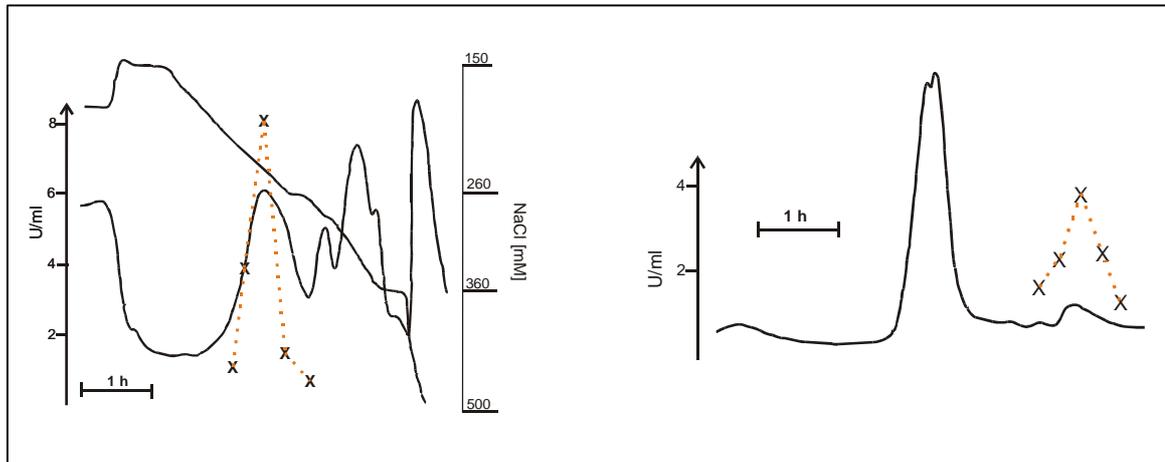


Abb. 20: Elutionsdiagramme der Q-Sepharose- (links) und Cu-IMAC-Säule (rechts) der Reinigung der ba_3 Chinoloxidase nach dem in 2.3.4.3 beschriebenen Protokoll. Die gemessene Chinoloxidase-Aktivität (U/ml) ist durch Kreuze markiert. Die aktiven Fraktionen aus der Q-Sepharose- wurden auf die Cu-IMAC-Säule aufgetragen.

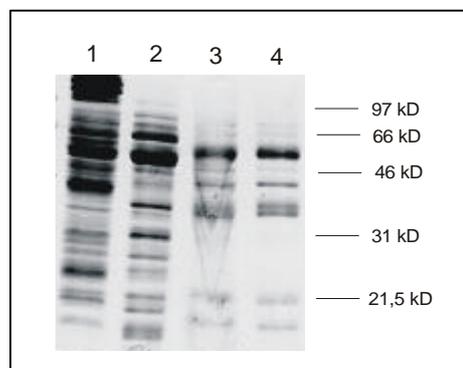


Abb. 21: SDS-Gel der verschiedenen Fraktionen der Reinigung der ba_3 Chinoloxidase nach dem in 2.3.4.3 beschriebenen Protokoll. Bahn 1: Solubilisat; Bahn 2: nach Q-Sepharose High Performance-Säule; Bahn 3: nach Cu-IMAC-Säule; Bahn 4 nach AcA34-Säule

Abbildung 21 zeigt ein SDS-Gel (2.3.1) der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung. Bahn 1 enthält das Solubilisat, Bahn 2 die vereinigten Fraktionen nach der ersten Säule, Bahn 3 die vereinigten Fraktionen nach der zweiten Säule und Bahn 4 das gereinigte Protein nach der abschließenden Gelfiltrationssäule. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Hauptaufreinigungserfolg der Cu-IMAC-Säule zuzuschreiben ist. Die Reinheit des isolierten Proteins nach diesem Schritt entspricht im wesentlichen dem nach der abschließenden Gelfiltration.

Dieser Sachverhalt ist auch in Tabelle 2 wiedergegeben. Durch den abschließenden Gelfiltrationsschritt nimmt die Proteinmenge um ca. 10% ab, von 11,5 auf 9,8 mg. Es handelt sich jedoch nicht um eine Abtrennung von Verunreinigungen, sondern um einen Verlust an *ba*₃ Chinoloxidase, da die Gesamtaktivität auch um ca. 10% abnimmt. Das Verhältnis Aktivität:Protein bleibt jedoch gleich. Die Gelfiltration bringt keinen weiteren Aufreinigungseffekt, dient aber zur Abtrennung des Imidazols.

	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [%]	Anreicherung	Ausbeute [%]
Solubilisat	1300	100	1	100
Q-Sepharose	220	53	2,9	49
Cu-IMAC	11,5	24	27	23
AcA34	9,8	21	27,3	20

Tab. 2: Übersicht über die Aufreinigung der *ba*₃ Chinoloxidase ohne Verwendung eines Affinitätstags.

3.2.4 Kinetische Parameter

Im Gegensatz zur Cytochrom *c* Oxidase benutzt die *ba*₃ Chinoloxidase ein hydrophobes Chinol und kein hydrophiles Cytochrom *c* als Substrat. Für die Cytochrom *c* Oxidase wurde eine starke Ionenstärke-Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit mit einem glockenförmigen Verlauf festgestellt (Witt et al., 1998a).

Abbildung 22 zeigt die entsprechende Ionenstärke-Abhängigkeit der Enzymaktivität der *ba*₃ Chinoloxidase. Gemessen wurde in einem Puffer mit 10 mM KPi pH 7,4 und 0,015% DM. Die Detergenz-Konzentration sollte im Test möglichst nahe oberhalb der CMC liegen. Die Ionenstärke wurde mit KCl eingestellt und berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$I = 0,5 \times \sum c_i \times z_i^2$$

c_i : Konzentration; z_i : Ladung des Ions

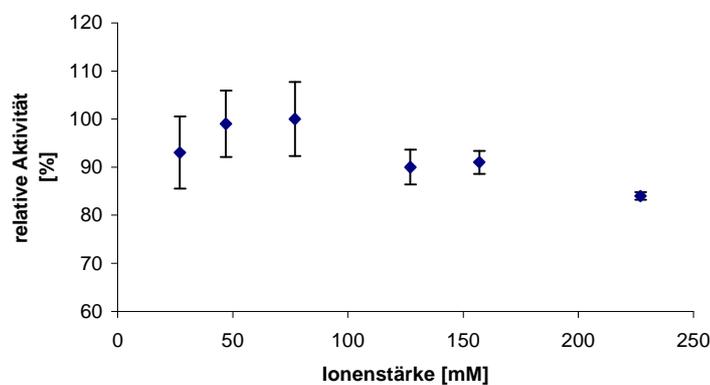


Abb. 22: Relative Aktivität der *ba*₃ Chinoloxidase in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Gemessen wurde in einem Puffer mit 10 mM KPi pH 7,4, 0,015% DM mit variabler KCl-Konzentration.

Im Gegensatz zur Cytochrom *c* Oxidase ist für die *ba*₃ Chinoloxidase keine Abhängigkeit der Aktivität von der Ionenstärke zwischen 30 und 230 mM feststellbar. Ein weiterer Test untersuchte die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit vom pH-Wert. Abbildung 23 zeigt die relativen Aktivitäten zwischen pH 5,5 und 8. Die Werte zeigen einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum zwischen pH 6,5 und 7.

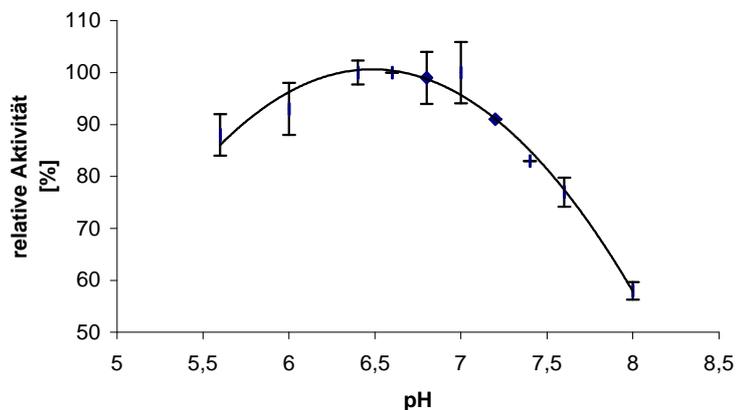


Abb. 23: Relative Aktivität der ba_3 Chinoloxidase in Abhängigkeit vom pH-Wert. Gemessen wurde in einem Puffer mit 10 mM KPi und 0,015% DM.

3.2.5 Diskussion

Die Reinigung der ba_3 Chinoloxidase sollte durch zwei unterschiedliche Verfahren beschleunigt und effizienter gemacht werden. Zum einen sollte versucht werden, die Oxidase durch einen Affinitätstag zu markieren, um die Reinigung in einem Schritt zu erreichen. Zum anderen sollte die bereits bestehende Methode (Zickermann et al., 1996) weiter verbessert werden. Für die Affinitätstags wurden zwei verschiedenen Marker gewählt. Strep-Tag II erlaubt die Aufreinigung über eine Streptavidinsäule und Elution mittels Desthiobiotin. Das His-Tag gestattet die Aufreinigung über eine Metall-Chelat-Säule und kann durch Imidazol eluiert werden. Für die Markierung mittels Strep-Tag II wurde der N-Terminus der Untereinheit IV sowie der C-Terminus der Untereinheit I gewählt. Das His-Tag wurde C-terminal an Untereinheit I bzw. II angebracht. Drei dieser vier Konstrukte (TSP3, TSP6 sowie TSP7) exprimieren eine aktive Chinoloxidase und der entsprechenden Affinitätsmarker kann immunologisch nachgewiesen werden. Jedoch ist die Effizienz der Reinigung bei diesen Konstrukten schlechter als bei der herkömmlichen Reinigungs-Methode ohne Verwendung eines Affinitätsmarkers. Die Ausbeuten liegen bei maximal 8% (TSP3), 20% (TSP6) sowie 23% (TSP7), bezogen auf die Chinoloxidase-Aktivität im Solubilisat.

Darüber hinaus traten bei diesen Aufreinigungen unerwünschte Nebeneffekte auf. Bei TSP6, dem Konstrukt mit dem C-terminalen Strep-Tag II an Untereinheit I, kam es zu einer Anhäufung von Untereinheit I (Abbildung 15, Bahn 1). Reinigte man das ungebundene Protein nochmals auf unter Verwendung von F_V-Fragmenten auf (Ostermann, 2000), so erhielt man diesmal die Untereinheiten I und II in annähernd äquimolarem Verhältnis (Abbildung 15, Bahn 2). Ein immunologischer Nachweis gegen Strep-Tag zeigte zudem ein positives Signal in Höhe der Untereinheit II. Dies deutet an, daß unter nativen Bedingungen das Strep-Tag II an dieser Position teilweise maskiert ist und somit nicht an die Säulenmatrix binden kann. Bei TSP 7, dem Konstrukt mit dem His-Tag an Untereinheit II kam es zur Anhäufung der Untereinheit IIa und zum Verlust der Untereinheit I (Abbildung 18, Bahn 2). Bei Aufreinigung des Durchlaufs erhielt man wie bei TSP6 abermals die Untereinheiten I und II in annähernd äquimolarem Verhältnis (Abbildung 18, Bahn 3). Eine Besonderheit der Reinigung von TSP7 mittels His-Tag lag darin, daß man nur eine Form der Untereinheit II in Höhe von 43,5 kD isolierte, nicht jedoch die beiden anderen Formen der Untereinheit II (Abbildung 19, Bahn 2). Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß es sich bei den beiden kleineren Fragmenten der Untereinheit II um C-terminale Abbauprodukte handeln könnte. Auf diese Überlegung wird näher in Abschnitt 3.4 eingegangen. Daß man bei der weiteren Reinigung des Säulendurchlaufs dieser „Mutante“ (Abbildung 18, Bahn 3 sowie Abbildung 19, Bahn 3) alle drei Formen der Untereinheit II sehen konnte, lag entweder wieder an einer teilweisen Maskierung des His-Tags bei der vorhergehenden Reinigung oder aber es handelt sich auch bei dem größten Fragment der Untereinheit II bereits um ein Abbauprodukt. Bei TSP11 (His-Tag Untereinheit I, C-terminal) ließ sich zwar die Untereinheit II immunologisch nachweisen, ein Aktivitätstest der Chinoloxidase fiel aber negativ aus. Möglicherweise resultiert das Einbringen mehrerer positiver Ladungen in dieser Position in einer Störung des Protein-Assemblies oder in einer Instabilität des Proteins.

Die Reinigung der *ba*₃ Chinoloxidase ohne Nutzung eines Affinitätsmarkers basierte im wesentlichen auf dem 1996 entwickelten Verfahren (Zickermann et al., 1996). Es wurden kleinere Variationen in den verwendeten Säulenmaterialien und Änderungen der Gradienten vorgenommen. Statt einer Q-Sepharose fast flow- wurde eine Q-Sepharose High Performance-Säule des gleichen Herstellers genutzt, die eine bessere Reinigung ergab. Der NaCl-Gradient lag nun zwischen 150 und 350 mM und nicht mehr wie ursprünglich zwischen 0 und 500 mM. Zudem wurde eine Zwischenstufe bei 260 mM NaCl eingebaut. Dadurch erhielt man einen abgetrennten Proteinpeak, der den größten Anteil der *ba*₃ Chinoloxidase-

Aktivität beinhaltete (Abbildung 20). Diese Proteinfraction wurde auf eine Cu-IMAC-Säule aufgetragen. Jedoch wurde die Flußgeschwindigkeit auf 0,5 ml/ min reduziert und bei 50 mM Imidazol eine Stufe für 10 min eingebaut. Durch diese Maßnahmen erhielt man mit einer Verzögerung von einer Stunde einen abgesetzten Proteinpeak, der sämtliche ba_3 Chinoloxidase-Aktivität enthielt (Abbildung 20). Durch diese eindeutige Abtrennung vom Haupt-Proteinpeak wurde bereits nach diesem Säulenschritt eine „saubere“ ba_3 Chinoloxidase erhalten (Abbildung 21, Bahn 3). Die abschließende Gelfiltration war für die Reinheit des Proteins nicht mehr von Bedeutung. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methode konnten somit auch die Randfraktionen der abschließenden AcA34-Säule aufgefangen werden, ohne eine Gefahr der Verunreinigung. Die mit dieser Methode erzielte Ausbeute lag zwischen 20% und 30% und somit im Bereich der herkömmlichen Reinigungsprozedur.

3.3 Expression des *Escherichia coli cyo*-Operons in *Paracoccus denitrificans* und Charakterisierung der Chinoloxidase

1997 wurde beschrieben, daß eine Deletion des *ctaB*-Gens in *Paracoccus* zu einer inaktiven *bb₃* Chinoloxidase führt (Zickermann et al., 1997). Das *ctaB*-Gen kodiert für eine Farnesyltransferase, die die Synthese von Häm *o* aus *b* katalysiert (Zickermann et al., 1997). Darüber hinaus ist bekannt, daß *Paracoccus* mit Ausnahme der *cbb₃* Oxidase nur Häm *a* als high-spin Häm verwendet. Da *E. coli* nicht in der Lage ist, Häm *a* zu synthetisieren, wäre es durchaus möglich, daß durch eine heterologe Expression der *E. coli* Chinoloxidase in *Paracoccus* Häm *a* in das Enzym eingebaut werden könnte. Dies würde die Frage klären, ob die Besetzung der high-spin Position mit der für jedes Enzym charakteristischen Häm-Gruppe strukturelle und funktionelle Relevanz hat oder ob es sich bei diesem Phänomen um eine Frage der Häm-Verfügbarkeit bzw. des Häm-Einbaus handelt. Das *cyo*-Operon, welches für die strukturellen Untereinheiten der *E. coli* Chinoloxidase kodiert, lag zu Beginn der Untersuchungen auf dem Vektor pJRHSA vor (Rumbley et al., 1997). Der Vorteil dieses Vektors lag darin, daß ein His-Tag am C-Terminus der Untereinheit II bereits angefügt war, mit dem die Oxidase erfolgreich aus *E. coli* gereinigt werden konnte.

3.3.1 Konstruktion von ORI2K31

Um eine effiziente Transkription in einem heterologen System zu erreichen, mußten die vier Gene für die Untereinheiten I-IV des *E. coli cyo*-Operons unter die Kontrolle des *P. denitrificans qox*-Promotors gestellt werden (Abbildung 24). Ausgangspunkt war ein konstruiertes *qox*-Operon, in dem das *qoxA*-Gen durch das *cyoA*-Gen unter Zuhilfenahme zweier erzeugter Schnittstellen *SpeI* und *AflIII* ausgetauscht wurde (Winterstein, 1997). Der *qox*-Promotor sowie das Signalpeptid von QoxA blieben jedoch erhalten, was dazu führt, daß die Aminosäuresequenz der reifen Untereinheit jetzt mit CKAEVLV anstatt CNSALLD beginnt. Dieses Konstrukt wurde dann in den „broad host range“ Vektor pRI2 (Pfitzner et al., 1998) mit *HindIII/XbaI* subkloniert. Anschließend folgte eine Ligation mit dem *SmaI/EcoRV*-Fragment aus pJRHSA in die *SmaI*-Schnittstelle dieses Vektors. Das resultierende Plasmid pOR660 (2.2.1) exprimierte nun die 4 strukturellen *cyo*-Gene unter Kontrolle des *qox*-Promotors.

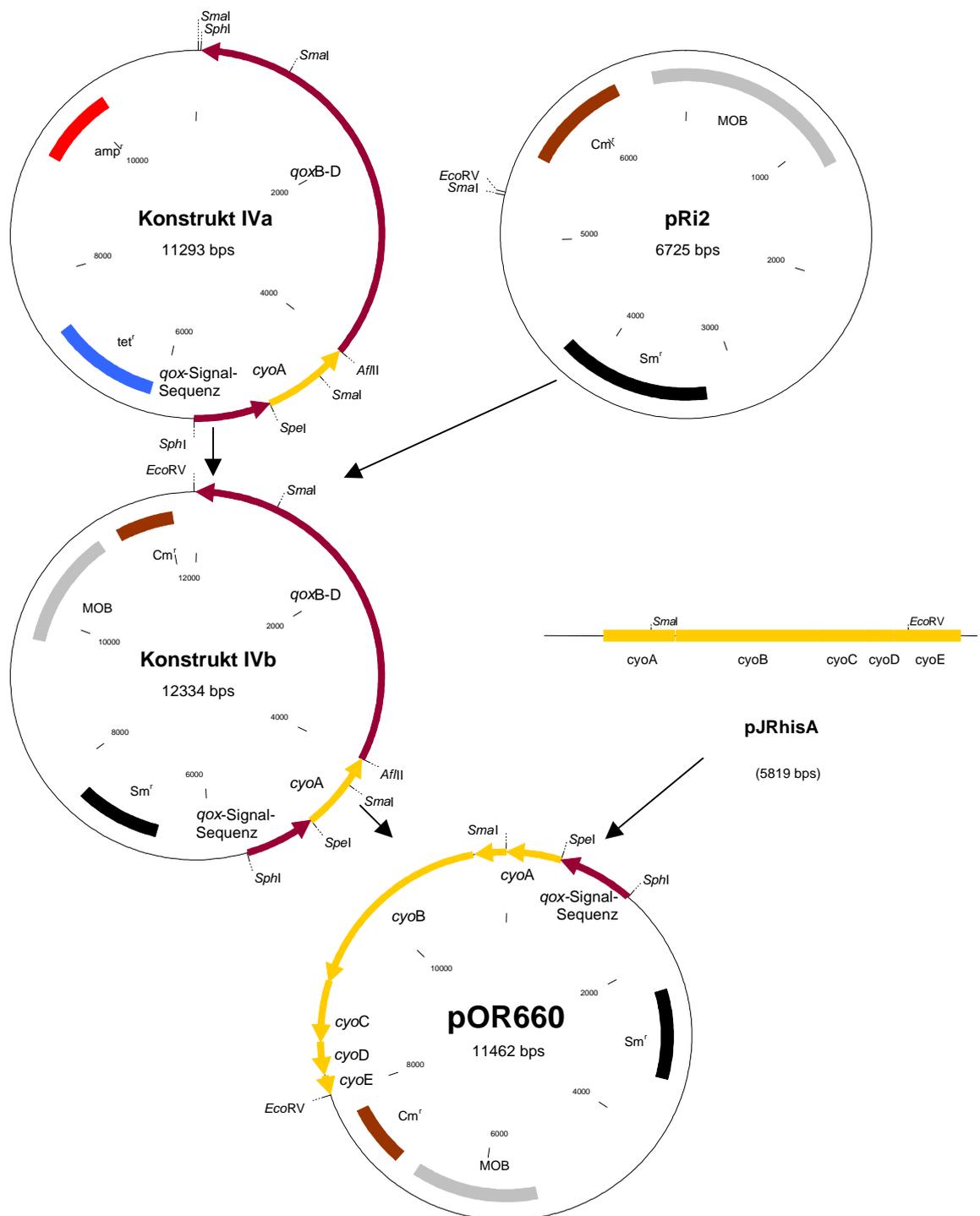


Abb. 24: Konstruktion von pOR660. Ausgehend von Konstrukt IVa (Winterstein, 1997) wurden die Gene für die chimäre Chinoloxidase über *HindIII/XbaI* in pRI2 kloniert. Anschließend folgte eine Ligation mit dem *SmaI/EcoRV*-Fragment aus pJRhisA (Rumbley et al., 1997) in die *SmaI*-Schnittstelle dieses neuen Vektors (Konstrukt IVb), wodurch der Vektor pOR660 entstand.

3.3.2 Charakterisierung

Das Plasmid pOR660 wurde über ein Triple mating in den *ba*₃-Deletionsstamm ORI2/4 eingebracht. Die erzielte Expression war direkt vergleichbar mit der des *qox*-Operons, wenn beide Konstrukte unter gleichen Bedingungen angezogen wurden. Wie es bereits für *E. coli* gezeigt wurde (Rumbley et al., 1997), konnte die neu konstruierte Chinoloxidase aus *P. denitrificans* in einem Schritt unter Verwendung der Cu-IMAC-Säule gereinigt werden (2.3.4.2). Die elektrophoretische Auftrennung des Proteins zeigte, daß die Molekularmassen der Untereinheiten unverändert bleiben, unabhängig davon, ob das Protein in *E. coli* oder *P. denitrificans* exprimiert wurde (siehe Abbildung 25, Bahn 2 und 3). Die kleineren Untereinheiten III und IV sind in diesem Gel nicht aufgelöst.

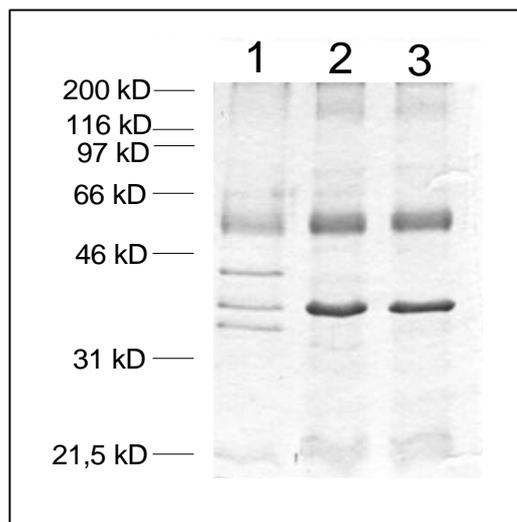


Abb. 25: Heterologe Expression der *E. coli* Chinoloxidase in *Paracoccus*. Bahn 1: *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans*, Bahn 2: heterolog in *Paracoccus* exprimierte Cytoxidase und Bahn 3: homolog in *E. coli* exprimierte Cytoxidase.

Spektroskopische Untersuchungen wurden unter nativen (2.4.2.1) und denaturierenden Bedingungen (2.4.2.2) durchgeführt.

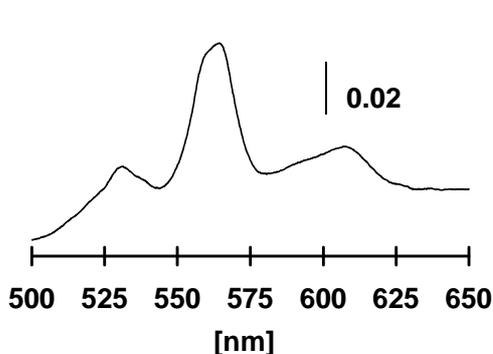


Abb. 26: Natives Redox-Spektrum der Cyto Chinoloxidase aus dem *P. denitrificans*-Stamm ORI2K31. Das Dithionit-reduzierte minus oxidierte Differenzspektrum wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,18 mg/ml aufgenommen.

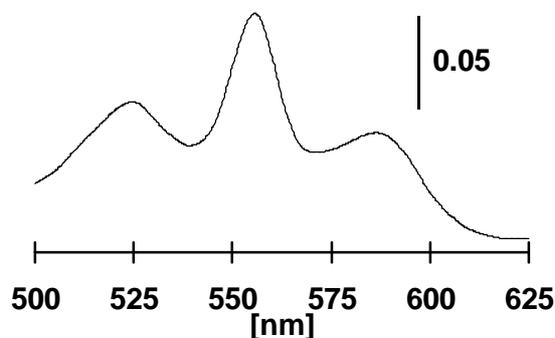


Abb. 27: Pyridin-Hämochrom-Spektrum der Cyto Chinoloxidase aus dem *P. denitrificans*-Stamm ORI2K31. Das Spektrum wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml aufgenommen.

Abbildung 26 zeigt das native Redox-Spektrum der Cyto Chinoloxidase aus ORI2K31. Neben einem Haupt-Peak bei 564 nm ist ein weiterer bei 607 nm zu sehen. Der 564 nm Peak ist charakteristisch für Häm *b* und/oder *o*, wohingegen der 607 nm Peak die Gegenwart von Häm *a* andeutet. Um die Natur des 607 nm Peaks näher zu charakterisieren, wurde ein Pyridin-Redox-Spektrum aufgenommen. Dieses denaturierende Spektrum hat den Vorteil, daß man die freigesetzten Häm-Gruppen charakterisieren kann, ohne störende Einflüsse durch die Proteinumgebung in Kauf nehmen zu müssen. Abbildung 27 zeigt ein solches Pyridin-Redox-Spektrum der Cyto Chinoloxidase, isoliert aus dem *Paracoccus*-Stamm ORI2K31. Der Peak bei 556 nm ist charakteristisch für Häm *b* und/oder *o* und der Peak bei 589 nm identifiziert eindeutig Häm *a*. Um jedoch die Gegenwart von Häm *b* und/oder *o* eindeutig zu beweisen, wurde mit den isolierten Proben eine HPLC-Analyse (2.3.7) durchgeführt. Die Peaks konnten dabei durch Vergleich ihrer Retentionszeiten zugeordnet werden, im Vergleich mit isolierten Häm-Gruppen ausgewählter Enzymkomplexe (*aa*₃, *bc*₁, *bo*₃). Es waren zwei dominante Peaks für Häm *a* und *b* erkennbar. Weiterhin wurde ein dritter kleiner Peak, charakteristisch für Häm *o*, identifiziert. Die gesammelten Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Organismus	Exprimiertes Operon	Häm-Zusammensetzung	Häm <i>b:a</i> -Verhältnis	Aktivität [1/s]
<i>E. coli</i> GO105	<i>cyo</i>	<i>bo</i> ₃	-	549
<i>P. denitrificans</i> ORI2K31	<i>cyo</i>	<i>ba</i> ₃	1:0.86	592
<i>P. denitrificans</i> G440	<i>qox</i>	<i>ba</i> ₃	1:1	180

Tab. 3: Häm-Zusammensetzung und Aktivität der gereinigten Chinoloxidasen. Die Aktivität ist in Wechselzahlen angegeben, basierend auf der Chinol-Oxidation.

Durch das Pyridin-Redox-Spektrum sowie die HPLC-Analyse kann ein Häm *b:a*-Gehalt der heterolog exprimierten Cyo Oxidase von 1:0,86 berechnet werden. Weiterhin zeigt dieses Enzym im Vergleich zum homolog exprimierten Wildtyp nahezu identische Wechselzahlen. Abbildung 28 zeigt ein CO-Differenzspektrum (2.4.2.4) der heterolog in *Paracoccus* exprimierten *E. coli* Chinoloxidase im Vergleich mit dem *E. coli*- und *P. denitrificans*-Wildtypenzym. Bahn A zeigt das *Paracoccus*-Wildtypenzym mit einem Peak und Trog bei 589 und 609 nm in der α -Region und 426 und 441 nm im Soret-Bereich. Diese Werte sind charakteristisch für CO-reaktives Häm *a* in der high-spin Position des Enzym und sind identisch zu dem heterolog in *Paracoccus* exprimierten *E. coli*-Enzym in Bahn B. Als Vergleich ist in Bahn C das *E. coli*-Wildtypenzym aufgetragen. Dieses zeigt typische Merkmale für CO-reaktives Häm *o* in der high-spin Position, einen Peak und Trog bei 416 und 427 nm in der α -Region, sowie charakteristische Merkmale im Soret-Bereich.

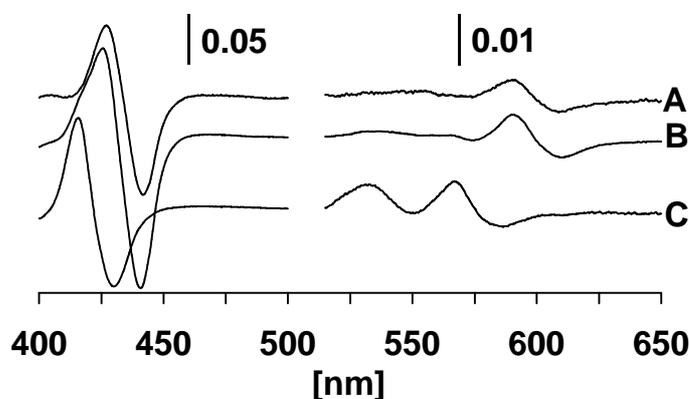


Abb. 28: CO-Differenzspektren von gereinigten Chinoloxidasen. **A:** *P. denitrificans*: *ba*₃ Chinoloxidase, **B:** Cyo Oxidase exprimiert im *Paracoccus*-Stamm ORI2K31, **C:** *E. coli bo*₃ Chinoloxidase (Stamm GO105). Die vertikalen Balken zeigen die Absorptionen für die Soret- und α -Region.

3.3.3 Diskussion

Die *E. coli bo₃* Chinoloxidase und die *P. denitrificans ba₃* Chinoloxidase gehören beide zur Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidase. Die höchste Sequenzhomologie dieser beiden Oxidase ist in Untereinheit I zu finden (siehe Einleitung, Tabelle 1), welche alle redoxaktiven Zentren trägt, ein low-spin Häm und das binukleäre Zentrum, bestehend aus einem high-spin Häm und einem Kupfer-Ion. Die Ergebnisse zeigen, daß die *E. coli* Chinoloxidase in *Paracoccus* unter Kontrolle des *Paracoccus qox*-Promotors exprimiert werden kann. Die Expression führte jedoch zu einem Enzymkomplex mit veränderter Häm-Zusammensetzung in der high-spin Position. Das native Redox-Spektrum (Abbildung 26), das Pyridin-Spektrum (Abbildung 27), die Häm-Analyse sowie das CO-Differenzspektrum (Abbildung 28) zeigen eindeutig, daß unter heterologen Expressionsbedingungen in *Paracoccus* Häm *a* in die high-spin Position eingebaut wird. Es ersetzt somit das Häm *o* in der nativen *E. coli* Oxidase. Das Pyridin-Spektrum (Abbildung 27) und die Häm-Analyse weisen eine Häm *b:a*-Stöchiometrie von nahezu eins auf. Häm *o* findet sich nur in geringen Mengen (Tabelle 3). Diese Daten werden auch durch das CO-Differenzspektrum bestätigt (Abbildung 28-B). Der Peak bei 426 nm in der Soret-Region ist charakteristisch für einen CO-Häm *a₃*-Komplex. Die geringe Blauverschiebung dieses Peaks im Vergleich zur *Paracoccus ba₃* Chinoloxidase (Abbildung 28-A) könnte durch eine veränderte Proteinumgebung verursacht sein. Die kleine Schulter bei 416 nm, sowie spektrale Ähnlichkeiten in der α -Region, im Vergleich zur *E. coli bo₃* Chinoloxidase (Abbildung 28-C), sind Anzeichen für die bereits in der Häm-Analyse bestimmten geringen Mengen von Häm *o* in der high-spin Position des Enzyms.

Mit Ausnahme der *cbb₃* Cytochrom *c* Oxidase weisen alle Indizien darauf hin, daß Häm *b* nicht in die high-spin Position von Häm-Kupfer-Oxidase unter Erhalt der enzymatischen Aktivität eingebaut werden kann (Saiki et al., 1992; Saiki et al., 1993a; Saiki et al., 1993b; Zickermann et al., 1997). Die Wildtyp-Aktivität der heterolog in *Paracoccus* exprimierten Cytochrom *c* Oxidase schließt aus diesen Gründen die Gegenwart von Häm *b* in der high-spin Position dieses Enzymkomplexes aus. Somit scheint es zwingend, daß der Einbau eines farnesylierten Derivats von Häm *b* in die high-spin Position des Enzym eine Grundvoraussetzung für eine funktionelle Chinoloxidase darstellt. Ob es sich dabei um ein Häm *o* oder Häm *a* (mit einer Formyl-Gruppe statt einer Methyl-Gruppe am Pyrrol-Ring D) handelt, scheint jedoch nicht von Bedeutung zu sein. Dieses Ergebnis könnte erneut darauf

hinweisen, daß die Hydroxyl-Gruppe des Hydroxyethyl-Farnesyl-Rests an der Übertragung von Protonen durch den K-Kanal auf das binukleäre Zentrum beteiligt sein könnte (Zickermann et al., 1997). Während Häm *o* das einzige farnesylierte Häm-Derivat ist, das in *E. coli* synthetisiert werden kann, ist *P. denitrificans* darüber hinaus in der Lage, Häm *a* aus *o* herzustellen. Da in *Paracoccus* jedoch unter nativen Bedingungen nur Häm *a* in die high-spin Position von Chinoloxidasen eingebaut wird, steht Häm *o* für den Einbau offensichtlich nicht zur Verfügung. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, daß es zu schnell zu Häm *a* umgewandelt wird oder kein Enzym vorhanden ist, das Häm *o* einbauen kann.

3.4 Heterogenität der Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase

Die reife Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase sollte, abgeleitet aus der Gensequenz von *qoxA*, aus 379 Aminosäuren bestehen. Dies erklärt jedoch nicht, warum diese Untereinheit im SDS-Gel mehrere Banden bei 43,5 sowie 37 und 34 kD aufweist. Mögliche Ursachen könnten in einem proteolytischen Abbau oder Modifikation dieser Untereinheit liegen. Durch N-terminale Sequenzierung konnte gezeigt werden, daß alle drei Formen der Untereinheit II mit der gleichen Aminosäuresequenz beginnen (Zickermann, 1996). Bei homologen Chinoloxidasen, der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* (Ma et al., 1997) sowie der *aa*₃ Chinoloxidase aus *Bacillus subtilis* (Santana et al., 1992) konnte gezeigt werden, daß der N-Terminus der Untereinheit II eine Lipidmodifikation trägt. Versuche, dies bei der *ba*₃ Chinoloxidase aus *Paracoccus* nachzuweisen, schlugen bislang fehl. Im Vergleich zu den meisten anderen Chinoloxidasen ist die Untereinheit II der *Paracoccus ba*₃ Chinoloxidase um mehr als 50 Aminosäuren länger (Richter et al., 1994). Da bislang keine N-terminale Modifikation oder N-terminaler proteolytischer Abbau dieser Untereinheit festgestellt werden konnte, soll mit den folgenden Experimenten nachgewiesen werden, ob es sich bei diesen 3 Formen der Untereinheit II um einen proteolytischen Abbau der zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren handelt.

3.4.1 Konstruktion der verkürzten Fragmente

Ausgehend von dem Laufverhalten der 3 Formen der Untereinheit II im SDS-Gel könnten bis zu 100 Aminosäuren abgebaut sein. Um dies zu überprüfen, wurde durch Mutationen die Untereinheit II am C-Terminus um 10, 60 bzw. 110 Aminosäuren verkürzt. Die dafür notwendigen Stop-Codons wurden in Zusammenarbeit mit Thomas Ostermann (MPI für Biophysik, Frankfurt/M) ins Plasmid pCW1 eingeführt, basierend auf dem in Abschnitt 2.2.13 beschriebenen Mutagenesesystem. Es erfolgte eine Klonierung in den *Paracoccus*-Expressionsvektor pRI2 und anschließendes Triple mating in ORI2/4. Die resultierenden *Paracoccus*-Stämme erhielten folgende Bezeichnung:

TSP8 = *ba*₃ Stop -10
TSP9 = *ba*₃ Stop -60
TSP10 = *ba*₃ Stop -110

3.4.2 Reinigung und Charakterisierung

Abbildung 29 zeigt einen Western-Blot gegen Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans*. Zu diesem Zweck wurden Membranen im analytischen Maßstab (2.3.3) präpariert. Bahn 1 enthält den Wildtyp, Bahn 2 den Stamm TSP8 (-10 Konstrukt), in Bahn 3 und 4 wurden zwei unterschiedliche Proben des Stammes TSP9 (-60 Konstrukt) aufgetragen und in Bahn 5 und 6 zwei unterschiedliche Proben des kürzesten Konstrukts TSP10 (-110 Konstrukt).

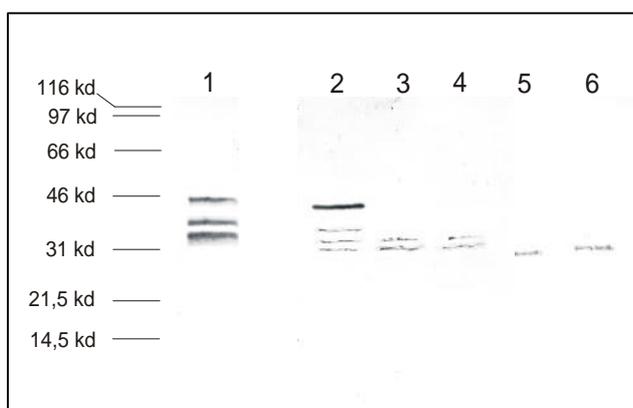


Abb. 29: Western-Blot gegen Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans*. Eingesetzt wurden Membranen des Wildtyps (Bahn 1) sowie der Stämme TSP8 (Bahn 2), TSP9 (Bahn 3 und 4) sowie TSP10 (Bahn 5 und 6).

Es ist deutlich zu erkennen, daß sowohl bei der um 10 als auch bei der um 60 Aminosäuren verkürzten Untereinheit II noch unterschiedliche Fragmente auftreten. Erst die um 110 Aminosäuren verkürzte Untereinheit II weist ein homogenes Laufverhalten auf und zeigt nur noch eine Bande im Western-Blot.

Weitere Untersuchungen wurden abermals in Zusammenarbeit mit Thomas Ostermann durchgeführt. Die aus den Stämmen TSP8, 9 und 10 jeweils gereinigten *ba*₃ Chinoloxidasen zeigten alle zwischen 80% und 100% Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.

3.4.3 Diskussion

Die Heterogenität der Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase wurde erstmals 1996 beschrieben (Zickermann, 1996). Jedoch waren vor Beginn dieser Arbeit noch keine genauen Ursachen für die im SDS-Gel beobachteten Fragmentgrößen dieser Untereinheit bekannt. Sie zeigt drei Banden bei 43,5 sowie 37 und 34 kD. Ursachen wurden in einer posttranslationalen Modifikation bzw. einem proteolytischen Abbau vermutet. Von der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* ist es bekannt, daß diese Untereinheit im N-terminalen Bereich proteolytisch gespalten wird, einhergehend mit einer Lipidmodifikation an der Spaltstelle. Es kommt dabei zu einer Lipidverknüpfung an der Thiol- und Aminogruppe des nun endständigen Cysteins (Ma et al., 1997). Die Untereinheit II der *Paracoccus ba*₃ Chinoloxidase enthält eine ähnliche Aminosäuresequenz und wird auch proteolytisch gespalten. Scheinbar kommt es jedoch nicht zu einer Lipidmodifikation am N-Terminus (Zickermann, 1996). Da alle 3 isolierten Formen der reifen Untereinheit II mit der gleichen Aminosäuresequenz beginnen, wurde ein proteolytischer Abbau des C-Terminus vermutet. Im Vergleich mit den meisten anderen Chinoloxidasen ist die Untereinheit II der *Paracoccus* Chinoloxidase um mehr als 50 Aminosäuren länger (Richter et al., 1994). Ein Vergleich der Röntgenstruktur-Daten der periplasmatischen Domäne der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* (Wilmanns et al., 1995) und der 4 Untereinheiten *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus* (Iwata et al., 1995) zeigt, daß strukturelle Ähnlichkeiten über weite Bereiche der hydrophilen Domäne, nicht aber im C-Terminus vorliegen (Vergleiche Abbildung 4). Deshalb sollte eine C-terminale Verkürzung um bis zu 100 Aminosäuren dieser Untereinheit keine strukturell wichtigen Bereiche betreffen.

Erste Hinweise, daß es sich tatsächlich bei den drei Formen der Untereinheit II um einen proteolytischen Abbau des C-Terminus handelt, gab es bereits bei dem Versuch, die Oxidase mittels His-Tag an dieser Position aufzureinigen (Abschnitt 3.2.2). Anhand Abbildungen 18, Bahn 2 und Abbildung 19, Bahn 2 erkennt man, daß nur die größte Form der Untereinheit II gereinigt werden kann. Versucht man jedoch das Material, das nicht an die Säule gebunden hat, über die konventionelle Methode aufzureinigen, dann kann man wieder alle drei Formen dieser Untereinheit isolieren (Abbildung 18 und 19, je Bahn 3). Würde es sich um einen N-terminalen Abbau oder um eine Modifikation handeln, dann sollte man bei der Reinigung mittels His-Tag am C-Terminus alle drei Formen der Untereinheit II sehen. Diese Ergebnisse wurden durch die Mutanten mit der verkürzten Untereinheit II bestätigt (Abbildung 29). Durch sukzessive Verkürzung der Untereinheit verlor man die Banden bei höherem

Molekulargewicht, bis schließlich bei dem kürzesten Fragment nur noch eine Bande zu detektieren war und die *ba*₃ Chinoloxidase homogen isoliert werden konnte. Darüber hinaus zeigten die verkürzten Fragmente auch annähernd Wildtyp-Aktivität (85%-100%) (Ostermann, 2000). Die C-terminalen Aminosäuren scheinen also weder einen Einfluß auf die strukturelle Stabilität zu haben, noch für die Funktion der Chinoloxidase notwendig zu sein.

3.5 Protonen-Ausgangskanal, Rolle der Arginine 490/491 und Aspartat 416

Kurz nach Veröffentlichung der Kristallstrukturdaten der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* wurden zwei Protonenkanäle postuliert, der D-Kanal, benannt nach der Aminosäureposition D124, sowie der K-Kanal, benannt nach der Aminosäureposition K354. Beide Kanäle beginnen auf der cytoplasmatischen Seite und führen zum binukleären Reaktionszentrum. Die Funktion dieser Kanäle besteht darin, Protonen auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins aufzunehmen und diese entweder zum binukleären Zentrum zu transportieren, sie werden dort für die Sauerstoffreduktion benötigt, oder sie über die Membran zu translozieren. Zahlreiche Veröffentlichungen berichten über die bei der Protonenbewegung beteiligten Aminosäuren sowie die Reihenfolge der dabei benutzten Kanäle (Iwata et al., 1995; Konstantinov et al., 1997; Michel, 1998; Pfitzner et al., 1998; Vygodina et al., 1998; Michel, 1999; Ruitenbergh et al., 2000). Es ist bislang aber noch weitgehend unklar, auf welchem Weg die zu translozierenden Protonen die periplasmatische Seite erreichen. Anhand der FTIR-Spektroskopie konnten zwei reversibel protonierbare Positionen identifiziert werden (Behr et al., 1998). Es handelt sich dabei um die D Ring-Propionat-Gruppen des low- und high-spin Häms. Diese könnten Bestandteil zweier Cluster A und B sein und den Beginn des Protonen-Ausgangskanals darstellen (Michel, 1998). Grundvoraussetzung dafür ist jedoch, daß die beiden Häm-Propionate in ihrer deprotonierten Form stabilisiert werden. Elektrostatische Potentialberechnungen zeigen, daß dies durch zwei konservierte benachbarte Arginine möglich ist (Kannt et al., 1998). Anhand von Mutagenesestudien und Protonen-Pumpversuchen soll die Funktion dieser Arginine geklärt werden. Cluster B enthält zudem die Aminosäure D416 (*ba*₃ Nomenklatur), die einen stabilisierenden Einfluß auf das Cluster haben könnte (Michel, 1998). Ihre Bedeutung für den Protonentransfer ist jedoch umstritten. Während ihr eine Rolle im Falle der Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* zugesprochen wird (Pfitzner et al., 2000), wird dies im Falle der Cytochrom *c* Oxidase aus *Rhodobacter sphaeroides* nicht angenommen (Qian et al., 1997). Mittels analoger Mutationen und Ganzzellpump-Experimenten soll die Bedeutung dieser Aminosäure in der *ba*₃ Chinoloxidase untersucht werden.

3.5.1 Konstruktion der Arginin- und Aspartat-Mutanten

Bei den beiden benachbarten Argininen handelt es sich in der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* um die Arginine 490 und 491. Mittels der in Abschnitt 2.2.13 beschriebenen

Mutagenesemethode wurden diese, unter Zuhilfenahme der in Abschnitt 2.2.13.2 aufgelisteten Oligonukleotide, jeweils zu Asparagin (R490N und R491N) bzw. Glutamin (R490Q und R491Q) mutiert. Zusätzlich wurde noch eine Glutamin-Doppelmutante (R490/491Q) hergestellt. Aspartat 416 wurde zu Glutamat (D416E) und Leucin (D416L) mutiert. Im Falle der R491Q- und der R490/491Q-Mutation konnte eine erste Kontrolle der erfolgreichen Mutation durch Restriktionsverdau durchgeführt werden, da durch die Mutation von Arginin 491 zu Glutamin eine *PvuII*-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Alle Klone wurden sequenziert (Abschnitt 2.2.14). Die dafür verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.2.14.3 aufgelistet. Positive Klone wurden in den *Paracoccus*-Expressionsvektor pRI2 umkloniert und durch Triple mating in den *ba*₃-Deletionsstamm ORI2/4 bzw. den *aa*₃/*ba*₃-Deletionsstamm TSP24 überführt. Eine Kontrolle des erfolgreichen Triple matings geschah über Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA, Membran-Aktivitätstest sowie Western-Blot-Analyse gegen Untereinheit II der Chinoloxidase. Die resultierenden *Paracoccus* Stämme erhielten folgende Bezeichnung:

TSP16 =	pTS43 in ORI2/4 (R491Q)
TSP17 =	pTS46 in ORI2/4 (R490Q)
TSP18 =	pTS47 in ORI2/4 (R490/491Q)
TSP23 =	pTS50 in ORI2/4 (R490N)
TSP32 =	pTS63 in TSP24 (R491N)
TSP20 =	pTS45 in ORI2/4 (D416E)
TSP33 =	pTS65 in TSP24 (D416L)

3.5.2 Ganzzellpumpen

Für die Bestimmung der Protonen-Pumpaktivität gibt es generell zwei unterschiedliche Methoden. Zum einem können die zu untersuchenden Proteine isoliert und in künstliche Liposomen rekonstituiert werden, zum anderen können Ganzzellpump-Experimente durchgeführt werden. Eine Voraussetzung für Protonen-Pumpversuchen in rekonstituierten Liposomen ist, daß alle Proteine in der gleichen Orientierung rekonstituiert werden. Darüber hinaus sollten die Liposomen „dicht“ sein, d. h. der Protonenrückfluß sollte so gering wie möglich sein. Da es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich war, für die *ba*₃ Chinoloxidase ein solches rekonstituiertes Pump-Experiment zu etablieren, wurde die Methode des Ganzzellpumpens verwendet. Diese hat den Vorteil, daß die Proteine in einer eindeutigen

Orientierung vorliegen und eine intakte Zellmembran vorhanden ist. Die Methode hat jedoch den Nachteil, daß nach Zugabe des Substrats für ein bestimmtes Protein alle vorangehenden und folgenden Proteine dieser Redoxkette auch angesprochen werden. Diese müssen dann entweder inhibiert werden bzw. deren Protonen-Pump-Stöchiometrie eindeutig bekannt sein. Abbildung 30 zeigt die Atmungskette von *P. denitrificans* sowie die pro transportiertem Elektron freigesetzten Protonen.

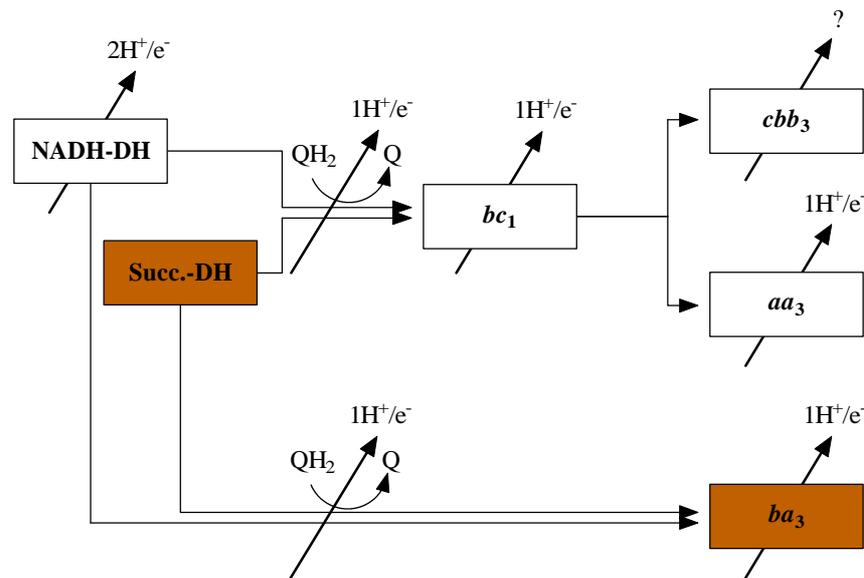


Abb. 30: Atmungskette von *P. denitrificans*. Angegeben sind die während des Elektronentransfers auf der periplasmatischen Seite freigesetzten Protonen.

Je nach verwendetem Substrat und Anzuchtbedingungen können so Protonen/Elektron-Stöchiometrien im nativen System zwischen 2 und 5 gemessen werden. Durch die Wahl des Substrats und durch Inhibierung einzelner Komplexe müssen deshalb klare Bedingungen für das Experiment geschaffen werden. Die Experimente wurden gemäß der in Abschnitt 2.3.8 beschriebenen Methode ausgeführt. Die Zugabe von Rotenon bewirkte, daß die NADH-Dehydrogenase inhibiert wurde und so nur durch die Succinat-Dehydrogenase Elektronen geliefert wurden. Myxothiazol hemmte den bc_1 -Komplex, so daß nur noch die in Abbildung 30 farblich hervorgehobenen Enzymkomplexe, die Succinat-Dehydrogenase und die ba_3 Chinoloxidase, am Elektronentransport beteiligt waren. Da die Succinat-Dehydrogenase nicht zum Aufbau des Protonengradienten über die Membran beiträgt, sollten nun im nativen

System pro verbrauchtem Elektron zwei Protonen über die Membran transloziert werden, eins stammt aus der Oxidation des Chinols, das zweite wird durch die *ba*₃ Chinoloxidase über die Membran gepumpt. Die Messung wurde im anaeroben Zustand durch eine bekannte Menge an Substrat in Form von Sauerstoff-gesättigtem Wasser gestartet. Dadurch ist die Anzahl der für die Sauerstoffreduktion benötigten Elektronen definiert. Der dabei entstandene pH-Sprung wurde durch einen Schreiber aufgezeichnet (Abbildung 31).

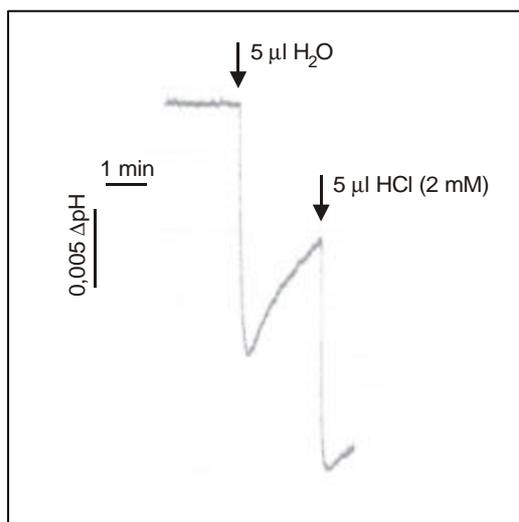


Abb. 31: Exemplarisches Schreiberprotokoll eines Protonen-Ganzzellpump-Experiments. Durch Pfeile sind die Zeitpunkte der Zugabe des Substrats (5 µl Sauerstoff-gesättigtes Wasser) sowie des Eichpulses (5 µl einer 2 mM HCl-Lösung) angegeben.

Das System wurde im Anschluß durch einen Säurepuls geeicht. Durch Verrechnung des während der Reaktion aufgezeichneten und des durch den Säurepuls gemessenen pH-Sprungs konnte die Protonen/Elektronen-Stöchiometrie der *ba*₃ Chinoloxidase sowie der gemessenen Mutanten berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Das durch die Chinol-Oxidation entstandene Proton ist bereits abgezogen. Das bedeutet, daß bei Wildtyp-Messungen eine Protonen/Elektron-Stöchiometrie von 1 erwartet wird. Bei der Messung der R490/491Q-Mutante mußten die Messdaten extrapoliert werden, da diese Mutante nur ca. 30% Membranaktivität zeigt. Für die R490N-Mutante konnte keine Protonen/Elektron-Stöchiometrie gemessen werden, da in Membranen keine enzymatische Aktivität zu messen war.

Mutation	H ⁺ /e ⁻
WT	0,9-1,2
R490Q	0,4-0,6
R491Q	0,8-1,0
R490/491Q	0-0,3
R490N	nicht bestimmt, enzymatisch inaktiv
R491N	1-1,1
D416E	0-0,2
D416L	1,0

Tab. 4: Protonen-Pump-Stöchiometrien der Wildtyp (WT) *ba*₃ Chinoloxidase sowie einiger Untereinheiten I Mutanten. Gemessen wurde im Ganzzellsystem. Das durch die Chinol-Oxidation entstandene Proton ist bereits abgezogen. Alle Daten wurden in Anwesenheit von Rotenon und Myxothiazol aufgenommen.

3.5.3 Diskussion

Eine Analyse der Röntgenstruktur-Daten der *aa*₃ Cytochrom *c* Oxidase (Iwata et al., 1995) weist einen potentiellen Weg auf, über den Protonen ausgehend vom Ende des D-Kanals (Glu278) eine Ausgangsposition auf der periplasmatischen Seite des Proteins erreichen könnten. Nach diesem Modell könnten Protonen von Glu278 auf zwei Proteincluster A und B übertragen werden. Dies ist möglich durch ein ausgedehntes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und zahlreichen Wassermolekülen. Cluster A soll unter anderem die low-spin Häm- und Cluster B die high-spin Häm-Propionate enthalten (Michel, 1998). Diese könnten eine zentrale Rolle bei der Übertragung der Protonen spielen, da durch FTIR-Spektroskopie gezeigt werden konnte, daß mindestens zwei der vier Häm-Propionate ihre Konformation bzw. ihren Protonierungszustand während der Reduktion des Enzyms ändern (Behr et al., 1998). Elektrostatische Berechnungen zeigen, daß alle 4 Häm-Propionate in ihrer anionischen, nicht protonierten Form stabilisiert werden. Die D-Ring-Propionate sind dabei von besonderem Interesse, da insbesondere diese durch Ladungsinteraktionen mit den Argininen 473 und 474 (*Paracoccus aa*₃ Oxidase; R490 und R491 in der *ba*₃ Oxidase aus *Paracoccus*) sowie durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden (Kannt et al., 1998). Das high-spin Häm-Propionat des D-Rings bildet Wasserstoffbrücken zu Arginin 473 und das

low-spin Häm-Propionat des D-Rings bildet Wasserstoffbrücken zu Arginin 474 aus. Durch die Stabilisierung der D-Ring-Propionate in ihrer anionischen Form wären sie geeignete Kandidaten für eine transiente Bindung von Protonen, bevor diese in den periplasmatischen Raum abgegeben werden. Eine Schwächung der Stabilisierung der anionischen Form könnte demzufolge einen Einfluß auf die Protonenpump-Stöchiometrie haben. Zu den Argininen 473 und 474 analoge Reste sind sowohl in der *ba₃* Oxidase aus *P. denitrificans* als auch in der *bo₃* Oxidase aus *E. coli* konserviert und könnten dort die gleichen Aufgaben übernehmen. Um deren Funktion und damit die Bedeutung der D-Ring-Propionate zu testen, wurden die beiden benachbarten Arginine 490 und 491 der *ba₃* Chinoloxidase gegen Glutamin sowie Asparagin ausgetauscht bzw. eine Glutamin-Doppelmutation eingeführt. Die Protonen-Pump-Stöchiometrie wurde mittels Ganzzellpump-Experimente ermittelt, da die Rekonstitution der *ba₃* Chinoloxidase in künstliche Liposomen im Vorfeld nicht etabliert werden konnte.

Tabelle 4 zeigt die durch Ganzzellpump-Experimente ermittelten Protonen/Elektron-Stöchiometrien des *ba₃* Wildtyps, sowie der Arginin 490/491- und Apartat 416-Mutationen. Der Wildtyp zeigt die erwartete Stöchiometrie von 1 Proton/Elektron. Abweichungen von 10% vom erwarteten Wert sind bei diesem Meßsystem durchaus tolerierbar. Das durch die Oxidation des Chinols auf der Außenseite freiwerdende Proton ist in der Tabelle bereits abgezogen.

Die Mutation von Arginin 491 zu Asparagin (R491N) oder Glutamin (R491Q) verringert die Protonen-Translokation nicht bzw. nur geringfügig. Während für die Asparagin-Mutation eine Protonentransfer-Stöchiometrie von 1-1,1 Protonen/Elektron berechnet wurde, erhielt man für die Glutamin-Mutation einen Wert von 0,8-1 Protonen/Elektron. Damit liegen beide Werte im Bereich des Wildtyps. Die Mutation Arginin 490 zu Glutamin (R490Q) lieferte dagegen Werte von 0,4-0,6 Protonen/Elektron. Werden beide Arginine zu Glutamin mutiert (R490/491Q), so verringert sich zum einen die Enzymaktivität auf ca. 50% (Meßwerte sind nicht dargestellt), zum anderen sinkt auch die Protonentransfer-Stöchiometrie auf maximal 0,3 Protonen/Elektron. Der drastischste Effekt ist bei der Mutation Arginin 490 zu Asparagin (R490N) zu beobachten. Diese Mutante zeigt keine Enzymaktivität mehr. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse kann durch die berechneten Daten in Tabelle 5 gegeben werden. Diese stellt die Stabilisierung in ΔpK -Einheiten der anionischen und damit deprotonierten Form der D-Ring-Propionate des low- und high-spin Häms der *aa₃* Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* dar.

Stabilisierung der anionischen Form in ΔpK -Einheiten		
Mutation	Häm a_3	Häm a
	D-Ring-Propionat	D-Ring-Propionat
WT	22,5	28,9
R490Q	11,5	18,6
R491Q	16	15,3
R490/491Q	5	5
R490N	6,5	18,6
R491N	16	10,3

Tab. 5: Berechnete Stabilisierung der anionischen Form der D-Ring-Propionate der Häm-Gruppen durch Ladungsinteraktionen und Wasserstoffbrücken-Bindungen in ΔpK -Einheiten. Die berechneten Werte beziehen sich auf die aa_3 Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans*, die Numerierung aber auf die ba_3 Chinoloxidase aus *Paracoccus*. Für Wasserstoffbrücken-Bindungen wird eine Stabilisierung von 5 ΔpK -Einheiten angenommen. Die berechneten Werte stammen aus: (Kannt et al., 1998).

Es handelt sich dabei jedoch nur um theoretisch ermittelte Werte, die nicht unmittelbar auf das biologische System übertragen werden können, vielmehr zeigen sie eine generell Tendenz auf. Diese Werte können aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten auch für die ba_3 Chinoloxidase aus *P. denitrificans* angenommen werden. Da Arginin 491 sowohl zu Glutamin als auch zu Asparagin mutiert werden konnte, ohne einen Einfluß auf die Protonentransfer-Stöchiometrie zu haben, aber die Mutation von Arginin 490 zu Glutamin oder Asparagin die Protonen/Elektron-Rate herabsetzte bzw. ein inaktives Protein lieferte, kann davon ausgegangen werden, daß die Stabilisierung des D-Ring Propionats des low-spin Häms in der anionischen Form nicht kritisch für den Protonentransfer ist, da die R491Q- und R491N-Mutationen die Stabilisierung der anionischen Form um weitere 3 bzw. 8 ΔpK -Einheiten im Vergleich zu beiden Arginin 490-Mutationen herabsetzten. Es scheint vielmehr so, daß die D-Ring-Propionatgruppe des high-spin Häms in der anionischen Form stabilisiert sein muß. Die beiden Mutationen von Arginin 491 zu Glutamin und Asparagin verminderten zwar die Stabilisierung um 6,5 ΔpK -Einheiten ohne jedoch einen Einfluß auf den Protonentransfer zu haben. Wurde jedoch Arginin 490 zu Glutamin mutiert, so verminderte sich die Stabilisierung um 11 ΔpK -Einheiten und die Protonentransferrate verminderte sich auf 0,4-0,6 Protonen/Elektron. Daß bei dieser Mutation der Protonentransfer nur vermindert, jedoch nicht

völlig eliminiert wurde, weist darauf hin, daß eine protonierbare oder positiv geladene Seitengruppe an dieser Position nicht unbedingt notwendig ist. Eine vorsichtige Interpretation der Kristallstrukturdaten der *aa₃* Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus* zeigt, daß bei der R490Q-Mutation eine Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen der Amid-Gruppe und dem D-Ring Häm-Propionat noch möglich ist. Dies geht aber aufgrund der geringeren Länge der Seitenkette nicht mehr im Falle der R490N-Mutation. Dadurch verminderte sich die Stabilisierung der anionischen Form nochmals um 5 ΔpK -Einheiten und resultierte in einem inaktiven Protein. Ein ähnliches Resultat ist auch bei der R490/491Q-Doppelmutation zu beobachten. Bei dieser verminderte sich die Stabilisierung um einen ähnlich großen Betrag wie bei der R490N-Mutation, 17 im Vergleich zu 16 ΔpK -Einheiten und die Protonentransferrate sank auf maximal 0,3 Protonen /Elektron. Die in Tabelle 5 aufgelisteten Interaktionen und daraus abgeleiteten Erklärungen für die gemessenen Protonentransferraten zeigen jedoch nur einen generellen Trend und berücksichtigen keine kompensatorischen Effekte, die durch Mutationen auftreten können. Sie weisen jedoch darauf hin, daß der Verlust der Protonen-Translokation mit einer Destabilisierung der anionischen Form des high-spin D-Ring-Propionats korreliert. Eine naheliegende Erklärung wäre, daß die D-Ring-Propionatgruppe des high-spin Häms unter nativen Bedingungen als transients Protonenakzeptor fungiert. Die Propionatgruppe könnte somit in Verbindung mit Arginin 490 den Beginn eines Protonen-Ausgangs Kanals definieren, in guter Übereinstimmung mit dem bereits definierten Protonen-Ausgangscluster B (Michel, 1998; Michel, 1999).

Der im Falle der Aminosäure Aspartat 399 der Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus* beobachtete direkte Einfluß auf das Protonenpumpen und die Interpretation der gemessenen Protonentransferraten kann für die *ba₃* Chinoloxidase nicht getroffen werden, da die Leucin-Mutante (D416L) in der Chinoloxidase noch volles Protonenpumpen, die Glutamat-Mutante (D416E) hingegen ein entkoppeltes Verhalten zeigt. Das Auftreten des entkoppelten Phänotyps deutet an, daß diese Aminosäure auf eine indirekte Art am Protonentransfer beteiligt sein könnte, möglicherweise durch die Beeinflussung des Redox- oder Protonierungszustands anderer für den Protonentransfer notwendiger Gruppen. Eine Beteiligung dieses Rests am Protonenpumpen kann im Gegensatz zur Cytochrom *c* Oxidase aus *R. sphaeroides* als gesichert gelten. Es sind jedoch weitere Mutanten und Untersuchungen notwendig, um eine exakte Rolle dieses Aspartats für das Protonenpumpen in der *ba₃* Chinoloxidase aus *P. denitrificans* zu bestimmen.

3.6 Untersuchungen am binukleären Zentrum - Tyrosin 297

In dem in der Einleitung vorgestellten Modell für den Reaktionszyklus der Sauerstoffreduktion zu Wasser wird das binukleäre Zentrum zuerst durch 2 Elektronen reduziert und gelangt in den **R**-Zustand mit Fe^{II} und Cu_B^{I} bevor molekularer Sauerstoff binden kann. Ohne weitere Aufnahme von Elektronen oder Protonenbewegungen kommt es zur Spaltung der O-O-Bindung (Michel, 1998; Michel, 1999), so daß nun beide Sauerstoffatome in der Oxidationsstufe von Wasser vorliegen und es sich bei der Häm a_3 Sauerstoffverbindung um eine Oxoferryl-Spezies handelt (Weng und Baker, 1991). Dieser Zustand wird als **P_M**-Intermediat bezeichnet.

Für die vollständige Reduktion des Sauerstoffmoleküls zu Wasser werden 4 Elektronen benötigt. Da jedoch aus den beiden Metallzentren des binukleären Zentrums nur 3 Elektronen geliefert werden können, wird die Entstehung eines Tyrosinradikals am binukleären Zentrum diskutiert, welches das nötige vierte Elektron liefern könnte. Es ist bislang aber ungeklärt, ob es sich bei diesem Tyrosinradikal um Tyrosin 280 handelt. Aus diesem Grund soll das entsprechende Tyrosin 297 in der ba_3 Chinoloxidase aus *Paracoccus* zu Histidin und Phenylalanin mutiert und die gereinigten Enzyme im Anschluß spektroskopisch charakterisiert werden.

3.6.1 Konstruktion der Tyrosin-Mutanten

Gemäß der in Abschnitt 2.2.13 beschriebenen Mutagenesemethode wurde der Vektor pCW1 (2.2.1) genutzt, um unter Zuhilfenahme der in Abschnitt 2.2.13.2. aufgelisteten Mutageneseprimer Tyrosin 297 in Histidin (Y297H) sowie in Phenylalanin (Y297F) umzuwandeln. Eine Kontrolle der erfolgreichen Mutation erfolgte mittels Sequenzierung (2.2.14). Im Anschluß wurde das mutierte *qox*-Operon in den *Paracoccus*-Expressionsvektor pRI2 kloniert. Mit dem nach Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA positiven Klonen wurde ein Triple mating (Abschnitt 2.2.11) in den *Paracoccus aa₃/ba₃*-Deletionsstamm TSP24 durchgeführt. Die resultierenden *Paracoccus*-Stämme erhielten folgende Bezeichnungen:

TSP28 pTS58 in TSP24 (**Y297F**)
TSP29 pTS59 in TSP24 (**Y297H**)

3.6.2 Charakterisierung

In Membranen einer analytischen Präparation (Abschnitt 2.3.3) konnte in den beiden Stämmen TSP28 (Y297F) und TSP29 (Y297H) die Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase immunologisch detektiert werden (Abschnitt 2.3.2, Western-Blot wird nicht gezeigt). Jedoch konnte in Membranen keine *ba*₃ Chinoloxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Daraufhin folgte eine Reinigung der Enzyme gemäß Abschnitt 2.3.4.3 sowie deren spektroskopische Charakterisierung. Elektrophoretisch waren alle 4 Untereinheiten nachweisbar (nicht gezeigt). Ein Redox-Spektrum der mutierten Enzyme im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 32) zeigt, daß der charakteristische Peak für Häm *a* bei 609 nm im α -Bereich nicht mehr vorhanden ist. Auch ist keine entsprechende Absorption im Soret-Bereich zu beobachten. Während beim Wildtyp ein Doppel-Peak bei 432/441 nm für Häm *b* und *a* erkennbar ist, sieht man bei den beiden Mutanten Y297F und Y297H nur noch einen Absorptions-Peak bei 430 nm.

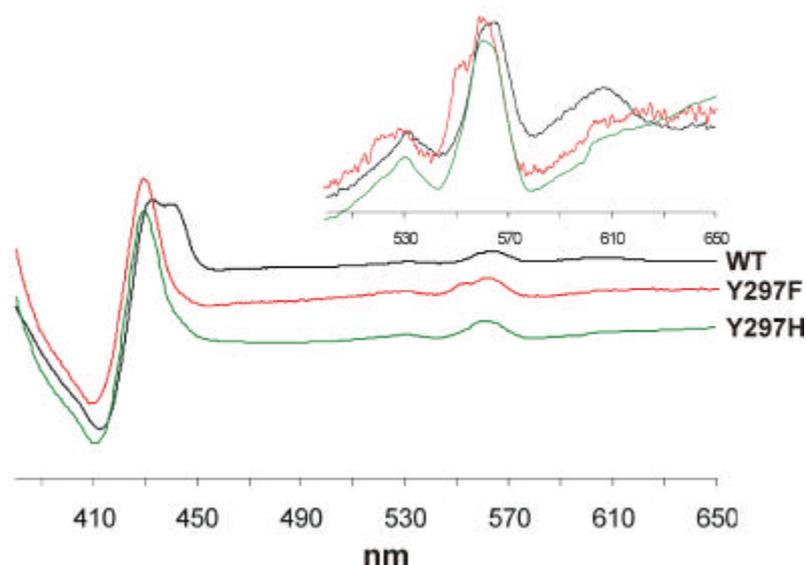


Abb. 32: Redox-Spektren der gereinigten *ba*₃ Chinoloxidasen. WT in schwarz, Y297F-Mutante in rot und Y297H-Mutante in grün. Spektren wurden auf gleiche Absorption im Soret-Bereich normiert.

Ein Kriterium für eine intakte Proteinumgebung der Häme, insbesondere des high-spin Häms, ist die Aufnahme von Liganden-Spektren mit den Inhibitoren CO und KCN. Das KCN-Spektrum (Abbildung 33) zeigt, daß durch die Mutation Y297H der Peak bei 430 nm im

Vergleich zum Wildtyp stärker ausgeprägt ist. Bei der Mutation Y297F ist dieses Verhalten auch zu sehen, zusätzlich kommt es auch zu einer geringen Blauverschiebung des Peaks.

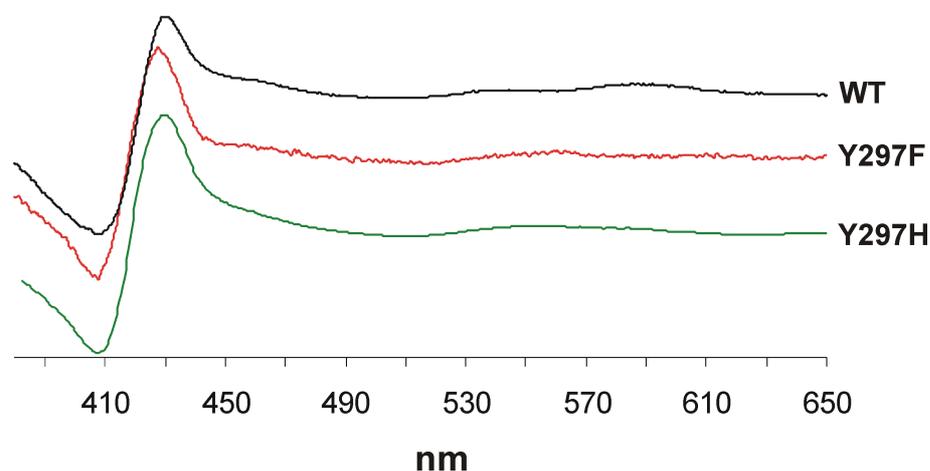


Abb. 33: Cyanid-Spektren des ba_3 Chinoloxidase-Wildtyps (schwarz) und der beiden Mutationen Y297F (rot) und Y297H (grün). Die Spektren wurden auf gleiche Absorption im Soret-Bereich normiert.

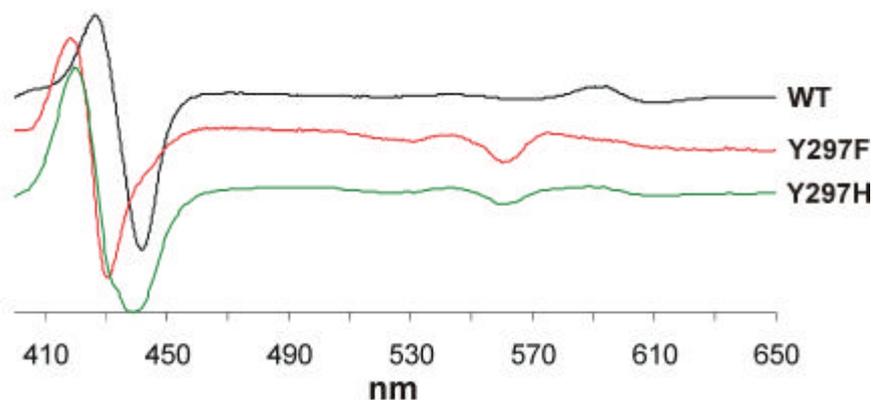


Abb. 34: CO-Differenzspektren des ba_3 Chinoloxidase-Wildtyps (schwarz) und der beiden Mutanten Y297F (rot) und Y297H (grün). Die Spektren wurden auf gleiche Absorption im Soret-Bereich normiert.

Drastischere Effekte sind im CO-Differenzspektrum (Abbildung 34) zu beobachten. Im Wildtyp sind die für die ba_3 Chinoloxidase typischen Verschiebungen des Häm a_3 Peaks zu beobachten. Durch die Bindung von CO wird der Peak im Soret-Bereich von 609 zu 589 nm

und im α -Bereich von 441 zu 426 nm verschoben. Im Gegensatz dazu ist bei beiden Mutanten im Soret-Bereich nur ein ausgeprägter Trog bei 560 nm und im α -Bereich eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen zu sehen. Bei der Mutante Y297H wird der Peak von 438/430 zu 420 nm, im Falle der Mutante Y297F von 430 zu 419 nm verlagert.

Ein Vorteil der Aufnahme von Cyanid-Spektren besteht in der Tatsache, daß Cyanid nicht nur mit dem Sauerstoff-bindende high-spin Häm reagiert, wodurch Aussagen über die Proteinumgebung des Häms getroffen werden kann, sondern auch das high-spin Häm im oxidierten Zustand hält. Dadurch können die Spektren der low- und high-spin Häme separiert werden (Abbildung 35). In der Wildtyp *ba₃* Chinoloxidase ist eindeutig zu erkennen, daß die low-spin Häm-Position nur von Häm *b*, die high-spin Häm-Position dagegen nur von Häm *a* besetzt wird. In beiden Mutanten ist zu erkennen, daß die high-spin Position von Häm *b* und/oder *o* besetzt wird. Eine Quantifizierung des Besetzungsgrads der low- und high-spin Position mit Häm kann nicht durchgeführt werden, da eine unterschiedliche Proteinumgebung und Ligandierung Einfluß auf den Extinktionskoeffizienten der Häm-Gruppen hat.

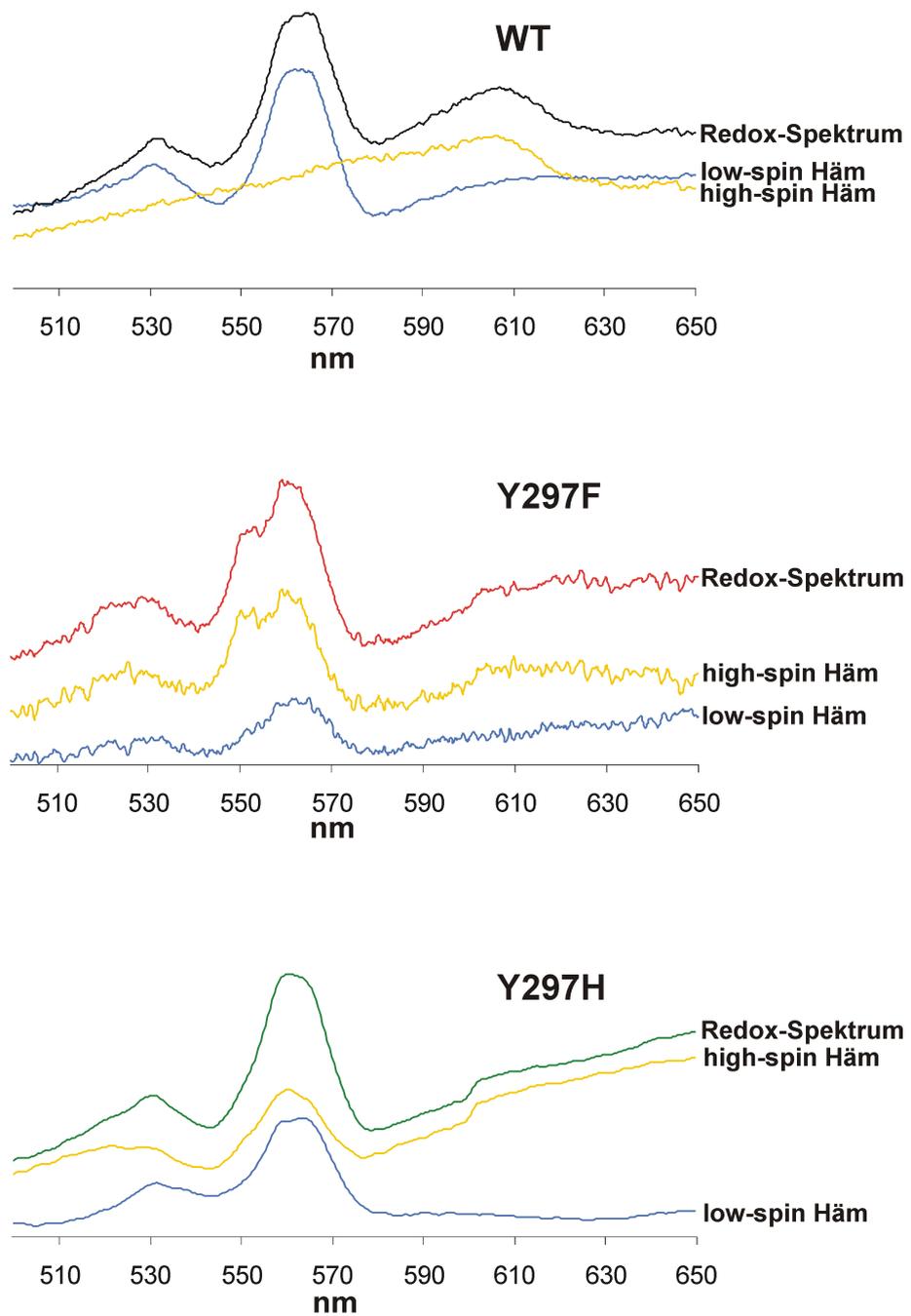


Abb. 35: Redox-Spektren der separierten Häm-Komponenten der WT *ba*₃ Chinoloxidase sowie der beiden Mutanten Y297F und Y297H. Durch Verrechnung der KCN-Spektren können die low- und high-spin Komponenten ermittelt werden. Low- und high-spin Spektren addieren sich zum Redox-Spektrum.

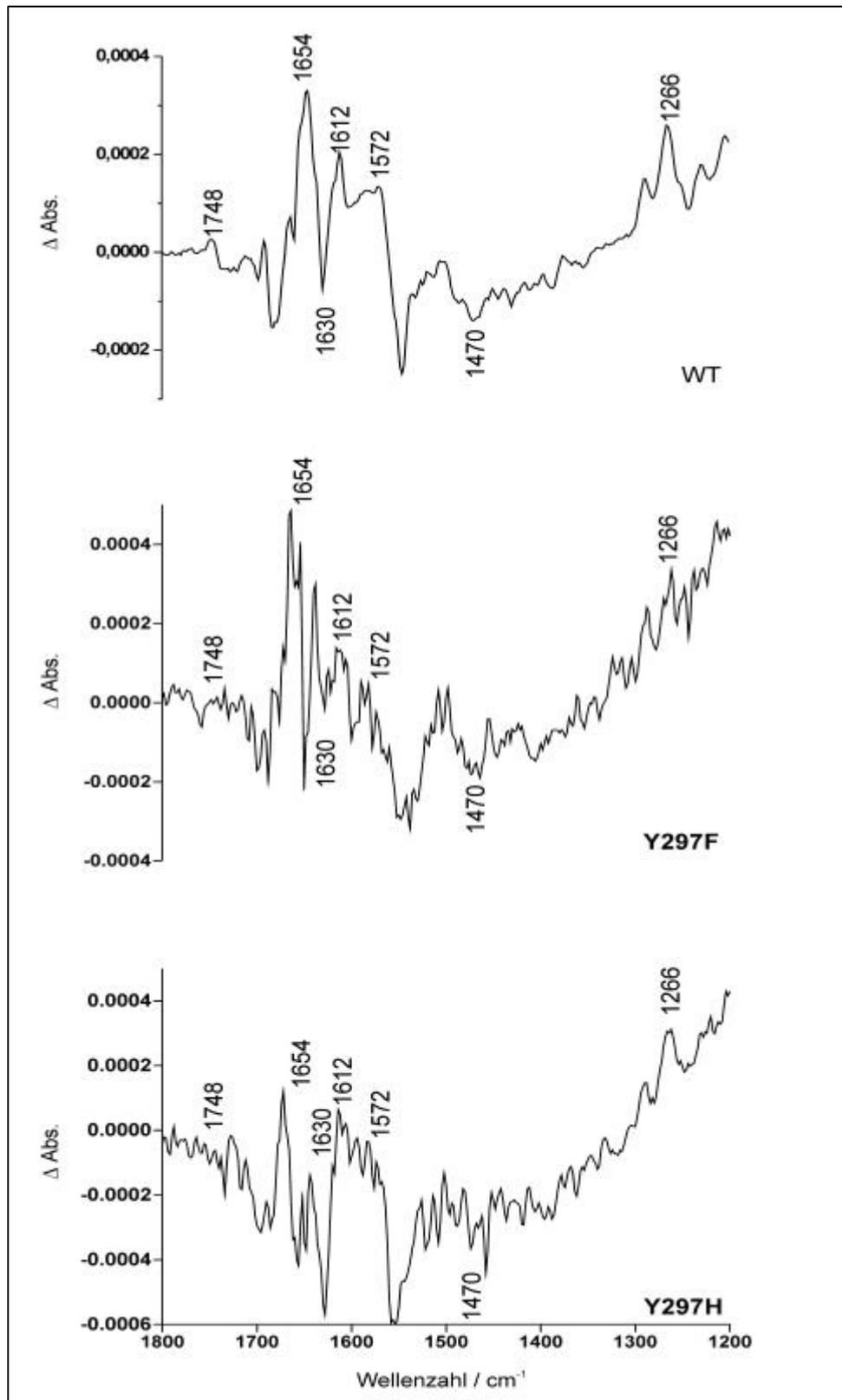


Abb. 36: Differenz-FTIR-Spektren der WT *ba*₃ Chinoloxidase sowie der Mutanten Y297F und Y297H. Elektrochemisch induziert (-0,5V – 0,5V); 1800 – 1200 cm⁻¹

Abbildung 36 zeigt elektrochemisch induzierte Differenz-FTIR-Spektren der *ba*₃ Chinoloxidase sowie beider Mutanten (Y297F und Y297H). Beide Mutationen bewirken eine starke Verschiebung der Signale im Bereich zwischen 1700 und 1570 cm⁻¹, wodurch der Amid I Bereich betroffen ist. Auch kann ein Differenzsignal, daß im Wildtyp-Enzym bei 1748/1728 cm⁻¹ zu sehen ist, in beiden Mutanten nicht mehr gemessen werden. Ferner ist eine Verminderung der Signalintensitäten der Peaks bei 1654, 1290, 1266 und 1204 cm⁻¹ zu beobachten.

3.6.3 Diskussion

Im Rahmen des Reaktionszyklus der Cytochrom *c* und Chinoloxidasen wird ein Tyrosinradikal diskutiert. Dieses soll bei der Reduktion des am binukleären Zentrum gebundenen Sauerstoffmoleküls bis zur Oxidationsstufe von Wasser beteiligt sein und für diesen Zweck ein Elektron liefern (Gennis, 1998; MacMillan et al., 1999; Michel, 1999). In Analogie zur Cytochrom *c* Oxidase könnte es sich bei der Chinoloxidase aus *P. denitrificans* um Tyrosin 297 handeln. Die Analyse der Kristallstrukturdaten der Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* (Ostermeier et al., 1997) sagte voraus, daß dieses Tyrosin kovalent an die Imidazol-Gruppe eines Histidin-Liganden von Cu_B gebunden sein könnte. Diese kovalente Bindung wurde 1999 bestätigt (Ostermeier et al., 1997; Buse et al., 1999) und würde das während der Reaktion zwischenzeitlich entstehende Tyrosinradikal stabilisieren. Darüber hinaus ist es wichtig für die geometrische Struktur des binukleären Zentrums (Das et al., 1998) und seine Abwesenheit könnte zum Verlust der Aktivität führen. Dies wurde bereits für Mutationen der entsprechenden Tyrosinreste der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* gezeigt (Thomas et al., 1994; Kawasaki et al., 1997; Mogi et al., 1998). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte Tyrosin 297 der *ba*₃ Chinoloxidase aus *P. denitrificans* durch Phenylalanin sowie Histidin ersetzt werden. Mittels spektroskopischer Techniken sollte ermittelt werden, ob Tyrosin 297 am Reaktionszyklus beteiligt ist bzw. Einfluß auf die Stabilität des binukleären Zentrums hat.

Entsprechende Experimente wurden mit den Membranen der *Paracoccus*-Stämme TSP28 (Y297F) und TSP29 (Y297H) durchgeführt. Die immunologische Detektion der Untereinheit II der *ba*₃ Chinoloxidase fiel in beiden Stämmen positiv aus, es konnte jedoch in beiden Fällen keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Im Anschluß wurde das gereinigte Enzym spektroskopisch charakterisiert. Das Redox-Spektrum (Abbildung 32) zeigt, daß die

Mutation zu Phenylalanin sowie zu Histidin drastische Effekte auf die Häm-Zusammensetzung hat. Das Fehlen des Häm *a* Peaks bei 609 nm läßt mehrere Interpretationen zu. Es könnte zu einem Verlust des high-spin Häms durch Änderungen der Struktur des binukleären Zentrums gekommen sein. Es wäre aber auch genauso gut vorstellbar, daß die high-spin Häm-Position mit Häm *b* und/oder *o* besetzt ist. Der Verlust der Enzymaktivität spricht aber eher für die Anwesenheit von Häm *b* als für Häm *o* (siehe Abschnitt 3.3).

Eine Verlust der redox-aktiven Gruppen des binukleären Zentrums sowie eine völlige Nichtbesetzung der high-spin Häm-Position kann aber aufgrund der KCN-Spektren (Abbildung 33) ausgeschlossen werden. Im Falle der Tyrosin 297 Histidin-Mutation kommt es im Gegenteil zu einer Intensivierung des Peaks bei 430 nm. Dies ist auch bei der Phenylalanin-Mutation zu beobachten, zusätzlich zu einer geringen Blauverschiebung des Peak-Maximums. Eine Analyse der CO-Spektren (Abbildung 34) läßt ebenso vermuten, daß die high-spin Häm-Position mit Häm *b* besetzt ist. Im α -Bereich kommt es zu Verschiebungen zu kürzeren Wellenlängen. Bei der Mutation Y297H wird der Peak von 438/430 zu 420 nm, im Falle der Mutation Y297F von 430 zu 419 nm verschoben. Diese Unterschiede sind charakteristisch für Häm *b* in der high-spin Position (Zickermann et al., 1997). Der Grund für das Auftreten eines Trogs bei 438 nm im CO-Differenzspektrum der Y297H-Mutation könnte in einer partiellen Reoxidation während der Begasung mit CO liegen. Aufgrund der Redox-Spektren der einzelnen Häm-Komponenten (Abbildung 35) sowie der FTIR-Spektren (Abbildung 36) muß andererseits von einer Störung des binukleären Zentrums ausgegangen werden. Die Redox-Spektren der einzelnen Häm-Komponenten der Y297F- im Vergleich zur Y297H-Mutation zeigen, daß der Besetzungsgrad der low-spin Häm-Position in der Y297F Mutante geringer ist. Auch weisen die starken Verschiebungen der Redox-FTIR-Signale in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp im Bereich zwischen 1700 und 1570 cm^{-1} auf Änderung der Proteinstruktur sowie veränderte Protonierungszustände in der Umgebung des binukleären Zentrums hin. Die Verminderung des Differenzsignals bei 1748/1728 cm^{-1} ist ein weiteres Indiz für die Störung des binukleären Zentrums. Es könnte sich bei diesem Signal um das analoge Signal zum 1746/1736 cm^{-1} Differenzsignal der aa_3 Cytochrom *c* Oxidase aus *P. denitrificans* handeln. Dort wurde es der Seitenkette von Glutamat 278 zugeordnet (Hellwig et al., 1998), welches sich unmittelbar am binukleären Zentrum befindet.

Die Störung des binukleären Zentrums muß jedoch nicht unbedingt einen Einfluß auf die umgebende Proteinstruktur haben. So ist zwar eine Verminderung der Signalintensitäten der Peaks bei 1654, 1290, 1266 und 1204 cm^{-1} zu messen, ihr Vorhandensein zeigt aber eindeutig, daß Ubichinol in beiden Mutanten noch gebunden ist. Abschließend läßt sich sagen, daß es durch die Mutation von Tyrosin 297 zu Histidin bzw. Phenylalanin zu einer Störung des aktiven Zentrums kommt. Diese äußert sich primär in einem Verlust der Enzymaktivität und sekundär in einer Änderung der Häm-Zusammensetzung und Struktur des binukleären Zentrums

4 Zusammenfassung

Paracoccus denitrificans besitzt eine verzweigte Elektronentransportkette. Unter aeroben Bedingungen werden die Elektronen ausgehend von Ubichinol bevorzugt über den bc_1 -Komplex auf die aa_3 Cytochrom *c* Oxidase übertragen. Alternativ können die Elektronen jedoch unter Umgehung des bc_1 -Komplexes direkt auf die ba_3 Chinoloxidase transferiert werden. Diese gehört wie die Cytochrom *c* Oxidase zur Gruppe der Häm-Kupfer Oxidasen; sie reduzieren Sauerstoff zu Wasser und koppeln diese Reaktion an eine vektorielle Translokation von Protonen über die Membran.

Die vorgelegte Dissertation befaßt sich mit der Charakterisierung der ba_3 Chinoloxidase. Mittels Mutationen sollen ausgesuchte Aminosäuren untersucht werden, die an der Protonen-Translokation bzw. der Reduktion von Sauerstoff beteiligt sind. Zudem soll das Phänomen der heterogenen Untereinheit II geklärt sowie die Notwendigkeit für die Anwesenheit von Häm *a* in der high-spin Position untersucht werden. Dazu mußte zunächst das homologe Expressionssystem für die ba_3 Chinoloxidase verbessert werden. Zu diesem Zweck wurde ein aa_3/ba_3 *Paracoccus*-Deletionsstamm geschaffen, der es ermöglicht, die Expression der auf einem Plasmid *in trans* angebotenen Gene der Chinoloxidase um den Faktor fünf zu erhöhen. In Anlehnung an ein bereits existierendes Reinigungsprotokoll ist es gelungen, die Chinoloxidase in einem zweistufigen säulenchromatographischen Verfahren zu isolieren. Das gereinigte Enzym oxidiert sein Substrat Ubichinol in einer pH-abhängigen, aber Ionenstärke-unabhängigen Reaktion.

Bis dato sind zwei Kanäle definiert, der D- und der K-Kanal, über die Protonen ausgehend vom Cytoplasma bis zum binukleären Zentrum transportiert werden. Diese werden dann entweder für die Reduktion des Sauerstoffs verwendet oder gekoppelt an diesen Prozeß über die Membran transloziert. Durch gezielte Punktmutationen sowie Ganzzell-Pumpexperimente kann der Beginn eines weiterführenden Protonen-Ausgangskanals bestimmt werden, der durch die benachbarten Arginine 490, 491 und das D-Ring-Propionat des high-spin Häms gebildet wird. Durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und Ladungsinteraktionen stabilisieren diese Arginine die deprotonierte, anionische Form der Propionat-Gruppe und erlauben somit eine transiente Bindung von Protonen an das Propionat. Für die Stabilisierung dieses Zustands bzw. die spätere Weiterleitung von Protonen scheint unter anderem die Aminosäure Aspartat

416 verantwortlich zu sein, da eine Mutation an dieser Position zu einem entkoppelten Phänotyp führen kann.

Für die Reduktion des Sauerstoffs werden vier Elektronen benötigt. Da aber das vollständig reduzierte binukleäre Zentrum nur drei Elektronen liefern kann, wird ein Tyrosinradikal diskutiert, welches das benötigte vierte Elektron zur Verfügung stellen soll. Gezielte Punktmutationen und spektroskopische Analysen der *ba*₃ Chinoloxidase sollten zeigen, ob es sich dabei um Tyrosin 297 handelt, dessen Radikalform durch eine kovalente Bindung zu Histidin 293 stabilisiert wäre. Die Mutationen Y297H und Y297F führen in beiden Fällen zu einer enzymatisch inaktiven *ba*₃ Chinoloxidase. Durch FTIR-Spektroskopie kann gezeigt werden, daß Mutationen an dieser Position die Stabilität des binukleären Zentrums beeinflussen. Es läßt sich jedoch aufgrund der fehlenden Enzymaktivität sowie der Störung der geometrischen Struktur des binukleären Zentrums keine Aussage über die Bedeutung der Aminosäure Tyrosin 297 als Elektronendonator treffen.

Die Verkürzung des C-Terminus der Untereinheit II durch das Einbringen von Stop-Codons zeigt, daß es sich bei der Heterogenität dieser Untereinheit um einen proteolytischen Abbau handeln muß. Dieser geschieht an spezifischen, aber bisher noch nicht näher charakterisierten Positionen, hat aber keinen Einfluß auf den Zusammenbau oder die Aktivität der Oxidase.

Durch die heterologe Expression der *bo*₃ Chinoloxidase aus *E. coli* in *Paracoccus* kann gezeigt werden, daß eine Grundvoraussetzung für eine aktive Chinoloxidase ein farnesyliertes Häm *b* Derivat in der high-spin Häm-Position ist. Die dadurch gebildete Hydroxyl-Gruppe stellt eine Möglichkeit dar, wie die für die Reduktion des Sauerstoffs notwendigen Protonen das binukleäre Zentrum erreichen können. Ob es sich dabei um ein Häm *a* oder *o* handelt, ist wirtsspezifisch und eine Frage der Häm-Verfügbarkeit bzw. des Häm-Einbaus.

5 Literaturverzeichnis

Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S. und Wikstrom, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *escherichia coli* and its ubiquinone binding site [In Process Citation]. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 910-917.

Ädelroth, P., Gennis, R. B. und Brzezinski, P. (1998). Role of the pathway through K(I-362) in proton transfer in cytochrome *c* oxidase from *R. sphaeroides*. *Biochemistry* **37**, 2470-2476.

Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O.- M. H. und van Spanning, R. J. M. (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1046-1078.

Behr, J., Hellwig, P., Mäntele, W. und Michel, H. (1998). Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*: direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate ¹³C labeling. *Biochemistry* **37**, 7400-7406.

Berry, E. A. und Trumpower, B. L. (1987). Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra. *Anal. Biochem.* **161**, 1-15.

Bethesda Res. Lab., (1986). *Bethesda Res. Lab. Focus* **8**, 2

Bratton, M. R., Pressler, M. A. und Hosler, J. P. (1999). Suicide inactivation of cytochrome *c* oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site. *Biochemistry* **38**, 16236-16245.

Brock, T. D. und Madigan, M. T. (1988). *Biology of microorganisms*, Prentice Hall International Editions, London.

Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E. und Bluggel, M. (1999). Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase [In Process Citation]. *Protein Sci.* **8**, 985-990.

- Carr, G. J. und Ferguson, S. J. (1990). The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* **269**, 423-429.
- Chance, B., Saronio, C. und Leigh, J. S., Jr. (1975). Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen. *J. Biol. Chem.* **250**, 9226-9237.
- Crane, F. L. und Barr, R. (1971). Determination of ubiquinones. *Methods Enzymol.* **18**, 137-165
- Das, T. K., Pecoraro, C., Tomson, F. L., Gennis, R. B. und Rousseau, D. L. (1998). The post-translational modification in cytochrome *c* oxidase is required to establish a functional environment of the catalytic site. *Biochemistry* **37**, 14471-14476.
- de Gier, J. W., Lübben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H. und van der, O. J. (1994). The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Mol. Microbiol.* **13**, 183-196.
- de Vries, G. E., Harms, N., Hoogendijk, J und Stouthamer, A. H. (1989) Isolation and characterisation of *Paracoccus denitrificans* mutants with increased conjugation frequency and pleiotropic loss of a (nGATCn) DNA-modifying property. *Arch. Microbiol.* **152**, 52-57
- Garcia-Horsman, J. A., Puustinen, A., Gennis, R. B. und Wikström, M. (1995). Proton transfer in cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase of *Escherichia coli*: second-site mutations in subunit I that restore proton pumping in the mutant Asp135-->Asn. *Biochemistry* **34**, 4428-4433.
- Gennis, R. B. (1992). Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 184-187.
- Gennis, R. B. (1998). Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 241-248.
- Gerhus, E. (1992). Molekularbiologische und funktionelle Untersuchung zum *bc*₁ Komplex aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik, J. W. G. Universität Frankfurt/M, Germany.
- Gohlke, U., Warne, A. und Saraste, M. (1997). Projection structure of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* at 6 Å resolution. *EMBO J.* **16**, 1181-1188.

- Haddock, B. A. und Jones, C. W. (1977). Bacterial respiration. *Bacteriol. Rev.* **41**, 47-99.
- Haltia, T., Finel, M., Harms, N., Nakari, T., Raitio, M., Wikström, M. und Saraste, M. (1989). Deletion of the gene for subunit III leads to defective assembly of bacterial cytochrome oxidase. *EMBO J.* **8**, 3571-3579.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O.- M. H., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H. und Mäntele, W. (1998). Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans* investigated by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 7390-7399.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. und Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans* [see comments]. *Nature* **376**, 660-669.
- Jünemann, S., Meunier, B., Gennis, R. B. und Rich, P. R. (1997). Effects of mutation of the conserved lysine-362 in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **36**, 14456-14464.
- Kannt, A., Lancaster, C. R. und Michel, H. (1998). The coupling of electron transfer and proton translocation: electrostatic calculations on *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *Biophys. J.* **74**, 708-721.
- Kawasaki, M., Mogi, T. und Anraku, Y. (1997). Substitutions of charged amino acid residues conserved in subunit I perturb the redox metal centers of the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase. *J. Biochem. (Tokyo)* **122**, 422-429.
- Kleyman, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A. und Michel H. (1995). Engineered F_v Fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes. *Biotechnology* **13**, 155-160
- Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A. und Gennis, R. B. (1997). The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 9085-9090.

-
- Konstantinov, A. A., Vygodina, T., Capitanio, N. und Papa, S. (1998). Ferrocyanide-peroxidase activity of cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 11-23.
- Kramer, B., Kramer, W. und Fritz, H. J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**, 879-887.
- Kurowski, B. und Ludwig, B. (1987). The genes of the *Paracoccus denitrificans* *bc*₁ complex. Nucleotide sequence and homologies between bacterial and mitochondrial subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 13805-13811.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lawford, H. G. und Garland, P. B. (1972). Proton translocation coupled to quinone reduction by reduced nicotinamide--adenine dinucleotide in rat liver and ox heart mitochondria. *Biochem. J.* **130**, 1029-1044.
- Li, S. F. und De Moss, J. A. (1988). Location of sequences in the *nar* promoter of *Escherichia coli* required for regulation by Fnr and NarL. *J. Biol. Chem.* **263**, 13700-13705
- Legerski, R. J. und Robberson, D. L. (1985). Analysis and optimization of recombinant DNA joining reactions. *J. Mol. Biol.* **181**, 297-312.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Lübben, M., Warne, A., Albracht, S. P. und Saraste, M. (1994). The purified SoxABCD quinol oxidase complex of *Sulfolobus acidocaldarius* contains a novel haem. *Mol. Microbiol.* **13**, 327-335.
- Ludwig, B. (1986). Cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Methods Enzymol.* **126**, 153-159.
- Ludwig, B. und Schatz, G. (1980). A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 196-200.
- Ma, J., Katsonouri, A. und Gennis, R. B. (1997). Subunit II of the cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* is a lipoprotein. *Biochemistry* **36**, 11298-11303.

- MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T. und Michel, H. (1999). Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry* **38**, 9179-9184.
- Maneg, O. (1999). Verwendung eines synthetischen σ^{70} -Promotorelements für die Proteinexpression in *Paracoccus denitrificans*. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt/M, Deutschland
- Margulis, L. (1970). Origin of Eukaryotic Cells, Yale University Press, New Haven.
- Michel, H. (1998). The mechanism of proton pumping by cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 12819-12824.
- Michel, H. (1999). Cytochrome *c* Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping- A Discussion. *Biochemistry* **38**, 15129-15140.
- Mitchell, R. und Rich, P. R. (1994). Proton uptake by cytochrome *c* oxidase on reduction and on ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 19-26.
- Mogi, T., Minagawa, J., Hirano, T., Sato-Watanabe, M., Tsubaki, M., Uno, T., Hori, H., Nakamura, H., Nishimura, Y. und Anraku, Y. (1998). Substitutions of conserved aromatic amino acid residues in subunit I perturb the metal centers of the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase. *Biochemistry* **37**, 1632-1639.
- Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I. und Wikström, M. (1994). The histidine cycle: a new model for proton translocation in the respiratory heme-copper oxidases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 599-608.
- Ostermann, T. (2000). Herstellung von Fv-Antikörperfragmenten als Hilfsmittel zur Reinigung und Kokristallisation membranständiger Chinoloxidasen von *Escherichia coli* und *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, MPI für Biophysik, Frankfurt/M, Deutschland.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U. und Michel, H. (1997). Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two- subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 10547-10553.

- Otten, M. F., Reijnders, W. N., Bedaux, J. J., Westerhoff, H. V., Krab, K. und Van Spanning, R. J. (1999). The reduction state of the Q-pool regulates the electron flux through the branched respiratory network of *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **261**, 767-774.
- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B. und Richter, O.- M. H. (1998). Cytochrome *c* oxidase (heme *aa*₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97.
- Pfützner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O.- M. H. und Ludwig, B. (2000). Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans* [In Process Citation]. *Biochemistry* **39**, 6756-6762.
- Puustinen, A. und Wikström, M. (1999). Proton exit from the heme-copper oxidase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 35-37.
- Qian, J., Shi, W., Pressler, M., Hoganson, C., Mills, D., Babcock, G. T., und Ferguson-Miller, S. (1997). Aspartate-407 in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase is not required for proton pumping or manganese binding. *Biochemistry* **36**, 2539-2543.
- Raitio, M. und Wikström, M. (1994). *Biochem. Biophys. Acta* **1186**, 100-106
- Raleigh, E. A. und Wilson, G. (1986). *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 9070-9074.
- Rich, P. R. (1995). *Aust. J. Plant. Physiol.* **22**, 479-486.
- Richter, O.- M. H., Tao, J. S., Turba, A. und Ludwig, B. (1994). A cytochrome *ba*₃ functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J. Biol. Chem.* **269**, 23079-23086.
- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H. und Fendler, K. (2000). Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase [In Process Citation]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 4632-4636.
- Rumbley, J. N., Furlong, N. E. und Gennis, R. (1997). One-step purification of histidine-tagged cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli* and demonstration that associated quinone is not required for the structural integrity of the oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1340**, 131-142.

- Saiki, K., Mogi, T. und Anraku, Y. (1992). Heme *O* biosynthesis in *Escherichia coli*: the *cyoE* gene in the cytochrome *bo* operon encodes a protoheme IX farnesyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1491-1497.
- Saiki, K., Mogi, T., Hori, H., Tsubaki, M. und Anraku, Y. (1993b). Identification of the functional domains in heme *O* synthase. Site- directed mutagenesis studies on the *cyoE* gene of the cytochrome *bo* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26927-26934.
- Saiki, K., Mogi, T., Ogura, K. und Anraku, Y. (1993a). In vitro heme *O* synthesis by the *cyoE* gene product from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 26041-26044.
- Saiki, K., Mogi, T., Tsubaki, M., Hori, H. und Anraku, Y. (1997). Exploring subunit-subunit interactions in the *Escherichia coli bo*-type ubiquinol oxidase by extragenic suppressor mutation analysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 14721-14726.
- Saiki, K., Nakamura, H., Mogi, T. und Anraku, Y. (1996). Probing a role of subunit IV of the *Escherichia coli bo*-type ubiquinol oxidase by deletion and cross-linking analyses. *J. Biol. Chem.* **271**, 15336-15340.
- Sambrook, J., Fritsch E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467.
- Santana, M., Kunst, F., Hullo, M. F., Rapoport, G., Danchin, A. und Glaser, P. (1992). Molecular cloning, sequencing, and physiological characterization of the *qox* operon from *Bacillus subtilis* encoding the *aa*₃-600 quinol oxidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 10225-10231.
- Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lubben, M. und Van Der, O. J. (1991). The happy family of cytochrome oxidases. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 608-612.
- Saxena, K., Richter, O.- M. H., Ludwig, B. und Benz, R. (1997). Molecular cloning and functional characterization of the *Paracoccus denitrificans* porin. *Eur. J. Biochem.* **245**, 300-306
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

- Schmidt, T. G. und Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr. A* **676**, 337-345.
- Schmitt, I. (1997). Untersuchungen zur Funktion ausgewählter Promotorregionen von *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt/M, Deutschland.
- Schröter, T., Winterstein, C., Ludwig, B. und Richter, O.- M. H. (1998). Expression of the *Escherichia coli cyo* operon in *Paracoccus denitrificans* results in a fully active quinol oxidase of unexpected heme composition. *FEBS Lett.* **432**, 109-112.
- Snyder, S. W. und Hollocher, T. C. (1987). Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **262**, 6515-6525.
- Steinrücke, P. und Ludwig, B. (1993). Genetics of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **10**, 83-117.
- Thomas, J. W., Calhoun, M. W., Lemieux, L. J., Puustinen, A., Wikström, M., Alben, J. O. und Gennis, R. B. (1994). Site-directed mutagenesis of residues within helix VI in subunit I of the cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* suggests that tyrosine 288 may be a Cu_B ligand. *Biochemistry* **33**, 13013-13021.
- Tsatsos, P. H., Reynolds, K., Nickels, E. F., He, D. Y., Yu, C. A. und Gennis, R. B. (1998). Using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry to map the quinol binding site of cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 9884-9888.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å [see comments]. *Science* **272**, 1136-1144.
- Van Spanning, R. J., Wansell, C. W., Reijnders, W. N., Harms, N., Ras, J., Oltmann, L. F. und Stouthamer, A. H. (1991). A method for introduction of unmarked mutations in the genome of *Paracoccus denitrificans*: construction of strains with multiple mutations in the genes encoding periplasmic cytochromes *c550*, *c551i*, and *c553i*. *J. Bacteriol.* **173**, 6962-6970.

- van Verseveld, H. W. und Bosma, G. (1987). The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Microbiol. Sci.* **4**, 329-333.
- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E. und Wikström, M. (1999). Proton translocation by cytochrome *c* oxidase [see comments]. *Nature* **400**, 480-483.
- Vygodina, T. V., Pecoraro, C., Mitchell, D., Gennis, R. und Konstantinov, A. A. (1998). Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* **37**, 3053-3061.
- Weinstein, J. D. und Beale, S. I. (1983). Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* **258**, 6799-6807.
- Weinstein, J. D., Branchaud, R., Beale, S. I., Bement, W. J. und Sinclair, P. R. (1986). Biosynthesis of the farnesyl moiety of heme *a* from exogenous mevalonic acid by cultured chick liver cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **245**, 44-50.
- Weng, L. C. und Baker, G. M. (1991). Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase. *Biochemistry* **30**, 5727-5733.
- Wikström, M. (2000). Proton translocation by cytochrome *c* oxidase: a rejoinder to recent criticism. *Biochemistry* **39**, 3515-3519.
- Wikström, M., Bogachev, A., Finel, M., Morgan, J. E., Puustinen, A., Raitio, M., Verkhovskaya, M. und Verkhovsky, M. I. (1994). Mechanism of proton translocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 106-111.
- Wikström, M. und Morgan, J. E. (1992). The dioxygen cycle. Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction. *J. Biol. Chem.* **267**, 10266-10273.
- Wikström, M., Morgan, J. E. und Verkhovsky, M. I. (1998). On the mechanism of proton translocation by respiratory enzyme. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 139-145.
- Wilmanns, M., Lappalainen, P., Kelly, M., Sauer-Eriksson, E. und Saraste, M. (1995). Crystal structure of the membrane-exposed domain from a respiratory quinol oxidase complex with an engineered dinuclear copper center [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11955-11959.

- Winterstein, C. (1997). Konstruktion und Charakterisierung von Chimären zwischen der Ubichinoloxidase und der Cytochrom *c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Institut Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik, Universität Frankfurt/M, Deutschland
- Witt, H. und Ludwig, B. (1997). Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome *c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **272**, 5514-5517.
- Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. und Ludwig, B. (1998a). Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-*c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Involvement of a hydrophobic patch in the docking reaction. *J. Biol. Chem.* **273**, 5132-5136.
- Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. und Ludwig, B. (1998b). Cytochrome-*c*-binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **251**, 367-373.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Yagi, T. (1986). Purification and characterization of NADH dehydrogenase complex from *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 302-311.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 4443-4447.
- Yang, X. H. und Trumppower, B. L. (1986). Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans* [published erratum appears in *J Biol Chem* 1986 Nov 25;261(33):15813]. *J. Biol. Chem.* **261**, 12282-12289.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Zell, R. und Fritz, H. J. (1987). DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* **6**, 1809-1815.
- Zickermann, I. (1996). Biochemische und spektroskopische Charakterisierung der *ba*₃-Chinoloxidase aus *Paracoccus denitrificans*. Dissertation, Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik, J. W. G. Universität Frankfurt/M, Germany.

Zickermann, I., Anemüller, S., Richter, O.- M. H., Tautu, O. S., Link, T. A. und Ludwig, B. (1996). Biochemical and spectroscopic properties of the four-subunit quinol oxidase (cytochrome *ba*₃) from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 93-102.

Zickermann, I., Tautu, O. S., Link, T. A., Korn, M., Ludwig, B. und Richter, O.- M. H. (1997). Expression studies on the *ba*₃ quinol oxidase from *Paracoccus denitrificans*. A *bb*₃ variant is enzymatically inactive. *Eur. J. Biochem.* **246**, 618-624.

6 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Bovin Serum Albumin
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cm	Zentimeter
CMC	kritische Micellen-Konzentration
dATP	desoxy- Adenosintriphosphat
$\Delta\epsilon$	Extinktionskoeffizient
$\Delta G_0'$	freie Enthalpie bei pH 7
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dUTP	desoxy-Uridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_0'	Standardredoxpotential bei pH 7
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
EtOH	Ethanol
FTIR	Fourier-Transformation-Infarot-Spektroskopie
GFP	Grün fluoreszierendes Potein
Gm	Gentamycin
h	Stunde
HAc	Essigsäure

HAP	Heme Activating Protein
HPLC	high-performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
kD	Kilodalton
Km	Kanamycin
Kpi	Kaliumphosphat
l	Liter
LB	Luria Broth
M	Molar
mA	Milliampère
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NCS	newborn calf serum
ng	Nanogram
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORE	oxygen Respnsive Element
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pmol	Picomol
Q	Ubichinon
RBS	Ribosome Binding Site
Rif	Rifampicin
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

SDS	Natrium-dodecylsulfat
Sm	Streptomycinsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-buffered-Saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEG	Tris-EDTA-Glucose
Tet	Tetracyclin
TMPD	N,N,N',N',-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid
TNM	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid
TY	Trypton-Yeast-Extrakt
U	Unit
UE	Untereinheit
UZ	Ultrazentrifuge
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

7 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Thomas Schröter
Geburtstag: 12.02.1971
Anschrift: Wilhelmstraße 81, 68623 Lampertheim
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 – 1981 Grundschule-Schillerschule in Lampertheim
1981 – 1983 Starkenburggymnasium in Heppenheim
1983 – 1990 Kurpfalzgymnasium in Mannheim
Juni 1990 Schulabschluß mit der allgemeinen Hochschulreife

1990 - 1991 Grundwehrdienst in Wildflecken

Studium

Okt. 1991 – Sept. 1993 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main bis zum Vordiplom
Okt. 1993 – Nov. 1996 Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main
Nov. 1996 Diplom-Abschluß in Biochemie

Wissenschaftlicher Werdegang

- Juni 1996 – Nov. 1996 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie in der Abteilung für Molekulare Genetik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main mit dem Titel „Gezielte Mutagenese an ausgesuchten Aminosäuren der Eisen-Schwefel-Untereinheit des Cytochrom *bc*₁ Komplexes aus *Paracoccus denitrificans*“.
- März 1997 – Jan. 2001 wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biochemie in der Abteilung für Molekulare Genetik an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main
- Seit März 1997 Durchführung der Doktorarbeit mit dem Titel „Charakterisierung der *ba*₃ Chinoloxidase aus *Paracoccus denitrificans*“

8 Publikationen

Schröter, T., Winterstein, C., Ludwig, B., und Richter, O.- M. H. (1998). Expression of the *Escherichia coli cyo* operon in *Paracoccus denitrificans* results in a fully active quinol oxidase of unexpected heme composition. *FEBS Lett.* **432**, 109-112.

Schröter, T., Hatzfeld, O. M., Gemeinhardt, S., Korn, M., Friedrich, T., Ludwig, B., und Link, T. A. (1998). Mutational analysis of residues forming hydrogen bonds in the Rieske [2Fe-2S] cluster of the cytochrome *bc₁* complex in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 100-106.

9 Danksagung

Während der Durchführung meiner Arbeit habe ich von vielen Seiten Unterstützung erfahren. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit der Durchführung, sowie für sein stets offenes Ohr bei allen aufgetretenen Problemen.

Dem ganzen Arbeitskreis der Abteilung für Molekulare Genetik.

Hans Werner Müller, für die unersetzliche technische Hilfe; für ihn gab es nie ein Problem.

Dr. Oliver- M. H. Richter, für seine wertvollen Anregungen und den stets kontroversen Diskussionen, sowie der Überlassung von manch seiner „vergrabenen Schätze“ aus der Gefriertruhe.

Klaus Hoffmeier für die Hilfe bei den Ganzzellpump-Versuchen, ohne seine stoische Ruhe und Gelassenheit wären diese nicht möglich gewesen.

Dr. Petra Hellwig und Dr. Ute Pfitzner für die Messung und Interpretation von FTIR-Daten.

Dr. Thomas Ostermann, uns verband nicht nur die Arbeit, wir kämpften auch zusammen gegen die „Windmühlen“ – ich grüße den „Lord of the board“.

Ace, Doc Hollywood, Flip, Fräulein R., Horst T., kleine Kröte, Lilo, Ole, Oma, Schwester D und natürlich der Kronprinzessin für das „ganz besondere“ Klima im Labor.

Oma Inge für die backtechnische Unterstützung.

Familie Becker für Kost und Logis.

José Airas – einem guten Freund.

Meinen Eltern für die Unterstützung meines Studiums.

Vor allem Sandra Becker für ihre Geduld und stetige Unterstützung.

Und alle, die ich vergessen habe.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thomas Schröter, geboren am 12.02.1971, daß ich die vorgelegte Dissertation über „Charakterisierung der ba_3 Chinol Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*“ selbstständig angefertigt und mich anderer Quellen oder Hilfsmittel, als der in ihr angegebenen nicht bedient habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den

(Unterschrift)