

**Identifizierung eines Menachinol-oxidierenden
Cytochrom *bc*-Komplexes aus
*Thermus thermophilus***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie



von Daniela Maneg (geb. Mooser)
aus Frankfurt am Main

Bad Homburg vor der Höhe (2007)

D30

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

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig, Prof. Dr. E. Bamberg

Datum der Disputation: _____

"Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will."

Galileo Galilei

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Das Genus <i>Thermus</i>	1
1.2 Die Spezies <i>T. thermophilus</i>	3
1.3 Die Atmungskette	4
1.4 Die Atmungskette von <i>T. thermophilus</i>	5
1.5 Struktur- und Funktionsmerkmale von <i>bc</i>-Komplexen	10
1.6 Menachinol-oxidierende <i>bc</i>-Komplexe	13
1.7 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräteliste	16
2.1.2 Chemikalien und Bezugsquelle	17
2.1.3 Lösungen und Puffer	18
2.1.4 Größenstandards und Kits	26
2.1.5 Antikörper	26
2.1.6 Nukleinsäuren	27
2.1.6.1 Plasmide	27
2.1.6.2 Oligonukleotide	29
2.1.7 Enzyme	30
2.1.8 Bakterienstämme	31
2.1.9 Anzuchtmedien	31
2.1.10 Antibiotika	32

2.2 Molekulargenetische Methoden	32
2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>T. thermophilus</i>	32
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	33
2.2.3 Restriktionsverdau und elektrophoretische Auftrennung	34
2.2.4 Ligation	35
2.2.5 Klenow <i>Fill-in</i>	36
2.2.6 Herstellung CaCl ₂ kompetenter-Zellen	36
2.2.7 Herstellung Rubidiumchlorid kompetenter-Zellen	36
2.2.8 Blau-Weiß-Selektion	37
2.2.9 Hitzeschocktransformation	37
2.2.10 Natürliche Transformation in <i>T. thermophilus</i> HB27 Zellen	38
2.2.11 Elektroporation	38
2.2.12 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	39
2.2.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.14 Ganzzell PCR mit <i>T. thermophilus</i> HB27	40
2.2.15 Phosphorylierung von Oligonukleotiden	40
2.2.16 Gerichtete Mutagenese	41
2.2.17 DNA-Sequenzierung	42
2.3 Proteinbiochemische Methoden	42
2.3.1 SDS-Gelelektrophorese	42
2.3.2 Coomassie-Färbung	43
2.3.3 Silberfärbung	43
2.3.4 Häm-Färbung	43
2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	44
2.3.6 Membranpräparation und -solubilisierung	44
2.3.7 Expression und Aufreinigung des löslichen Cytochrom <i>c</i> -Fragments	45
2.3.8 Expression und Aufreinigung des Volllängen-Cytochrom <i>c</i>	46
2.3.9 Expression und Aufreinigung der <i>ba</i> ₃ -Oxidase	46
2.3.10 Expression und Aufreinigung des Rieske-Fragments	48
2.3.11 Aufreinigung des Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂	48
2.3.12 Western-Blotting	49
2.3.13 Probenvorbereitung für MALDI-MS	50
2.3.14 Redox-Spektren	51
2.3.15 Pyridin-Hämochrom-Spektren	52
2.3.16 ATPase-Test	52

3 Ergebnisse	53
3.1 Nachweis eines <i>bc</i>-Genlocus in <i>T. thermophilus</i>	53
3.1.1 Analyse der genomischen Sequenzinformationen	53
3.1.2 Struktur des <i>bc</i> -Operons	53
3.1.3 Identifizierung und Charakterisierung der <i>fb</i> cXFB Gene	54
3.1.3.1 Cytochrom <i>c</i>	55
3.1.3.2 FbcX	58
3.1.3.3 Rieske-Protein	60
3.1.3.4 Cytochrom <i>b</i>	61
3.1.4 Sequenzunterschiede der Subspezies HB8 und HB27	62
3.2 Isolierung des <i>bc</i>-Komplexes aus <i>T. thermophilus</i>	64
3.2.1 Co-Immünpräzipitation zum Nachweis eines <i>bc</i> -Komplexes	64
3.2.2 Chromatographischer Nachweis des <i>bc</i> -Komplexes	66
3.2.2.1 Klonierung des <i>fb</i> cXFB-Operons zur homologen Expression	66
3.2.2.2 Anzucht des Expressionsstammes DM6	68
3.2.2.3 Chromatographische Aufreinigung des <i>bc</i> -Komplexes	69
3.3 Charakterisierung des isolierten <i>bc</i>-Komplexes	73
3.3.1 Immunologische Identifizierung	74
3.3.2 MALDI-Massenspektrometrie	75
3.3.3 N-terminale Sequenzierung	76
3.3.4 Nachweis und Charakterisierung der Cofaktoren	77
3.3.4.1 Die Häm-Cofaktoren der Cytochrome	77
3.3.4.2 EPR-Spektrum des Fe ₂ S ₂ -Zentrums im Gesamtkomplex	80
3.3.4.3 Redoxpotentiale	80
3.4 Die enzymatische Aktivität des isolierten <i>bc</i>-Komplexes	81
3.5 Temperaturstabilität des isolierten <i>bc</i>-Komplexes	86
3.5.1 Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität	86
3.5.2 Entfaltungsuntersuchung des <i>bc</i> -Komplexes mittels CD-Spektroskopie	87
3.6 Konstruktion eines Plasmids zur Deletion des <i>fb</i>c-Operons	89

3.7 Heterologe Expression der <i>Thermus bc</i>-Komponenten und Cytochrom <i>c</i>₅₅₂ in <i>E. coli</i>	91
3.7.1 Cytochrom <i>c</i>	91
3.7.2 Rieske-Protein	91
3.7.3 Expression des gesamten <i>fbcC</i> XFB-Operons	93
3.7.4 Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂	96
3.7.4.1 Optimierung der Expression von Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂	97
3.7.4.2 Mutagenese am Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂	99
3.8 Konstruktion des <i>Thermus/E.coli</i>-Shuttlevektors pDM12	100
3.9 Aufreinigung weiterer <i>T. thermophilus</i> Proteine	102
3.9.1 Versuche zur <i>ba</i> ₃ -Expression	102
3.9.2 Ein MDR-ähnlicher ABC-Transporter	105
3.9.2.1 Homologe Expression des ABC-Transporters	105
3.9.2.2 Heterologe Expression des ABC-Transporters in <i>E. coli</i>	110
3.9.2.3 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität	111
3.9.3 Aufreinigung der nativen Cu-ATPase	113
4 Diskussion	115
4.1 Das extrem thermophile Bakterium <i>T. thermophilus</i>	115
4.2 Aufbau des <i>fbcC</i>XFB-Operons	116
4.3 Proteindomänen und Untereinheiten des <i>bc</i>-Komplexes	117
4.3.1 Cytochrom <i>b</i> und Rieske-Protein	117
4.3.2 Cytochrom <i>c</i> zeigt eine ungewöhnliche Topologie und Verwandtschaft	119
4.3.3 Die zusätzliche vierte Untereinheit FbcX	122
4.4 Der <i>bc</i>-Komplex ist die zentrale Komponente der <i>T. thermophilus</i> Atmungskette	123
4.5 <i>T. thermophilus</i> und sein <i>bc</i>-Komplex - eine phylogenetische Betrachtung	124
4.6 Aspekte der Thermostabilität	127

4.7 Aufreinigung des vier-Untereinheiten <i>bc</i>-Komplexes	130
4.8 Der isolierte <i>bc</i>-Komplex zeigt <i>in vitro</i> enzymatische Aktivität	134
4.9 Homologe und heterologe Expression von <i>Thermus</i> Proteinen	135
4.10 Zusammenfassung	138
5 Literaturverzeichnis	140
6 Abkürzungsverzeichnis	151
7 Lebenslauf	153
8 Publikationen	155
9 Danksagung	156

1 Einleitung

1.1 Das Genus *Thermus*

Dem Genus *Thermus* werden verschiedene extrem thermophile Spezies zugerechnet, deren optimale Wachstumstemperaturen über 65°C liegen (Williams *et al.*, 1995; Brock & Freeze, 1969). Der erste Stamm dieser Spezies, *Thermus aquaticus*, wurde aus einer heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark, USA, isoliert (Brock & Freeze, 1969), zeitgleich wurden weitere Stämme als Verunreinigung von temperierten Industrieanlagen gefunden. Erste Isolate in Japan wurden als *Flavobacterium thermophilum* bezeichnet (Oshima & Imahori, 1971) und später in *Thermus thermophilus* (Stamm HB8, ATCC BAA-163) umbenannt (Oshima & Imahori, 1974).

Die taxonomische Stellung des Genus *Thermus* wird aufgrund von Sequenz-Analysen in naher Verwandtschaft zur Klasse *Deinococcus* gesehen. DNA/DNA-Reassoziationsstudien und 16S rRNA-Analysen zeigen, dass sich das Genus *Thermus* aus verwandten aber dennoch phänotypisch variablen Spezies zusammensetzt (Chung *et al.*, 2000). Die Erstellung von taxonomischen Stammbäumen durch rRNA-Vergleiche ergab darüber hinaus, dass innerhalb der Bakterien nur *Aquifex* ($t_{\max}=95^{\circ}\text{C}$) und *Thermotoga* ($t_{\max}=90^{\circ}\text{C}$) evolutionär tiefer verwurzelt sind als das Genus *Thermus* ($t_{\max}=80^{\circ}\text{C}$). *Thermus* wird deshalb phylogenetisch sehr nah zu einem letzten gemeinsamen Vorfahren eingeordnet (Daniel & Cowan, 2000; Pace, 1997) (Abb. 1). Dieses Bild eines konvergenten Stammbaumes stützt somit die These, dass im Verlauf der Evolution ein erster lebender Organismus vermutlich unter sehr hohen Temperaturen entstanden ist, siehe auch Diskussion.

Das Genus *Thermus* findet zunehmende Beachtung als Quelle für robuste und thermostabile Enzyme. Diese bergen aufgrund ihrer allgemeinen Stabilität auch gegenüber extremen pH-Werten und Proteasen ein enormes Forschungsinteresse und werden bereits für verschiedenste biotechnologische Anwendungen eingesetzt (Pantazaki *et al.*, 2002; Vieilles & Zeikus, 2001; Niehaus *et al.*, 1999). So konnte z.B. die PCR-Technik (Mullis *et al.*, 1986) durch Verwendung der aus *T. aquaticus* isolierten Taq DNA Polymerase (Kaledin *et al.*, 1980) wesentlich verbessert werden. Die erhöhte Rigidität thermostabiler Proteine bei niedrigen Temperaturen ermöglicht eine einfache Handhabung und hat sich besonders in der Strukturforschung als entscheidender Vorteil erwiesen (siehe Kap. 1.1.1).

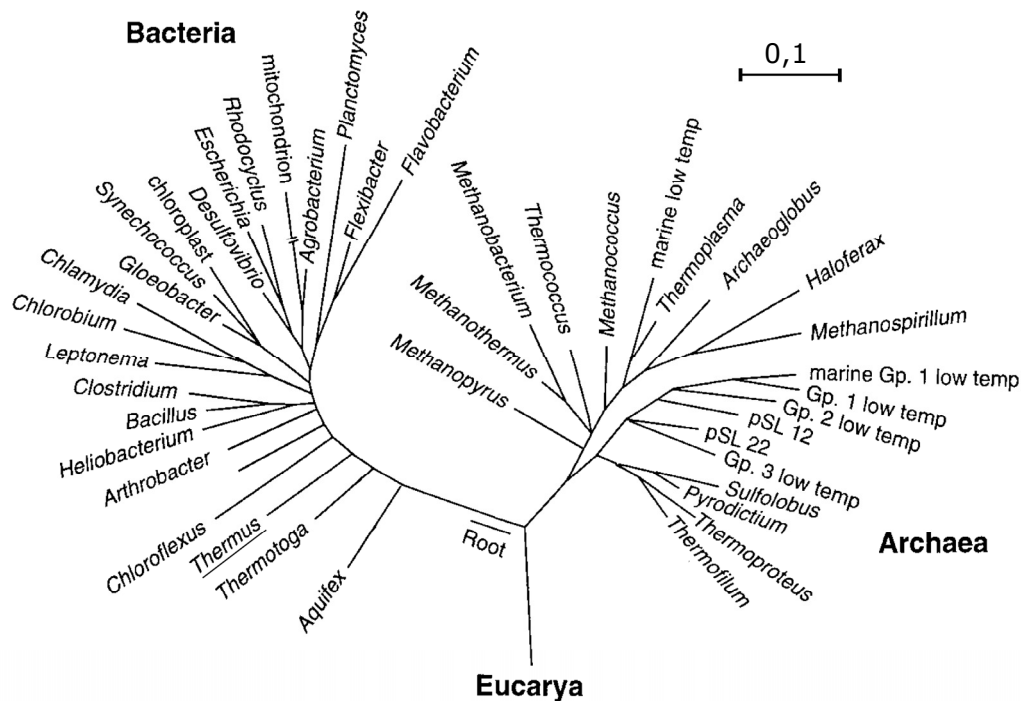


Abb. 1: Der phylogenetische Stammbaum basiert auf rRNA-Sequenzen der kleinen ribosomalen Untereinheit und wurde nach N. Pace modifiziert (Pace, 1997); der abgebildete Maßstab entspricht einer Änderung von 0,1 Mutation pro Nukleotid.

Die Arbeit mit thermophilen Organismen ist immer auch mit der Frage nach den allgemeinen Strategien zum Überleben bei diesen extremen Temperaturen verbunden. Die zunehmende Verfügbarkeit von Genom- und Proteomdaten hat zahlreiche vergleichende Studien zwischen thermophilen und mesophilen Organismen ermöglicht. Sowohl anhand der DNA-Sequenz als auch hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung konnten Unterschiede aufgezeigt werden, die jedoch noch keine allgemein gültigen Aussagen zulassen. Die erhöhte Proteinstabilität wird unter anderem durch eine optimierte Konformation erreicht, z. B. durch das Einführen zusätzlicher Ionenpaarbindungen auch zwischen Untereinheiten, der Optimierung von Wasserstoffbrücken und hydrophober Effekte. Diese zusätzliche Stabilisierung der Sekundärstruktur muß jedoch in Balance zur notwendigen Flexibilität stehen, so dass die Funktion der Enzyme nicht beeinträchtigt wird (Aguilar *et al.*, 1997). Nach einer Theorie von C. Aguilar, wird dies, besonders bei größeren Membranproteinen durch flüssigkeitsgefüllte Hohlräume, die einer thermischen Denaturierung entgegen wirken, erreicht. Auch die Zellmembranen müssen bei diesen hohen Temperaturen ihre

abgrenzende Wirkung aufrechterhalten, ohne dabei die Fluidität und dadurch den Stoffaustausch mit der Umgebung zu beeinträchtigen. Diese Thermoadaptationen von Membranen werden in Bakterien durch ein verändertes Lipidmuster gewährleistet. So wurden neben verlängerten Acylseitenketten besonders auch solche mit erhöhtem Sättigungsgrad und zusätzlichen Verzweigungen bzw. Zyklisierungen gefunden. In *T. thermophilus* wurden darüber hinaus auch Thermozeaxanthine (Carotinoid-Glucosid-Ester) nachgewiesen, denen bei hohen Temperaturen eine Stabilisierung der Membranen zugeschrieben wird (Hara *et al.*, 1999).

1.2 Die Spezies *T. thermophilus*

T. thermophilus wächst obligat aerob bei 40–85°C (Williams, 1989) und wird damit zu den hyperthermophilen Eubakterien gezählt. Das Temperaturoptimum liegt für den Stamm HB8 bei 75°C, für HB27 bei 80°C (DSMZ, www.dsmz.de) und pH 7,5–8, wobei die Wachstumsrate stark von der Belüftung abhängt.

Die Gram-negativen Zellen wachsen als unbewegliche Stäbchen, die lange Filamente bilden und gelb- und orangefarbene Carotinoide synthetisieren. Bei längerer Kultivierung kann die Form uneinheitlich werden, auch kürzere Filamente werden beobachtet, und je nach Belichtung kann die Pigmentierung verloren gehen. Die Bakterien sind nichtsporulierend, sensitiv gegenüber β -Lactam Antibiotika (Brock & Freeze, 1969) und haben einen hohen GC-Gehalt von 64 mol% (Williams, 1989).

Die Subspezies HB8 und HB27 wurden beide vollständig sequenziert und die Genomsequenzen stehen seit 2004 der Öffentlichkeit zur Verfügung (Henne *et al.*, 2004; Masui *et al.*, 2004). Beide Stämme besitzen je ein Chromosom und ein Megaplasmid (Tab. 1), HB8 enthält ein zusätzliches 9,3 kb Plasmid. Die chromosomale DNA ist hoch konserviert: 94% der Gene (1860 Gene) sind auf den Chromosomen beider Subspezies zu finden, wohingegen nur 122 (HB27) bzw. 113 (HB8) Stammspezifische Gene identifiziert werden können. Die beiden Megaplasmide sind dagegen variabler und zeigen nur ein zu 72% übereinstimmendes Genrepertoire. Es wird deshalb vermutet, dass über lateralen Gentransfer neuerworbene Gene zunächst in das extrachromosomale Plasmid inseriert wurden, um so eine schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen zu erreichen (Bruggemann *et al.*, 2006).

T. thermophilus zeichnet sich gegenüber anderen Thermophilen durch eine gute Transformationseffizienz aus, die diese Spezies genetischen Manipulationen leicht zugänglich macht (Friedrich *et al.*, 2002; Koyama *et al.*, 1986). Diese Eigenschaft ist

ein Grund dafür, dass sich *T. thermophilus* besonders in der Strukturbiologie zu einem Modelorganismus für Thermophile entwickelt hat. So konnten selbst komplexe Strukturen wie die vollständige 30S Untereinheit des Ribosoms (Clemons *et al.*, 2001; Wimberly *et al.*, 2000) und die membranständige ba_3 -Cytochrom *c* Oxidase (Soulimane *et al.*, 2000) aus *T. thermophilus* kristallisiert und strukturell analysiert werden. Die Verfügbarkeit der beiden Genome HB8 und HB27 lassen weitere Ergebnisse im Bereich der Struktur-Funktionsbeziehung thermophiler Proteine erwarten und haben bereits zu vielversprechenden Projekten (z. B. "Structural-Biological Whole Cell Projekt", www.thermus.org) geführt, die sich die 3D-Strukturanalyse von möglichst vielen *Thermus*-Proteinen zum Ziel gesetzt haben.

Tab. 1: Genomeigenschaften der beiden *T. thermophilus* Stämme

Stamm		HB27	HB8
Chromosomgröße (bp):		1.894.877	1.849.742
Plasmidgröße (bp):	pTT27	232.605	256.992
	pTT8	-	9.322
Anzahl der Gene:	Chromosom	1.988	1.973
	Plasmid	230	251 (+14)

1.3 Die Atmungskette

Die Reaktionen der Atmungskette und die damit verbundene Phosphorylierung von ADP zu ATP stellen die Hauptenergiequelle aerober Zellen dar. Unter aeroben Bedingungen werden die mit der Nahrung aufgenommenen energiereichen Verbindungen im Verlauf von Glykolyse, Fettsäureoxidation und Zitratzyklus meist vollständig zu CO_2 oxidiert. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf NAD^+ und FAD als Redoxäquivalente übertragen, die anschließend in der Atmungskette reoxidiert werden. Aerobe Organismen übertragen die gewonnenen Elektronen unter Bildung von H_2O auf Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor. Die große Differenz der Normalpotentiale von NADH/NAD^+ (-0,32 V) und $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ (+0,81 V) wird von den Multienzymkomplexen der Atmungskette genutzt, um eine Kaskade gekoppelter Redoxreaktionen anzutreiben. Die bei diesem Prozess freiwerdende Energie dient nach der chemiosmotischen Theorie (Mitchell, 1961) primär dem Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die Membran, welcher einen Rückfluss

von Protonen über die Membran durch die F_0F_1 -ATPase antreibt. Das elektrochemische Potential bewirkt somit die Phosphorylierung von ADP durch die ATP-Synthase (Mitchell, 1961).

Die Multienzymkomplexe der Mitochondrien sind asymmetrisch in die innere Membran integriert. Über Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase) werden Elektronen von NADH auf Ubichinon (Coenzym Q) weitergeleitet, während Elektronen höheren Potentials über Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase) auf Ubichinon übertragen werden. Vom reduzierten Coenzym Q werden die Elektronen über Komplex III (Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase) auf Cytochrom c übertragen. Cytochrom c fungiert dabei als Elektronen-Vermittler zwischen Komplex III und Komplex IV (Cytochrom c Oxidase), durch den im letzten Schritt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden.

Bakterielle Systeme sind häufig einfacher aufgebaut und spiegeln dennoch grundlegende Prinzipien der höher entwickelten Organismen wider. So können den Enzymkomplexen der bakteriellen Atmungskette strukturelle und funktionelle Äquivalente in den Mitochondrien zugeordnet werden, die jedoch einen weit komplexeren Aufbau zeigen. Die Elektronentransportwege der Bakterien sind dagegen weit flexibler (Anthony, 1988). So verfügen die meisten über verzweigte Elektronentransportketten, die ihnen eine Anpassung an unterschiedliche Wachstumsbedingungen ermöglichen. Ein breites Spektrum an terminalen Elektronenakzeptoren lässt auf verschiedene aerobe und anaerobe Elektronentransportwege schließen.

Die Auswertung molekularer Daten und Sequenzvergleiche deutet darauf hin, dass die verschiedenen Atmungsketten schon sehr früh in der Evolution entstanden sind, wahrscheinlich noch bevor größere Sauerstoffmengen von photosynthetisierenden Organismen freigesetzt wurden. Der letzte universale Vorfahr wäre damit in der Lage gewesen, sich mit verschiedenen metabolischen Mechanismen effizient an diverse Umweltbedingungen anzupassen (Castresana & Moreira, 1999).

1.4 Die Atmungskette von *T. thermophilus*

Die Prozesse der Energieumwandlung in *T. thermophilus* wurden bereits früh als ähnlich denen in mesophilen Bakterien beschrieben (McKay *et al.*, 1982). Diese These konnte in den letzten Jahren durch die Isolierung mehrerer der mitochondrialen

Atmungskettenkomplexen homologer Enzyme bestätigt werden: So wurden zwei NADH-Chinon Oxidoreduktasen mit Menachinon-8 (MK-8) als Elektronenakzeptor beschrieben (Yagi *et al.*, 1988) sowie die *caa*₃-Oxidase (Fee *et al.*, 1980) und die *ba*₃-Oxidase (Zimmermann *et al.*, 1988) als zwei alternative Endoxidasen. Aufgrund von Sequenzhomologien werden beide Oxidasen dem Häm/Kupfer-Typ zugeschrieben. Weiterhin konnten zwei *c*-Typ Cytochrome, *C*₅₅₂ und *C*_{555/549} isoliert werden.

Bis heute wurde noch keine Cytochrom *c* Oxidoreduktase (*bc*₁-Komplex) beschrieben. Lediglich ein lösliches Rieske-Protein wurde als möglicher Bestandteil eines Komplex III identifiziert (Fee *et al.*, 1984).

Die Chinonquelle der *T. thermophilus* Atmungskette unterscheidet sich von dem unter Prokaryoten weit verbreiteten Ubichinon. So konnte Menachinon-8 als ausschließliches Chinon aus *Thermus* Membranen isoliert werden (Collins & Jones, 1981). Das Mittelpunktspotential des Redoxpaares Menachinon/Menachinol ($E'_m = -75$ mV) ist gegenüber dem von Ubichinon/Ubichinol ($E'_m = +100$ mV) stark erniedrigt. Aus bioenergetischer Sicht ist das ein Nachteil, da der Betrag der freiwerdenden Energie bei der Elektronenübertragung von NADH auf Menachinon damit geringer ausfällt als unter der Verwendung von Ubichinon (Yano *et al.*, 1997). Die meisten Spezies nahe dem Ursprung des phylogenetischen Stammbaumes werden dem Niedrigpotential/Menachinon-Typ zugeordnet (Schütz *et al.*, 2000), weshalb ein Urtyp des *bc*-Komplexes postuliert wird, der, in Anpassung an eine zunächst noch geringe Sauerstoffkonzentration der Uratmosphäre, Menachinon oxidierte (Knoll, 1992).

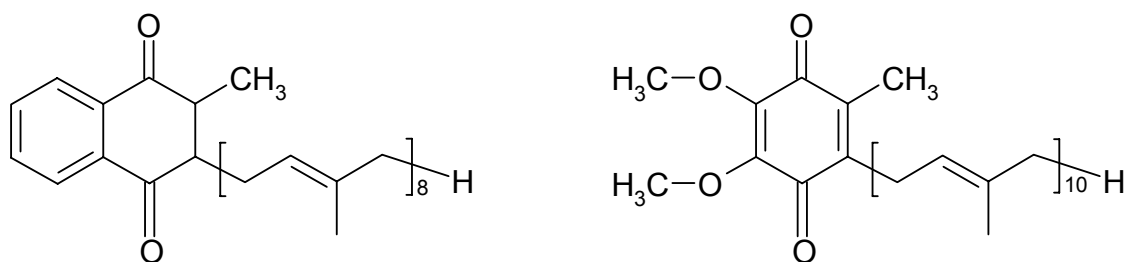


Abb. 2: Strukturformel von Menachinon-8 (MK-8, links) und Ubichinon (UQ₁₀, rechts).

Im weiteren Verlauf der Evolution entwickelten sich dann Systeme, die in der Lage waren, Chinone mit höherem Mittelpunktspotential zu verwenden und damit den in zunehmendem Maße verfügbaren Sauerstoff zu nutzen. Es entwickelten sich dabei drei Systeme, die noch in heutigen Organismen vorhanden sind: (i) die Verwendung von

Ubichinon bei den Proteobakterien, (ii) Plastochinon bei den Cyanobakterien und (iii) Caldariellachinon bei den Sulfolobales (Archaeen). Der Übergang von Menachinon zu Ubichinon hat vermutlich in der Gruppe der Proteobakterien stattgefunden und zur α -, β - und γ -Untergruppe geführt. Das zur γ -Untergruppe gehörende Bakterium *E. coli* spiegelt diesen Vorgang vermutlich wider, da es sowohl Mena- als auch Ubichinon nutzen kann.

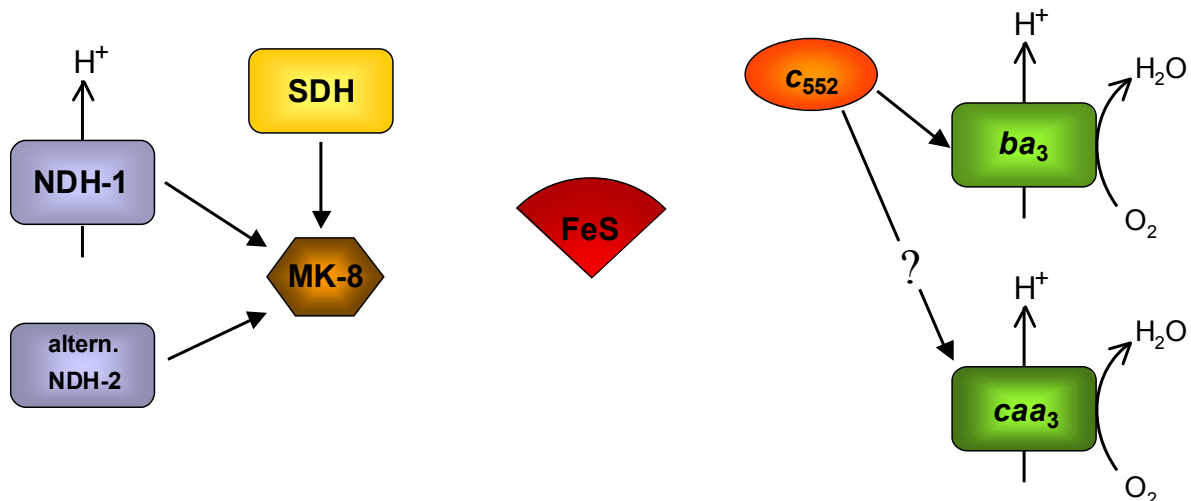


Abb. 3: Schematische Darstellung der Atmungskette von *Thermus thermophilus* (Stand bei Beginn der Arbeit).

NADH:Chinon Oxidoreduktase (NDH-1)

Die NDH-1 von *T. thermophilus* ist eine dem eukaryotischen Komplex I äquivalente Protonenpumpende Dehydrogenase. Das Operon setzt sich aus 14 Strukturgenen (NQO1-14) zusammen, die sich im Protein voraussichtlich als 7 transmembrane (NQO7, NQO8, NQO10-14) und 7 periphere (NQO1-6, NQO9) Untereinheiten darstellen (Yano *et al.*, 1997). Diese sind zu entsprechenden Untereinheiten im mitochondrialen Komplex I und anderen bakteriellen NDH-1 homolog. Die Elektronen der NDH-1 von *T. thermophilus* werden jedoch nicht auf Ubichinon, sondern auf Menachinon-8 als einzigen endogenen Elektronenakzeptor übertragen (siehe oben).

Biochemische Analysen der isolierten NDH-1 haben ergeben, dass das Enzym ein nicht-kovalent gebundenes FMN und 9 Eisen-Schwefel-Cluster als Redoxkomponenten enthält, in bakteriellen NDH-1 und mitochondrialem Komplex I werden generell acht Eisen-Schwefel-Bindungsstellen gefunden (Nakamaru-Ogiso *et al.*, 2002). Das zusätzliche [4Fe-4S] Zentrum in der NQO-3 von *T. thermophilus* ist stark sauerstoffempfindlich.

Die zweite in *T. thermophilus* nachgewiesene NADH:Chinon Oxidoreduktase (NDH-2) ist ein nicht-energiegekoppeltes Enzym aus nur einer Polypeptidkette, das ein nicht-kovalent gebundenes FMN aber keine Eisen-Schwefel-Zentren enthält. Im Gegensatz zu mesophilen NDH-2 ist das Enzym in der Lage, NADH zu oxidieren und die Elektronen auf MK-8 zu übertragen (Yagi *et al.*, 1988). Der Chinon-Pool wird darüber hinaus mit Elektronen von einer Succinat-Dehydrogenase versorgt (Soulimane & Buse, 1999).

Die *caa*₃-Cytochrom c Oxidase

Diese Oxidase enthält der mitochondrialen *aa*₃-Oxidase analoge katalytische Zentren und wird bevorzugt bei hohem Sauerstoffpartialdruck produziert (Fee *et al.*, 1980). Zusätzlich enthält die *caa*₃ ein kovalent gebundenes *c*-Typ Cytochrom, das den Elektroneneintritt in die Oxidase ermöglicht, und kann somit als integrierte Version des nicht kovalent gebundenen Redoxkomplexes zwischen Cytochrom *c* und Oxidase in höheren Organismen angesehen werden (Gerscher *et al.*, 1998).

Das Enzym entsteht aus zwei Fusionsproteinen, kodiert von den Genen *caaA* und *caaB*. Das kleinere Protein (UEII) enthält die Bindungsstelle für ein homobinukleares Cu_A und ist mit der Cytochrom *c* Domäne verbunden. Das größere Protein entspricht einer Fusion aus Untereinheit I und III (Buse *et al.*, 1989). Untereinheit I enthält ein Häm *a*, über das die Elektronen von Cu_A an Häm *a*₃ weitergeleitet werden. Häm *a*₃ bildet mit dem in der Nähe liegenden Cu_B ein heterobinukleares Metallzentrum, in dem Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Eine weitere Untereinheit wurde identifiziert, die jedoch keine signifikante Homologie zu typischen Häm/Cu-Oxidase aufweist.

Die zur Wasserbildung benötigten Protonen werden in Bakterien auf der cytosolischen Seite aufgenommen und es werden Protonen zur Bildung des elektrochemischen Gradienten über die Membran transportiert. Beide Wege sind unter den bisher untersuchten Oxidasen hoch konserviert. In der *caa*₃-Oxidase fehlen jedoch Aminosäuren, denen eine wesentliche Rolle bei der Weiterleitung von Protonen zugeschrieben wird. Da dennoch Protonenpump-Aktivität beobachtet werden kann, wird diese Rolle von anderen, noch zu ermittelnden Aminosäuren übernommen (Hellwig *et al.*, 2002).

Die ba_3 -Cytochrom c Oxidase

Die ba_3 -Oxidase steht unter der Kontrolle eines sauerstoffsensitiven Promotors und wird verstärkt bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck synthetisiert. Sie besteht aus drei Untereinheiten I, II und IIa und beinhaltet die ähnliche Redoxzentren wie aa_3 -Oxidasen. Im Unterschied zur caa_3 - bezieht die ba_3 -Oxidase ihre Elektronen jedoch über einen mobilen Carrier, das c-Typ Cytochrom c_{552} (Soulimane *et al.*, 1997). Die Oxidase setzt sich aus 15 transmembranen Helices und einer periplasmatischen Domäne zusammen, die N-Termini der Untereinheiten sind zur cytosolischen und die C-Termini zur periplasmatischen Seite orientiert. Da in Untereinheit II, im Vergleich zu Homologen, 60 N-terminale Aminosäuren fehlen, besteht diese aus nur einer Transmembranhelix, die in fester Bindung zu Untereinheit I steht.

Untereinheit IIa besteht aus nur einer Transmembranhelix, die sich an gleicher Position, jedoch in umgekehrter Orientierung, wie die erste Helix in anderen aa_3 -Oxidasen befindet und von funktioneller Bedeutung zu sein scheint (Soulimane *et al.*, 2000).

Untereinheit I setzt sich aus 13 Transmembranhelices zusammen, die über nur kurze Loops verbunden sind, was als eine typische Eigenschaft thermostabiler Proteine angesehen wird (Adams & Kelly, 1998). Die 13. Helix weist keine Homologie zu entsprechenden Sequenzen auf. Der ba_3 -Oxidase fehlen mehrere konservierte Aminosäuren sowohl bei den Protonentransportwegen als auch im katalytischen Bereich. Dennoch ist sie in der Lage Protonen zu pumpen, wenn auch mit einer geringeren Effizienz von $0,5 \text{ H}^+/\text{e}^-$ (Kannt *et al.*, 1998).

Cytochrom c_{552}

Cytochrom c_{552} ist ein lösliches Monohäm-Protein aus 131 Aminosäuren mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 10,8 (Hon-Nami & Oshima, 1977). Die spektralen Eigenschaften des Proteins sind typisch für c-Typ Cytochrome, doch zeigt die α -Bande des reduzierten Zustandes einen gesplitteten Verlauf, mit einem Peak bei 552 nm und einer Schulter bei 548 nm (Soulimane *et al.*, 1997).

Um die Häm-Spalte eines typischen Cytochrom c treten häufig Lysin-Reste mit einer anionischen Bindungsstelle der entsprechenden Oxidase in elektrostatische Wechselwirkung. Dieser Wechselwirkung über größere Entfernung folgt eine Feinjustierung über hydrophobe Wechselwirkungen, die schließlich zu einem produktiven Elektronentransferkomplex führt. Da in *T. thermophilus* die entsprechenden Aminosäurereste, sowohl in den Bindungsdomänen von c_{552} als auch bei der ba_3 -Oxidase fehlen, geht man hier von einer nicht-elektrostatisch dominierten

Komplexbildung aus (Maneg *et al.*, 2003; Soulimane *et al.*, 2000). Diese Theorie wird durch kinetische Experimente gestützt, in denen die Aktivität der ba_3 bei niedrigster Ionenstärke maximiert werden konnte (Guiffre *et al.*, 1999), was sich mit der generellen Beobachtung schwächer werdender elektrostatischer Wechselwirkungen bei Temperaturerhöhung deckt.

Die Polypeptidkette von c_{552} ist etwa ein Drittel länger als die vergleichbarer Proteine. Der verlängerte C-terminale Teil wurde als Thermoklammer beschrieben, die zu einer stabileren Gesamtstruktur beiträgt (Than *et al.*, 1997).

Das Rieske-Protein

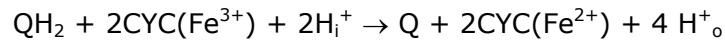
Aus *T. thermophilus* HB8 konnte ein lösliches Rieske FeS-Protein isoliert und charakterisiert werden (Fee *et al.*, 1984). Diesem Protein fehlen jedoch die 38 N-terminalen Aminosäuren (Gatti *et al.*, 1998), die vermutlich für die Verankerung in der Membran verantwortlich sind. Diese hydrophile Domäne konnte mit guter Auflösung in der Kristallstruktur dargestellt werden (Hunsicker-Wang *et al.*, 2003) und wurde bereits für detaillierte Funktionsstudien herangezogen. Mit EPR-Methoden konnte in der aufgereinigten hydrophilen Domäne ein [2Fe-2S] Komplex nachgewiesen werden, dessen spektrale Eigenschaften prinzipiell dem Rieske Protein aus Rinderherz ähneln. Bis heute konnte das Rieske Protein von *T. thermophilus* jedoch nicht im Komplex mit Cytochrom *b* oder *c* beschrieben werden.

1.5 Struktur- und Funktionsmerkmale von *bc*-Komplexen

Die Cytochrom *bc*-Komplexe stellen eine phylogenetisch diverse Gruppe Elektronentransferierender Membranproteine dar. Zu dieser Proteinfamilie werden Enzymkomplexe gerechnet, die neben Cytochrom *b* ein FeS-Protein (ISP) enthalten und eine signifikante Sequenzhomologie zu mitochondrialen bc_1 -Komplexen aufweisen. Die meisten Mitglieder besitzen außerdem ein gebundenes Cytochrom vom *c*- oder *f*-Typ; auch Dihäm-Cytochrome und zusätzliche Untereinheiten ohne prosthetische Gruppen können vorhanden sein.

Cytochrom *b* besitzt zwei *b*-Typ Häme, die sich in den spektralen und Redox Eigenschaften unterscheiden. Das ISP enthält einen Eisen-Schwefel Komplex mit ungewöhnlich hohem Redox-Mittelpunktpotential.

Der mitochondriale bc_1 -Komplex, oder Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (QCR), katalysiert den Elektronentransfer von einem Hydrochinon (Ubichinon Q) auf ein lösliches Redoxprotein, Cytochrom c (CYC). In Mitochondrien kann folgende Reaktionsgleichung aufgestellt werden:



Formel 1: Reaktionsgleichung des mitochondrialen bc_1 -Komplexes. Die frei werdende Energie wird verwendet um Protonen von der Innenseite der Membran (H_i^+) auf die Außenseite (H^+_o) zu bringen.

Der b_6f -Komplex, oder Plastochinol:Plastocyanin Oxidoreduktase, überträgt Elektronen von Plastochinon auf Plastocyanin oder Cytochrom c_6 und ist am Elektronentransport der sauerstoffproduzierenden Photosynthese in Chloroplasten und Cyanobakterien beteiligt (Berry *et al.*, 2000).

Da sowohl in Bakterien als auch in Archaeen bc -Komplexe aus einem Rieske ISP und Cytochrom b , das als eine Einheit oder getrennt in zwei Untereinheiten auftreten kann, bestehen, wird diese Kombination als evolutionäre Grundeinheit angesehen. Die meisten der Enzyme besitzen c -Typ Cytochrome als zusätzliche Untereinheit, die sich jedoch stark unterscheiden und oft keinen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung haben. Da sich die Strukturgene fast aller c -Typ Cytochrome stromauf- oder stromabwärts der Grundeinheit befinden, wird angenommen, dass der Grundeinheit aus ISP/Cyt b unterschiedliche c -Typ Cytochrome zugefügt wurde konnten. Die evolutionäre Grundeinheit aus ISP/Cyt b kann somit auch als funktionelle Einheit angesehen werden (Schütz *et al.*, 2000).

Im Folgenden soll die Struktur eines typischen bc_1 -Komplexes anhand des Hefe-Komplexes erläutert werden. Dieser kann in allgemeiner Homologie zu den entsprechenden Komplexen in Vertebraten gesehen werden und wurde bereits detailliert untersucht (Hunte, 2001). Der Hefe bc_1 -Komplex stellt sich als ineinander umwundenes Homodimer dar. Das Zentrum eines Monomers aus acht Cytochrom b (orange) Transmembranhelices gebildet. Daran angelagert sind je ein einzelner Membrananker des Rieske Proteins (grün) und von Cytochrom c_1 (rot), den zwei anderen katalytischen Untereinheiten. Im Bereich des Intermembranraumes von Eukaryoten sind diverse Untereinheiten beschrieben und auch in der Kristallstruktur des Hefeproteins enthalten. Da die Funktion dieser zusätzlichen Untereinheiten

weitgehend ungeklärt ist und sich keine Äquivalente in prokaryotischen Systemen nachweisen lassen, sind diese in der obigen Darstellung Abb. 4 nicht gezeigt.

Die zentrale Proteinuntereinheit des Hefe-Komplexes besteht aus Cytochrom *b* mit zwei nicht-kovalent gebundenen Häm *b* (b_L und b_H) Gruppen, dem Rieske-Protein mit einem Eisen-Schwefel Zentrum Fe_2S_2 und Cytochrom c_1 mit einer kovalent gebundenen Häm *c* Gruppe. Das Enzym ist ein funktionelles Dimer mit je zwei Stellen für die Chinol-Oxidation (Q_o -Stelle), Chinol Reduktion (Q_i -Stelle) und für die Bindung von Cytochrom *c*.

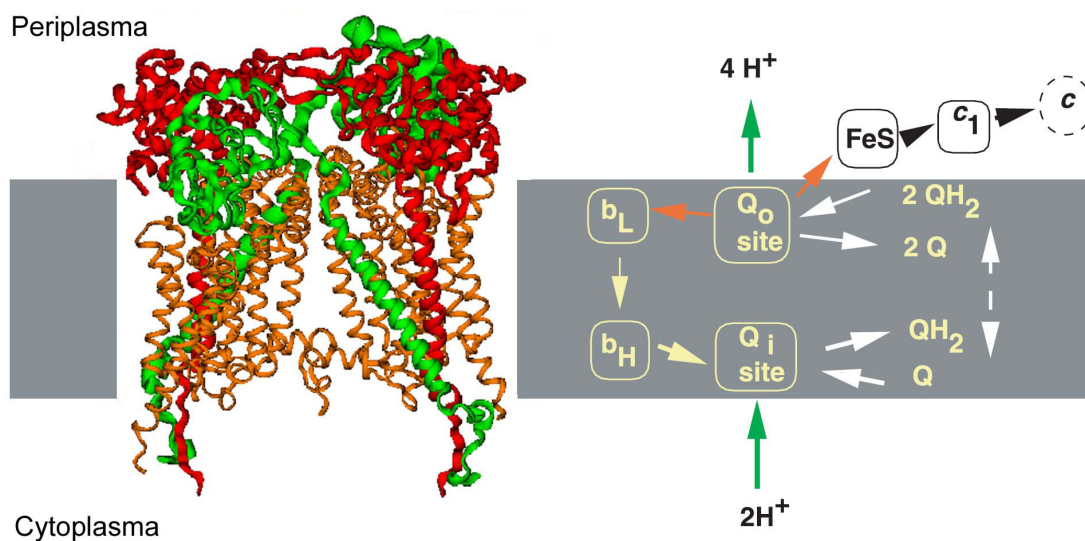


Abb. 4: Strukturmodell der dimeren Hefe QCR und schematische Darstellung des Q-Zyklus innerhalb einer funktionellen Einheit, modifiziert nach Hunte, 2001. Dargestellt sind nur die redoxaktiven Untereinheiten: Cytochrom *b* (orange), Cytochrom c_1 (rot) und Rieske (grün).

Die Ubichinol-Oxidation an der Q_o -Seite ist zweigeteilt. Ein Elektron wird über das Fe_2S_2 -Zentrum auf Cytochrom c_1 übertragen, das zweite Elektron wird zur Reduktion von gebundenem Ubichinon an der Q_i -Stelle verwendet. Die Protonen von Ubichinol werden nach außen abgegeben, während ein weiteres Molekül Ubichinon auf der Matrixseite protoniert wird. Nach einem zweiten Zyklus des Elektronentransfers verlässt das nunmehr vollständig reduzierte Ubichinol die Q_i -Bindungstasche. Dieser Mechanismus wird als Q-Zyklus bezeichnet und trägt zur Entstehung eines Protonengradienten bei (siehe Abb. 4). Jede Q_o -Stelle setzt sich aus Cytochrom *b* und Cytochrom c_1 des einen Monomers und dem Rieske Protein des anderen Monomers zusammen, so dass eine Monomerisierung das katalytische Zentrum des Komplexes zerstören würde. Ob die beiden Reaktionszentren unabhängig voneinander oder als

funktionelle Einheit arbeiten, ist noch offen. Da die äußere Domäne des Rieske Proteins über eine flexible Region mit dem Membrananker verbunden ist, wird eine Bewegung des Fe_2S_2 -Clusters von Häm b_L zu Häm c_1 hin ermöglicht (Hunte *et al.*, 2003).

1.6 Menachinol-oxidierende *bc*-Komplexe

Bisher konnten nur einige wenige thermophile *bc*-Komplexe isoliert werden und auch aus der Gruppe der Menachinon-oxidierenden wurden erst wenige detailliert beschrieben. Ein Komplex, der diese beiden Eigenschaften vereint, ist der des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus*. Dieser Komplex oxidiert Naphthochinon, zeigt aber ansonsten eine sehr starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu den bc_1 -Komplexen der ϵ -Proteobakterien (Schütz *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis steht eindeutig in Widerspruch zu der phylogenetischen Einordnung dieses Genus, nahe am Ursprung des divergenten Stammbaumes (siehe Abb. 1). Die nächsten Verwandten zählen ebenfalls zu den Naphtochinon-oxidierenden Organismen, doch weisen diese deutliche Unterschiede in der evolutionären Einordnung ihrer Gene für Cytochrom *b* und das Rieske-Protein auf. Aus diesem Grund wird für *A. aeolicus* der Erwerb eines bc_1 -Komplexes über lateralen Gentransfer postuliert und es konnte damit der erste thermophile Naphtochinol-oxidierende bc_1 -Komplex beschrieben werden (Schütz *et al.*, 2003).

Ein *bc*-Komplex aus vier Untereinheiten konnte auch aus *Bacillus* PS3 isoliert werden (Kutoh *et al.*, 1988), eine zu *B. stearothermophilus* verwandte Spezies. Dieser thermostabile Komplex weist neben niedrigen Mittelpunktpotentialen der Redoxzentren auch weitere Ähnlichkeiten zu den b_6f -Komplexen der Chloroplasten auf (Liebl *et al.*, 1992). Darüber hinaus konnte ein stabiles Assoziat aus *bc*-Komplex und terminaler Oxidase beschrieben werden. Dieser Superkomplex kann unter bestimmten Bedingungen der Membran-Solubilisierung beobachtet werden und besteht aus sieben Untereinheiten (Kutoh *et al.*, 1988). Eine weitere Spezies des Genus *Bacillus*, *B. subtilis*, wurde überwiegend auf genetischer Ebene und in intakten Membranen auf die Existenz und Aktivität einer Menachinol:Cytochrom *c* Reduktase hin überprüft (Yu *et al.*, 1995). Das aus drei offenen Leserahmen bestehende Operon kodiert für ein Rieske Protein, eine Cytochrom *b*-Untereinheit (die der größeren gesplitteten Cytochrom *b*-Variante in b_6f -Komplexen entspricht) und ein ungewöhnliches Protein aus Untereinheit IV (die kleinere Komponente der gesplitteten Cytochrom *b*-Version) fusioniert mit einer Häm *c*-Domäne. Dieser Häm-Domäne kann keine bislang bekannte

c- oder *f*-Untereinheit der *bc*-Komplexe zugeordnet werden. Sie ähnelt vielmehr dem löslichen Cytochrom c_{550} und wird als Beispiel der großen Variabilität der *c*-Untereinheiten innerhalb der *bc*-Gruppe angeführt.

Ein Menachinon-abhängiger *bc*-Komplex des mesophilen *Corynebacterium glutamicum* kann in Form eines Chinol-Oxidase Superkomplexes aufgereinigt werden. Die Cytochrom *c*-Untereinheit trägt zwei Häme und ermöglicht auf diesem Weg vermutlich einen direkten Elektronentransfer zur aa_3 -Oxidase (Bott & Niebisch, 2003); eine ähnliche Situation wird auch für das verwandte Bakterium *Rhodococcus rhodochrous* beschrieben (Sone *et al.*, 2003). Eine ungewöhnliche Zusammensetzung aus Häm-Proteinen wird für den *bc*-Komplex des thermohalophilen *Rhodothermus marinus* beobachtet. Dieser *bc*-Komplex ist bislang der einzig beschriebene, dem eine Rieske-ähnliche FeS-Komponente fehlt (Pereira *et al.*, 1999).

1.7 Zielsetzung

Einige Membranprotein-Komplexe der Atmungskette aus *T. thermophilus* wurden bereits identifiziert; bislang fehlt jedoch der Nachweis eines *bc*-Komplexes zur Beschreibung einer vollständigen Reaktionskette von NADH bis hin zu molekularem Sauerstoff. Ziel dieser Arbeit ist es, diese Lücke zu schließen.

Darüber hinaus soll die Zusammensetzung dieses thermostabilen und Menachinol-oxidierenden Proteinkomplexes durch seine Isolierung geklärt und eine erste Charakterisierung vorgenommen werden. Dazu wird die Überexpression der entsprechenden Gene angestrebt, wobei die Optimierung eines *Thermus/E.coli*-Shuttlevektors für die generelle Expression hitzestabiler Proteine in *Thermus* als Ausgangspunkt dient. Außerdem sollen die zur Verfügung stehenden Sequenz-Informationen und Charakteristika der einzelnen Untereinheiten zur phylogenetischen Einordnung zu verwandten und homologen *bc*-Komplexen genutzt werden.

Ein anderer Aspekt dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, inwieweit die thermostabilen Eigenschaften des isolierten *bc*-Komplexes auch noch in Detergenzumgebung erhalten bleiben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Autoklav	Getinge
Brutschrank	Heraeus
Detektoren:	
UVicord SII	Amersham Bioscience
UVicord VW 2251	Amersham Bioscience
Elektrophoresesysteme	BioRad
Fermenter Microferm	New Brunswick Scientific
Fraktionssammler:	
Frac-200	Amersham Bioscience
Super Frac	Amersham Bioscience
Konzentratoren	Millipore, Sartorius
Luftbadschüttler	New Brunswick Scientific
Manton-Gaulin-Pressen	APV Schröder
Megafuge RC 3C plus	Sorvall
pH-Meter pH340i	WTW
Programmer GP-250 Plus	Amersham Bioscience
Schüttelplattform	Edmund Bühler
Speedvac-Zentrifuge	Savant
Spektrophotometer:	
U-3000	Hitachi
UVIKON	Kontron
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler OmniGene	HYBAID
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus
Transilluminator	TMW
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson
Ultra-Turax-Homogenisator T25 IKA	Labortechnik
Ultrazentrifuge L-70	Beckmann
UV-Tisch	UVP

Videoprinter	Mitsubishi
Vortexer Reax 2000	Heidolph
Video Copy Processor	Mitsubishi
Zentrifuge RC 3Cplus	Sorvall

2.1.2 Chemikalien und Bezugsquelle

Acetonitril HPLC Grade	Merck
Agar-Agar	Merck
Agarose	Merck
Ampicillin	AppliChem
Antimycin A	Sigma
Asparaginsäure	AppliChem
Bacto-Trypton	Beckton-Dickinson
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-inodylphosphat)	BTS-Biotech Trade&Service
Bromphenolblau	Biomol
Chloramphenicol	AppliChem
Coomassie Brilliantblau G-250	AppliChem
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem
DEC (n-Decyl- β -D-Maltosid)	Biomol
Dithionit	Merck
DM (Dodecyl- β -D-Maltosid)	Calbiochem
Glycin	Merck
Hefeextrakt	GibcoBRL
IPTG (β -D-Isopropylthiogalaktosid)	Biomol
Jodacetamid	Sigma
Kanamycin	Merck
MOA-Stilben	BASF
Myxothiazol	Sigma
NBT (Nitro-Blue-Tetrazolium)	BTS-Biotech Trade&Service
NCS (Newborn-calf-serum)	Biochrom KG
Pefabloc	Biomol
PonceauS	Sigma
Serin	AppliChem
Stigmatellin	Sigma
Strobilurin	BASF
TMBZ (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin)	Sigma

Triton X-100	Serva
Trypsin (Sequencing Grade)	Roche
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid)	BTS-Biotech Trade&Service

Weitere Standardchemikalien und Lösungen in p.a. Qualität von Merck und Roth

2.1.3 Lösungen und Puffer

Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Probenpuffer:

0,02% (v/v) Bromphenolblau

30 mM EDTA

5% (v/v) Glycerin in TBE-Puffer

TBE-Puffer pH 8 (10-fach):

1 M Tris

1 M Borsäure

25 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung:

10 mg/ml in H₂O

Isolierung genomischer DNA

Lysepuffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0

100 mM EDTA

SDS-Lösung:

20% SDS (w/v)

NaClO₄-Lösung:

5 M NaClO₄

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA

Chloroform/Isoamylalkohol:
im Verhältnis 24:1 (v/v)

Phenol: in TE-Puffer gesättigt

Phenol/(Chloroform/Isoamylalkohol):
gemischt im Verhältnis 1:1 (v/v)

NaAc-Lösung pH 5,0:
1 M Natriumacetat/Eisessig

Plasmid-Präparation

Lösung I: TEG-Puffer pH 7,5
(kann durch H₂O ersetzt werden)
25 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
50 mM Glucose

Lösung II: NaOH/SDS
0,2 M NaOH
1% SDS (w/v)

Lösung III: KAc-Lösung pH 5 bei 4°C
3 M KAc
11,5% Eisessig (v/v)

Chloroform/Isoamylalkohol: im Verhältnis 24:1 (v/v)

RNase: 2 mg/ml in 50% Glycerin

Rubidiumchlorid kompetente-Zellen

TFB-I Puffer: sterilfiltriert
30 mM KAc
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl, in 15% Glycerin, pH 5,8 mit 1 M HAc einstellen

TFB-II Puffer: sterilfiltriert

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

in 15% Glycerin pH 6,8 mit 1 M KOH einstellen

Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger

Acrylamidlösung:

48% Acrylamid (w/v)

1,5% Bisacrylamid (w/v)

Gelpuffer:

3 M Tris/HCl pH 8,5

0,3% SDS

Sammelgel:

0,5 ml Acrylamidlösung

6,0 ml H₂O

1,5 ml Gelpuffer

Trenngel 12%:

2,0 ml Acrylamidlösung

3,5 ml H₂O

3,3 ml Gelpuffer

1,0 ml Glycerin

Trenngel 15%:

3,0 ml Acrylamidlösung

2,5 ml H₂O

3,3 ml Gelpuffer

1,0 ml Glycerin

Kathodenpuffer (5-fach):

0,5 M Tris pH 8,3

0,5 M Tricin

0,5% SDS

Anodenpuffer (10-fach):

1 M Tris/HCl, pH 8,9

Protein-Probenpuffer:

12 ml 20% SDS (w/v)

6 ml Glycerin

3 ml Tris/HCl (1 M) pH 7

10 ng Bromphenolblau

2,5 ml β -Mercaptoethanol

Coomassie-Färbung

Färbelösung:

0,02% Coomassie-Brilliant-Blau (w/v)

10% Essigsäure

10% Methanol

Entfärbelösung:

10% Essigsäure

10% Methanol

Silber-Färbung

Fixierlösung:

50% Ethanol

12% Essigsäure

0,5 ml/l Formaldehyd 37%

Vorbehandlung:

0,2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Färbelösung:

0,2% AgNO_3 (v/v)

0,75 ml/l Formaldehyd 37%,

dunkel aufbewahren

Entwickler:

60 g/l Na_2CO_3

4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

0,5 ml/l Formaldehyd 37%

Stopp-Lösung:

50 mM EDTA pH 8

Häm-Färbung

Lösung I:

0,25 M Natriumacetat pH 5

Lösung II:

45 mg TMBZ

30 ml Methanol

70 ml Lösung I

Lösung III:

780 μl H_2O_2 30%

30 ml Methanol

70 ml Lösung I

Lösung IV:

30 ml Isopropanol

70 ml Lösung I

Western-Blot

Transferpuffer (5-fach): in 2 l H_2O

30 g Tris

142 g Glycin

10 ml 20% SDS (w/v)

Ponceaurot-Färbelösung:

2% PonceauS

3% Trichloressigsäure

NCS-Lösung:

50 ml NCS auf 1 l TBS

TBS-Puffer (10-fach):

10 mM Tris/HCl pH 7,4

140 mM NaCl

TBS/Triton-Puffer:

0,05% Triton-X100 auf 1 l TBS

TNM-Puffer:

100 mM Tris/HCl pH 9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

NBT/BCIP-Färbelösung:

40 µl NBT-Stammlösung (50 mg/ml in Dimethylformamid 70%)

40 µl BCIP-Stammlösung (50 mg/ml in Dimethylformamid 70%)

10 ml TNM-Puffer

Stopp-Lösung:

50 mM EDTA pH 8

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Lowry A:

2% Na₂CO₃

0,1 M NaOH

Lowry B₁:

1% CuSO₄ x 5 H₂O

Lowry B₂:

2% Kalium-Natrium-Tartrat

Folin-Ciocalteu-Reagenz:

Folin-Ciocalteu 1:1 mit H₂O verdünnen

Säulenchromatographische Proteinaufreinigung

DEAE Sepharose:

Waschpuffer:

20 mM KP_i

1 mM EDTA

0,5% Triton X-100

Q-Sepharose high performance:

Waschpuffer: pH 8

20 mM Tris/HCl pH 8

1 mM EDTA

Elutionspuffer: pH 8

20 mM Tris/HCl pH 8

1 mM EDTA

400 mM NaCl

Cobalt-Talon Metallaffinitätssäule

T. thermophilus bc-Komplex, homolog und heterolog exprimiert:

Waschpuffer :

50 mM NaP_i pH 7

300 mM NaCl

30% Glycerin

0,16% DEC

Elutionspuffer :

50 mM NaAc pH 5,3

300 mM NaCl

30% Glycerin

0,16% DEC

T. thermophilus ba_3 -Oxidase:

Waschpuffer :

50 mM NaP_i pH 7

150 mM NaCl

0,5% Triton X-100

Elutionspuffer :

50 mM NaP_i pH 7

150 mM NaCl

0,5% Triton X-100

500 mM Imidazol

T. thermophilus ABC-Transporter, CuATPase und Rieske Vollängen-Protein:

Waschpuffer :

50 mM NaP_i pH 7

300 mM NaCl

0,05% DM

Elutionspuffer :

50 mM NaP_i pH 7

300 mM NaCl

0,05% DM

500 mM Imidazol

Probenvorbereitung für MALDI Massenspektrometrie

Waschpuffer I:

50% Acetonitril, HPLC Grade

25 mM Ammoniumbicarbonat pH 8

Reduktionslösung :

10 mM DTT

100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8

Alkylierungslösung :

55 mM Jodacetamid

100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8

Trypsin-Stammlösung :

25 µg Trypsin-Lyophilisat, Sequencing Grade

200 µl 1 mM HCl

Verdau-Puffer : 200 µl

20 µl Trypsin-Stammlösung (12,5 ng/µl)

50 mM Ammoniumbicarbonat

5 mM CaCl₂

Waschpuffer II nach Verdau :

50 mM Ammoniumbicarbonat

5 mM CaCl₂

Peptid-Extraktion I:

20 mM Ammoniumbicarbonat

Peptidextraktion II:

5% Ameisensäure

50% Acetonitril

2.1.4 Größenstandards und Kits

Größenstandards

für DNA:

EcoRI/HindIII restringierte λ -DNA	Herstellung im Arbeitskreis
1 kb DNA Leiter	New England BioLabs
100 bp DNA Leiter	New England BioLabs

für Proteine:

Der verwendete Standardmarker (Invitrogen) setzt sich aus folgenden Proteinen zusammen:

Protein:	Molekulargewicht (kDa):
Myosin	210
Phosphorylase (rot)	105
BSA	78
Glutamat-Dehydrogenase	55
Alkohol-Dehydrogenase	45
Carbo-Anhydrase	34
Myoglobin (cyan)	17
Lysozym	16
Aprotinin	7
Insulin, B-Kette	4

Kits

Miniprep Kit	Qiagen
Midiprep Kit	Qiagen
Gel Extraction Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen

2.1.5 Antikörper

Penta-His Antikörper	Novagen
Anti-Kaninchen IgG-Antikörper	Sigma
Kaninchen Anti-Ttctc Antikörper	Eurogentec, Belgien
Protein A-Alkalische Phosphatase	Sigma Aldrich

2.1.6 Nukleinsäuren

2.1.6.1 Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Herkunft
pBlueskriptSK	Amp ^R , Klonierungsvektor, <i>f1 ori</i> , <i>lacZα</i>	Stratagene
pBBR1MCS-5	Amp ^R , Gm ^R	Kovach, 1995
pEC86	Amp ^R , <i>ccm</i> ABCDEFGH in pACYC184	Arslan <i>et al.</i> , 1998
pET22b(+)	Amp ^R , <i>lac</i> -Operator, <i>pe/B</i> Leader-Sequenz	Novagen
pUC18	Amp ^R , Klonierungsvektor, <i>lacZα</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pDM1	Amp ^R , Δ pUC18 mit <i>T. t. bc</i> -Operon	Diplomarbeit D. Mooser
pDM3	Amp ^R , Δ pET22b, <i>pe/B</i> Leader-Sequenz mit <i>T. t. HB8 Cyt. c</i> , C-terminaler His ₆ -Tag	Diplomarbeit D. Mooser
pDM4	Amp ^R , Δ pBlueskript mit <i>T. t. HB8 bc</i> -Operon, <i>bc</i> -Promotorbereich, C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit
pDM5	Amp ^R , Δ pBlueskript mit Fragment des <i>T. t. HB8 bc</i> -Operons bis zur vorhandenen Xho-Schnittstelle	diese Arbeit
pDM6	Amp ^R , HTK ^R , Δ pMA36 <i>Thermus/E.coli</i> Shuttlevektor mit <i>T. t. HB8 bc</i> -Operon, <i>bc</i> -Promotorbereich, C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit
pDM8	Amp ^R , HTK ^R , pDM6 ohne endogene NdeI-Schnittstelle, nach Klenow <i>fill in</i>	diese Arbeit
pDM9	Amp ^R , pDM5 mit neuer NdeI-Schnittstelle, eingeführt über <i>quikChange</i> -Mutagenese	diese Arbeit
pDM10	Amp ^R , HTK ^R , pDM8 mit neu eingefügtem NdeI-Genanfang, aus pDM9	diese Arbeit
pDM11	Amp ^R , Gm ^R , Δ pUC18 mit eingefügter MCS für <i>Thermus/E.coli</i> -Shuttlevektor (NdeI, SacII, NotI, SwaI, PacI, PstI)	diese Arbeit
pDM12	Amp ^R , HTK ^R , Gm ^R , Δ pDM10 <i>Thermus/E.coli</i> -Shuttlevektor mit <i>bc</i> -Promotorbereich und kleiner MCS (NdeI, SacII, NotI, SwaI, PacI, PstI)	diese Arbeit

pDM13	Amp ^R , ΔpDM11 mit Fragment des <i>T. t.</i> HB27 ABC-Operons bis zur vorhandenen SacII-Schnittstelle	diese Arbeit
pDM14	Amp ^R , ΔpUC18 mit <i>T. t.</i> HB27 ABC-Operon, C-terminaler His ₆ -Tag	diese Arbeit
pDM15	Amp ^R , HTK ^R , ΔpDM12 <i>Thermus/E.coli</i> -Shuttlevektor mit <i>T. t.</i> HB27 ABC-Operon, <i>bc</i> -Promotorbereich und C-terminalem His ₆ -Tag	diese Arbeit
pDM16	Amp ^R , HTK ^R , ΔpDM12 <i>Thermus/E.coli</i> -Shuttlevektor mit <i>T. t.</i> HB8 <i>ba</i> ₃ -Operon, N-terminal verlängerter Untereinheit IIa, <i>bc</i> -Promotorbereich, C-terminalem His ₁₀ -Tag und TEV-Schnittstelle	diese Arbeit
pDM17	Amp ^R , ΔpUC18 mit <i>T. t.</i> HB8 Cyt. <i>c</i> ₅₅₂ , ohne endogene Signalsequenz	diese Arbeit
pDM18	Amp ^R , ΔpET22b, <i>pe</i> B Leader-Sequenz mit <i>T. t.</i> HB8 Cyt. <i>c</i> ₅₅₂ , ohne endogene Signalsequenz	diese Arbeit
pDM18 V83A	Amp ^R , ΔpET22b, <i>pe</i> B Leader-Sequenz mit <i>T. t.</i> HB8 Cyt. <i>c</i> ₅₅₂ , ohne endogene Signalsequenz, Austausch V83A	diese Arbeit
pDM18 Y8V	Amp ^R , ΔpET22b, <i>pe</i> B Leader-Sequenz mit <i>T. t.</i> HB8 Cyt. <i>c</i> ₅₅₂ , ohne endogene Signalsequenz, Austausch Y8V	diese Arbeit
pDM20	Amp ^R , ΔpET22b mit <i>T. t.</i> HB27 ABC-Operon, C-terminaler His ₆ -Tag, aus pDM14	diese Arbeit
pDM21	Amp ^R , ΔpET22b mit Fragment des <i>T. t.</i> HB8 <i>bc</i> -Operons bis zur vorhandenen Xho-Schnittstelle	diese Arbeit
pDM22	Amp ^R , ΔpET22b, <i>pe</i> B Leader-Sequenz mit <i>T. t.</i> HB8 <i>bc</i> -Operon	diese Arbeit
pDM24	Amp ^R , Gm ^R , ΔpUC18, <i>T. t.</i> HB27 <i>bc</i> -Suizidvektor mit stromauf- und -abwärts Flanken des <i>bc</i> -Operons	diese Arbeit
pDM31	Amp ^R , HTK ^R , ΔpUC18, <i>T. t.</i> HB27 <i>bc</i> -Suizidvektor mit stromauf- und -abwärts Flanken des <i>bc</i> -Operons	diese Arbeit

2.1.8 Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Herkunft
<i>E. coli</i> K12-Stämme: DH5 α	<i>supE</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Res.Lab., Inc
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ^- , Δ (<i>lac</i> - <i>proAB</i>), [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^aZ</i> Δ M15]	Hanahan, 1985
<i>E. coli</i> DE3-Stämme: BL21 (DE3)	<i>F'</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁺</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Novagen
C41 (DE3)	entstanden aus BL21(DE3)	Miroux & Walker 1996
C43 (DE3)	entstanden aus C41(DE3)	Miroux & Walker 1996
<i>T. thermophilus</i> : HB8		DSM Nr. 579, ATCC 27634
HB27		DSM Nr. 7039, ATCC BAA-163

2.1.9 Anzuchtmedien

LB-Medium:

Bactotrypton 1% (w/v)

Hefeextrakt 0,5% (w/v)

NaCl 0,5% (w/v)

pH-Wert: 7,5 mit 1N NaOH-Lösung einstellen

Agar-Platten:

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde LB-Medium mit 1,5% Agar (w/v) versetzt und autoklaviert (20 min bei 121°C). Nach dem Abkühlen auf Handwärme wurde gegebenenfalls steriles Antibiotikum dazugegeben und in Petrischalen gegossen.

Gefrierkulturmedium:

LB-Medium 2-fach konzentriert

Glycerin 20% (v/v)

2.1.10 Antibiotika

Ampicillin:

Stammlösung: 50-100 mg/ml in 50% Glycerin

Konzentration im Medium: 50-100 µg/ml

Chloramphenicol:

Stammlösung: 30-60 mg/ml in Ethanol

Konzentration im Medium: 30-60 µg/ml

Kanamycin:

Stammlösung: 25 mg/ml in 50% Glycerin

Konzentration im Medium: 25 µg/ml

Die Antibiotika werden als Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert (außer ethanolische Lösungen) und bei -20°C gelagert.

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *T. thermophilus*

Eine 50 ml Übernachtskultur von *T. thermophilus* wird auf Eis abgekühlt und anschließend bei 6.000 rpm (Megafuge) für 15 min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen, das Zellpellet in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und nach der Zugabe von 2 ml 20 %iger SDS-Lösung für 30 min bei 65°C inkubiert. Um eine optimale Durchmischung zu erreichen wird dieser Vorgang der Zellyse und auch alle weiteren Inkubationsschritte im Rollerschrank vorgenommen. Die Freisetzung der genomischen DNA bewirkt einen starken Anstieg der Viskosität, so dass die Lösung eventuell durch die Zugabe von Lysepuffer verdünnt werden muß. Sollte das der Fall sein, müssen alle weiteren Volumina entsprechend vergrößert werden. Für die Präzipitation der Proteine werden 6 ml NaClO₄-Lösung unter

Schütteln dem Bakterienlysat zugegeben und mit 7 ml Chloroform bei 45°C so lange vermischt, bis die zwei Phasen vollständig emulgiert sind. Anschließend wird 30 min bei 6.000 rpm (Megafuge) und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen, ohne diese dabei durch gefällte Proteinkomponenten der trüben Zwischenphase zu verunreinigen. Der Überstand wird anschließend mit 0,7 Volumen Isopropanol langsam überschichtet und durch Schräghalten und gleichzeitigen Drehen vorsichtig ineinander überführt. Dabei präzipitiert die genomische DNA als fädiges Knäuel und kann mit einer hakenförmig geformten Pasteurpipette in ein sauberes Gefäß überführt werden. Überschüssige Flüssigkeit wird abgenommen und die DNA bei 68°C in 4,9 ml TE-Puffer und 0,1 ml 20%iger SDS-Lösung gelöst. Es folgt ein RNase Verdau (20 µg/ml) für 20 min bei 37°C. Zur weiteren Extraktion noch vorhandener Proteine wird die Probe mit einem Volumen Phenol/(Chloroform/Isoamylalkohol) gemischt und zur Trennung der Phasen für 40 min bei 37°C und 6.000 rpm (Megafuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen und zur Entfernung eventueller Phenolreste mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol vermischt. Die wässrige Phase wird erneut durch 20 min Zentrifugation bei 6.000 rpm (Megafuge) und RT getrennt, abgenommen und zur Fällung der genomischen DNA mit zwei Volumen kaltem Ethanol abs. in Anwesenheit von 300 mM NaAc überschichtet. Die Fällung sollte für mindestens 8 h bei 4°C erfolgen bevor die DNA durch Zentrifugation (20 min, 6.000 rpm, 4°C) pelletiert und nach Abnahme des Überstandes bei 65°C getrocknet wird. Das Pellet wird in 1 ml TE-Puffer aufgenommen, in ein sauberes Gefäß überführt und bei 65°C solange inkubiert, bis sich die genomische DNA vollständig gelöst hat (eventuell über Nacht). Zur Überprüfung der Reinheit, werden 10 µl DNA-Lösung mit 1 ml TE-Puffer verdünnt und ein Spektrum im Bereich von 230-330 nm gegen TE-Puffer aufgenommen. Der Quotient E_{260}/E_{280} sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Zur Mengenabschätzung der DNA-Lösung werden 5 µl DNA-Lösung zusammen mit einem geeigneten DNA-Standard auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen und im elektrischen Feld getrennt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Bei der DNA-Minipräparation werden die Bakterien durch alkalische Lyse (Birnboim & Doley, 1979) zerstört und die Plasmid-DNA anschließend mit Ethanol gefällt.

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur werden 2 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge13) bei 13.000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Pellet wird vollständig in 100 µl kaltem H₂O resuspendiert, mit 200 µl frisch angesetzter Lösung II versetzt und dadurch zur

Lyse gebracht. Durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes wird der Inhalt gemischt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert, bis die Lösung eine klare und schleimige Konsistenz aufweist. Zur Fällung der genomischen DNA werden 150 µl eiskalte Lösung III zugegeben, durch Invertieren rasch gemischt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wird anschließend für 10 min, 13.000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge (Biofuge13) abzentrifugiert. In einem neuen Reaktionsgefäß wird der Überstand mit dem gleichen Volumen eines Chlorophorm/Isoamyl-Gemisches (24:1, v/v) versetzt und erneut für 10 min, 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Zur Plasmid-DNA Fällung werden der wässrigen Phase zwei Volumen kaltes Ethanol zugegeben, invertiert und für 15 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Im Anschluß wird das Pellet in 50 µl H₂O aufgenommen, resuspendiert und mit 1 µl RNase-Stammlösung versetzt. Die Probe wird 30 min bei 37°C inkubiert und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Restriktionsverdau und elektrophoretische Auftrennung

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, definierte DNA-Sequenzen zu erkennen und zu spalten. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme vom Typ II spalten DNA an einer spezifischen Stelle innerhalb der Erkennungssequenz. Die eingesetzte DNA-Menge richtete sich danach ob der Restiktionsverdau für analytische oder präparative Zwecke eingesetzt werden sollte. Für den Verdau mit Restriktionsendonukleasen werden die vom Hersteller angegebenen Enzym-Puffer verwendet.

Die Restriktion von DNA wird in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt: Dazu werden ca. 100 ng Plasmid (für analytische Zwecke) und 300-400 ng Plasmid (für präparative Zwecke) mit dem/den Enzym/en und 2 µl Enzym-Puffer versetzt und gegebenenfalls mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wird für ca. 1,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend durch die Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt. Die Proben können zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden.

Zur Analyse werden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Grundlage der horizontalen Gelelektrophorese ist die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. In der Agarosematrix wandert die negativ geladenene DNA von der Kathode zur Anode; aufgrund der Porengröße des Agarosegels, wandern große DNA-Fragmente langsamer

als Kleinere, so dass sich mit dieser Methode Gemische aus DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe auftrennen lassen.

Die verwendete Agarose Konzentration richtet sich nach Größe und Verwendungszweck der aufzutrennenden DNA-Fragmente. Zur Auftrennung von großen Fragmenten ist eine geringere Konzentration erforderlich als für Kleine. Die verwendeten Agarosekonzentrationen betragen 0,7% für Fragmente im Bereich 1.000 bp-10.000 bp und 1,2% für Fragmente von 300 bp-5.000 bp.

Für die Herstellung eines Gels wird die benötigte Agarosemenge abgewogen und das entsprechende Volumen TBE-Puffer zugefügt. Die Suspension wird in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wird pro 100 ml Gel 5 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben und das Gel in eine Flachbettkammer mit eingehängten Gelkämmen gegossen. Nach der Polymerisation wird das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Anschließend werden die mit DNA-Probenpuffer versetzten Proben und ein DNA-Größenstandard in die Geltaschen gefüllt und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm durchgeführt.

Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht. Dadurch lassen sich die DNA enthaltenden Banden auf dem Transilluminator bei 305 nm oder unter der UV-Handlampe bei 365 nm sichtbar machen.

2.2.4 Ligation

In den hier durchgeführten Ligationsexperimenten erfolgt der Einbau einer speziellen DNA-Sequenz („Insert“) in einen vorbereiteten Vektor über das Enzym T4-DNA-Ligase (Lehmann, 1974). Diese Reaktion wird begünstigt, wenn Vektor und Insert kohäsive Enden (sticky ends) aufweisen, über die sie reassoziieren können.

DNA-Ligasen katalysieren die Verknüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen der freien Phosphatgruppe des 5'-Endes und der Hydroxylgruppe des Zuckers am 3'-Ende von DNA-Strängen. Die hier verwendete T4-DNA-Ligase benötigt ATP als Cosubstrat. Im Gegensatz zu der DNA-Ligase aus *E. coli*, die als Cofaktor NAD⁺ verwendet, kann die T4-DNA-Ligase auch stumpfe Enden (blunt ends) verbinden.

Bei der Ligation des Vektors mit dem Insert handelt es sich um eine intermolekulare Reaktion. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Schnittstellen an Vektor und Insert sollte die Wahrscheinlichkeit verringern, dass eine intramolekulare Reaktion, d. h. die Religation des Vektors, stattfindet. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen an Vektor und Insert ist, dass das Insert in nur der vorgegebenen Richtung inkloniert werden kann.

Es empfiehlt sich etwa 3x mehr DNA-Insert als Vektor, bezogen auf die Anzahl der Moleküle, einzusetzen. Der Ansatz wird in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Im Regelfall werden 40 ng Vektor und die berechnete Insertmenge mit 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) und Ligationspuffer versetzt. Der Ligationsansatz wird bei 22°C etwa 1 h inkubiert, eventuell auch über Nacht und anschließend für 10 min auf 65°C zur Denaturierung der Ligase erhitzt.

2.2.5 Klenow Fill-in

Das große Fragment (Klenow) der DNA Polymerase I ist ein proteolytisches Produkt der *E. coli* DNA Polymerase I. Sie ist zur Polymerisation in der Lage und trägt 3'-5' Exonuklease Aktivität, sie besitzt jedoch keine 5'-3' Exonuklease Aktivität mehr. Mit diesem Enzym können somit 5'-überhängende DNA Enden eines Doppelstranges aufgefüllt werden, so dass glatte Strang-Enden entstehen.

Dazu wird die DNA in Puffer des Klenow-Fragmentes gelöst, alternativ kann Restriktionsendonuklease Puffer verwendet werden. Dem Ansatz werden 33 µM eines jeden dNTPs zugegeben sowie eine Unit Klenow-Fragment pro µg DNA. Der Ansatz wird für 15 min bei 25°C inkubiert und anschließend mit 10 mM EDTA (Endkonzentration) für 20 min bei 75°C abgestoppt (Sambrook, 1989).

2.2.6 Herstellung CaCl₂ kompetenter-Zellen

Um *E. coli* Empfängerstämme kompetent zu machen, wird eine entsprechende Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,3-0,6) geerntet (Biofuge, 10 min, 4.000 rpm und 4°C) und in eiskaltem TCM-Medium (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂; im Eisbad abkühlen und auf pH 7 einstellen) aufgenommen (Hälfte des Kulturvolumens). Nach 1 h Inkubation auf Eis werden die Zellen erneut abzentrifugiert (Biofuge, 10 min, 4.000 rpm und 4°C), das Pellet wird in dem eiskalten Gemisch aus 80% TCM und 20% Glycerin (ein Zehntel des Kulturvolumens) aufgenommen und resuspendiert.

Die Zellsuspension wird in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.7 Herstellung Rubidiumchlorid kompetenter-Zellen

Zur Herstellung RbCl kompetenter *E. coli* Zellen mit einer Transformationseffizienz, die um einen Faktor von 10² über der von CaCl₂ kompetenten Zellen liegt (Hanahan

1985), werden 2 ml LB-Medium mit einer entsprechenden Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag in 50 ml LB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD von 0,45-0,50 angezogen. Die Zellsuspension wird auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 2.000 g (1°C) abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 7,5 ml eiskaltem TFB-I Puffer aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut bei 3.000 g für 10 min (1°C) pelletiert und anschließend in 2 ml eiskaltem TFB-II resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspension werden in Plastikgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle Lösungen werden in Plastikgefäßen angesetzt, sterilfiltriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.8 Blau-Weiß-Selektion

Bei dieser Selektion können *E. coli*-Stämme, die zur α - Ω -Komplementation befähigt sind, über die Insertionsaktivierung des auf vielen Plasmiden (z.B. pBlueskript und pUC-Plasmiden) enthaltenen *lacZ'*-Anteils der β -Galaktosidase eine grobe Unterscheidung zwischen wahrscheinlich rekombinanten und „leeren“ Plasmiden getroffen werden. Der Einbau von Fremd-DNA in die im *lacZ*-Abschnitt gelegene MCS (multiple Klonierungsstelle) zerstört das Leseraster des Gens und die betroffenen Bakterien bilden in Anwesenheit des Farbstoffes X-Gal keine blauen Kolonien, sondern bleiben farblos.

Eine Agarplatte wird dazu mit einer Mischung aus 10 µl IPTG (50 mg/ml) und 40 µl X-Gal gleichmäßig und steril bestrichen. Nachdem die Platte einige Minuten offen im Brutschrank getrocknet wurde, können Transformationsansätze ausplattiert oder Einzelkolonien ausgestrichen werden.

2.2.9 Hitzeschocktransformation

Für die Transformation wird ein 100 µl Aliquot kompetenter Zellen (siehe oben) 20 min auf Eis aufgetaut. Zu jedem Ansatz werden ca. 5 µl eines Ligationsansatzes zugegeben, mit der Pipette vorsichtig durchmischt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert.

Zum sogenannten „Hitzeschock“ wird der Transformationsansatz für 90 sec auf 42°C erhitzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wird der Ansatz in 900 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotika überführt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach werden Teilmengen (1/10 und 9/10) des Ansatzes auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und zur Selektion über Nacht inkubiert.

2.2.10 Natürliche Transformation in *T. thermophilus* HB27 Zellen

T. thermophilus besitzt eine hohe Transformationskompetenz (Friedrich *et al.*, 2002; Koyama *et al.*, 1986) Plasmid-DNA kann somit über natürliche Transformation mit guter Effizienz in *Thermus* HB27 Zellen eingebracht werden.

Eine Übernachtskultur von *T. thermophilus* HB27 wird zunächst mit 70°C warmem LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 verdünnt und 1:1000 mit CaCl₂/MgCl₂-Lösung (0,1 M CaCl₂, 0,12 M MgCl₂) versetzt. Durch die Zugabe von zweiwertigen Ionen sollen die Zellen, in der anschließenden Wachstumsphase bis zu einer OD₆₀₀ von 1-1,2 bei 70°C, optimal für die Aufnahme von DNA vorbereitet werden. 400 µl einer ausreichend dichten Zellkultur werden dann in ein Plastikgefäß überführt, mit 200-800 ng DNA versetzt und vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wird für 2 h bei 70°C geschüttelt, bevor mit 3 ml warmem LB-Medium aufgefüllt und den Zellen über Nacht bei 70°C im Wasserbadschüttler Zeit zur Aufnahme der DNA gegeben wird. Am nächsten Tag wird der Ansatz für 7 min bei 6.000 rpm und RT zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf vorgewärmte, antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 70°C und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.11 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden durch einen kurzen elektrischen Puls Poren in der Cytoplasmamembran erzeugt, durch die fremde DNA in die Zelle eindringen kann. Es ist wichtig im Anschluß die richtigen Bedingungen zum Wiederverschließen der Poren für den jeweiligen Zelltyp zu wählen.

Von einer Übernachtskultur wird 0,5-1 ml bei 5.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 10%igem Glycerin gewaschen (resuspendiert und erneut zentrifugiert), nach dem zweiten Waschschrift wird das Pellet in 100 µl 10%igem Glycerin aufgenommen. Den Zellen werden ca. 2 ng Plasmid-DNA zugegeben und für 2 min auf Eis gestellt.

Die anschließende Elektroporation wird in vorgekühlten Porationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 1 mm durchgeführt, die dazu zwischen die Elektroden eines Porators (BIO-RAD) gebracht und einem Spannungspuls von 12,5 kV/cm (für *T. thermophilus*) ausgesetzt werden. Der Ansatz wird sofort in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika überführt und anschließend bei optimalen Wachstumsbedingungen für ca. 3 h zur Zell-Regeneration geschüttelt. Die elektroporierten Zellen werden auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und unter optimalen Wachstumsbedingungen über Nacht inkubiert.

2.2.12 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Flüssigkulturen:

Autoklaviertes LB-Medium wird mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes beimpft. Der Kultur wird die entsprechende Antibiotika-Stammlösung in einer 1:1000 Verdünnung zugefügt und anschließend im Luftbadschüttler oder auf einer Schüttelplattform bei 240 rpm geschüttelt.

E. coli-Stämme werden bei 25-37°C und Stämme von *T. thermophilus* bei 70-75°C angezogen.

Erhaltungsplatten:

Zur Erhaltung von Bakterienkulturen werden diese auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei Temperaturoptimum inkubiert. Die Lagerung der Platten kann bis zu vier Wochen in der Kältekammer erfolgen. Wegen der geringen Haltbarkeit von Chloramphenicol müssen die Kulturen wöchentlich auf frische Platten überstrichen werden.

Gefrierkulturen:

Zur Lagerung und Erhaltung von Bakterienkulturen auf Dauer werden Gefrierkulturen hergestellt. Dazu werden 1,5 ml einer 2 ml Übernachtskultur des entsprechenden Stammes 3 min bei 6.000 rpm in der Tischzentrifuge (Biofuge13) abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 800 µl Gefriermedium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für Klonierungsexperimente und zur Einführung neuer Schnittstellen wird die Methode der „Polymerase-Kettenreaktion“ PCR angewendet.

Die PCR wird in einem 100 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Dabei dient isolierte genomische DNA oder Plasmid-DNA als Vorlage (Template). Dem Reaktionsansatz werden je 50 pmol der beiden geeigneten Primer, Polymerasepuffer, 0,2 mM dNTPs zugegeben und gegebenenfalls mit H₂O aufgefüllt. Um die Spezifität der Basenpaarungen zu erhöhen, können eventuell 5-8% DMSO zugegeben werden.

Die PCR wird in einer PCR-Apparatur (Thermocycler) in 30 sukzessiven Zyklen, bestehend aus drei Phasen durchgeführt:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95°C für 30 sec.
2. Anlagerung (annealing) der Primer an den DNA-Einzelstrang für 30 sec, wobei sich die Annealing-Temperatur nach der Länge und dem GC-Gehalt der verwendeten Primer richtet.
3. DNA-Synthese (elongation) bei 68°C, die Dauer der Elongation richtet sich dabei nach der Syntheserate der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des zu synthetisierenden Fragmentes.

Die Anzahl der Zyklen kann nach gewünschter Ausbeute gewählt werden. Vor dem ersten Zyklus findet für 5 min eine zusätzliche Denaturierung statt, nach der 2 Units der gewünschten DNA-Polymerase zugegeben werden (*Hot start* PCR). Nach dem letzten Zyklus wird der Ansatz bei 72°C für 10 min inkubiert, um die vollständige Synthese aller Amplifikate zu gewährleisten.

Zur Kontrolle werden 5 µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Kap. 2.2.3).

2.2.14 Ganzzell PCR mit *T. thermophilus* HB27

Zur Überprüfung der homologen Rekombination, aber auch nach Elektroporation von Plasmiden in *T. thermophilus* HB27 können Einzelkolonien direkt anhand einer spezifischen PCR identifiziert werden. Der PCR-Ansatz wird in einem Volumen von 50 µl in fest verschließbaren Plastikgefäßen durchgeführt. Zunächst werden 27 µl H₂O vorgelegt und darin genügend Zellmaterial von *T. thermophilus* HB27 resuspendiert. Die Zellsuspension wird für 20 min bei 110°C erhitzt und während dieser Zeit mehrfach gemischt. Anschließend wird die Probe auf Eis abgekühlt und die übrigen Komponenten für die PCR Reaktion zugegeben (siehe oben). Die Anwesenheit von 5% DMSO und die Durchführung eines *Hot starts*, also die Zugabe der Polymerase nach erfolgter Trennung der Doppelstrang DNA, führt zu guten Ergebnissen. Eine Positiv-Kontrolle sollte bei jedem Ansatz mitgeführt werden.

2.2.15 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Für den vollständigen Ablauf der nachfolgenden Mutagenesereaktion muß das 5' Ende der Primer phosphoryliert werden. Dazu werden in einem 20 µl-Ansatz 2 µl Polynukleotidkinase Puffer (10x), 4 µl ATP-Lösung (5 mM), 1 µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl), sowie 100 pmol des Primers gemischt und mit H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend bei 70°C für 10 min inaktiviert.

2.2.16 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese wurde grundlegend nach der *QuikChange*-Methode (Stratagene) durchgeführt. Der Ablauf und die Reaktionskomponenten wurden jedoch in unserem Arbeitskreis abgewandelt und optimiert. Unter Verwendung des hier beschriebenen Protokolls können eine oder mehrere Mutationen gleichzeitig und dabei zielgerichtet in Plasmide eingeführt werden. Für die Mutagenesereaktion werden 2,5 µl DNA Polymerase-Puffer (10x, + MgSO₄), ca. 50 ng des Ausgangsplasmids, 10 µl dNTPs (2 mM), je 10 pmol der phosphorylierten mutagenen Primer, 2,5 µl NAD⁺-Lösung (5 mM), 1 µl *Pfu*-DNA Polymerase (2,5 U/µl), 1 µl thermostabile Ampligase (5 U/µl) mit H₂O bis zu einem Volumen von 25 µl aufgefüllt und anschließend sorgfältig vermischt. Der Ansatz wird in ein festverschließbares Reaktionsgefäß überführt und mit Mineralöl überschichtet. Zur Trennung der parentalen DNA in zwei Einzelstränge wird die Probe bei 95°C im Thermocycler erhitzt und zur Anlagerung der Primer an den komplementären DNA-Strang anschließend auf 55°C abgekühlt. Im nachfolgenden Schritt bei 65°C kommt es zur Elongation der Primer durch die *Pfu*-Polymerase bevor die NAD⁺-abhängige Ampligase das entstehende 3'-Ende mit dem 5'-Ende des Primers verknüpfen kann. Auf diese Weise entsteht doppelsträngige zirkuläre DNA mit der gewünschten Mutation. Zur Vervielfältigung wird der Reaktionszyklus 30-mal wiederholt, das Aufschmelzen und Annealing erfolgt dabei jeweils für 1 min, die Syntheszeit richtet sich nach verwendeter DNA Polymerase (*Pfu*-Polymerase 2 min/kb) und der Länge des Ausgangsplasmids. Nach abgeschlossener Mutagenesereaktion werden 20 µl des Ansatzes entnommen, bei eventueller Verunreinigung mit Mineralöl kann die Probe mittels QiaQuick Gel Extraktions Kit (Qiagen) aufgereinigt werden, um die nachfolgenden Reaktionen nicht zu beeinträchtigen. Zum spezifischen Verdau der Ausgangs-DNA wird anschließend ein Restriktionsverdau mit DpnI durchgeführt. Diese Restriktionsendonuklease schneidet selektiv methylierte DNA-Moleküle und zerstört dadurch das nicht mutierte Templat. Dem 30 µl-Ansatz wird neben der Probe (ca. 20 µl), 1 µl DpnI, 3 µl Puffer (10x) H₂O zugegeben und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der enzymatischen Reaktion erfolgt bei 80°C für 20 min. Der Reaktionsansatz wird anschließend in DH5α- oder JM 109-Zellen transformiert und die Plasmid-DNA von mehreren Einzelkolonien zur Identifizierung präpariert. Wenn möglich, wird die Kontrolle der Mutagenesereaktion über ein verändertes Restriktionsmuster überprüft und durch Sequenzierung verifiziert. Die Sequenzierung des DNA-Abschnitts soll auch unerwünschte *second-site* Mutationen aufdecken, die durch eine mäßig genaue Synthese der *Pfu*-Polymerase auftreten können.

2.2.17 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Mutagenesereaktionen und PCR-Produkten aber auch zur Analyse des *T. thermophilus* HB8 *bc*-Operons wurde die genaue Basenabfolge von DNA-Abschnitten durch Sequenzierung bestimmt. Plasmid-DNA und entsprechend komplementäre Primer wurden dazu der Firma Scientific Research and Development GmbH zur Verfügung gestellt, die die Sequenzierung grundlegend nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit fluoreszenzmarkierten Terminatoren durchführt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine können nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) in denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. In dieser Arbeit werden Polyacrylamidgele nach H. Schägger (Schägger & von Jagow, 1997) verwendet, die eine präzise Darstellung von Proteinen im Bereich von 1-100 kDa ermöglichen.

Zur Vorbereitung werden die Proteinproben 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 37-80°C (je nach Proteinprobe) erhitzt. Dadurch werden Wasserstoffbrücken gelöst und die Polypeptidkette gestreckt, so dass sich Sekundär- und Tertiärstrukturen auflösen. Das im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol dient als Reduktionsmittel zur Spaltung von Disulfidbrücken. Ein Überschuß des anionischen Detergenz SDS gewährleistet eine konstante Ladungsverteilung auf den Polypeptidketten, so dass eine Auftrennung aufgrund der Masse erfolgen kann, die nahezu unabhängig von der Eigenladung des Proteins ist.

Der vorbereitete Trenngelansatz wird mit 20 μ l TEMED und 100 μ l frischem APS (10% w/v) gemischt und in eine geeignete Gelvorrichtung gegossen. Nach vollständiger Polymerisation wird in gleicher Weise mit Sammelgel überschichtet und ein Probenkamm eingeführt. Eine Elektrophoreseapparatur aus zwei getrennten Kammern wird mit ausreichend 1x Anoden- bzw. 1x Kathodenpuffer gefüllt und das ausgehärtete Gel eingespannt. Die entstandenen Geltaschen werden mit Puffer gespült, um eventuelle Acrylamidreste zu entfernen und mit den Proteinproben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches erfolgt bei konstanten 100 V für ca. 90 min.

2.3.2 Coomassie-Färbung

Die mit elektrophoretischen Methoden aufgetrennten Proteingemische können im SDS-Gel durch Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau im Bereich von 100 ng- 1 µg sichtbar gemacht werden.

Dazu wird das SDS-Polyacrylamidgel für 1 h in Färbelösung geschwenkt und anschließend solange mit Entfärbelösung gewaschen, bis sich die Proteinbanden deutlich vor dem Hintergrund abzeichnen. Der bei der Proteinauftrennung mitgeführte Protein-Größenstandard ermöglicht nun die Abschätzung des Molekulargewichtes der einzelnen Proteinbanden.

2.3.3 Silberfärbung

Mit der Silberfärbung können Proteine noch im Subnanogramm-Bereich nachgewiesen werden. Die von den Proteinen gebundenen Silber-Ionen werden, initiiert durch funktionelle Gruppen und Peptidbindungen, zu Silberkeimen reduziert, die anschließend durch starke Reduktionsmittel zu metallischem Silber reduziert werden.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine werden zunächst in der Essigsäure enthaltenden Lösung zur Vorinkubation über Nacht fixiert. Nachdem dreimal je 20 min mit 50%igem Ethanol gewaschen wurde, wird das Gel für 1 min in die Vorbehandlungslösung gegeben und anschließend dreimal für je 20 sec mit H₂O gespült. Anschließend wird das Gel für 20 min in der Färbelösung geschwenkt und wiederum für dreimal je 20 sec mit H₂O gespült. Bei der nun folgenden Entwicklung, wird das Gel solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis sich die braunen Proteinbanden vor hellem Hintergrund abzeichnen. Dann muß die Reaktion nach kurzem Abspülen mit H₂O sofort mit Stopplösung abgebrochen werden, um eine zu starke Anfärbung zu vermeiden.

2.3.4 Häm-Färbung

Im Anschluß an eine SDS-gelelektrophoretische Proteinauftrennung kann zum spezifischen Nachweis von kovalent gebundenen Häm-Gruppen, integriert in c-Typ Cytochrome, eine Häm-Färbung durchgeführt werden (Thomas *et al.*, 1976; Holland *et al.*, 1974). Die Färbemethode basiert auf den Peroxidase-Eigenschaften von Hämgruppen, die mit 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin (TMBZ) und H₂O₂ spezifisch nachgewiesen werden können.

Die Proteinproben werden hier zur Vorbereitung mit Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol versetzt. Das Gel wird nach der Elektrophorese für 1 h in Lösung I

inkubiert. Nach Anfärbung im Dunkeln mit Lösung II wird die Färbereaktion mit Lösung III abgestoppt. Die nun geschrumpften Gele können in 10%iger Essigsäure auf Ausgangsgröße gequollen werden.

2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge in einer Probenlösung kann durch Färbetests erfolgen. Dabei sind die funktionellen Gruppen der Proteine an Farbreaktionen mit Farbstoffbildenden Reagenzien beteiligt; die Intensität des Farbstoffs kann in direkte Korrelations zur Proteinkonzentration gesetzt und über spektrophotometrische Messung bestimmt werden.

Im Lowry-Assay (Lowry *et al.*, 1951) wirkt der in der Biuret-Reaktion gebildete Kupfer-Protein-Komplex unterstützend auf die Reduktion des im Folin-Ciocalteau-Reagenz enthaltenen Molybdats vor allem durch Tyrosin und Tryptophan, in geringem Maße Cystein und Histidin der Proteine.

Zur Erstellung einer Eichreihe werden Verdünnungen einer BSA-Stammlösung angesetzt. Ein Volumen von 50 µl der Verdünnungen, der Proben sowie zwei Blindwerten aus H₂O werden mit je 850 µl der frisch angesetzte Arbeitslösung (20 ml Lowry A; 0,5 ml SDS 20%; 0,2 ml Lowry B1; 0,2 ml Lowry B2) gemischt und 10 min im Dunkeln inkubiert. Danach werden 100 µl des Folin-Ciocalteau-Reagenz zugegeben, gut gemischt und für weitere 30 min im Dunkeln inkubiert. Die resultierende tiefblaue Färbung wird bei 750 nm gemessen; nach Erstellung der Eichreihe kann mit dieser auf die Proteinkonzentration in der Probe geschlossen werden.

2.3.6 Membranpräparation und –solubilisierung

Nach Anzucht der Bakterienkulturen werden die Zellen bei 5.000 rpm (Sorvall RC3C 10 min 4°C) geerntet und das Zellpellet in einem geeigneten Puffer (50 mM KPi⁻, NaPi⁻-Puffer oder Tris/HCl pH 7-8 resuspendiert). Zur Proteaseinhibierung wird die Zellsuspension mit Pefabloc (2 mM) versetzt. Durch die Zugabe von Lysozym (4 mg/ml) und Ultrabeschallung (Branson Sonifier, Stufe 4, 40%, dreimal 10 min) werden die Zellwände aufgeschlossen und die festen Zellbestandteile in der Ultrazentrifuge bei 130.000 g für 45 min abgetrennt. Die geleeartige Oberschicht des entstandenen Pellets enthält die Membranfraktion und wird vollständig mit einem Spatel abgenommen. Anschließend werden die Membranen in einem geeigneten Puffer aufgenommen (siehe oben) und mit einem Homogenisator gründlich resuspendiert.

Für die nachfolgende Solubilisierung wird zunächst die Proteinkonzentration des Homogenisats nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951) bestimmt (siehe 2.3.5). Weiterhin wird das Membransolubilisat auf eine Endkonzentration von 10 mg Protein pro ml in ein geeignetes Puffersystem (50-100 mM pH 7-8) verdünnt. Die Detergenzmenge, die für eine vollständige Solubilisierung notwendig ist, wird zunächst in kleinen Testansätzen bestimmt und dann im gewünschten Verhältnis zur Menge der Membranproteine zugegeben. Außerdem kann die Zugabe von NaCl und auch weiterer Zusätze zur Unterdrückung hydrophober Wechselwirkungen sinnvoll oder notwendig sein. Der Solubilisierungsansatz wird, je nach Protein und verwendetem Detergenz für 30 min bis 3 h bei 4°C gerührt und anschließend für 30 min bei 130.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten Membranbestandteilen sollte sofort weiterverarbeitet werden.

2.3.7 Expression und Aufreinigung des löslichen Cytochrom *c*-Fragments

Das lösliche Fragment von Cytochrom *c* aus *T. thermophilus* mit einem Molekulargewicht von 9,4 kDa wurde in den Vektor pET22-b kloniert und mit Häm-*c* Cofaktor heterolog in *E. coli* Zellen exprimiert (Mooser *et al.*, 2005).

Zur Isolierung dieses Fragmentes werden 50 ml LB-Medium mit einer Gefrierkultur von MA37 beimpft, mit Ampicillin und Chloramphenicol (Stammlösung 1:1000 verdünnt) versetzt und bei 32°C geschüttelt. Nach ca. 8 h werden je 10 ml dieser Vorkultur zur Beimpfung von 2,5 l LB-Medium mit Antibiotika genutzt, die bei 32°C über Nacht geschüttelt werden. Die Ernte der 10 l Kultur erfolgt, wenn genommene Proben nach Zentrifugation ein rotes Zellpellet aufweisen. Dann werden die Zellen für 15 min bei 5.000 rpm und 4°C abzentrifugiert.

Das Zellpellet wird auf Eis in kaltem Periplasmapuffer (100 mM Tris/HCl, 500 mM Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen und resuspendiert. Nach der Zugabe von Lysozym wird der Ansatz für 30 min bei 4°C gerührt und anschließend 1:1 mit H₂O verdünnt. Nach nochmaligem Rühren für 30 min bei 4°C werden die unlöslichen Bestandteile für 30 min bei 130.000 g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird nach eventueller Ultrabeschallung durch einen Faltenfilter filtriert und auf einen pH-Wert von 8 eingestellt.

Zur Aufreinigung wird die Periplasmapräparation auf eine Säule mit Q-Sepharose High Performance (Amersham Bioscience) aufgetragen, die zuvor ausreichend mit Waschpuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) äquilibriert wurde. Nach erneutem Waschen, wird das Protein mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 700 mM NaCl, pH 8), der über einen Gradientenmischer (Flußgeschwindigkeit 0,2 ml/min)

zugeführt wird, innerhalb von 2 h in Fraktionsröhrchen eluiert. Die an der roten Färbung erkennbaren Cytochrom-Fractionen werden gepoolt und auf eine Säule mit Sephacryl S100 (Amersham Bioscience) zur Gelfiltration aufgetragen, die zuvor mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) äquibriert wurde. Nach der Elution mit Waschpuffer werden erneut die rotfarbigen Fractionen gepoolt, in Konzentratoren (Vivascience) mit geeigneter Porengröße (3.000 *cut off*) ankonzentriert und in einem SDS-Polyacrylamidgel auf Reinheit überprüft. Die Konzentration kann über ein Redoxspektrum bestimmt werden.

2.3.8 Expression und Aufreinigung des Vollängen-Cytochom c

Das Plasmid pDM3 und der Hilfsvektor pEC86 (Arslan *et al.*, 1998) werden sukzessive in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und auf LB_{Amp/Cm}-Platten selektioniert. Die Einzelklone werden in einer Testexpression überprüft, ein geeigneter Klon wird für die weitere Hauptkultur verwendet und in Gefrierkulturmedium bei -80°C gelagert. Der Hauptkultur wird eine Vorkultur vorangestellt, die Expression des *T. thermophilus* Cytochom c wird in LB_{Amp/Cm}-Medium bei 32°C durchgeführt. Die Induktion mit IPTG ist optional und führt zu keiner erkennbaren Verbesserung der Proteinexpression. Die Zellen werden bei 5.000 rpm (Sorvall RC3C 10 min 4°C) geerntet, in 50 mM KP_i pH 8 resuspendiert und durch Ultraschallung aufgeschlossen. Die Membranfraction wird durch Ultrazentrifugation (130.000 g) separiert und anschließend in 50 mM KP_i pH 8 homogenisiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Solubilisierung in einem Protein:Detergenz-Verhältnis von 1:3 (Triton X-100), bzw. 1:2 (DM) für 1 h bei 4°C unter Rühren durchgeführt. Nach erneuter Ultrazentrifugation (130.000 g) wird der Überstand durch einen Faltenfilter filtriert und auf eine äquibrierte (50 KP_i pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% DM oder 0,5% Triton X-100) Ni-NTA Säule aufgetragen. Die Säule wird mit oben genanntem Puffer bis zum Wiedererreichen der Basislinie bei 280 nm gewaschen. Die Proteinelution wird durch Anlegen eines kontinuierlichen Imidazolgradienten von 0-150 mM Imidazol erreicht. Die Probe eluiert bei ca. 90 mM Imidazol und ist leicht anhand der rot gefärbten Fractionen zu erkennen. Diese werden gepoolt, ankonzentriert und über eine Gelfiltration (Sephacryl S100, 50 KP_i pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% DM oder 0,5% Triton X-100) weiter gereinigt.

2.3.9 Expression und Aufreinigung der *ba*₃-Oxidase

Das Plasmid pDM16 wird in *T. thermophilus* HB27 elektroporiert und auf LB_{Km}-Platten bei 70°C selektioniert. Zur Kontrolle werden Einzelklone für eine Plasmidpräparation

angezogen, Plasmid-DNA isoliert und die Identität in einer spezifischen PCR-Reaktion verifiziert. Ein geeigneter Einzelklon wurde bei -80°C in Gefrierkultur-Medium gelagert und für eine Vorkultur in LB_{Km} -Medium über Nacht bei 70°C im Wasserbadschüttler angezogen. Da das Plasmid mit vorgeschaltetem *bc*-Promotor konstruiert wurde, kann die gesamte Anzucht unter aeroben Bedingungen erfolgen. Für die Hauptkultur werden am nächsten Tag LB_{Km} -Medium 3%ig mit der dicht bewachsenen Vorkultur angeimpft und weitere 18 h inkubiert. Zur Ernte werden die Zellen auf RT abgekühlt und bei 5.000 rpm (Sorvall RC3C 10 min 4°C) pelletiert. Anschließend wird das Zellpellet in 100 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Durch Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier, Stufe 4, 40%, dreimal 10 min) werden die Zellen aufgeschlossen und durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 6.000 rpm, 10 min, 4°C) grobe Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wird erneut zentrifugiert (35.000 rpm, 60 min, 4°C) und das Membranpellet in 100 mM Tris/HCl Puffer pH 8 resuspendiert, so dass eine ca. 10 mg/ml Proteinlösung entsteht. Diese Suspension wird auf 5% Triton X-100 eingestellt, für 3 h solubilisiert und ultrazentrifugiert (130.000 g) um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wird abgenommen, zusätzlich über einen Faltenfilter gereinigt, 1:5 (v/v) mit detergentenfreiem Puffer verdünnt und so den Startbedingungen der nachfolgenden Metallaffinitätssäule angenähert. Die Ni-NTA Säule wird mit Puffer (0,5% Triton X-100, 50 mM NaP_i pH 8, 100 mM NaCl) äquilibriert bevor der Solubilisierungsansatz langsam aufgetragen und unter den gleichen Pufferbedingungen mit mehreren Säulenvolumina gewaschen wird. Die Elution des Proteins erfolgt durch Anlegen eines Imidazolgradienten von 0-150 mM. Die durch die Häm-Cofaktoren grün-bräunlich gefärbten Fraktionen eluieren bei ca. 60 mM Imidazol, werden vereinigt, ankonzentriert und über eine Gelfiltration (Sephacryl S200 in 0,5% Triton X-100, 50 mM NaP_i pH 8, 150 mM NaCl) weiter aufgereinigt. Falls das starke Detergenz Triton X-100 bei weiterführenden Analysen stört, kann das auf der Ni-NTA gebundene Protein in 0,05% DM-haltigem Puffer (ansonsten gleiche Zusammensetzung, siehe oben) mit mehreren Säulenvolumina umgepuffert werden. Das Konstrukt pSF4 in *T. thermophilus* HB27 kodiert für ein His_{10} -Tag und eluiert entsprechend bei höheren Imidazol-Konzentrationen (ca. 90 mM). Da es unter der Kontrolle des *ba*₃-Promotors steht muß es unter mikroaerophilen Bedingungen angezogen werden, die Ausbeute wird dadurch verringert.

2.3.10 Expression und Aufreinigung des Rieske-Fragments

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wird mit dem Plasmid pSF1 transformiert und auf LB_{Amp}-Platten selektioniert. In einer Testinduktion mit nachfolgender Kontrolle im SDS-Gel wird ein Klon mit guter Expression für die Hauptkultur gewählt und als Gefrierkultur bei -80°C gelagert. Die Hauptkultur wird über Nacht bei 32°C angezogen und am nächsten Morgen 1:10 mit LB_{Amp}-Medium verdünnt. Die Zellen werden weiter bis zu einer OD von 0,75-1,2 bei 32°C inkubiert und anschließend mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach ca. 3,5 h werden die Zellen geerntet und das bräunliche Zellpellet in 10 mM Tris/HCl Puffer pH 8 resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit Lysozym (4 mg/ml), Pefabloc (2 mM) und 0,1%ig mit Triton X-100 versetzt und 1 h bei 32°C gerührt. Die geöffneten Zellen werden dann auf Eis gekühlt und die genomische DNA durch Ultrabeschallung fragmentiert. Die Lösung wird zusätzlich mit 40 U/ml DNase versetzt und erneut bei 32°C für 30 min gerührt. Die festen Bestandteile werden bei 12.000 g für 20 min (4°C) separiert und der bräunliche Überstand für eine 55%ige Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. Das Salz wird langsam und unter ständigem Rühren bei RT zugegeben bis es sich vollständig gelöst hat (ca. 15 min). Die Probe wird wie oben angegeben zentrifugiert und in analoger Weise auf 70% Ammoniumsulfat gebracht. Die Lösung wird für weitere 15 min gerührt und erneut abzentrifugiert. Das bräunliche Pellet wird in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8 resuspendiert und gegen den gleichen Puffer in Anwesenheit von 0,1 mM EDTA über Nacht dialysiert. Die Probe wird anschließend auf eine mit 20 mM Tris/HCl Puffer pH 8 äquilibrierte Säule (Q Sepharose Fast Flow) aufgetragen, mit Auftragspuffer gewaschen und innerhalb von 60 min mit einem Gradienten von 0-500 mM NaCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen werden im SDS-PAG auf Reinheit kontrolliert, gepoolt, ankonzentriert und unter Verwendung der oben genannten Puffern über eine zweite Anionenaustauschersäule (DEAE-Sepharose CL6B) nachgereinigt. Es folgt eine erneute Kontrolle der Einzelfraktionen im SDS-PAG.

2.3.11 Aufreinigung des Cytochrom c₅₅₂

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) wird mit den Plasmiden pDM18 und pEC86 nacheinander transformiert und auf LB_{Amp/Cm}-Platten selektioniert. Anschließend wird eine Testexpression im kleinen Maßstab durchgeführt, um einen gut exprimierenden Klon zu identifizieren. Dieser wird in Gefrierkulturmedium bei -80°C gelagert oder für eine Anzucht in 100 ml LB_{Amp/Cm}-Medium angeimpft. Die Vorkultur wird bei 37°C angezogen, nach 4 h für die Hauptkultur 1:250 in LB_{Amp/Cm}-Medium verdünnt und bei RT über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag werden die Zellen geerntet (Sorval RC3C,

5.000 rpm, 10 min) und in einer Periplasmapräparation geöffnet, ohne dass dabei die Cytoplasmamembran zerstört wird. Dafür wird das Zellpellet in Periplasmapuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 500 mM Sucrose) resuspendiert und in Gegenwart von Lysozym (10 µg/ml) und Pefabloc (10 µM) für 3 h bei RT gerührt. Durch Einwirkung von Lysozym und einer Verdopplung des Volumens mit H₂O wird das Periplasma freigesetzt. Die festen Bestandteile werden durch 1 h Zentrifugation bei 35.000 rpm und 4°C separiert. Der Überstand wird auf pH 8 eingestellt und eventuell vorhandene genomische DNA durch Ultrabeschallbehandlung fragmentiert. Vor der chromatographischen Aufreinigung wird der Ansatz über einen Faltenfilter filtriert und auf eine zuvor äquilibrierte (50 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) CM-Sepharose aufgetragen. Innerhalb 4 Säulenvolumina wird ein Gradient bis 300 mM NaCl angelegt und das Cytochrom *c*₅₅₂ eluiert. Die rot gefärbten Fraktionen werden im SDS-Gel auf Verunreinigungen hin kontrolliert, entsprechend gepoolt und ankonzentriert. Für die nachfolgende Gelfiltration wird eine Sephacryl S100 Säule mit Laufpuffer äquilibriert (50 mM NaCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Die fraktionierte Probe wird anschließend spektroskopisch auf einen typischen Schulterbereich im aufsteigenden Ast des Hauptpeaks kontrolliert und eventuell die 1. Ableitung des Spektrums berechnet. Bei spektroskopischen Abweichungen kann die Bindung und graduelle Elution des Cytochroms auf der CM-Sepharose unter gleichen Pufferbedingungen wiederholt werden. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen kann hierbei ein zweiter, ebenfalls rot gefärbter Cytochrom Peak eluiert werden, der sich in den spektralen Eigenschaften (UV-vis, CD, siehe Ergebnisteil) unterscheidet.

2.3.12 Western-Blotting

Die Technik des Protein-Blotting mit anschließender Immundetektion wurde 1979 von Tomlin und Renard eingeführt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und darauf fixiert. Die immobilisierten Proteine können in den nun folgenden Schritten spezifische Antikörperreaktionen eingehen und die dadurch entstandenen Immunkomplexe in einer sich anschließenden enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wird das Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) gelegt und in eine mit Transfer-Puffer gefüllte vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Der Transfer wird bei konstanten 400 mA für 1 h durchgeführt.

Anschließend wird die Membran bis zum Erscheinen der roten Proteinbanden (für ca. 5 min) unspezifisch in Ponceaurot-Lösung angefärbt und nach Markierung der

Protein-Markerbanden vollständig mit H₂O entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird die Membran für 30 min in NCS-Lösung geschwenkt. Anschließend wird der spezifische Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in NCS zugegeben und für mindestens 1 h inkubiert. Es folgen drei Waschschrte mit NCS für je 10 min, bevor ein in NCS verdünnter 2. Antikörper, gekoppelt an Alkalische Phosphatase (AP) oder ein Protein A-AP-Konjugat zur Detektion des 1. Antikörpers zugegeben und ebenfalls für mindestens 1 h inkubiert wird. Um unspezifische Bindungen zu lösen folgen Waschschrte mit TBS-Triton X-100, TBS und TMN für jeweils 10 min. Der auf der Membran gebundene Immunkomplex wird mit der NBT/BCIP-Färbelösung überschichtet und im Dunkeln entwickelt. Die bei Redox-Reaktionen entstehenden Produkte bilden einen Komplex, der als blauer Farbstoff ausfällt und die spezifische Immunreaktion sichtbar macht. Die Reaktion wird mit 50 mM EDTA abgestoppt.

2.3.13 Probenvorbereitung für MALDI-MS

Die in einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennten und anschließend mit einer Coomassie-Färbung dargestellten Proteine werden im Gel einem enzymatischen Verdau unterzogen werden. Die daraus resultierenden Peptidfragmente können anschließend massenspektrometrisch analysiert werden.

Bei der gesamten Probenvorbereitung für MALDI-MS ist darauf zu achten, dass die Probe nicht kontaminiert wird. Vor allem um Verunreinigungen mit Keratin zu vermeiden, sollten während der gesamten Prozedur Handschuhe getragen und wenn möglich unter einer Sterilbank gearbeitet werden.

Zunächst wird die gewünschte Coomassie-Bande, eine BSA-Bande als Standard und ein Gelstück ohne Protein als Blindprobe ausgeschnitten. Diese werden dreimal für je 15 min, unter leichtem Schütteln, mit 400 µl Millipore Wasser gewaschen und anschließend als ca. 1 mm kleine Gelstücke je in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Um das SDS aus dem Gel zu entfernen, wird nun dreimal für je 15 min und unter leichtem Schütteln mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Nun wird das Gel dehydriert und dazu zweimal für 10 min in 100 µl Acetonitril geschüttelt. Anschließend werden die Gelstücke in einer Speedvac-Zentrifuge für 15-20 min getrocknet.

Zur nun folgenden Reduktion der Disulfidbrücken, werden die Gelstücke mit 100 µl Reduktionslösung bedeckt, für 1 h bei 56°C inkubiert und im Anschluß auf RT abgekühlt. Die S-Alkylierung wird für 45 min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Dazu werden die Proben mit 100 µl Alkylierungslösung bedeckt und einige Male gemischt. Es wird dreimal für je 5 min mit 100 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung gewaschen, bevor die Gelstücke durch Schrumpfen und Quellen gereinigt werden.

Dazu wird mit 100 μ l Acetonitril überschichtet, für 5 min geschüttelt, der Überstand abgenommen, mit 100 μ l 100 mM Ammoniumbicarbonat überschichtet und für weitere 5 min geschüttelt. Die Proben werden erneut für 5 min mit 100 μ l Acetonitril geschüttelt, bevor sie für mindestens 20 min in der Speedvac-Zentrifuge getrocknet werden.

Die getrockneten Gelstücke werden mit Trypsin-Lösung bedeckt und für 45 min auf Eis gestellt. Der Überstand wird anschließend abgenommen, durch Waschpuffer II ersetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der Ansatz wird für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand mit den Peptidfragmenten abgenommen. Zur vollständigen Extraktion der im Gel verbliebenen Peptide, werden die Proben mit 20 mM Ammoniumbicarbonat und dreimal mit einer Lösung aus 5% Ameisensäure/ 50% Acetonitril überschichtet, je 20 min bei 15.000 g zentrifugiert und die Überstände gesammelt. Die vereinigten Extrakte werden in der Speedvac-Zentrifuge für 20-60 min getrocknet und bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt.

Zur Messung werden die Proben nach der Dünnschicht-Methode (Thin layer) auf dem Probenteller präpariert. Dazu wird zunächst die Matrix (α -Cyano-4-Hydroxymizsäure) verteilt, die nach Verdampfen eine dünne homogene Schicht aus Kristallen bildet. Darauf wird die Probe aufgetragen, die nach dem Trocknen noch mit 0,1%iger Trifluoressigsäure gewaschen werden kann.

2.3.14 Redox-Spektren

Proteine haben im UV/Vis-Bereich unterschiedliche spektrale Eigenschaften, anhand derer sie in Absorptionsspektren charakterisiert werden können. So beeinflussen Chromophore als prosthetische Gruppe das spektrale Verhalten eines Proteins abhängig des Redoxzustandes und der Mikroumgebung.

Die Absorptionmessungen werden im Bereich von 500-650 nm, sowohl am Kontron Uvicon 941 als auch am Hitachi U3000 Spektrophotometer aufgenommen. Dazu wird die Proteinlösung in einem geeigneten Puffer verdünnt, der außerdem zur Aufnahme einer Basislinie im gewählten Spektrenbereich dient, gegen die im Weiteren gemessen wird. Nach Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat zur Proteinlösung wird das Oxidationsspektrum aufgenommen. Die Probe wird anschließend durch eine Spatelspitze Dithionit reduziert und erneut gemessen. Durch Subtraktion wird das Oxidationsspektrum vom Reduktionsspektrum abgezogen und man erhält ein Redox-Differenzspektrum.

Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten der Probe kann über das Lambert-Beersche-Gesetz die Konzentration der Proteinlösung bestimmt werden.

2.3.15 Pyridin-Hämochrom-Spektren

Liegen mehrere Häm-Gruppen in einer Lösung vor, kann die Konzentration von Pyridin-Hämochromen direkt bestimmt werden, ohne dass andere Häm-Klassen extrahiert werden müssen (Berry & Trumpower, 1986). Die Proteinlösung wird dazu mit einem denaturierenden Puffer aus 20% Pyridin und 50 mM NaOH gemischt und das Redoxspektrum wie oben beschrieben ermittelt. Die Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Häm-Klasse können in der angegebenen Referenz nachgeschlagen und auf diese Weise die Konzentration der Häm-Gruppe bestimmt werden

2.3.16 ATPase-Test

Die ATPase Aktivität der isolierten homolog und heterolog exprimierten *T. thermophilus* HB27 MDL-ähnlichen Proteine kann nach der Malachit-Grün Methode (Baykov, *et al.* 1988) in Abhängigkeit der ATP-Konzentration bestimmt werden. Das bei diesem Test durch ATP-Hydrolyse entstehende anorganische Phosphat kann durch eine Reaktion mit Malachitgrün kolorimetrisch nachgewiesen werden und dient bei dieser Methode somit als Maßeinheit für die Aktivität des Proteins. Der hier verwendete Assay wurde von S. Dinkelaker für die Verwendung thermostabiler Proteine optimiert. Der jeweiligen Probe (ca. 1 µg) wird 25 µl Bindepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) und 0-5 mM ATP zugegeben und anschließend für 4 min bei 80°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 175 µl eiskalter H₂SO₄ (20 mM) gestoppt und weiterhin auf Eis inkubiert. Die Proben werden auf Mikrotiterplatten übertragen und gleichzeitig mit frisch angesetzter Färbelösung (0,28 mM Malachit-Grün Lösung, 0,17% Tween-20, 1,48% Ammonium Molybdat Tetrahydrat) versetzt. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei RT bevor die Absorptionsänderung bei 620 nm gegen Phosphatpuffer (0-6 nmol) gemessen wird. Von dem ermittelten Messwert wird der Leerwert (ATP in Puffer ohne Protein) subtrahiert.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis eines *bc*-Genlocus in *T. thermophilus*

3.1.1 Analyse der genomischen Sequenzinformationen

Zur Identifizierung des *bc*-Genlocus sollte ein Sequenzmotiv verwendet werden, das den eindeutigen Rückschluß auf die Existenz eines *bc*-Komplexes in *T. thermophilus* erlaubt. Da das Rieske-Protein eine spezifische Komponente der *bc*-Komplexe und ihrer Äquivalenten in Pflanzen ist, wurde das Konsensus-Motiv CPCHG (Box II) für diese Homologie-Suche ausgewählt. Nicht veröffentlichte Informationen des Göttinger Instituts (Anke Henne vom Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen), das zu dieser Zeit an der Entschlüsselung der Genomsequenz von *T. thermophilus* HB27 (NC 005835) arbeitete, konnten als Datengrundlage herangezogen werden. Die Homologie-Suche wurde mit Hilfe des Programms tBLASTn search (Proteinsequenz vs. translatierte Datenquelle; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) durchgeführt und ergab zwei Treffer: In einem direkten Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, dass es sich bei einem der beiden Treffer um die bereits bekannten Daten des löslichen Rieske-Fragments handelt, die zweite Übereinstimmung wird in Kap. 3.1.4 diskutiert.

In der näheren Sequenzumgebung stromauf- und -abwärts des Rieske-Motivs konnten weitere Konsensusmotive identifiziert werden, die auf typische Komponenten eines Proteinkomplexes der Atmungskette schließen lassen, ein Sequenzbereich von ca. 10 kb wurde daher mit dem Programm SECentral (ORF search) nach offenen Leserahmen durchsucht.

3.1.2 Struktur des *bc*-Operons

Es können vier direkt aufeinanderfolgende Leserahmen identifiziert werden, die einen Sequenzbereich von 3137 bp mit einem GC-Gehalt von 69% umfassen. Die Gene werden in gleicher Richtung abgelesen und sind nur durch 8-10 bp getrennt. Das Start-Triplett wird bei allen vier Genen durch ein ATG kodiert, die Stopp-Kodons sind dagegen divers: TAA, TGA, TAG, TAG.

Eine typisch prokaryotische σ^{70} Promotorregion ist im erwarteten Sequenzbereich nicht zu finden. Dagegen findet sich 45 bp stromaufwärts des ersten Start-Kodons eine

sechser Sequenz (TATAGT), die große Übereinstimmung zur TATA-Konsensussequenz von Prokaryoten zeigt (siehe Abb. 5). Mit einem Abstand von 14-18 bp zur -10 Region kann eine typischerweise weniger definierte -35 Region festgestellt werden. Sequenzvergleiche weisen auf sehr gute Übereinstimmung mit der Sequenz TTGGCC hin, die jedoch nur einen verkürzten Abstand von 9 bp bis zur -10 Region aufweisen würde. Eine GA-reiche Ribosomenbindungsstelle (RBS) kann deutlich vor allen vier Genen aufgezeigt werden, für das erste Gen im Operon ist die RBS in Abb. 5 eingezeichnet. Darüber hinaus ist 16 bp nach dem Stopp-Kodon des vierten Gens eine ausgeprägte Terminationsschleife bestehend aus einer 24 bp palindromen Sequenz vorhanden. Diese GC-reiche Sequenz ist in der Lage, intramolekulare Wasserstoffbrücken auszubilden und deutet auf eine direkte Termination ähnlich der in *E. coli* beschriebenen hin. Dieser Haarnadelstruktur sind vier Thymine nachgeschaltet, die durch Freisetzung der RNA-Polymerase den Abbruch der Transkription bewirken könnten (Abb. 5). Die in diesem Abschnitt beschriebenen Sequenzmerkmale weisen stark auf eine Genanordnung im Operon hin, das in Prokaryoten als nur eine einzige polycistronische Transkriptionseinheit in mRNA umgeschrieben wird.

Sequenz stromaufwärts:

....CATCTGTCCTTGGCCGAGGGGTCG**TATAGT**GGTGAGGTGGGGTCTTGCGCCCTTTTACGAGAGGGAGGCGAG**ATG**...

Sequenz stromabwärts:

...TAGCCCTGCCGCCTTCG**CCCCACCGCGGCCGCGGTGGGGTTT**GCGCGCCGTTCCGTGCCGGCTTGC...

RBS

Abb. 5: Stromauf- und -abwärts des *bc*-Genlocus liegende DNA-Sequenzabschnitte. Die stromaufwärts des *fett* markierten ersten Start-ATG liegende TATA-Box ist in rot dargestellt. Weiterhin ist die Ribosomenbindungsstelle (RBS) exemplarisch für das erste Gen dargestellt und unterstrichen. Stromabwärts des *fett* markierten letzten Stopp-Kodons ist die Terminationsschleife in rot, der palindrome Bereich durch Pfeile dargestellt. Die sich anschließende Thymin-Abfolge ist blau markiert.

3.1.3 Identifizierung und Charakterisierung der *fb*cXFB Gene

Die DNA-Sequenz der identifizierten Strukturgene wurde *in silico* translatiert und die so gewonnenen Aminosäuresequenzen konnten anschließend zum Identitätsabgleich mit verschiedenen Proteindatenbanken verwendet werden. Für drei der vier Genprodukte stellte sich auf diese Weise eine offensichtliche Sequenzhomologie zu Proteinkomponenten anderer *bc*-Komplexe dar, für eines der Genprodukte konnte dagegen keine sinnvolle Übereinstimmung gefunden werden. Die Genabfolge im

Operon kann aufgrund dieser Sequenzvergleiche folgendermaßen angegeben werden: Cytochrom *c*, FbcX, Rieske-Protein, Cytochrom *b* (Abb. 6). Wie später gezeigt wird (Kap. 3.3), sind alle vier Proteine Bestandteile eines aktiven *bc*-Komplexes in *T. thermophilus*.

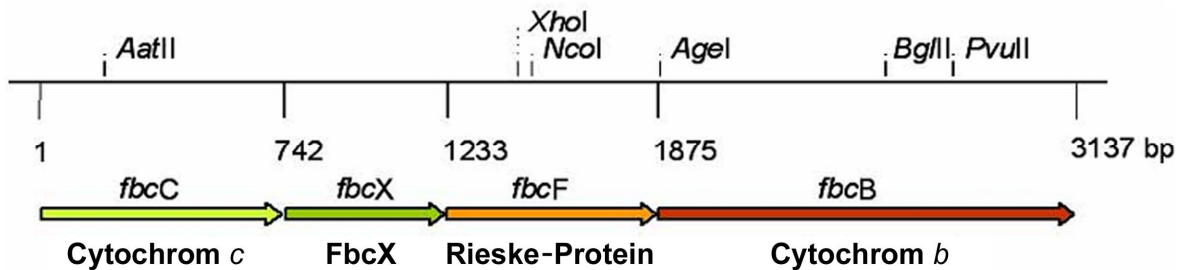


Abb. 6: Struktur des Operons *fbcCXB*. Dargestellt ist die Abfolge der offenen Leserahmen mit Bezeichnung der resultierenden Genprodukte. Die obere Skalierung gibt die Position des jeweiligen Genanfangs im 3137 bp großen Operon an, weiterhin sind exemplarisch Restriktionsschnittstellen aufgeführt.

3.1.3.1 Cytochrom *c*

Das erste Gen im Operon kodiert für ein Monohäm *c*-Typ Cytochrom. Dieses Protein besteht aus 243 aa, was rechnerisch ein Molekulargewicht von 26 kDa ergibt (siehe auch Tab. 2). Die Aminosäuresequenz wurde hinsichtlich hydrophober Bereiche nach der DAS-Methode (Dense Alignment Surface, Cserzo *et al.*, 1997) analysiert. Der resultierende Hydropathie-Plot weist einen hydrophoben Bereich von ca. 18 aa (Pos. 101-118) auf, der im zentralen Bereich des Proteins lokalisiert ist (Abb. 5). Als Konsequenz würde diese vorhergesagte Transmembranhelix das Cytochrom in zwei etwa gleich große hydrophile Domänen unterteilen, die über die Lipidmembran getrennt in verschiedenen Zellkompartimenten vorliegen sollten (Abb. 8).

Die hydrophile C-terminale Domäne umfasst 125 aa und das für *c*-Typ Cytochrome spezifische Häm-Bindemotiv CAACH ist in diesem Proteinteil lokalisiert (Pos. 171-175). Der Einbau der kovalenten Hämgruppe und auch die Wechselwirkung zu der löslichen Komponente Cytochrom *c*₅₅₂ erfolgen periplasmatisch (siehe unten), so dass für die C-terminale Domäne des Cytochrom *c* eine dem Periplasma zugewandte Orientierung zu erwarten ist.

Die N-terminale Domäne besteht aus 105 aa und ist damit im Vergleich zu bekannten Cytochrom *c* Untereinheiten des *bc*-Komplexes ungewöhnlich groß. Sie weist keine

klare Signalsignatur auf, die über den Transportmechanismus des Cytochroms über die Lipidmembran Aufschluß geben könnte. Dass diese N-terminale Domäne Bestandteil des reifen Proteins ist und nicht posttranslational prozessiert wird, ist in Kap. 3.3.1 und 3.3.2 aufgezeigt.

Zur phylogenetischen Einordnung wurde die Aminosäuresequenz der einzelnen Genprodukte mit unterschiedlichen Programmen in verschiedenen Proteindatenbanken abgeglichen. Die jeweiligen Ergebnisse weichen z. T. voneinander ab, sollen hier aber nicht diskutiert werden. Exemplarisch werden hier die mit Fasta3 (FASTA at the EBI) gewonnenen Ergebnisse vorgestellt. Wie bereits oben erwähnt, wird aufgrund des Hydropathie-Plots eine ungewöhnliche Topologie für das hier vorgestellte Cytochrom *c* vorgeschlagen. Es ist deshalb auch nicht verwunderlich, dass die Homologie-Suche zu keinem Treffer über die gesamte Proteinelänge führte. Bei den Treffern mit der besten Übereinstimmung handelt es sich um zwei Spezies des Genus *Deinococcus*, die bereits in der Einleitung als Gruppen-Verwandte eingeführt wurden: *D. radiodurans* (NC 008010) weist dabei die längste Gesamthomologie auf, *D. geothermalis* (NC 008010) die höchste Sequenzidentität (über einen etwas kürzeren Bereich; näheres in Kap. 3.1.3.2).

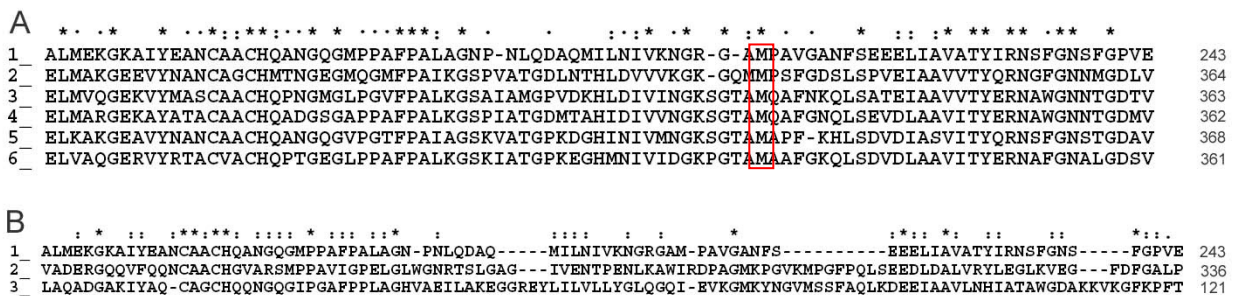


Abb. 7: Sequenzvergleich der *T. thermophilus* FbcC Häm *c* Bindedomäne. Das Multi-Sequenz Alignment wurde mit Clustal X (1.83) durchgeführt. A: Die *T. thermophilus* Cytochrom *c* UE wurde einer Homologie-Suche unter Verwendung des Programms FASTA3 (version 3 at the EBI) unterzogen, die 5 besten Treffer wurden mit Clustal X zugeordnet. Die 86 C-terminalen aa der Häm-Bindedomäne des FbcC-Proteins (Zeile 1) sind vergleichend zu den entsprechenden Sequenzen der fusionierten *c*-Domänen der *caa*₃-Oxidase dargestellt: Zeile 2, *Methylococcus capsulatus*, Q60AH4; 3, *Shewanella amazonensis*, Q3QLP8; 4, *Marinobacter aquaeolei*, Q36PG5; 5, *Nitrobacter multiformis*, Q2YCN0; 6, *Azotobacter vinelandii*, Q4IZQ3. *, vollständige Identität; :, 4 identische Positionen im Vergleich zur Sequenzvorlage; •, entsprechend 2-3 Identische Positionen. B: Sequenzvergleich von *T. thermophilus* *c*-Häm Domänen: Zeile 1, FbcC; 2, *caa*₃-Oxidase; 3, Cytochrom *c*₅₅₂. *, vollständige Identität :, Identität von einer aa im Vergleich zur Sequenzvorlage.

Betrachtet man die Sequenzbereiche in Einzelabschnitten, ist festzustellen, dass für die ersten 50 aa unter den bisherigen Eintragungen in die Proteindatenbanken keine sinnvolle Sequenzidentität festzustellen ist. Der zentrale Bereich von Pos. 58-157 imponiert durch seine starke Identität zur N-terminalen Hälfte einer Cytochrom *c* Untereinheit von *D. radiodurans* (siehe nächstes Kapitel).

Der C-terminale Teil des Cytochroms (Pos. 158-243) beinhaltet das stark konservierte Häm-Bindemotiv für *c*-Typ Cytochrome CXXCH (siehe oben), es können deshalb erwartungsgemäß besonders viele Homologien zu bekannten Proteinsequenzen dieses *c*-Typs festgestellt werden. Bei genauerer Betrachtung stellen sich bekannte Äquivalente anderer *bc*-Komplexe aber nur im unteren Bereich der Identitätsrangfolge dar. Im oberen Bereich sind überraschenderweise Sequenzidentitäten zu Untereinheiten der *caa*₃-Oxidasen aufgezeigt. Der *T. thermophilus*-Domäne wurden die fünf besten Sequenzidentitäten mit ClustalX (1.83) zugeordnet und in Abb. 7A dargestellt. Bei den hier gelisteten Sequenzen handelt es sich hauptsächlich um Proteine der γ -Proteobakterien. Gezeigt wird ein Abschnitt aus der *c*-Häm-Domäne der *caa*₃-Oxidase, die C-terminal mit einer typischen hydrophilen Cu_A-Domäne der Untereinheit II verbunden ist. Zum Vergleich wurde auf gleiche Weise ein Alignment mit der *T. thermophilus* eigenen *caa*₃-Oxidase und der löslichen Komponente Cytochrom *c*₅₅₂ durchgeführt, für diesen Vergleich mußten jedoch größere Sequenzlücken zugelassen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 7B gezeigt.

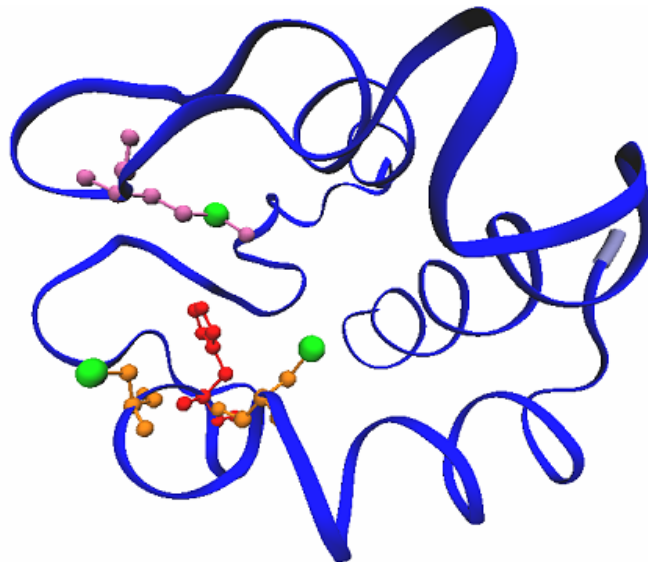


Abb. 8: 3-D Strukturvorhersage für die C-terminalen 86 aa der Cytochrom *c* Untereinheit [<http://swissmodel.expasy.org/repository>]. Farbkodierung der Häm-Liganden: Cystein orange, Histidin rot, Methionin lila, Schwefel grün. Der N-Terminus des Fragments (Ala158) ist hellblau markiert.

In Abb. 7A lassen sich über einen Bereich von 86 aa 2-3 homologe Cluster lokalisieren: zunächst der Häm-Bindungsbereich, die Region um das für c-Typ Cytochrome definierte Methionin als 6. Häm-Ligand und schließlich der C-terminale Bereich. Abb. 7B zeigt, dass diese homologen Bereiche durchaus nicht in allen *caa*₃-Oxidasen vorhanden sind. Die *Thermus* eigene *caa*₃-Oxidase ähnelt der Sequenzvorlage zwar auch im Bereich der Häm-Bindung, die Gesamtidentität ist jedoch wesentlich geringer, gleiches ist für Cytochrom *c*₅₅₂ als ein Beispiel für andere c-Typ Cytochrome festzustellen. Für Teil A kann dagegen eine Sequenzidentität von 29% über alle sechs Sequenzen zuzüglich weiterer 30% Sequenzähnlichkeit angegeben werden.

Der hier diskutierte Sequenzbereich konnte darüber hinaus zur 3-D Strukturvorhersage verwendet werden. Während die gesamte Aminosäuresequenz der Cytochrom c-Untereinheit dem Swiss-Prot Programm [<http://swissmodel.expasy.org/repository>] zur Verfügung gestellt wurde, konnte nur für die C-terminalen 86 aa eine 3-D Strukturvorhersage anhand vorliegender Daten berechnet werden. Das Ergebnis der Berechnung wurde mit dem Programm VMD 1.8.2 bearbeitet und die Aminosäurereste des Häm-Bindemotivs farblich hervorgehoben. Auch wenn es sich bei diesem Strukturmodell nur um eine Vorhersage handelt, so ist doch die sinnvolle Orientierung der Häm-Liganden auch bezüglich des Met212 (6. Ligand, siehe Abb. 7A und 44) deutlich zu erkennen. Weitere Proteinstrukturen sollten dieses Ergebnis in Zukunft verfeinern können.

3.1.3.2 FbcX

Das zweite Gen im Operon kodiert für ein sehr hydrophobes Protein aus 160 aa mit einer molekularen Masse von 17,6 kDa. In der sequenzgestützten Transmembranvorhersage werden vier Helices mit einer jeweiligen Länge von 11-20 aa vorgeschlagen (Abb. 9). Anhand der Aminosäuresequenz lassen sich keine Cofaktor-Bindemotive feststellen, auch andere Konsensus-Motive können nicht identifiziert werden. Im direkten Vergleich mit bekannten Untereinheiten der *bc*- und *b_{6f}*-Komplexe kann kein homologes Äquivalent zugeordnet werden. Erst durch einen detaillierten Sequenzvergleich mit Fasta3 (Proteindatenbank EBI) können homologe Bereiche aufgezeigt werden. Es handelt sich dabei um zwei Cytochrom c-Untereinheiten des Genus *Deinococcus* (*D. radiodurans* und *D. geothermalis*, siehe auch Abschnitt Cytochrom c). Das direkte Alignment der Untereinheit FbcX mit *D. radiodurans* zeigt eine hohe Identität der letzten drei Helices zur C-terminalen

Proteindomäne von *D. radiodurans* auf, lediglich der ersten Transmembranhelix von FbcX kann kein homologer Sequenzbereich zugeordnet werden. Dass die Untereinheit FbcX einschließlich der N-terminalen Helix Bestandteil des reifen Proteinkomplexes ist, wird in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 gezeigt.

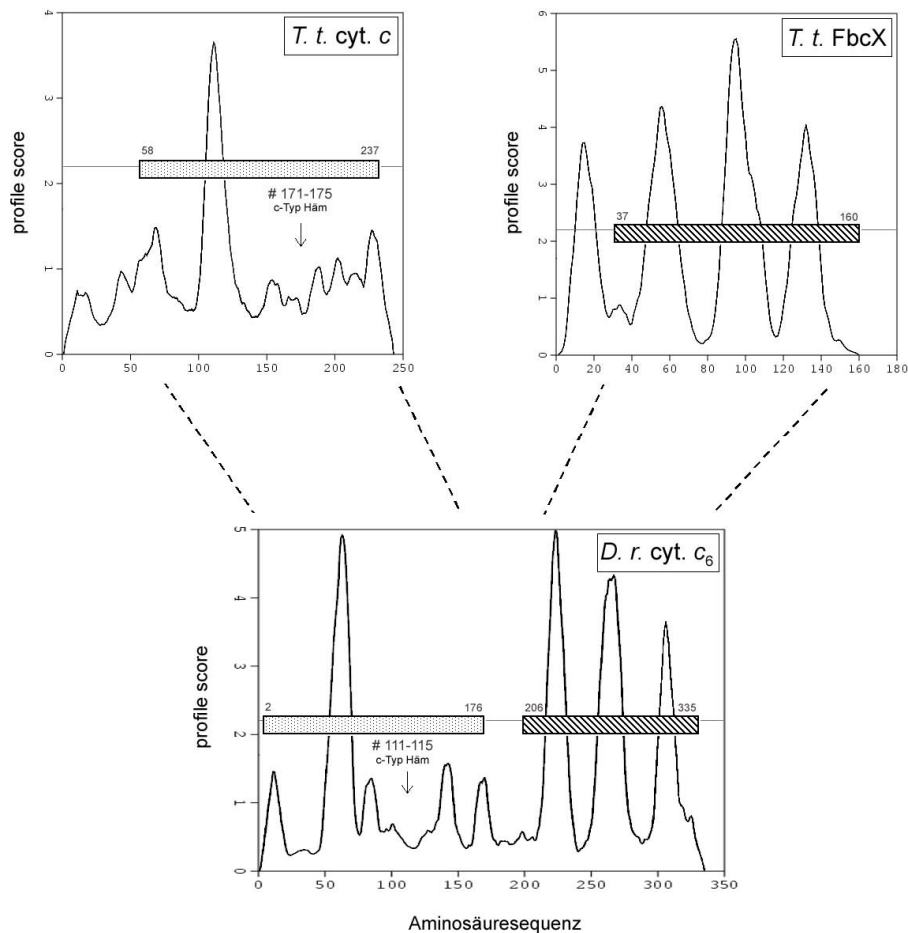


Abb. 9: Hydropathie-Plot (nach der DAS-Methode) der Untereinheiten Cytochrom c und FbcX aus *T. thermophilus*, sowie der *D. radiodurans* Cytochrom c Untereinheit. Die unterschiedlich schraffierten Balken geben homologe Bereiche an, die angeführten Nummern weisen auf die jeweilige Start- und Endposition in der Proteinsequenz hin. Weiterhin ist die Position der Häm-Signatur angegeben.

In Abb. 9 sind die homologen Bereiche der Cytochrom c- und FbcX-Untereinheit und ihre Sequenzäquivalente in *D. radiodurans* durch Profilbalken im Hydropathie-Plot dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die *Thermus* Cytochrom c-Untereinheit hohe Identität zur N-terminalen und FbcX zur C-terminalen Proteinhälfte des *Deinococcus* Proteins zeigt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass beide

Proteine durch Genfusion oder –spaltung auseinander hervorgegangen sind. Gestützt wird diese Hypothese auch dadurch, dass beide *Thermus*-Proteine durch direkt benachbarte Gene kodiert werden. Betrachtet man das *fbC*XFB-Operon vergleichend zur *Deinococcus* DNA-Sequenz, ist eine sehr hohe Gesamtidentität festzustellen, was die in der Einleitung gemachte Aussage über die Gruppen-Verwandschaft beider Genera unterstützt.

3.1.3.3 Rieske-Protein

Das Rieske-Protein wird durch das dritte Gen im Operon kodiert. Die *in silico* Translation ergibt ein Genprodukt von 210 aa mit einem errechneten Molekulargewicht von 22,4 kDa. Die N-terminale Aminosäuresequenz weist ein typisches TAT-Exportsignal (SRRRLFLK) mit einem deutlichen Twin-Arginin Motiv auf (Pos. 11-18). In Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3 wird gezeigt, dass die Signalsequenz nicht posttranslational prozessiert wird, sondern Bestandteil des aktiven Proteinkomplexes ist. Im Hydropathie-Plot ist eine Transmembranhelix erkennbar, die sich der TAT-Sequenz direkt anschließt und mit Position 20 beginnt. Der C-terminale lösliche Teil des Proteins wurde bereits in *E. coli* exprimiert und für eine detaillierte Strukturaufklärung genutzt (siehe Einleitung). Diese Proteindomäne zeigt nur eine geringe Gesamthomologie zu bekannten prokaryotischen Rieske-Untereinheiten. Die Sequenzidentitäten beschränken sich hauptsächlich auf den Bereich um die hoch konservierte Fe₂S₂-Cluster Domäne.

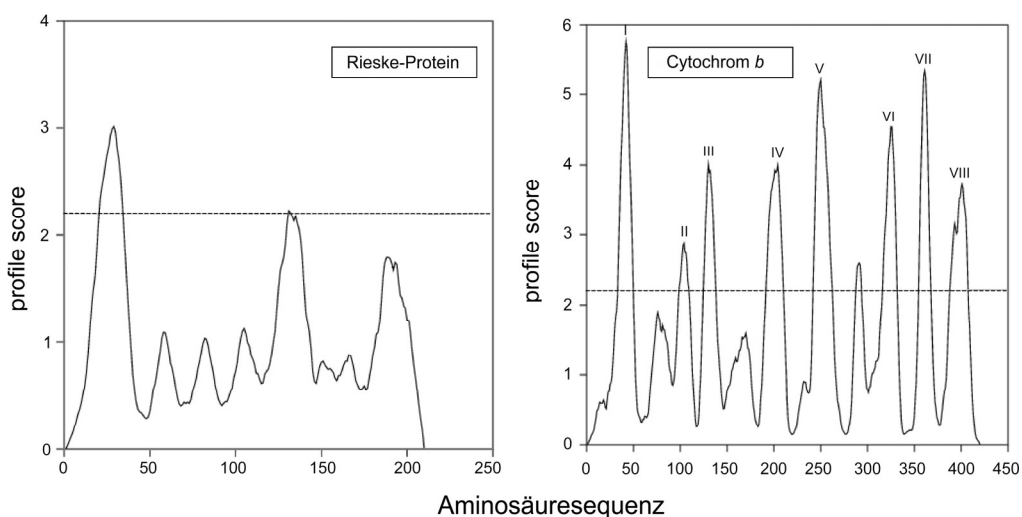


Abb. 10: Hydropathie-Plot (nach der DAS-Methode) des *T. thermophilus* Rieske-Proteins und von Cytochrom *b*. Die Helices aus Cytochrom *b* wurden entsprechend ihrer Homologie zu äquivalenten Untereinheiten in römischer Nummerierung angegeben.

3.1.3.4 Cytochrom *b*

Das letzte Gen im Operon kodiert für Cytochrom *b*. Diese größte Untereinheit des *bc*-Komplexes mit 420 aa und einem rechnerischen Molekulargewicht von 47,5 kDa erweist sich im Hydropathie-Plot als sehr hydrophob und es werden mindestens acht Transmembranhelices vorhergesagt. Vergleicht man die Aminosäuresequenz über Fasta3 mit Proteindatenbanken, werden sowohl Ähnlichkeiten zu typischen Cytochrom *b*-Untereinheiten, aber auch homologe Bereiche zu Cytochrom *b₆*-Äquivalenten aufgezeigt. Die Gesamtidentität erstreckt sich über die volle Proteinlänge der Cytochrom *b*-Untereinheiten und liegt somit nicht wie in Cytochrom *b₆*-Homologen in einer gesplitteten Version vor. Wie schon bei den zuvor diskutierten Untereinheiten besteht auch hier die höchste Identität zur *Deinococcus*-Gruppe angegeben werden. Der direkte Vergleich mit *D. radiodurans* ergibt eine Identität von 45%, hingegen beträgt diese zu *S. cerevisiae* lediglich 23%. Dennoch können hauptsächlich die Struktur motive der ersten Proteinhälfte auch der Hefesequenz zugeordnet werden.

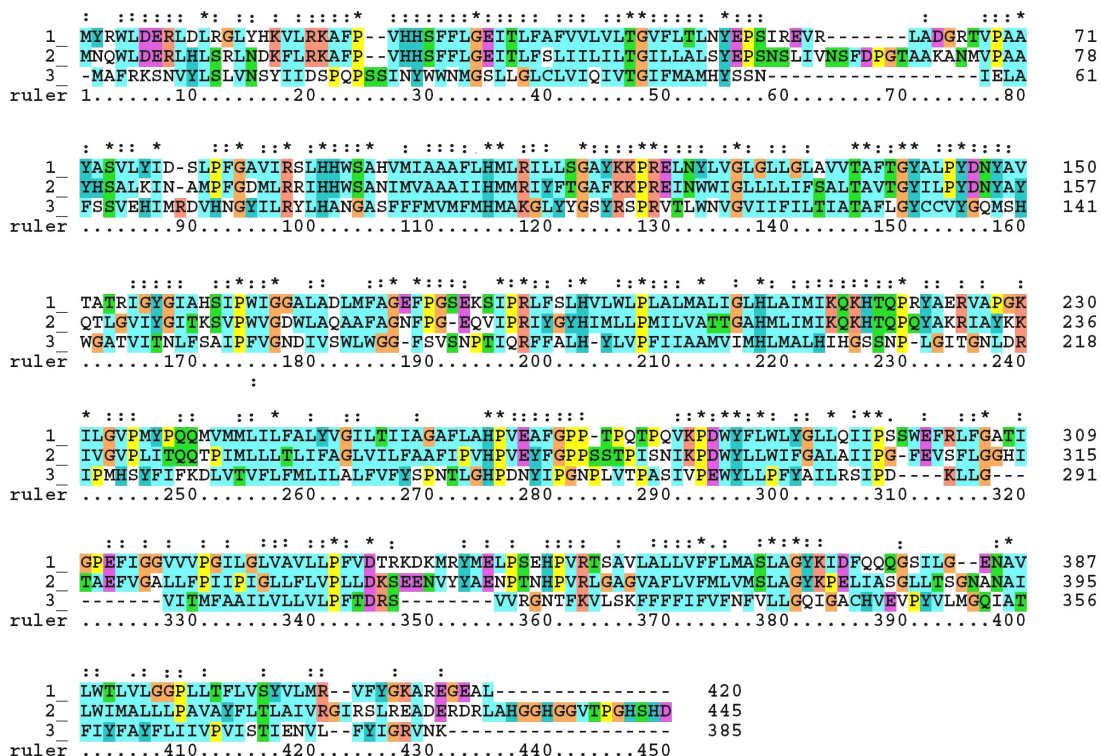


Abb. 11: Sequenzvergleich der *T. thermophilus* Cytochrom *b*-Untereinheit, durchgeführt mit ClustalX (1.83). Das direkte Alignment zeigt die Aminosäurereste der Cytochrom *b*-Untereinheiten von *T. thermophilus* (1), *D. radiodurans* (2) und *S. cerevisiae* (3). Die hohe Übereinstimmung der Untereinheiten aus *Thermus* und *Deinococcus* ist anhand der Farbrunterlegung zu erkennen, die Identität der Hefe-Untereinheit ist dagegen deutlich geringer. * vollständige Identität; : 2 identische Positionen.

Der hydrophile N-Terminus erstreckt sich über 34 aa und wird in Anlehnung an homologe Untereinheiten im Cytoplasma vermutet. In Helix zwei und vier sind jeweils die Histidin-Liganden des Häm *b* lokalisiert (aa 91/105 und 208/217). Diese Bereiche um die Konsensus-Motive weisen entsprechend eine besonders ausgeprägte Homologie auf. Eine dritte Häm-Bindestelle, ähnlich der in Cytochrom *b*₆ vorhandenen, kann nicht gefunden werden.

Wie in Abb. 12 schematisch dargestellt ist, sind besonders die ins Periplasma reichenden Loop-Bereiche der ersten Proteinhälfte stark verlängert (48, 53, 53 aa), ähnlich wie von der Hefe-Struktur bekannt. Die zweite Proteinhälfte stellt sich diverser dar, doch auch hier können konservierte Bereiche festgestellt werden. Lediglich die Zuordnung von Helix 8 ist nicht eindeutig, da entsprechende homologe Bereiche fehlen. Die Zuordnung erfolgte dennoch auf Grundlage der DAS-Transmembranvorhersage. Die vorhergesagte Anzahl von 8 Membranhelices konnte somit anhand von Sequenzvergleichen verifiziert werden und lässt gemeinsam mit dem Fehlen eines dritten Häm-Bindemotivs und dem Vorliegen der Untereinheit in der Vollängenversion die Einordnung dieses *Thermus* Cytochrom *b* zur mitochondrialen Gruppe zu.

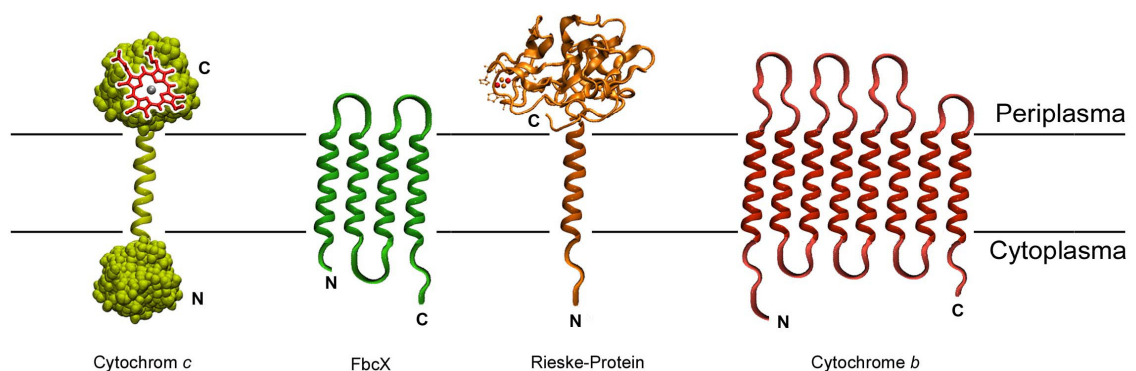


Abb. 12: Schematische Darstellung der *T. thermophilus* bc-Untereinheiten. Der Vorhersage der Domänenverteilung über die Lipidmembran liegen neben Sequenzinformationen auch die Ergebnisse der Hydrophathie-Plots (Abb. 5 und 6) zugrunde. Die für das lösliche Rieske-Fragment vorhandenen Strukturinformationen (Hunsicker-Wang *et al.*, 2003) wurden in diese schematische Darstellung eingefügt.

3.1.4 Sequenzunterschiede der Subspezies HB8 und HB27

Bereits in der Einleitung wurde auf Unterschiede der *T. thermophilus* Subspezies HB8 und HB27 bezüglich Temperaturoptimum und Pigmentierung hingewiesen. Neben diesen phänotypischen Merkmalen können aber auch auf DNA-Ebene Abweichungen festgestellt werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 angedeutet wurde, führte die Suche nach dem Rieske-Konsensusmotiv zu zwei Treffern: der erste Treffer entspricht dem im *bc*-Operon lokalisierten und oben ausführlich besprochenen Rieske-Protein. Der zweite Treffer führt zu einem 184 aa großen, abseits des *bc*-Lokus gelegenen Proteins. Die Aminosäuresequenz dieses Proteins beinhaltet die typischen Konsensus-Boxen: Box I CTHQGC, Box II CPCHFG, und kann somit zu den Rieske-Proteinen gezählt werden. Der kurze N-Terminus zeigt ein Twin-Arginin-Motiv mit einer deutlich weniger ausgeprägten Signalsequenz. Bereits ab Pos. 10 folgt die einzige vorhergesagte Transmembranhelix. Die Liganden des Eisen-Schwefel-Clusters sind auch in diesem Rieske-Protein in der löslichen C-terminalen Domäne lokalisiert. Vergleicht man die Proteinsequenz von Rieske (*bc*-Operon) und Rieske II direkt miteinander, erhält man eine Sequenzidentität von 26%, eine Genduplikation kann somit als Erklärung für das Vorhandensein dieser Untereinheit nicht herangezogen werden. Betrachtet man die Umgebung der Genomsequenz von Rieske II, so können keine typischen Sequenzen von Atmungsketten-Komplexen identifiziert werden. Direkt stromaufwärts, auf gleichem DNA-Strang, befindet sich ein hypothetisches Protein, das bisher noch nicht zugeordnet wurde. Sequenzanalysen deuten darauf hin, dass es sich dabei um ein membranständiges Protein handelt, das im löslichen C-terminalen Teil ein c-Typ Häm-Bindemotiv (CAACH) aufweist. Die weiter stromaufwärts liegenden offenen Leserahmen werden der *ccm*-Genfamilie zugerechnet und sind vermutlich an der Häm-Biosynthese beteiligt.

Wird die Konsensusmotiv-Suche dagegen auf genomischer DNA des Stammes HB8 durchgeführt, ergeben sich drei Treffer. Zwei dieser Treffer können den eben beschriebenen Proteinen Rieske (*bc*-Lokus) und Rieske II zugeordnet werden. Der dritte Treffer kann der kleinen Untereinheit (Locus_Tag TTHB128) einer Arsenit-Oxidase zugeordnet werden. Diese befindet sich ebenso wie die dazugehörige große Untereinheit (Locus_Tag TTHB127) auf dem HB8-Megaplasmid pTT27 (NC 006462). Homologe Bereiche zur Arsenit-Oxidase aus HB8 können auch in HB27 gefunden werden. Doch ist z. B. die große Untereinheit dieser Oxidase von 861 aa in HB8 auf nur 119 aa in HB27 verkürzt. Auch die kleine Untereinheit ist verkürzt und zusätzlich fehlt das typische Konsensus-Motiv der Eisen-Schwefel Cluster fast vollständig. Diese Untereinheit wird deshalb im programmgestützten Sequenzvergleich nicht aufgezeigt. Es kann vermutet werden, dass es sich bei den Untereinheiten in HB27 um inaktive Protein-Überreste handelt.

Auch innerhalb des *bc*-Lokus können Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden. Das klonierte Konstrukt pDM6 (siehe Kap. 3.2.2.1) enthält das *fb*cCXFB-Operon von Stamm HB8 und wurde noch vor der Veröffentlichung der

vollständigen Genomsequenz dieses Stammes sequenziert. Vergleicht man die DNA-Sequenz von HB8 und HB27, so ergibt sich eine Gesamtidentität von 98%. Auf Proteinebene folgt für die Untereinheiten Cytochrom *c*, FbcX und Cytochrom *b* eine Identität von 99% aufgezeigt werden, das entspricht nur einem Aminosäureaustausch für Cytochrom *c* und jeweils zwei für FbcX und Cytochrom *b* (siehe Tab. 2). Nur für das Rieske-Protein ist eine deutlich reduzierte Identität von 96% festzustellen. Bei dieser Untereinheit sind sieben Aminosäurereste ausgetauscht, die jedoch nicht im Cluster-Bereich liegen. Der Austausch kann als nicht-konservativ bezeichnet werden, ein klarer Trend lässt sich jedoch nicht feststellen.

Tab. 2: Unterschiede der Subspezies HB8/HB27 im Bereich des *fbcCXFB*-Operons

Untereinheit	Aminosäure-Unterschied zwischen HB8 und HB27
Cytochrom <i>c</i>	D203N
FbcX	Q39E, A111S
Rieske-Protein	K68Q, K76N, L103V, E111A, E146K, V157M, Y206C
Cytochrom <i>b</i>	T133A, G200A

3.2 Isolierung des *bc*-Komplexes aus *T. thermophilus*

3.2.1 Co-Immunpräzipitation zum Nachweis eines *bc*-Komplexes

In einem ersten Ansatz wurde versucht, den vollständigen endogenen *bc*-Komplex über immunologische Kopplung aus nativen *Thermus*-Membranen zu isolieren. Dazu wurde ein polyklonaler Antikörper (Anti-Ttctc) gegen das *T. thermophilus* Cytochrom *c* generiert (siehe Material und Methoden). Die IgG-Fraktion wurde isoliert und bei -80°C gelagert.

Für die direkte Co-Immunpräzipitation wurden Zellen von *T. thermophilus* HB8 angezogen, geerntet und die Membranen präpariert. Die Gesamt-Proteinkonzentration wurde nach Lowry bestimmt und in einer Konzentration von 10 mg/ml zur Solubilisierung eingesetzt. Als Detergenz wurde Dodecyl-Maltosid (DM) (2:1, w/w) dem Ansatz zugegeben. Um die optimale Vernetzung zwischen Proteinkomplex und Antikörper zu ermitteln, wurde die Antikörperlösung zunächst gegen das Solubilisat titriert und diese Mischung für mehrere Tage bei 4°C inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde bei 3.000 rpm in der Tischzentrifuge (Biofuge13) abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit KP_i -Puffer (50 mM, pH 8, 0,5 g/l DM) gewaschen. Zur weiteren

Analyse wurde das Präzipitat in SDS-Probenpuffer resuspendiert, durch Hitze denaturiert und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Die resultierenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-MS und MS/MS analysiert (C. Corvey, AK Prof. Karas, Uni-Frankfurt). Da zu dieser Zeit die Gesamtsequenz noch nicht öffentlich zur Verfügung stand, konnte zum Datenabgleich lediglich auf die Proteinsequenz des *bc*-Operons und in Datenbanken zugängliche Proteinsequenzen zurückgegriffen werden. Auf diese Weise gelang der Nachweis für die zwei größten Untereinheiten des *Thermus bc*-Komplexes: Für Cytochrom *c* konnte 60% der Sequenz detektiert werden, zusätzlich wurde das Peptid bei m/z 1151,6 (NLPDGEHTLR) fragmentiert und die Aminosäureabfolge bestimmt (Abb. 13A); für das sehr hydrophobe Cytochrom *b* war lediglich eine Sequenzabdeckung von 15% möglich, zur weiteren Identifizierung wurde das Fragment bei m/z 1357,7 (YMELPSEHPVR) analysiert (Abb. 13B).

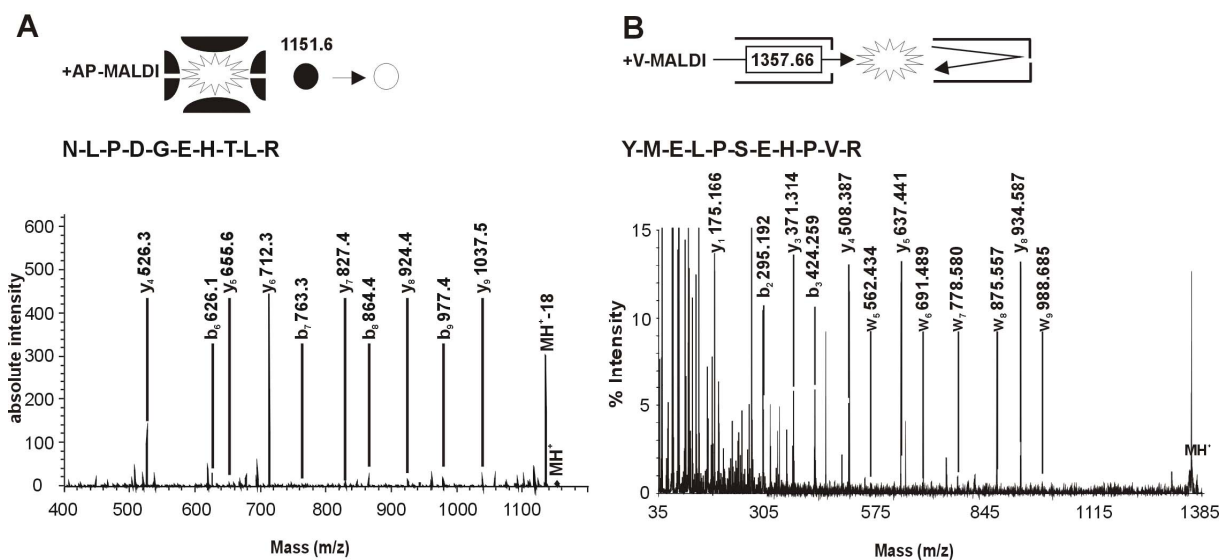


Abb. 13: Identifizierung der *Thermus* Untereinheiten Cytochrom *c* und Cytochrom *b* nach direkter Co-Immunpräzipitation mittels MALDI-MS und MS/MS (HP1100 ion-trap/AP-MALDI oder MALDI-TOF/TOF). A: gezeigt wird das AP-MALDI MS/MS-Spektrum des Cytochrom *c*-Peptids NLPDGEHTLR. B: MALDI-MS/MS Spektrum des Cytochrom *b*-Fragments YMELPSEHPVR. Die resultierenden MS/MS-Peaks sind jeweils mit der resultierenden Fragment-Masse und dem Ionen-Typ beschriftet. (Gezeigt werden: C-terminal (y -Ionen), N-terminal (b - und a -Ionen), sowie Satelliten Ionen (w -Ionen)).

Bei der Analyse weiterer Proteinbanden konnte die leichte und die schwere Kette von Kaninchen-IgG identifiziert werden. Da es sich dabei um die dominierenden Banden im Proteingel handelte, führte auch eine stärkere Probenbeladung nicht zur Darstellung

weiterer Proteinbanden. Die Silberfärbung besitzt eine 10-fach niedrigere Nachweisgrenze für Proteine und ermöglichte somit die Detektion weiterer Proteinbanden mit kleinerem Molekulargewicht (<25 kDa), die Proteinmenge war jedoch für eine MALDI-Analyse nicht ausreichend.

Unter den genannten Detergenz-Bedingungen konnten mit dieser Methode nur zwei der vermuteten vier Untereinheiten isoliert und identifiziert werden, dennoch kann dieser Versuchsansatz als erster Nachweis eines *bc*-Komplexes in *T. thermophilus* gewertet werden.

3.2.2 Chromatographischer Nachweis des *bc*-Komplexes

3.2.2.1 Klonierung des *bc*CXFB-Operons zur homologen Expression

Zur homologen Expression des *bc*-Komplexes wurde zunächst genomische DNA von *T. thermophilus* HB8 isoliert, hinsichtlich Konzentration und Reinheit spektroskopisch überprüft und anschließend als PCR-Template eingesetzt. Das gesamte Operon einschließlich eines 125 bp stromaufwärts liegenden Sequenzbereichs, der die vermutliche Promotorregion umfasst, wurde in zwei Fragmenten (1574 bp, 1714 bp) amplifiziert. Die Primer DTh6-F/DTh7-R und DTh8-F/DTh9-R wurden verwendet, um neben der endogenen XhoI-Schnittstelle (Abb. 14) auch eine 5' KpnI und 3' PstI Schnittstelle einzuführen; Primer DTh9-R führt zusätzlich die Kodierungssequenz zur Expression von sechs C-terminalen Histidinen (His₆-Tag) ein. Die genannten Schnittstellen konnten anschließend für die sukzessive Klonierung der PCR-Fragmente in den *Thermus/E.coli*-Shuttlevektor pMA34 verwendet werden. Das fertige Plasmid pDM6 wurde durch Elektroporation in den *T. thermophilus* Stamm HB27 eingebracht und die Zellen mittels Kanamycin (25 mg/ml) auf LB_{Km25}-Platten Ü/N bei 70°C selektioniert.

Die gewachsenen Kolonien wurden Ü/N vervielfältigt und eventuell aufgenommene Plasmid-DNA nach der Plasmid Mini-Präparation isoliert. Die mit dieser Methode erreichte Ausbeute ist für *Thermus*-Zellen geringer als für *E. coli*, die Ausgangsmenge wird deshalb um das 2- bis 3-fache erhöht (siehe Material und Methoden). Aus *Thermus* isolierte Plasmid-DNA ergibt im spezifischen Restriktionsverdau kein plausibles Schnittmuster, vermutlich wird die DNA modifiziert und es ergeben sich veränderte Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme. Die eindeutige Identifizierung eines Plasmids erfolgt deshalb per PCR. Dazu wurden die Primer DTh8-F/HTK-R verwendet, die den 2. Teil des Operons und darüber hinaus einen Teil

der sich anschließenden Kanamycin-Resistenz amplifizieren. Das resultierende Amplikon wurde zusätzlich einem spezifischen Kontrollverdau unterzogen und der entsprechende Stamm DM6 in glycerinhaltigem LB-Medium bei -80°C gelagert.

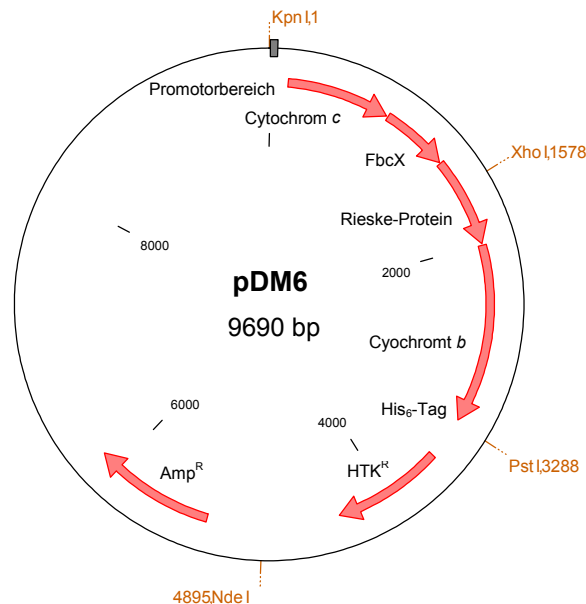


Abb. 14: Plasmidkarte des Expressionsvektors pDM6. Das gesamte 3137 bp Operon *fbcCXFB* mit dem stromaufwärts liegenden Promotorbereich und der Kodierungssequenz für einen C-terminalen His₆-Tag wurde über die Schnittstellen KpnI, XhoI und PstI in den *Thermus/E.coli*-Shuttlevektor pMA34 kloniert. Dem Proteinkodierungsbereich folgen die Gene für die hitzestabile Kanamycin- und die Ampillicin-Resistenz (HTK^R, Amp^R).

Zu diesem Zeitpunkt war die Genomsequenz von *T. thermophilus* HB8 noch nicht veröffentlicht. Um mögliche Sequenzunterschiede der Subspezies HB8 und HB27 aufzudecken (siehe Kap. 3.1.4), wurden deshalb beide Stränge des Operons *fbcCXFB* im Expressionsvektor DM6 in jeweils sechs Sequenzierschritten mit den Primern DTh19-27 analysiert (SRD Scientific Research and Development GmbH, Frankfurt). Die ermittelten Basensequenzen konnten zu übereinstimmenden Komplementärsträngen zusammengesetzt werden und decken sich für den *bc*-Komplex mit den im November 2004 vom National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan) veröffentlichten Daten.

3.2.2.2 Anzucht des Expressionsstammes DM6

Um ein homogenes Ausgangsmaterial für alle nachfolgenden Anzuchten gewährleisten zu können, wurde das für die Sequenzierung verwendete Isolat des Expressionsstammes DM6 in einer 30 ml LB-Kultur in Anwesenheit von 25 µg/ml Kanamycin (LB_{Km25}) Ü/N bei 70°C vervielfältigt. Am nächsten Tag wurde die Übernachtkultur im Verhältnis 1:1 mit vorgewärmtem LB_{Km25}-Medium verdünnt und für weitere fünf Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen schonend bei 3.000 g für 2 min sedimentiert und in Gefrierkulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf 30 Aliquots verteilt und als Ausgangsmaterial für alle weiteren Anzuchten verwendet.

Für die Plattenkultur werden LB-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin verwendet. Die Kultivierung findet Ü/N bei 70°C in wassergesättigter Atmosphäre statt. Wird die Wachstumstemperatur reduziert, muß die Inkubationszeit entsprechend verlängert werden. So findet auch bei einer Temperatur von 45°C noch Zellwachstum statt, doch wird dieses erst nach zwei Tagen sichtbar. Vorkulturen wurden bevorzugt in kleinvolumigen Schüttelkolben durchgeführt. Besonders bei der Anzucht von HB8 in Kulturröhrchen führt eine unzureichende Sauerstoffzufuhr infolge mangelhafter Durchmischung zur Verklumpung am Röhrchenboden und einem verminderten Zellwachstum. Hauptkulturen wurden 2%ig in 5 l Schüttelkolben wie auch im Fermenter mit einem Fassungsvermögen von 10 und 100 l angesetzt. Da die erreichte Zellzahl wie auch die Expressionsrate des *bc*-Komplexes wesentlich durch die Belüftungsrate beeinflusst wird (siehe nächster Abschnitt), wurden die mit einem Aluminiumdeckel verschlossenen Schüttelkolben während des Wachstums leicht geöffnet. Die Fermenteranzucht wurde mit einer Belüftungsrate von 0,5 l Sauerstoff pro Minute und Liter Fermentervolumen bei einer Rührfrequenz von 200 rpm durchgeführt. Aufgrund der starken Schaumbildung mußte der Ü/N-Kultur einige Tropfen Antifoam zugegeben werden. Die regelbare Sauerstoffzufuhr des Fermentersystems erweist sich als klarer Vorteil, so dass diesem System eine eindeutige Präferenz erteilt wird. Im 10 l-Fermenter konnte unter den oben genannten Bedingungen eine Zelldichte von ca. 4 OD erreicht werden.

Einfluß von Sauerstoff auf die Zellzahl und die *bc*-Expressionsrate

Für diesen Versuch wurden viermal 2,5 l LB_{Km25}-Medium in 5 l Schüttelkolben vorgelegt. Alle Kolben wurden 1%ig mit einer dichten Vorkultur von *T. thermophilus* HB27 angeimpft und Ü/N bei 70°C inkubiert. Zwei der Kolben wurden mit Aluminiumdeckeln fest verschlossen und mit einer Frequenz von 50 rpm geschüttelt. Die anderen zwei Kolben blieben geöffnet und wurden im geschlossenen Schüttler bei

200 rpm inkubiert. Im Folgenden wurde die OD der Ü/N-Kultur, der daraus separierte Anteil an Gesamtmembranprotein und die davon isolierte Menge an *bc*-Komplex bestimmt. Der jeweilige Mittelwert der Doppelbestimmung ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tab. 3: Sauerstoffeinfluss auf Zellwachstum und Proteinexpression

Anzuchsbedingung	50 rpm	200 rpm
OD der Ü/N-Kultur	0,4	1,5
Gesamtmembranprotein [mg]	271	766
Membranprotein/l Kultur [mg/l]	54	153
Anteil des <i>bc</i> -Komplexes an Membranprotein (%)	1	2
Ausbeute <i>bc</i> -Komplex/l Kultur [mg]	0,5	3

Die oben dargestellte Tabelle zeigt deutlich, dass sowohl das Zellwachstum als auch die Expressionsrate des *bc*-Komplexes durch die O₂-Sättigung des Mediums beeinflusst wird. Die Zellzahl und entsprechend die Membranfraktion wird etwa vervierfacht. Darüber hinaus kann durch Sauerstoffzufuhr der prozentuale Anteil des *bc*-Komplexes in den Membranen verdoppelt werden, was einer 6-fach erhöhten Gesamtausbeute entspricht. Der Vergleich einer geschlossenen Kolbenanzucht mit einer Anzucht im Fermenter sollte noch deutlicher ausfallen, aufgrund der geringeren Vergleichbarkeit wurde jedoch auf diesen Versuch verzichtet. Die Anzuchten wurden deshalb bevorzugt im 10 l Fermenter mit geregelter Sauerstoffzufuhr von 0,5 l/min durchgeführt (siehe oben).

3.2.2.3 Chromatographische Aufreinigung des *bc*-Komplexes

Erste Versuche, den endogenen *bc*-Komplex aus *T. thermophilus* HB8 wt durch Ausnutzung ionischer Wechselwirkung aufzureinigen, blieben erfolglos. Auch unter optimierten Puffer- und Detergenzbedingungen (siehe unten) kann mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie kein stöchiometrischer vier-Untereinheiten Komplex isoliert werden.

Aus diesem Grund wurde der Expressionsstamm DM6 konstruiert, der neben dem gesamten *fb*cC_XF_B-Operon auch für einen C-terminalen His₆-Tag an der Cytochrom *b*-Untereinheit kodiert (siehe Kap. 3.2.2.1). Dieser soll die Bindung an eine

Metallaffinitätssäule gewährleisten und auf diese Weise eine spezifische Aufreinigung des *bc*-Komplexes ermöglichen.

Für die Aufreinigung wurde der Stamm DM6 wie oben beschrieben angezogen (Kap. 3.2.2.2). Vor der Ernte wurden die Zellen rasch bei 4°C auf RT abgekühlt und anschließend durch 15 min Zentrifugation bei 5.000 rpm (4°C) separiert (Sorvall RC3C). Das Zellpellet wurde mit 50 mM NaP_i pH 7 auf Eis resuspendiert und nach Zugabe von Pefabloc (25 µg/ml) und Lysozym (100 µg/ml) bei -80°C tiefgefroren.

Membranpräparation

Für die nachfolgende Membranpräparation wurde das Zellpellet bei RT unter Rühren schonend aufgetaut und die Zellen im Anschluß je nach Volumen durch Ultraschall (dreimal 5 min, 40% output) oder eine Menton-Gaulin Presse (6 min, 400 bar) auf Eis geöffnet. Die Zellbestandteile wurden innerhalb 1 h bei 120.000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge geschichtet. Die obere Membranschicht wurde abgenommen, in kaltem Puffer (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl) resuspendiert und anschließend mit einem Ultraturax vollständig homogenisiert. Der Gesamtproteinanteil wurde nach Lowry bestimmt und die Membranen in Aliquots bei -80°C tiefgefroren.

Solubilisierung

Für die Solubilisierung wurde ein Membranaliquot schonend im Wasserbad aufgetaut und in einer Konzentration von 10 mg/ml angesetzt. Der Ansatz wurde in NaP_i Puffer pH 7 und 300 mM NaCl durchgeführt. Weiterhin wurde zur Stabilisierung des 4-UE Komplexes 30% (v/v) Glycerin zugegeben. Das Detergenz Decyl-β-D-Maltosid (DEC) wurde in einem Verhältnis von 1:2 (Protein:Detergenz) zugegeben und der Ansatz für mindestens 2 h z. T. aber auch Ü/N bei 4°C gerührt. Die Effizienz der Solubilisierung kann bereits nach der sich anschließenden Ultrazentrifugation (1 h bei 120.000 g) qualitativ beurteilt werden. Ist hierbei ein rötlich gefärbtes Restpellet entstanden, konnte nicht die gesamte Membranfraktion in Lösung gebracht werden. Das ist z.B. bei Inkubationszeiten von weniger als 2 h oder bei der Verwendung von weniger Detergenz zu beobachten.

Aufreinigung

Der klare, rötlichbraune Überstand wird nach der Ultrazentrifugation abgenommen, durch einen Faltenfilter filtriert und dann auf die bereits mit Puffer A (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl, 30% Glycerin, DEC 2- bis 4-fache CMC) äquilibrierte Cobalt-Talon Säule (BD-Bioscience) mit einer Geschwindigkeit von 0,8 ml/min aufgetragen. Da sich bei der Aufreinigung des *bc*-Komplexes leicht Aggregate auf dem Säulenmaterial

festsetzten, wird die Säule vor jeder Anwendung regeneriert (siehe Material und Methoden) und frisch mit 50 mM CoCl_2 -Lösung beladen. Zur Vermeidung von Aggregaten wird die Säule zunächst mit Puffer A (2-fache CMC DEC) voräquilibriert, bis sich eine stabile Basislinie eingestellt hat. Vor dem Probenauftrag wird zusätzlich mit zwei Säulenvolumen Puffer A (4-fache CMC) gespült, um den Abfall der Detergenzkonzentration während des Probenauftrags auf die Säule abzumildern. Auch im Anschluss an den Probenauftrag wird zunächst mit 2 Säulenvolumen Puffer A (4-fache CMC) und dann bis zum Wiedererreichen der Basislinie mit 2-facher CMC (2 ml/min) gewaschen. Die chromatographische Aufreinigung kann visuell verfolgt werden, wird aber auch mit einem UV-Detektor bei 280 nm verfolgt. Für die Elution (1 ml/min) wird NaAc-Puffer mit 300 mM NaCl, 30% Glycerin und DEC (2-fache CMC) versetzt und auf einen pH-Wert von 5,3 (bei 4°C) eingestellt. Da bei niedrigem pH-Wert der Stickstoff am Imidazolring der Histidine zunehmend protoniert wird, verringert sich die Affinität zu den immobilisierten Metallionen und der *bc*-Komplex eluiert als rotbrauner Ring von der Säule. Der Proteinkomplex wird dabei fraktioniert und sofort mit NaP_i -Puffer pH 8 auf einen neutralen Wert von pH 7 eingestellt. Die einzelnen Fraktionen werden im Tricine/SDS-PAGE überprüft, vereint und in Puffer A Ü/N über eine Aca34-Säule gefiltert (0,02 ml/min). Die Fraktionen werden nochmals im Proteingel überprüft, besonders in Hinsicht auf eine vollständige Stöchiometrie der vier UE und entsprechend gepoolt. Der Fraktionspool wird in Konzentratoren mit einem cutoff von 50.000 kDa ankonzentriert, aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Das Ergebnis eines Fraktionspools ist in Abb. 15A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein stabiler Proteinkomplex mit allen vier UE isoliert werden konnte, doch auch unter den oben beschriebenen optimierten Bedingungen konnte eine vollständige Abreicherung von Verunreinigungen nicht erreicht werden.

Gute Ergebnisse konnten mit der Aufreinigung im *Batch*-Verfahren erzielt werden. Bei dieser Methode wird die lokale Proteinkonzentration niedrig gehalten und somit Aggregationseffekte verringert. Dazu wurde das Solubilisat zu dem mit Puffer A (siehe oben) äquilibrierten Säulenmaterial (Cobalt-Talon) gegeben und auf einem Schwenktisch für 20 min inkubiert. Kleine Ansätze wurden bei 3.000 rpm in der Tischzentrifuge (Biofuge13) abzentrifugiert, für größere Ansätze wurde die auf das Säulenmaterial wirkende Gravitationskraft ausgenutzt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das auf dem Säulenmaterial immobilisierte Protein mit 10 Säulenvolumen Puffer A wie oben angegeben gewaschen (jeweils 10 min Inkubation auf dem Schwenktisch). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand farblos war. Die Elution wurde in gleicher Weise bei pH 5,3 durchgeführt. Dieses

Verfahren ist besonders für größere Ansätze sehr zeitaufwendig, führt aber zur Isolierung eines weitgehend stöchiometrischen vier-Untereinheiten Komplexes und zur effektiven Abreicherung von Verunreinigungen. Diese Methode wurde speziell für die Bereitstellung von Material für die Strukturaufklärung angewendet.

Eine deutliche Verbesserung der Aufreinigung konnte durch eine auf 300 mM erhöhte NaCl-Konzentration (vorher 150 mM) und die Zugabe von 30% Glycerin sowohl im Solubilisierungsansatz als auch in allen weiteren Puffern erreicht werden. Beide Substanzen konnten dazu beitragen, dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Säulenmaterial reduziert werden konnten. Die hohe Glycerinkonzentration beeinträchtigt die chromatographische Aufreinigung hinsichtlich der maximalen Fließgeschwindigkeit, erweist sich jedoch auch als nützliche Kryohilfe, die eine stabile Enzymaktivität auch nach einem Gefriervorgang gewährleistet.

Für die Solubilisierung wurde zunächst das kostengünstigere Triton X-100 in einem Protein:Detergenz Verhältnis von 1:2 bzw. 1:1 verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch jeweils nur die Cytochrom *b*-UE mit C-terminalem His₆-Tag aufgereinigt und im Anti-His Western-Blot nachgewiesen werden. Alternativ wurde in weiteren Versuchen mit Dodecyl-Maltosid gearbeitet. Eine vollständige Solubilisierung konnte bei einem Protein:Detergenz Verhältnis von 1:2 erreicht werden. Die weitere chromatographische Aufreinigung führte jedoch in keinem der Versuche zu einem vollständigen vier-Untereinheiten Komplex. Besonders die Rieske-UE konnte unter diesen Bedingungen nur andeutungsweise dargestellt werden, aber auch im Redox-Differenzspektrum zeigte sich eine unzureichende Stöchiometrie der Häm-Komponenten auf.

Neben der Cobalt-Talon Säule wurden auch andere Metallaffinitätsmaterialien getestet. So wurde u.a. mit Nickel bzw. Kupfer beladenes NTA-Material verwendet. Doch unter den oben genannten Aufreinigungsbedingungen wurden mit beiden Materialien mehr unspezifische Wechselwirkungen ausgebildet, die auch in stringenteren Waschsritten nicht entfernt werden konnten, ohne dabei auch die Stöchiometrie der *bc*-Komponenten zu beeinträchtigen. Alle verwendeten Materialien wurden auch dahingehend getestet, ob eine Elution mit Imidazol möglich ist, doch in allen Fällen führte bereits ein Waschsritt, besonders aber die Elution mit Imidazol, zum fast vollständigen Verlust der Rieske-UE.

Auch der für das Cobalt-Talon Material vom Hersteller (BD Bioscience) empfohlene pH-Wert zur alternativen Proteinelution mittels pH-Sprung auf pH 5 führte zum teilweisen Verlust des Rieske-Proteins. Aus diesem Grund wurde die Elution wie oben beschriebenen bei leicht erhöhtem pH (5,3) durchgeführt. Es ergibt sich aus diesem Wert ein Kompromiss zwischen Vollständigkeit und Ausbeute, denn unter diesen Elutionsbedingungen kann das Enzym als stabiler vier-Untereinheiten Komplex isoliert werden, es verbleibt jedoch etwa 20% des gebundenen Proteinmaterials auf der Säule und wird als Ausbeuteverlust in Kauf genommen.

3.3 Charakterisierung des isolierten *bc*-Komplexes

Die ankonzentrierte Proteinprobe wurde zunächst im SDS-Gel nach Schägger aufgetrennt. Relativ zum Proteinmarker stellen sich die vier Untereinheiten des *bc*-Komplexes in der erwarteten Größenabfolge dar: Cytochrom *b*, Cytochrom *c*, Rieske-Protein und FbcX (Abb. 15).

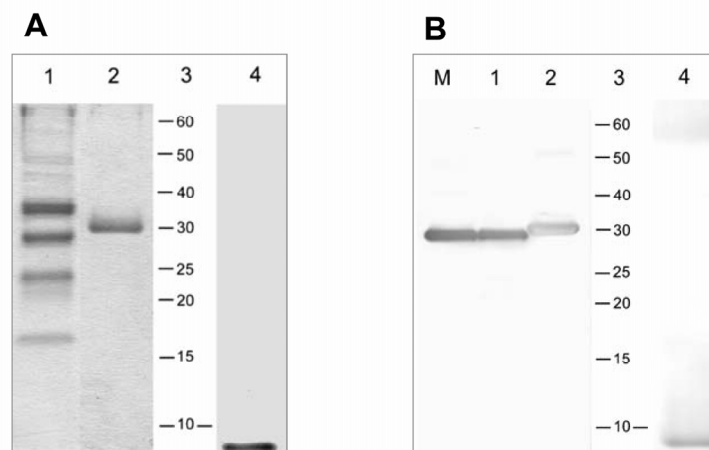


Abb. 15: Der isolierte *T. thermophilus bc*-Komplex besteht aus vier Untereinheiten und wurde im Tricin/SDS-Gel aufgetrennt (Bahn 1 und 2 12%iges Polyacrylamidgel, Bahn 4 15%). **A:** Coomassie-Färbung, **B:** Western-Blot mit Anti-Ttcytc Antikörper gegen die lösliche Häm-Domäne der FbcC-UE. 1: isolierter *bc*-Komplex, 2: Volllängen-Cytochrom *c*, 3: Molekulargewichts-Marker in kDa 4: C-terminales Cytochrom *c*-Fragment (85 aa).

Verschiedene Faktoren beeinflussen das Laufverhalten im SDS-Gel, so dass sich auch bei diesem Enzymkomplex apparente Molekülgrößen ergeben, die von den sequenzbasierten Berechnungen abweichen. In Tabelle 4 wird das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht der aus dem SDS-Gel abgeleiteten Molekülgröße gegenübergestellt. Beim Vergleich fällt besonders die sehr hydrophobe Untereinheit Cytochrom *b* auf (Abb. 9B, Abb. 10 B), die sich im Gel deutlich kleiner darstellt als erwartet, die Untereinheiten Cytochrom *c* und Rieske-Protein, mit nur jeweils einer Transmembranhelix laufen dagegen etwas zu hoch. Das Rieske-Protein zeichnet sich darüber hinaus durch eine reduzierte Anfärbbarkeit mit Coomassie-Farbstoff aus, erst durch eine verlängerte Färbezeit stellt sich die vollständige Proteinbande dar. Der Eindruck einer verringerten Präsenz wird auch dadurch verstärkt, dass sich diese Untereinheit im SDS-Gel z. T. als Doppelbande trennt, ähnlich wie es für das homologe Protein aus *Paracoccus denitrificans* beschrieben wurde (Bachmann *et al.*, 2006) und ist vermutlich auf eine unvollständige Entfaltung bzw. Reduktion der Disulfid-Brücken des Fe₂S₂-Clusters zurückzuführen.

Tab. 4: Molekulare Masse der *bc*-Untereinheiten und apparentes Laufverhalten im SDS-Gel

Untereinheit	Anzahl der Aminosäuren	M_r/kDa	M_{r,app}/kDa
Cytochrom <i>b</i>	420	47,5	36
Cytochrom <i>c</i>	243	26	28
Rieske-Protein	210	22,4	24
FbcX	160	17,8	17

M_r: als Berechnungsgrundlage diente die DNA-Sequenz

M_{r,app}: apparente Masse nach Laufverhalten

3.3.1 Immunologische Identifizierung

Zur weiteren Identifizierung der Untereinheiten standen Antikörper gegen den C-terminalen His₆-Tag an der Cytochrom *b*-Untereinheit und der polyklonale Antikörper Anti-Ttctc, gegen die C-terminale, lösliche Domäne des *T. thermophilus* Cytochrom *c* (siehe Kap. 3.2.1) zur Verfügung. Die immunologische Detektion wurde in getrennten Western-Blots durchgeführt und ist in Abb. 15B dargestellt. Beide Ergebnisse zeigen eine spezifische Antigen-Antikörper Reaktion auf erwarteter Bandenhöhe, unspezifische Nebenreaktionen sind nicht festzustellen. Der immunologische Nachweis kann somit als erster Hinweis auf die Identität der Untereinheiten gewertet werden

Darüber hinaus konnte mit Hilfe des Antikörpers Anti-Ttctc gezeigt werden, dass die lange N-terminale Domäne des Cytochrom *c* auch im reifen Proteinkomplex vorhanden ist. Dazu wurde das heterolog in *E. coli* exprimierte und über einen C-terminalen His₆-Tag aufgereinigte Vollängen-Cytochrom *c* (Kap. 3.7.1) parallel zum homolog exprimierten und aufgereinigten *bc*-Komplex sowie zu nativen *Thermus* Membranen im Western-Blot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die immunologische Detektion der aufgereinigten Cytochrom *c*-Untereinheit auf gleicher Höhe wie in solubilisierten Membranen erfolgt, es findet somit keine posttranslationale Prozessierung dieser Untereinheit statt. Auch das heterologe Vollängen-Protein wird auf gleicher Höhe angefärbt, abgesehen von einer leichten Verschiebung hin zu größerem Molekulargewicht, was auf die Anwesenheit des His₆-Tags zurückzuführen ist.

3.3.2 MALDI-Massenspektrometrie

Die weitere Identifizierung des vier-Untereinheiten *bc*-Komplexes erfolgte mit MALDI MS und MS/MS. Dazu wurde der aufgereinigte Enzymkomplex zunächst über Tricin/SDS-PAGE aufgetrennt. Die resultierenden Banden wurden ausgeschnitten, die Proteine aus dem Gel extrahiert (siehe Material und Methoden) und über Nacht mit Trypsin verdaut. Die Analyse wurde von C. Corvey, AK Prof. Karas durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war bereits die gesamte Genomsequenz von *T. thermophilus* HB27 öffentlich verfügbar, die MALDI-TOF-MS Ergebnisse für alle vier Untereinheiten des *T. thermophilus bc*-Komplexes konnten deshalb direkt anhand des Vergleichs mit Proteindatenbanken über das spezifische Muster der Peptidmassen (*mass fingerprint*) mit einer Massengenauigkeit höher 20 ppm identifiziert werden. Für die Untereinheiten Cytochrom *c* und Cytochrom *b* konnte die weiterführende Identifizierung mit MALDI MS/MS bereits nach der Direkten Co-Immunreaktion durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.3.2 beschrieben und werden in Abb. 16 gezeigt. Die *bc*-Untereinheiten Rieske-Protein und FbcX konnten erst nach chromatographischer Aufreinigung in ausreichender Menge der MALDI Analytik zur Verfügung gestellt werden und wurden nach der Identifizierung mit MALDI-MS weitergehend in der Peptid-Fragmentierung analysiert. Für das Rieske-Protein konnte die Aminosäureabfolge des Fragments HGAQVIAGPPRPVQLPVR nachgewiesen werden, für FbcX des Fragments FFGREEVITEEEK. Somit kann gezeigt werden, dass alle vier Untereinheiten auch nach Aufreinigung Teil eines weitgehend stabilen Enzymkomplexes sind.

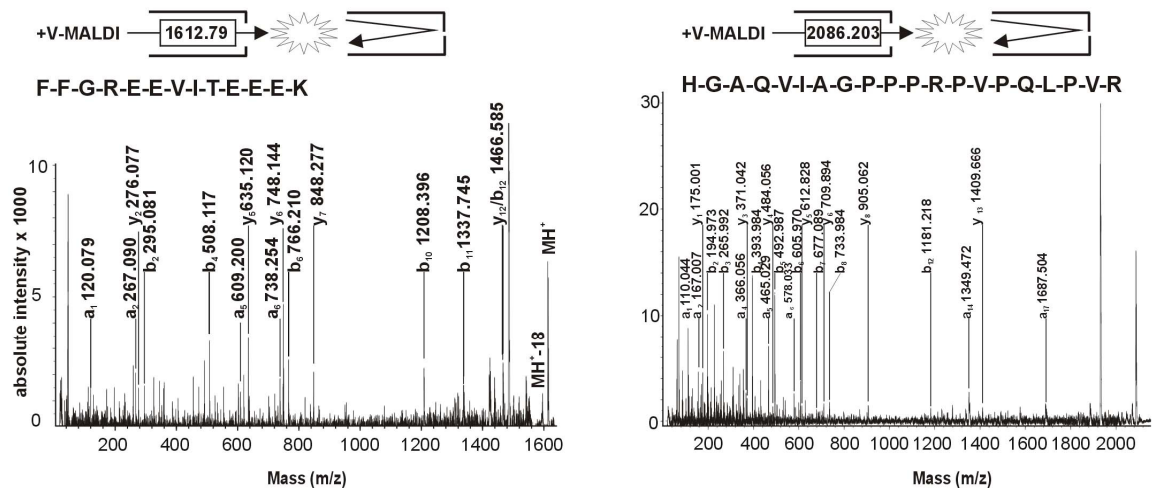


Abb. 16: Identifizierung der *Thermus*-Untereinheiten FbcX und Rieske-Protein nach chromatographischer Aufreinigung mittels MALDI-MS und MS/MS (MALDI-TOF/TOF). A: gezeigt wird das MALDI-MS/MS Spektrum des FbcX-Peptids FFGREEVITEEEK. B: MALDI-MS/MS Spektrum des Rieske-Proteinfragments HGAQVIAGPPPRPVPQLPVR. Die resultierenden MS/MS-Peaks sind jeweils mit der resultierenden Fragmentmasse (Da) und dem Ionen-Typ beschriftet. Gezeigt werden: C-terminal (y -Ionen), N-terminal (b - und a -Ionen), sowie Satelliten-Ionen (w -Ionen).

3.3.3 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung sollte Aufschluß darüber geben, ob die aufgrund der DNA-Sequenz erwartete Aminosäureabfolge auch tatsächlich im reifen Proteinkomplex vorhanden ist oder ob Teile als Signalsequenz fungieren und posttranslational entfernt werden. Die Analytik der N-terminalen Sequenzierung wurde von T. Soulimane (University of Limerick, Irland) durchgeführt. Dazu wurden die vier Untereinheiten des aufgereinigten *bc*-Komplexes mittels HPLC getrennt.

Die Methionyl-Bindungen wurden mit Cyan-Bromid gespalten und die resultierenden Peptidfragmente vor der Analyse über HPLC gereinigt. Es ergaben sich folgende N-Termini: Cytochrom *b* MYRWLDERLDRG, Rieske-Protein MDEREV und FbcX MYRNDPILPTFAL. Die Untereinheiten Cytochrom *b* und FbcX waren N-Formylmethionin-blockiert und wurden deshalb vor der Analyse zunächst deformyliert. Für Cytochrom *c* konnte mit dieser Methode keine N-terminale Sequenz ermittelt werden.

YP_145196|420 aa|Chinol:Cytochrom *c* Oxidoreductase, Cytochrome *b* [*Thermus thermophilus* HB8]
 MYRWLDERLRLDLRGLYHKVLRKAFVHHSFFLGEITLFAFVVLVLTGVFLLTNYEPSIREVRLADGR**TVPAAYA**
SVLYIDSLPFGAVIRSLHHWSAHVMIAAAFHMLRLILLSGAYKKPRELNLYLVGLGLLGLTVVTAFTGYALPYD
 NYAVTATRIGYGIHSSIPWIGGALADLMFAGEFPGSEKSI PRLFSLHVLWLPGLMALIGLHLAIMIKQKHTQ
 PRYAERVAPGKILGVMPYQQMVMMLILFALYVGILTI IAGAFLAHPVEAFGPPTPQTPQVKPDWYFLWLYGL
 LQIIPSSWEFRLFGATIGPEFIGGVVPGILGLVAVLLPFVDTRKDKMR**YMELPSEHPVR**TSAVLALLVFFLM
 ASLAGYKIDFQQQGSILGENAVLWTLVLGGPLLTFLVSYVLMRVFYGKAREGEAL

YP_145199|243 aa|Chinol:Cytochrom *c* Oxidoreductase; *c*-type Cytochrom [*Thermus thermophilus* HB8]
 MIVDRIEVYLDQGTPEPVAVLKEPPYRWKLDTR**NLPDGEHTLRVVT**HFRGGGQEI RVI PFTVNNYPDVLVLGVD
EGGEVAGEVELRMHVGEPELPVETPRFNPLWYAVAAVVVLGGIWSYFALSPAERIAEEVAPPAQEAQAHGGG
QEAAAAPAGVDPALMEK GKAIYEANCAACHQANGQGMPPAFPALAGNPNLQDAQMILDIVKNGRGAMPVANGF
SEEELIAVATYIRNSFGNSFGPVE

YP_145197|210 aa|Chinol:Cytochrom *c* Oxidoreductase, Rieske-Untereinheit [*Thermus thermophilus* HB8]
 MDEREVRLRQSRRLFLK**TVIGTGIGLSLVS**AFYVGASLRPREEVTPEKEPLKPGDILVYAQGGGEPKPIRLE
ELKPGDPFVLAYPM**DPKTK**VVKS**G**EAKNTLLVARFDPEELAPEVAQHAAEGVVAYSAVCTHLGCIVSQWVADE
EAALC**P**CHGGVYDLR**HGAQVIAGPPRPVPOLPVR**VEDGVLVAAGEFLGPVGVQASAGAYTRWV

YP_145198|160 aa|Chinol:Cytochrom *c* Oxidoreductase; FbcX-Untereinheit [*Thermus thermophilus* HB8]
 MYRNDPILP**TFALILAAGLFY**AA**YLDGR**H**IARLLGHVPQELS**VGQIGLMAFGAVLLLLYGLMGLVSYWLEGIEL
 RPGRHFPTPSTAPVAAGVILVLLLLTALS**GGFFVRL**LVYAAQTGHNP**TWLQGLIFG**SISLVVAALFGIYRR**FFGR**
EEVITEEEKSEFPW

Abb. 17: Identifizierung der vier *bc*-Komplex Untereinheiten von *T. thermophilus* mit MALDI-MS und N-terminaler Sequenzierung. Die in *fett* gedruckten Peptid-Fragmente wurden über MALDI-TOF-MS Spektren erhalten und mittels spezifischem Muster der Peptidmassen identifiziert. Doppelt unterstrichene Peptide wurden zusätzlich über Peptid-Fragmentierung analysiert. Unterstrichene Sequenzen wurden mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert.

3.3.4 Nachweis und Charakterisierung der Cofaktoren

3.3.4.1 Die Häm-Cofaktoren der Cytochrome

Das *c*-Typ Häm der Cytochrom *c*-Untereinheit ist über das Bindemotiv CAACH kovalent mit dem Proteinteil verknüpft und lässt sich deshalb auch im denaturierenden SDS-Gel über eine Häm-Färbung darstellen. Auf diese Weise lässt sich im aufgereinigten

bc-Komplex eine Bande in der erwarteten Höhe der Cytochrom *c*-Untereinheit bei 28 kDa darstellen, weitere Häme vom *c*-Typ werden nicht detektiert.

Der aufgereinigte Enzymkomplex liegt in oxidierten Form vor (Abb. 18). Wird dieser mit Na-Ascorbat reduziert, können im Redox-Spektrum spezifisch die Eigenschaften des *c*-Typ Häm in Cytochrom *c* aufgezeigt werden. Im Bereich der α -Bande stellt sich ein gesplitteter Peak mit einem Maximum bei 555 nm und einer Schulter bei 548,5 nm dar (Abb. 19, Spektrum C). Wird zusätzlich mit Dithionit reduziert, können auch die Absorptionseigenschaften der in der Cytochrom *b*-Untereinheit vorhandenen Häme vom *b*-Typ bei 562 nm gezeigt werden (Abb. 19, Spektrum A).

Die Absorptionseigenschaften der beiden Häm-Typen werden über Pyridin-Hämochrom Spektren ermittelt (Abb. 20), indem die teilweise Überlagerung dieser Chromophore im Gesamtkomplex durch eine Matrix-Rechnung nach Berry und Trumpower, 1987, rechnerisch korrigiert werden. Es ergeben sich daraus die Extinktionskoeffizienten für $\epsilon_{555-620} = 15,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Häm *c* und für $\epsilon_{561-620} = 23,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ Häm *b*. Diese berechneten Extinktionskoeffizienten werden im Folgenden zur Bestimmung der Konzentration und der Ausbeute herangezogen. So ergeben 1 l Kulturmedium je nach Anzucht ca. 180 mg Gesamtmembranprotein. Daraus lassen sich ca. 3-8 mg aufgereinigter *bc*-Proteinkomplex isolieren, so dass das homolog exprimierte His₆-markierte Enzym mindestens zu einem Anteil von 2-5% in der Membran vorliegen muss. Darüber hinaus kann die Stöchiometrie der Häm-Cofaktoren ermittelt werden. Wendet man die Extinktionskoeffizienten im Redox-Spektrum an, so ergibt sich ein Verhältnis von 1:1,8 (Häm *c* zu Häm *b*).

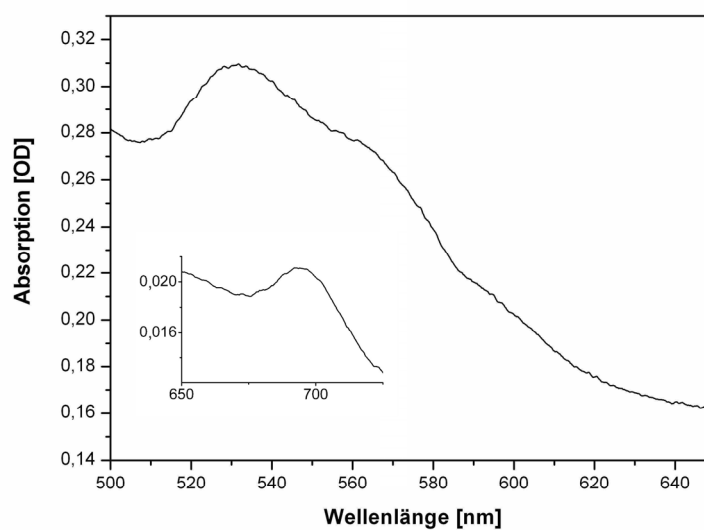


Abb. 18: UV-vis Spektrum des isolierten *T. thermophilus bc*-Komplexes im oxidierten Zustand. Der Einschub zeigt die Charge Transfer-Bande des Ferricytochrom *c* bei 695 nm.

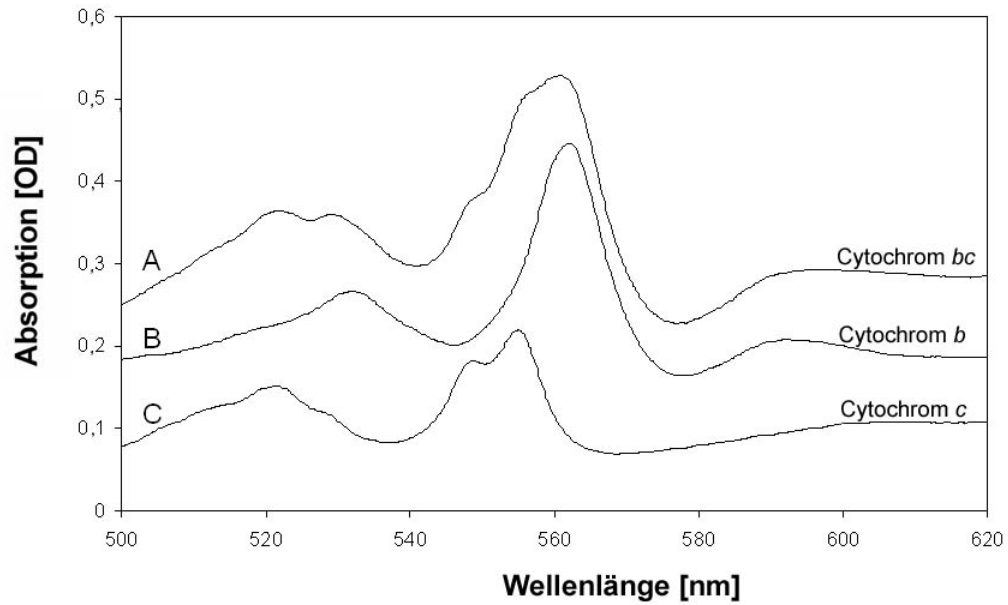


Abb. 19: Redox-Differenzspektrum des isolierten *bc*-Komplexes. A: Dithionit-reduziert minus oxidiert; B: Berechnetes Doppel-Differenzspektrum (A minus C); C: Ascorbat-reduziert minus oxidiert.

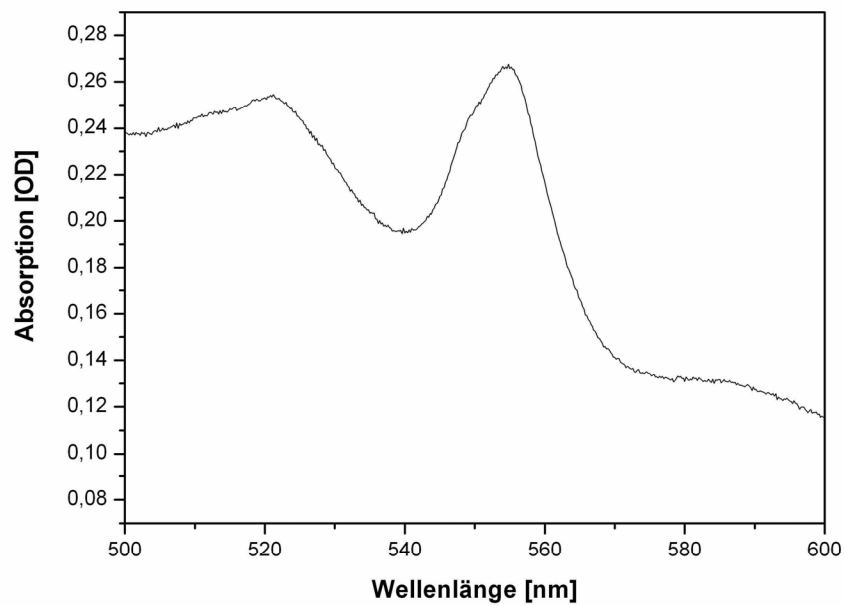


Abb. 20: Pyridin-Hämochrom Spektrum des aufgereinigten *T. thermophilus bc*-Komplexes.

3.3.4.2 EPR-Spektrum des Fe₂S₂-Zentrums im Gesamtkomplex

Ein EPR-Spektrum des löslichen Rieske-Fragments zur Darstellung des Fe₂S₂-Zentrums wurde bereits 1984 von J. Fee beschrieben. Zum Nachweis des korrekten Einbaus dieses Eisen-Schwefel-Clusters auch im aufgereinigten Gesamtkomplex wurde in Zusammenarbeit mit S. Lyubenova (AK Prof. Prisner, Universität Frankfurt/M.) ein EPR-Spektrum aufgenommen. Dazu wurde die gefilterte Probe auf eine Endkonzentration von 150 µM in 20 mM Na-Ascorbat Puffer in einem Messvolumen von 80 µl eingestellt. Alternativ wurde mit Dithionit reduziert, dieses Ergebnis des reduzierten Komplexes ist in Abb. 21 dargestellt und zeigt eine weitgehende Übereinstimmung zu den bisher veröffentlichten Daten. Die g-Werte können mit 2,02; 1,90; 1,78 (Werte von Fee *et al.*, 1984: 2,02; 1,90; 1,80) angegeben werden.

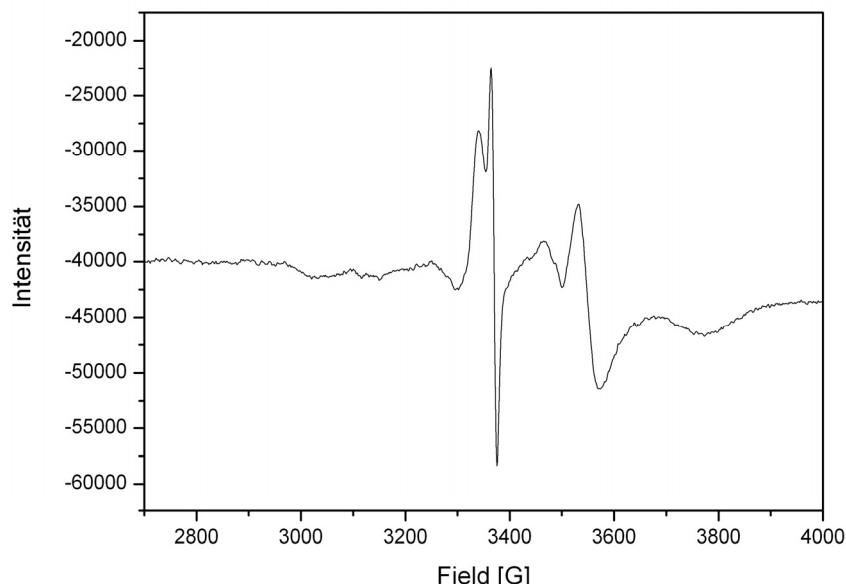


Abb. 21: EPR-Spektrum des isolierten vier-Untereinheiten *bc*-Komplexes. Zur Darstellung des reduzierten Zustandes wurde der Proteinprobe Dithionit in einer Endkonzentration von 80 µM zugegeben.

3.3.4.3 Redoxpotentiale

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des isolierten *bc*-Komplexes mußten Substrate und Akzeptoren gefunden werden, die sich sinnvoll in die Potentialreihe der Einzelkomponenten einfügen. Das Redoxpotential für das Fe₂S₂-Zentrum des Rieske-Fragments ist bereits in der Literatur bekannt (Link, 1999). Für die weiteren

redoxaktiven Zentren des Gesamtkomplexes wurden die Potentiale in Kooperation mit Dr. P. Hellwig ermittelt und sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Tab. 5: Potentiale der redoxaktiven Zentren im Gesamtkomplex

Häm b_L	Häm b_H	$Fe_2S_2^*$	Häm c
-205 mV	-40 mV	140 mV	210 mV

*Literaturangabe (Link 1999)

3.4 Die enzymatische Aktivität des isolierten *bc*-Komplexes

Zum Nachweis einer spezifischen enzymatischen Aktivität des aufgereinigten *bc*-Komplexes sollte ein Testsystem etabliert werden, das möglichst aus den natürlichen Reaktionspartnern besteht. Auf diese Weise kann ein Substratumsatz dargestellt werden, der den nativen Bedingungen nahe kommt und somit gute Aussagen bezüglich Umsatzrate und inhibitorischen Effekten zulässt. Da Menachinon-8 als einziges Chinon in nativen *Thermus* Membranen nachgewiesen wurde (Collins & Jones, 1981), werden die Elektronen vermutlich von diesem auf den *bc*-Komplex übertragen und von dort über das Shuttlemodul Cytochrom c_{552} an die ba_3 -Oxidase weitergeleitet (siehe Einleitung).

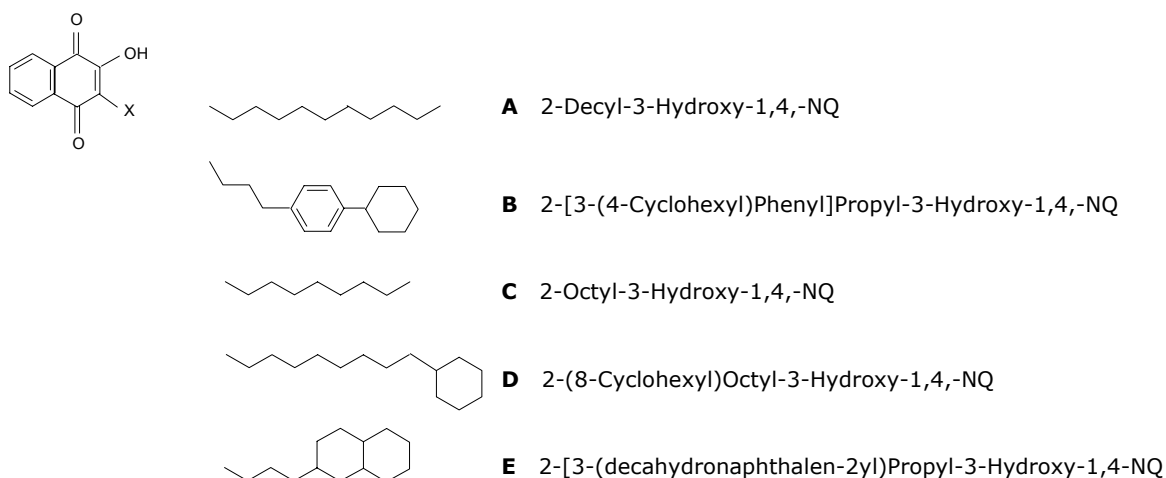
Menachinon-8 ist durch seine lange Isoprenoidkette stark hydrophob und damit für einen Assay in wässrigem Milieu ungeeignet. Ersatzweise sollten deshalb kürzerkettige und damit hydrophilere Derivate verwendet werden. Diese mussten jedoch zunächst mit dem Elektronenakzeptor des *Thermus bc*-Komplexes Cytochrom c_{552} auf unspezifische Wechselwirkungen hin untersucht werden, so dass in einem Aktivitätstest unerwünschte Nebenreaktionen ausgeschlossen werden können. Für den Assay wurde die heterologe Expression des Cytochrom c_{552} in *E. coli* (siehe 3.7.4), und die nachfolgende Reinigung (Material und Methoden) dahingehend optimiert, dass die spektralen Charakteristika sowohl im UV-vis als auch im CD-Spektrum weitgehend mit denen des homolog exprimierten Proteins übereinstimmten. Für vergleichende Messungen stand darüber hinaus das von T. Soulimane aus *Thermus* HB8 aufgereinigte Protein zur Verfügung (Than *et al.*, 1997).

Für Vorversuche wurden die verschiedenen Substrate mit einem geeigneten Reduktionsmittel (Na-Ascorbat, Dithionit, metallisches Zinkpulver als Katalysator in Gegenwart von 0,18 M HCl; Rothery & Weiner, 1998) teilreduziert und direkt im

Anschluß in Messpuffer (50 mM NaP_i pH 7, 150 mM NaCl, 30 % Glycerin, 0,16 % DEC) mit oxidiertem Cytochrom c₅₅₂ gemischt. Die Reduktion des Elektronenakzeptors wurde, wie auch bei allen nachfolgenden Versuchen, bei 552 nm anhand einer Zunahme der Absorption verfolgt. Diese Vorversuche wurden für die Substrate Lapachol, Menadiol, Dimethyl-Naphthochinol (DMN) und Ubichinol bei RT durchgeführt. Leider konnte unter den hier beschriebenen Reaktionsbedingungen mit allen Substraten ein leichter Anstieg der Absorption, also ein Elektronentransfer auf das Cytochrom, festgestellt werden und dieser Effekt wurde durch eine Erhöhung der Messtemperatur auf 45°C noch deutlich verstärkt. Die Subtraktion dieser Autoxidation von einer enzymatischen Hauptreaktion würde somit nur zu sehr ungenauen Ergebnissen führen, so dass die oben genannten Elektronendonoren für einen spezifischen Assay ungeeignet sind. Die Verwendung des aus *Thermus* isolierten Cytochrom c₅₅₂ führte in diesen Versuchen zu keiner Verbesserung der Ergebnisse.

In einem weiteren Versuch wurden verschiedene Substratanaloga des Menachinons (siehe Tab. 6) auf ihre Autoxidationsrate mit Cytochrom c₅₅₂ hin getestet. Da diese Substanzen nur unter anaeroben Bedingungen in einem stabilen reduzierten Zustand gehalten werden können, wurde die Reduktion mit Dithionit und auch die anschließende Messung in einem geschlossenen System mit vollständig entgastem Puffer durchgeführt (Apparatur und Anleitung: G. Madej, AK Lancaster, MPI Frankfurt/M.). Doch auch unter anaeroben Bedingungen fand ein Elektronentransfer zwischen Substrat und Akzeptor statt, so dass sich auch dieser Ansatz für einen enzymatischen Test als untauglich erwies.

Tab. 6: Naphthochinon (NQ) Derivate



Ein stabiler Aktivitätstest konnte dagegen mit den nicht-physiologischen Komponenten Decylubichinol (DQ, Sigma) als Elektronendonator und Cytochrom c_{550} (aus Pferdeherz, Sigma) als -akzeptor dargestellt werden. Beide Substanzen zeigen auch bei 45°C in Messpuffer (siehe oben) nur eine geringe Autoxidationsrate und konnten somit für den spezifischen Nachweis einer enzymatischen Aktivität des isolierten *Thermus bc*-Komplexes herangezogen werden. Bei einer höheren Messtemperatur dagegen, die den physiologischen Wachstumbedingungen von *Thermus* entsprechen würde, ist auch bei diesen Reaktionspartnern starke Autoxidation festzustellen, so dass für die folgenden Messungen eine verringerte enzymatische Aktivität des *bc*-Komplexes bei 45°C in Kauf genommen werden musste. Der Standardassay wurde in einem Messvolumen von 100 μ l durchgeführt. Dazu wurde das Spektrometer und der Messpuffer auf ca. 45°C vorgewärmt, DQ (50 μ M) und Cytochrom c_{550} (ca. 40 μ M) vorgelegt und die Reaktion mit *Thermus bc*-Komplex (50-400 pM Endkonzentration) gestartet. Die Zunahme der Absorption bei 550 nm ist in Abb. 22B dargestellt und lässt unter Verwendung der Anfangssteigung auf eine Wechselzahl von etwa einem Elektron pro sec. schließen. Dieser Standardtestansatz wurde auch zur Bestimmung der reversiblen Thermostabilität des isolierten *Thermus bc*-Komplexes in Kap. 3.5.1 verwendet.

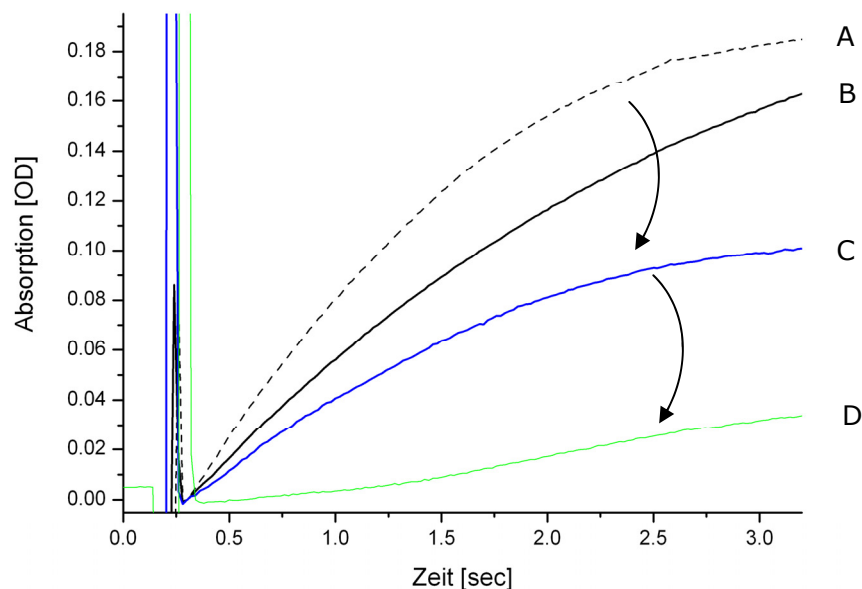


Abb. 22: Enzymatische Aktivität des isolierten *Thermus bc*-Komplexes bei 45°C. Der Test wurde in detergentenhaltigem Puffer mit reduziertem DQ (50 μ M) als Elektronendonator und Pferdeherz Cytochrom c_{550} (40 μ M) als -akzeptor angesetzt und mit 100 nmol *Thermus bc*-Komplex gestartet; die Extinktionszunahme wird bei 550 nm gemessen (B). Durch die Zugabe von 2 μ l DMSO wird die Umsatzrate gesteigert (A), eine verringerte Enzymaktivität kann nach Zugabe von 2 μ l Substanz Octyl-NQ (50 μ M, gelöst in DMSO) (C), bzw. 4 μ l (D) beobachtet werden.

Zur weiteren Charakterisierung der enzymatischen Reaktion kann für die hier angegebenen Reaktionsbedingungen ein theoretischer Wert für K_m und V_{max} ermittelt werden. Da diese Werte unter Verwendung physiologischer Reaktionskomponenten und im optimalen Temperaturbereich deutlich abweichen können, sollen hier exemplarisch nur die Werte für den Elektronentransfer zwischen DQ und *bc*-Komplex angegeben werden. Dazu wurden dem Standardassay fünf verschiedene DQ Konzentrationen zugegeben (37,5; 66,7; 100; 200; 375 μM) und die resultierende Anfangssteigung in Doppelbestimmung ermittelt. Diese Werte wurden in einem Diagramm nach Michaelis-Menten aufgetragen (siehe Abb. 23) und mit einer nicht-linearen Trendlinie in Abb. 23 dargestellt. Unter den oben genannten Bedingungen stellt sich ein typisch hyperbolischer Verlauf dar, so dass nach der Michaelis-Menten-Gleichung die Werte für K_M (83 μM) und V_{max} (12,4 $\mu\text{M}/\text{sec}$) ermittelt wurden.

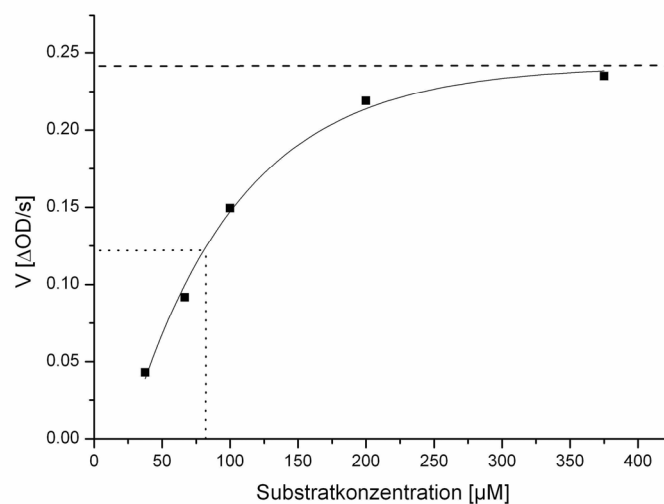


Abb. 23: Die Enzymaktivität des isolierten *T. thermophilus* *bc*-Komplexes wurde mit verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt und konnte zur Darstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik verwendet werden.

Um die Spezifität der Enzymreaktion nachzuweisen, wurden dem Testansatz verschiedene Hemmstoffe zugegeben, die bei bekannten *bc*₁-Komplexen (z. B. dem Hefe-Komplex) eine inhibitorische Wirkung erzielen. Die in Tab. 7 aufgelisteten Substanzen wurden in der angegebenen Menge (Endkonzentration im Testansatz) vorgelegt und der Test, wie oben beschrieben mit Enzym gestartet.

Tab. 7: Klassische *bc*-Komplex Inhibitoren

Inhibitor	Endkonzentration
Myxothiazol	20-80 μM
MOA-Stilben	20-80 μM
Strobilurin	20-80 μM
Antimycin A*	100-500 μM
Stigmatellin	20-80 μM
Aurachin C**	20-100 μM

* gelöst in Ethanol; alle anderen Substanzen wurden in DMSO gelöst.

** zur Verfügung gestellt von Prof. W. Oettmeier, Ruhr-Universität Bochum.

Da die verwendeten Hemmstoffe in DMSO oder Ethanol gelöst wurden, mussten zunächst Referenzmessungen für das entsprechende Lösungsmittel durchgeführt werden, deren Umsatzrate für die Bestimmung der Inhibierung als 100%-Wert verwendet wurde. Beide Referenzmessungen ergaben unter Zugabe von 10% Lösungsmittel eine gesteigerte Aktivität des *Thermus bc*-Komplexes, bei der anschließenden Messung der Hemmstoffe konnte jedoch für keinen der klassischen *bc*-Inhibitoren eine Verringerung um mehr als 10% der Enzymaktivität gemessen werden.

Um dennoch den Nachweis einer spezifischen Enzymreaktion erbringen zu können, wurden dem Standardtest die oben beschriebenen Menachinon-Substratanaloga (Tab. 6) in oxidiert Form und im molaren Verhältnis 1:1 zu reduziertem DQ zugegeben. Mit diesen Messungen wurde das Verdrängungspotential der einzelnen Substanzen gegenüber DQ an der Substrattasche des *Thermus bc*-Komplexes bestimmt. Die Effektivität der Verdrängung entspricht der in Tab. 6 angegebenen Reihenfolge von oben nach unten abfallend. In Abb. 22C ist dieser Effekt für die Substanz Octyl-NQ (Tab. 6C) dargestellt, darüber hinaus kann gezeigt werden, dass eine Verdopplung der Konzentration von Octyl-NQ (Verhältnis DQ:Octyl-NQ; 1:2) zu einer weiteren Verringerung der Umsatzrate führt.

Die nicht-physiologische Rückreaktion von reduziertem Cytochrom c_{552} über den *Thermus bc*-Komplex zu oxidierten Chinonen führte zu keiner Abnahme der Absorption bei 552 nm, es wurden somit weder Elektronen auf den *bc*-Komplex noch auf eventuell vorhandene andere Elektronenakzeptoren (z. B. Oxidasen) als Verunreinigung übertragen.

In weiteren Versuchen wurden Chinone mit unterschiedlichen Redoxpotentialen im Bereich von ca. 450 bis -150 mV verwendet (synthetisiert und zur Verfügung gestellt von H. Nasiri, AK Prof. Schwalbe, Universität Frankfurt/M.). Diese Experimente konnten noch nicht abschließend interpretiert werden und bedürfen einer weiteren Optimierung.

3.5 Temperaturstabilität des isolierten *bc*-Komplexes

T. thermophilus ist in der Lage, auch bei Temperaturen bis zu 85°C zu wachsen und sich zu vermehren (siehe Einleitung). In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die Thermostabilität des isolierten Proteinkomplexes auch in Detergenzumgebung aufrecht erhalten bleibt oder ob die natürliche Lipidumgebung Grundvoraussetzung für die thermostabilen Eigenschaften ist.

3.5.1 Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität

Für diesen Versuch wurden jeweils 50 µl einer aufgereinigten Proteinprobe (90 µM) in 11 fest verschließbare Plastikgefäße pipettiert. 9 dieser Proben wurden für 10 min bei 40-120°C (jeweils in 10°C-Schritten) inkubiert, eine Probe wurde nicht erhitzt und eine weitere wurde für 10 min dem Standard-Autoklavivorgang unterzogen. Anschließend wurden alle 11 Proben auf Eis inkubiert und im Aktivitätstest auf Restaktivität hin untersucht. Dazu wurden 10 µl der jeweiligen Probe mit 90 µl *bc*-Puffer (50 mM NaP_i pH 8, 150 mM NaCl, 30% Glycerin, 1,6 g/l Decyl-Maltosid) versetzt, 5 µl dieser 1:10 Verdünnung (9 µM) in das Standard-Protokoll zur Messung der enzymatischen Aktivität eingesetzt (siehe Kap. 3.4).

Konzentrierte Proteinproben weisen häufig eine höhere Stabilität auf als verdünnte. Um diesen Effekt zu überprüfen, wurde der oben beschriebene Messansatz ein zweites Mal durchgeführt, doch wurde diesmal die 1:10 Verdünnung vor der Hitzeinkubation durchgeführt. Für die Messung der Restaktivität wurden ebenfalls 5 µl der 9 µM Proteinprobe eingesetzt, auch die Kontrollen wurden entsprechend durchgeführt.

Beide Versuchsansätze wurden an einem zweiten Messtag mit einer neuen Proteincharge wiederholt. Der Mittelwert für den jeweiligen Messansatz ist in Abb. 24 dargestellt.

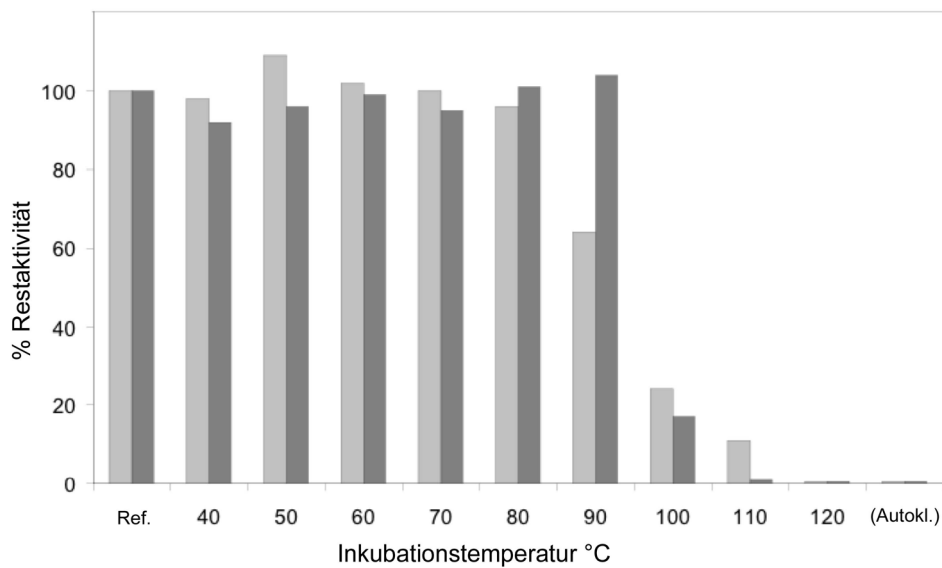


Abb. 24: Restaktivität (%) des isolierten *bc*-Komplexes nach 10 min Inkubation bei der angegebenen Temperatur. Ref.: die unbehandelte Vergleichsprobe entspricht 100% Aktivität. Autokl.: die Probe wurde einem Standard-Autoklavierungsvorgang unterzogen. Die durch hellgraue Balken dargestellten Proben wurden mit einer Konzentration von 9 µM inkubiert, dunkelgraue entsprechen Proben mit 90 µM.

In der graphischen Darstellung ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität im optimalen Wachstumsbereich auch im isolierten Proteinkomplex erhalten bleibt. Die konzentrierte Probe bleibt bis 90°C stabil, zeigt aber dann bereits bei 100°C nur noch eine Restaktivität von ca. 20%. Die verdünnte Probe zeigt bis 80°C volle Stabilität, die denaturierenden Prozesse wirken jedoch schon bei einer Inkubation von 90°C, hier zeigt die Probe nur noch eine Aktivität von ca. 60%. Der weitere Abfall der Restaktivität verläuft langsamer, so sind bei 100°C ca. 30% und bei 110°C noch 15% Aktivität zu messen.

3.5.2 Entfaltungsuntersuchung des *bc*-Komplexes mittels CD-Spektroskopie

Die thermische Stabilität des isolierten *bc*-Komplexes wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde die Proteinprobe mit *bc*-Puffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 30% Glycerin, 1,6 g/l Decyl-Maltosid) auf eine Endkonzentration von 6 µM verdünnt. Bei einer Wellenlänge von 222 nm lassen sich die in allen vier Untereinheiten des *bc*-Komplexes vorhandenen α -helikalen Faltungen darstellen. Eine kontinuierliche Temperaturerhöhung im Bereich von 15-97°C führt zu Veränderungen dieser Sekundärstrukturen und kann im CD-Spektrum beobachtet werden; die

Messung wird in einer Küvette mit 1 mm Schichtdicke an einem Jasco J-810 Spektrometer aufgenommen. Die Proteinentfaltung ist ein kooperativer Prozess, der sich als sigmoidale Funktion darstellt, der ermittelte Wendepunkt dieser Kurve wird als Schmelzpunkt bezeichnet. Aufgrund der Thermostabilität des isolierten *bc*-Komplexes von *T. thermophilus* kann die erwartete Kurve im Temperaturbereich bis 97°C nicht vollständig dargestellt werden.

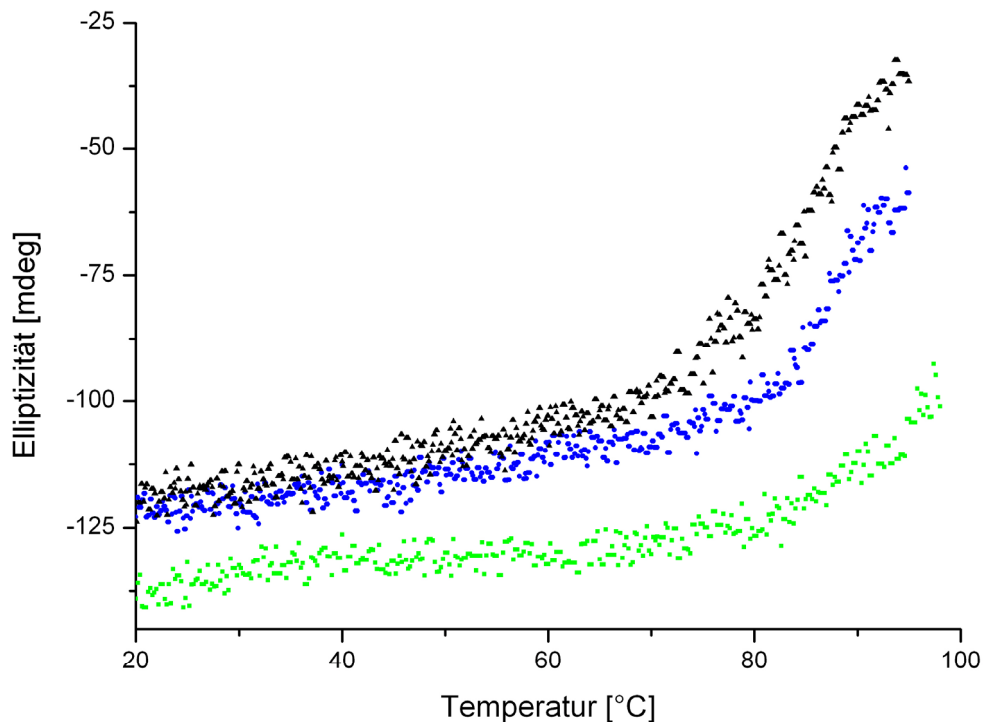


Abb. 25: CD-Spektrum des isolierten *bc*-Komplexes ohne Zusätze (grün), mit 1 M (blau) und mit 2 M (schwarz) Guanidinhydrochlorid. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 222 nm mit einer Küvette von 1 mm Schichtdicke im Temperaturbereich von 15-97°C an einem Jasco J-180 Spektrometer. Dafür wurde die Proteinprobe auf 6 μ M verdünnt. Dargestellt ist der Temperaturbereich von 20-95°C.

Es ist in Abb. 25 (grüne Kurve) zu erkennen, dass die thermische Denaturierung bei ca. 70°C beginnt, doch ist der Verlauf auch für eine mathematische Extrapolation der Funktion unzureichend. Ist der Schmelzvorgang nicht optimal darstellbar, können der Probe denaturierende Agenzien zugegeben werden. Harnstoff konnte in diesem Temperaturbereich nicht verwendet werden, deshalb wurde 1 M bzw. 2 M Guanidinhydrochlorid zugegeben. Dieses Agens lagert sich an Proteinstrukturen und führt damit zur Versteifung der Strukturen. Der Verlust der Flexibilität fördert den

Denaturierungsprozess und senkt damit den Schmelzpunkt. Dieser Effekt kann in Abb. 25 (blaue Kurve) durch die Zugabe von 1 M Gua aufgezeigt werden. In Anwesenheit von 2 M Gua kann die Entfaltung des Proteins soweit verstärkt werden, dass die Plateauphase der sigmoidalen Funktion zumindest im Ansatz beobachtet werden kann. aber auch unter diesen Messbedingungen ist der Entfaltungsvorgang bis 97°C noch nicht vollständig abgeschlossen. Die weitere Zugabe von Guanidinhydrochlorid führte bei der Wellenlänge von 222 nm zu einem Absorptionsshift wodurch die Darstellung der Sekundärstrukturen verhindert wurde. Alle drei Kurven zeigen einen leichten Anstieg der Elliptizität im Temperaturbereich vor der thermisch induzierten Entfaltung, dieser Anstieg wird durch die Zugabe von Guanidinhydrochlorid verstärkt und erschwert eine Anpassung der Kurven an eine sigmoidale Funktion. Für die thermische Entfaltung des *bc*-Komplexes in Anwesenheit von 2 M Gua kann somit ein ungefähre Schmelzpunkt von 80°C angegeben werden, der für den Schmelzvorgang ohne Zusatz um 10-15°C höher liegen könnte.

3.6 Konstruktion eines Plasmids zur Deletion des *fbc*-Operons

Für die Expression von Struktur- und Funktionsmutanten des *bc*-Komplexes soll ein *bc*-Deletionsstamm hergestellt werden, der die homogene Isolierung von Proteinvariationen gewährleistet. Dazu wird ein *Thermus*-Suizidvektor hergestellt, der die zwei stromauf- und -abwärts des *fbcC*XFB-Operons liegenden homologen Flanken enthält, an denen die Ereignisse zur Doppelt-homologen Rekombination stattfinden können. Zur Selektion wird weiterhin das hitzeresistente Kanamycin-Gen (HTK) angeboten. Der Suizidvektor muß zur Vervielfältigung in *E. coli* replizierbar sein, die Vermehrung in *Thermus* darf jedoch nicht gelingen. Für diesen Zweck wird der pUC18 Vektor ausgewählt, der keinen Replikationsursprung für *Thermus* enthält.

In PCR-Reaktionen werden mit den Primern DTh32-F (EcoRI) und DTh33-R (XbaI) die stromaufwärts-Flanke bzw. mit DTh24-F (PstI) und DTh35-R (HindIII) die stromabwärts-Flanke des *fbcC*XFB-Operons von genomischer HB8 DNA amplifiziert, die Primer DTh49-F (XbaI) und DTh50-R (PstI) generieren das Amplikon des HTK-Gens mit vorangestellter Promotorregion. Alle Fragmente werden spezifisch geschnitten und in einer vier-Fragment Ligation in den EcoRI/HindIII geöffneten pUC18 Vektor ligiert. Der Erfolg der Klonierung zu pDM31 konnte über die Selektion der Transformation auf LB_{Km25}-Platten überprüft werden. Das isolierte Plasmid einer gewachsenen Kolonie wurde im spezifischen Restriktionsverdau überprüft.

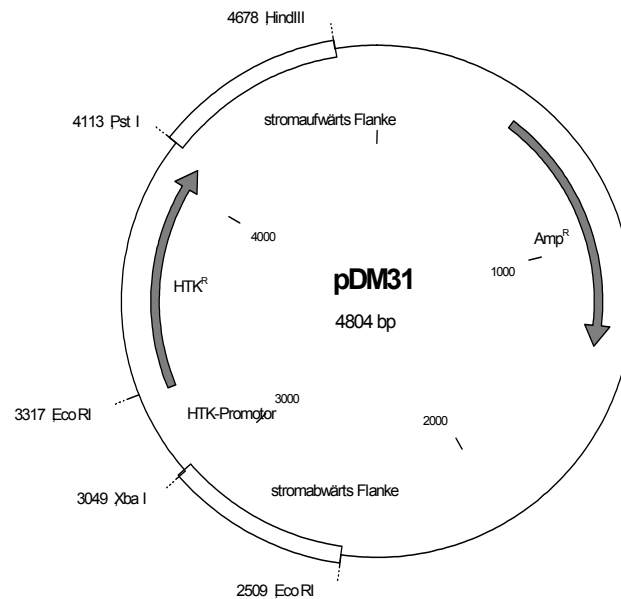


Abb. 26: Plasmidkarte des *Thermus*-Suizidvektors pDM31. Das Konstrukt basiert auf dem pUC18 Vektor und enthält die ca. 500 bp großen stromauf- und -abwärts zum *fbcCXFB*-Operon liegenden homologen Flanken. Der Vektor ist zur Replikation in *E. coli* befähigt und kann über eine Ampicillin-Resistenz selektioniert werden, *T. thermophilus* kann dagegen den vorhandenen Replikationsursprung nicht nutzen. Das Rekombinationsereignis findet an den homologen Flanken statt, deshalb kann bei Transformation eines linearisierten Suizidvektors die Doppel-homologe Rekombination über die Selektion mit Kanamycin überprüft werden. Die hitzestabile Kanamycin-Resistenz (HTK) wurde mit vorangestellter Promotorregion in den Vektor kloniert; alle verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

Zur homologen Rekombination wurde der Suizidvektor mit verschiedenen Restriktionsenzymen linearisiert und sowohl über Elektroporation als auch über natürliche Transformation in vorbereitete wt-Zellen von *Thermus* HB27 eingeführt (siehe Material und Methoden). Die Selektion wurde auf LB_{Km25}-Platten bei 70°C vorgenommen. Bis jetzt konnte jedoch keine Kolonie mit einer nachweisbaren Deletion gefunden werden. In seltenen Fällen finden sich nach ca. 2 Tagen der Inkubation einige Kolonien auf Platte, doch konnte in keinem der Fälle das HTK-Gen in Angrenzung an eine der *bc*-Flanken nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Deletion des *bc*-Operons für *Thermus* unter aeroben Bedingungen letal.

3.7 Heterologe Expression der *Thermus bc*-Komponenten und Cytochrom *c*₅₅₂ in *E. coli*

3.7.1 Cytochrom *c*

Die Cytochrom *c*-Untereinheit wurde bereits in verschiedenen Versionen hinter die *pe/Bleader* Sequenz des *pet22b* Vektors kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert. Dies geschah in Gegenwart des Hilfsvektors *pEC86*, der die Reifungsgene für die Häm-*c* Synthese zur Verfügung stellt. Die N-terminalen 86 aa wurden als lösliches Fragment isoliert und zum einen für die Generierung des polyklonalen Antikörpers Anti-Ttcytc verwendet, zum anderen wurden Elektronen-Transferprozesse mit Hilfe schneller Kinetiken untersucht (Mooser *et al.* 2005; O. Maneg, Dissertation 2004). Das Vollängen-Protein wurde mit Hilfe eines C-terminalen His₆-Tags über eine Metallaffinitätssäule aufgereinigt (Mooser, Diplomarbeit). Zum Nachweis der ungewöhnlichen Topologie (siehe Kap. 3.3.1 und 3.3.2) wurden Strukturuntersuchungen angestrebt. Dazu wurde das membranständige Protein anders als bisher in Dodecyl-Maltosid-haltigem Puffer aufgereinigt und für kristallographische Ansätze bereitgestellt. Der Nachweis des korrekt eingebauten Häm-Cofaktors wurde spektroskopisch erbracht, das Redox-Differenzspektrum entspricht dem in Abb. 19 gezeigten Ascorbat-Spektrum im Gesamtkomplex. Betrachtet man sich das Einzelspektrum des oxidierten Cytochrom *c* im Bereich von 695 nm, so ist ein deutlicher Peak erkennbar (Abb. 18, Einschub). Diese *Charge Transfer*-Bande kann als klarer Hinweis auf ein Methionin als sechsten Häm-Liganden verstanden werden, was die Eingliederung dieser Untereinheit in die Cytochrom *c*-Gruppe erlaubt. Die Untereinheit Cytochrom *f* der *b₆f*-Komplexe unterscheidet sich von der *c*-Untergruppe lediglich in diesem sechsten Ligand, der in diesem Fall von der N-terminalen Aminosäure gestellt wird und keine *Charge Transfer*-Bande im Bereich 695 nm aufweist.

3.7.2 Rieske-Protein

Die hydrophile Domäne der Rieske-Untereinheit wurde bereits eingehend biophysikalisch analysiert und strukturbiochemisch identifiziert (siehe Einleitung Kap. 1.2.2). Um vergleichende Untersuchungen u. a. mit FTIR-Spektroskopie durchführen zu können, wurde das lösliche Fragment in Anlehnung an die von Hunsicker-Wang (Hunsicker-Wang *et al.* 2003) gelöste Kristallstruktur (NCBI: 1NYK) aufgereinigt. Dazu wurden zunächst 173 aa der C-terminalen löslichen Domäne

(Pos. 38-210) von genomischer DNA (*T. thermophilus* HB27) mit den Primern DTh19-F und DTh20-R amplifiziert und über die per PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen XbaI/HindIII in den Vektor pet22b kloniert. Nach Transformation in *E. coli* wurde das Rieske-Fragment ohne Induktion mit IPTG bei RT über Nacht exprimiert und wie von J. Fee 1984 beschrieben klassisch aufgereinigt (siehe Material und Methoden). Die aufgereinigte Probe wurde im Redox-Differenzspektrum charakterisiert (Abb. 27A und B) und der korrekte Einbau des Fe₂S₂-Clusters im EPR-Spektrum kontrolliert (nicht gezeigt, vergleiche Abb. 21). Für die Berechnung der Proteinkonzentration der nur schwach gefärbten Probe werden zwei verschiedene Maxima gewählt: oxidiert $\epsilon_{458\text{nm}} = 6.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; reduziert $\epsilon_{470\text{nm}} = 2.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Das lösliche Fragment lässt sich mit einer Ausbeute von 4 mg/Liter Kultur aufreinigen und kann damit in ausreichender Menge für FTIR-Analysen (P. Hellwig, z. B. European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules) zur Verfügung gestellt werden.

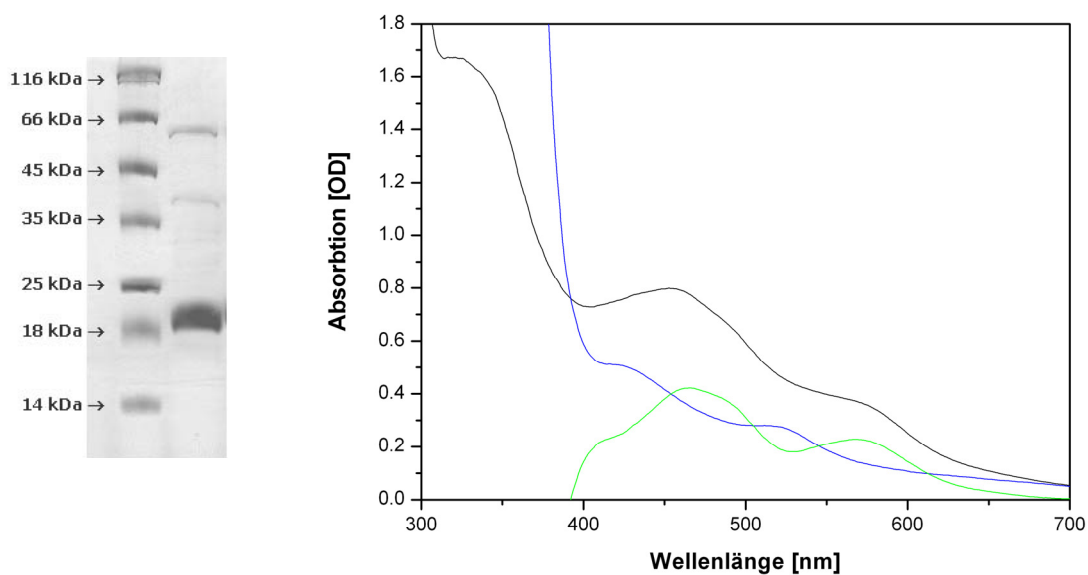


Abb. 27: Expression (heterolog in *E. coli*) und Aufreinigung des löslichen *T. thermophilus* Rieske-Fragments. A: Tricin/SDS-Gel des isolierten 18,3 kDa Proteins nach Coomassie-Färbung. B: Redox-Differenzspektrum des löslichen Rieske-Proteins. Spektrum oxidiert: schwarz, reduziert: blau, ox-red: grün.

Das Rieske-Protein wird im Gesamtkomplex über seinen N-terminalen Membrananker stabilisiert und könnte darüber in der Lage sein, die vermutete strukturelle Bewegung in der *Hinge*-Region abhängig von den jeweiligen Redoxzuständen zu gewährleisten (siehe Einleitung). Um weitergehende strukturelle und biochemische Untersuchungen

durchführen zu können, wurde auch das membranständige Vollängen-Protein aufgereinigt. Dazu wurde der entsprechende DNA-Bereich von *T. thermophilus* HB27 mit den Primern DTh21-F und DTh22-R amplifiziert und über die per PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen XbaI und HindIII in den geöffneten Vektor pet22b kloniert. Das Plasmid pSF2 wurde in *E. coli* transformiert und über einen ebenfalls per PCR eingeführten C-terminalen His₆-Tag in detergenzhaltigem Puffer über eine Metallaffinitätssäule sauber aufgereinigt. Das Redox-Differenzspektrum stellt sich im Vergleich zum löslichen Fragment (Abb. 27B) mit leicht verschobenen Maxima dar, wird hier aber nicht separat aufgeführt.

3.7.3 Expression des gesamten *fb*cXFB-Operons

In den letzten beiden Abschnitten wurde die Klonierung und heterologe Expression der *bc*-Untereinheiten Cytochrom *c* und Rieske-Protein beschrieben. Beide Untereinheiten konnten aufgereinigt und auch der Nachweis korrekt eingebauter Kofaktoren (Häm *c* und Fe₂S₂-Cluster) konnte erbracht werden. Nachdem nun bereits zwei der vier *bc*-Untereinheiten erfolgreich in *E. coli* heterolog exprimiert wurden (siehe Kap. 3.7.1 und 3.7.2), sollte auch das gesamte *T. thermophilus* Operon *fb*cXFB für die heterologe Expression eingesetzt werden. Dazu wurde die erste Hälfte des Operons mit den Primern DTh1-F und DTh7-R von genomischer HB8 DNA amplifiziert und über die dadurch generierten Schnittstellen NcoI/XhoI in den auf gleiche Weise geöffneten Vektor pet22b kloniert (pDM21). Die Verwendung der NcoI-Schnittstelle ermöglicht im fertigen Konstrukt sowohl die Verwendung der vektoreigenen T7-Promotorregion als auch der *pe*/Bleader-Sequenz, die den Proteinexport ins Periplasma gewährleistet. Da sich 3' der nativen XhoI-Schnittstelle eine ebenfalls native NcoI-Schnittstelle befindet, mußte das Operon in zwei Reaktionen amplifiziert und sukzessive kloniert werden (siehe Abb. 28) Die zweite Hälfte des *bc*-Operons wird über die Primer DTh8-F und DTh36-R auf Grundlage des Vektors pDM4 (siehe Kap. 3.2.2.1) amplifiziert. Der *reverse*-Primer generiert dabei den Kodierungsbereich für den C-terminalen His₆-Tag und führt eine BlnI-Schnittstelle ein, die gemeinsam mit der nativen XhoI-Schnittstelle für die Klonierung in das geöffnete Plasmid pDM21 genutzt wird. Der so entstandene Expressionsvektor pDM22 für die heterologe Expression des *bc*-Komplexes in *E. coli* ist in Abb. 28 gezeigt.

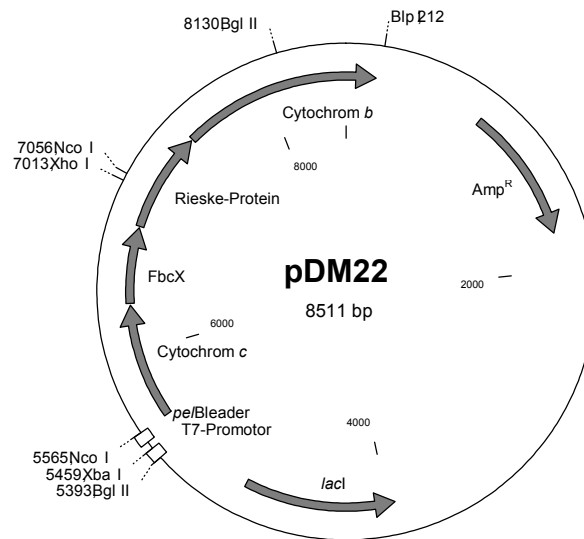


Abb. 28: Plasmidkarte von pDM22. Dieser Expressionsvektor basiert auf dem pet22b-Vektor. Das 3137 bp große *fbcCXFB*-Operon wurde über eine *NcoI*-Schnittstelle hinter die vektoreigene T7-Promotorregion mit darauffolgender *pe/Bleader*-Sequenz kloniert. Die Selektion konnte über die Ampicillin-Resistenz gewährleistet werden.

E. coli ist in der Lage Häm *b* zu synthetisieren, für die Synthese von Häm *c* muß jedoch der Hilfsvektor pEC86 (siehe Kap. 3.7.1) in die CaCl_2 kompeteten *E. coli* BL21(DE3) Zellen co-transformiert werden. Die erfolgreiche Transformation von pEC86 wird nicht über eine Plasmid-Präparation überprüft, sondern direkt über die Selektion mit den Antibiotika Ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ (Expressionsvektor) und Chloramphenicol 60 $\mu\text{g/ml}$ (Hilfsvektor). Auf die Verwendung des zweiten Antibiotikums sollte nicht verzichtet werden, da der Wirtstamm den Hilfsvektor bei vermindertem Selektionsdruck ausschleusst.

Erste Expressionsversuche bei 37°C Ü/N ergaben ein intensiv rotes Zellpellet, wie es ansonsten bei der Expression der Cytochrom *c*-Untereinheit zu beobachten ist. Die Membranpräparation und Solubilisierung erfolgt mit den gleichen Puffern und Komponenten wie zur Reinigung des homolog exprimierten Komplexes (Kap. 3.2.2.1). Über den C-terminalen His₆-Tag konnte zunächst nur eine chromatographische Anreicherung erfolgen. Der Elutionspool wies im SDS-PAGE eine Vielzahl an Proteinbanden auf, die nicht näher definiert werden konnten. Im Western-Blot konnte mit Anti-Tthcytc Antikörpern eine Bande auf der erwarteten Höhe der Cytochrom *c*-Untereinheit detektiert werden, dieses Ergebnis deckt sich auch mit der Beobachtung des intensiv roten Zellpellets. Der Western-Blot mit Anti-His Antikörper ergab jedoch

nur eine sehr schwache Bande. Das bedeutet, dass die heterologe Expression des gesamten Operons prinzipiell funktioniert: Die Cytochrom *b*-Untereinheit wird durch das letzte Gen im *fbcCXFB*-Operon kodiert, d.h. *E. coli* ist in der Lage eine vollständige polycistronische mRNA des Operons zu transkribieren. Die schwache Cytochrom *b*-Bande im Western-Blot des Elutionspools bedeutet aber auch, dass diese Untereinheit nur einen relativ geringen Teil der Gesamtmembranproteinfraktion stellt und die Aufreinigung unzureichend war. Das Redox-Differenzspektrum wird von den Absorptionseigenschaften der Cytochrom *c*-Untereinheit dominiert, was aufgrund der starken Rotfärbung des Zellpellets schon zu erwarten war.

Um die Proteinexpression zu verlangsamen und damit eventuell zu vervollständigen wurden für weitere Expressionsversuche Wachstumstemperaturen von 32°C, 28°C und 22°C (RT) ausgewählt. Es kann festgestellt werden, dass eine niedrigere Expressionstemperatur zwar die Ausbeute an Gesamtmembranprotein reduziert, gleichzeitig wird jedoch der relative Anteil an Cytochrom *b* im Elutionspool vergrößert. Darüber hinaus kann besonders bei der 22°C-Expression eine deutliche Verbesserung der Stöchiometrie zwischen der Cytochrom *c*- und Cytochrom *b*-Untereinheit sowohl im SDS-Gel als auch im Redox-Differenzspektrum beobachtet werden. Auch das Zellpellet erscheint in braunroter Färbung, ähnlich wie es bei der Ernte des homolog exprimierten Proteins beobachtet werden kann.

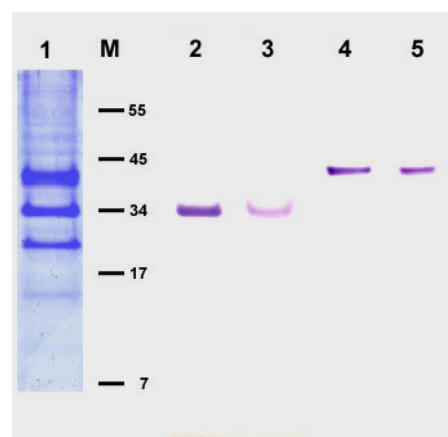


Abb. 29: Elektrophoretische und immunologische Identifizierung der isolierten *T. thermophilus* *bc*-Untereinheiten. Der über einen His₆-Tag aufgereinigte Komplex aus *T. thermophilus* (Bahn 1, 2 und 4) und aus *E. coli* (Bahn 3 und 5) wurde elektrophoretisch in einem 12%igen Tricine/SDS-Gelsystem aufgetrennt. Bahn 1: Coomassie-Färbung, Bahn 2 und 3: Western-Blot mit Anti-Ttcytc gegen die lösliche Häm-Domäne des Cytochrom *c*, Bahn 4 und 5: Western-Blot mit einem Anti-His Antikörper. Der Molekulargewichtsmarker (M) ist in kDa angegeben, die Angaben zum Molekulargewicht der einzelnen *bc*-UE sind in Tab. 4 zu finden.

Die saubere Aufreinigung des heterologen Gesamtkomplexes bleibt jedoch auch bei 22°C-Anzuchten unzureichend. Die Untereinheiten Cytochrom *c* und Cytochrom *b* lassen sich immunologisch mit Hilfe von Antikörpern (Abb. 29) nachweisen, deren eingebaute Häm-Cofaktoren spektrophotometrisch (nicht gezeigt). Um die noch verbleibenden Untereinheiten Rieske-Protein und FbcX eindeutig zu identifizieren müssen definierte Proteinbanden ohne Überlagerung von Fremdproteinen im SDS-Gel darstellbar sein, die anschließend z.B. über MALDI-Massenspektrometrie analysiert werden können. Doch führte bisher weder eine verlängerte Solubilisierung noch stringenteres Waschen zu einer wesentlichen Verbesserung der Reinheit. Auch mit der Verwendung von Imidazol für die Proteinelution konnte keine Optimierung der Aufreinigung erzielt werden. Erst die Verwendung von *E. coli* C41/43 (DE3)-Stämmen (Sørensen & Motensen, 2005) führte zur Darstellung aller vier Untereinheiten des *Thermus bc*-Komplexes. Dazu wurde, wie bereits oben beschrieben, das Plasmid pDM22 in Anwesenheit von pEC86 in LB_{Amp/Cm}-Medium bei RT exprimiert und über die Metallaffinitätssäule gereinigt. Die Aufreinigung und Darstellung der Proteinuntereinheiten ist deutlich gegenüber den bisher beschriebenen Versuchen verbessert. So können auch die zwei kleineren Untereinheiten Rieske-Protein und FbcX in einem vergleichenden SDS-PAGE dem Bandenmusters des homologen *bc*-Komplexes zugeordnet werden. Die eindeutige Identifizierung dieser Untereinheiten mittels MALDI steht jedoch noch aus. Auch sollte der analytischen Verwendung dieses heterologen Komplexes eine weitere Optimierung der Aufreinigung sowie eine Steigerung der Expressionsrate vorangehen.

3.7.4 Cytochrom *c*₅₅₂

Das heterolog in *E. coli* exprimierte Cytochrom *c*₅₅₂ war bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhanden und wurde für vielfältige Anwendungen wie Elektronentransferkinetiken oder als Elektronendonator/-akzeptor eingesetzt. Bei der Strukturaufklärung mittels NMR wurden in der Proteinsequenz unerwünschte Mutationen aufgefunden, die eine Neuklonierung des Proteins erforderlich machten, welche im Folgenden kurz beschrieben wird.

Das Strukturgen wurde für die Klonierung ohne die vorangehende Signalsequenz mit den Primern Th-c552F/R in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die dabei eingeführten Restriktionsschnittstellen XbaI/PstI wurden genutzt, um das Amplikon spezifisch zu schneiden und anschließend gerichtet in den in gleicher Weise geöffneten Vektor pUC18 zu klonieren. Unerwünschte Mutationen in dem so entstandenen Vektor pDM17 konnten mit einer Kontrollsequenzierung ausgeschlossen werden. Dieses kompakte

Plasmid wurde auch für die nachfolgenden Reaktionen der gerichteten Mutagenese verwendet.

Für die heterologe Expression in *E. coli* mußte das Strukturgen für Cytochrom c_{552} in den Expressionsvektor pET22b umkloniert werden. Das Plasmid pDM17 diente dafür zunächst als Template für die PCR-Reaktion mit den Primern Th-552-F/R, die die Schnittstellen NcoI/HindIII einführen. Diese Schnittstellen konnten dann für den spezifischen Verdau und die anschließende gerichtete Ligation in pet22b, direkt hinter die *pe/bleader*-Sequenz, die den Export ins Periplasma vermittelt, genutzt werden (pDM18) und ergaben nach Transformation in BL21(DE3)-Zellen den Expressionsstamm DM18. Für die einwandfreie Synthese des Cytochrom c_{552} -Cofaktors Häm *c* mußte noch der Hilfsvektor pUC86 (siehe Kap. 3.7.1) co-transformiert werden. Die Selektion der Zellen erfolgte über die Antibiotika Ampicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (60 µg/ml). Die Aufreinigung erfolgte grundlegend nach Yoshida *et al.*, 1984.

3.7.4.1 Optimierung der Expression von Cytochrom c_{552}

Bei vergleichenden Versuchen von heterolog und homolog exprimiertem Protein wurden Unterschiede deutlich. So zeigten sich im Redoxspektrum Abweichungen, die auf eine veränderte Proteinumgebung des Häm-Cofaktors schließen lassen. In Abb. 31A ist das vergleichende Redox-Differenzspektrum des homolog und heterolog exprimierten Cytochrom c_{552} dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Hauptpeak mit einem Maximum bei 552,5 nm im heterologen Protein um etwa 1 nm zu einer kürzeren Wellenlänge hin verschoben ist. Auch die typische Schulter im aufsteigenden Ast des Hauptpeaks ist nicht mehr vorhanden, was sich besonders deutlich in der aus dem Spektrum gebildeten 1. Ableitung (Abb. 31B) aufzeigen lässt. Die Schulter des aus *Thermus* isolierten Proteins stellt sich als deutlicher Wendepunkt dar, dieser ist im heterolog exprimierten nicht vorhanden. Weiterhin ist im Bereich von 570-580 nm des aus *E. coli* isolierten Proteins ein kleiner Peak festzustellen, der aus bisherigen Beschreibungen nicht bekannt ist. Darüber hinaus konnte das CD-Spektrum im nahen UV-Bereich (Abb. 30B) lokale Faltungsunterschiede sichtbar machen. So ist neben kleineren Variationen besonders die Veränderung des Hauptpeaks zwischen 380 und 410 nm in Lage und Gestalt zu nennen. Die Analyse der globalen Proteinstruktur im fernen UV-Bereich (Abb. 30A) zeigt jedoch eine generelle Übereinstimmung beider Strukturen auf.

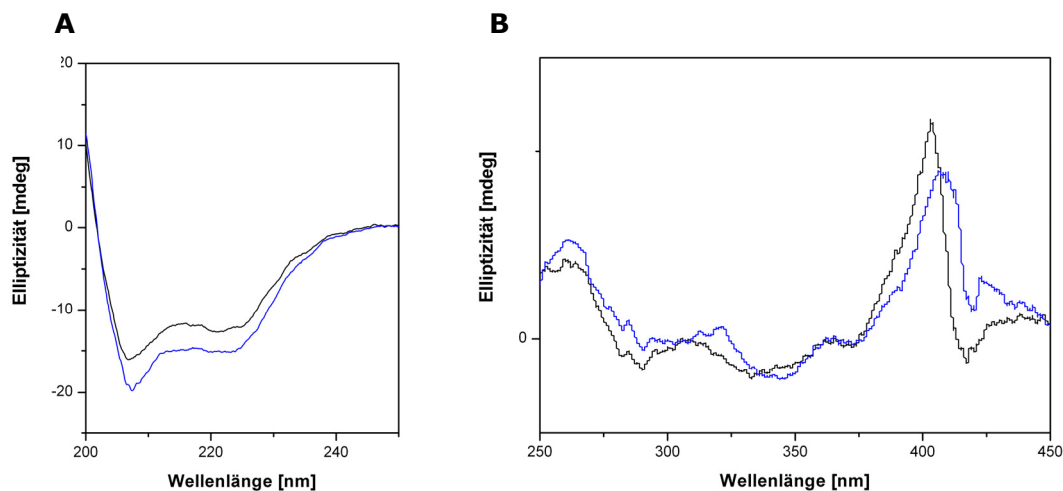


Abb. 30: Die Proteinstruktur des homolog und heterolog exprimierten Cytochrom c_{552} wurde vergleichend im UV-Spektrum aufgenommen. (A) Der ferne UV-Bereich von 200-250 nm stellt die globale Proteinstruktur (B) der nahe Bereich von 250-450 nm den Bereich der Sekundärstrukturen dar. Cytochrom c_{552} homolog: schwarz, heterolog exprimiert: blau.

Da die hier beschriebenen Variationen des heterolog exprimierten Proteins auch noch nach der oben beschriebenen Neuklonierung beobachtet werden konnten, wurden verschiedene Parameter der Anzucht variiert (Temperatur, Anzuchtmedium, mit/ohne Induktion durch IPTG). Außerdem wurde versucht, im Verlauf der chromatographischen Aufreinigung eventuelle Inhomogenitäten zu separieren. Die besten Ergebnisse, auch hinsichtlich der Ausbeute, konnten mit einer Anzucht in LB-Medium bei RT erreicht werden. Die Zellen wurden dazu mit einer bei 37°C kultivierten Vorkultur 1%ig angeimpft und für 18 h bei ca 22°C geschüttelt. Die Induktion mit IPTG führte zu keiner Verbesserung, weshalb in weiteren Anzuchten darauf verzichtet wurde. Während der chromatographischen Aufreinigung konnten durch flach eingestellte Elutionsgradienten zwei rotgefärbte Peaks voneinander getrennt werden. Im Tricin/SDS-Gel können beide Proteinfractionen bei der gleichen molekularen Masse dargestellt werden, es handelt sich also nicht um eine verkürzte oder aggregierte Variante des Cytochroms. Im Redox-Spektrum stellen sich dagegen deutliche Unterschiede dar. So zeigt die erst bei höherer Salzkonzentration eluierende Proteinfraction die typischen Eigenschaften des homolog exprimierten Proteins (Maximum bei 552,5 nm, Schulter im Hauptpeak), die zuerst eluierende Fraction lässt die typische Schulter vermissen und zeigt den zusätzlichen Peak bei 575 nm. Es können also eindeutig zwei verschiedene Proteinpopulationen separiert werden. Diese treten ebenso bei der 37°C-Anzucht auf, bei RT ist das Mengenverhältnis aber eindeutig zugunsten der gewünschten Peakfraction hin verschoben. Nach optimierter

Anzucht und Aufreinigung (siehe Material und Methoden) weist das heterolog exprimierte Protein die oben beschriebenen charakteristischen Redox-Merkmale auf (nicht gezeigt) und unterscheidet sich nicht wesentlich von dem in Abb. 30 dargestellten Kurvenverlauf (schwarze Kurve) des homolog exprimierten Proteins. Das Ergebnis wurde auch im CD-Spektrum überprüft und ergab ein nahezu dem aus *Thermus* isolierten Protein angeglichenes Spektrum (nicht gezeigt).

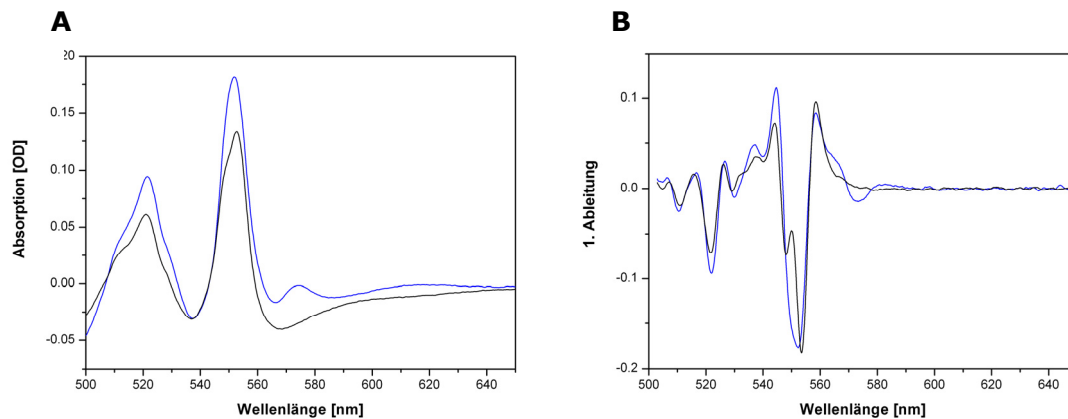


Abb. 31: Vergleichende Darstellung des homolog (schwarz) und heterolog (blau) exprimierten *T. thermophilus* Cytochrom c_{552} . A: Redox-Differenzspektrum; B: 1. Ableitung von A.

3.7.4.2 Mutagenese am Cytochrom c_{552}

Für das Cytochrom c_{552} von *T. Thermophilus* wurde in Rückfaltungsexperimenten über Fluorezenzquenching ein Faltungsintermediat beschrieben (Travaglini-Allocatelli *et al.*, 2004). Aus dieser Arbeit wurden einige topologisch konservierte Aminosäurereste von evolutionär entfernten Cytochromen abgeleitet, die wichtige Kontakte im Faltungsmechanismus der c-Typ Cytochrome vermitteln könnten. Um die spezifischen Effekte von A83 und V8 bei der Ausbildung von interhelicalen Kontakten zu untersuchen, wurden die Mutanten V83A und Y8V nach der *QuikChange*-Methode generiert, in den Expressionsvektor pET22b transferiert und wie oben beschrieben (Kap. 3.7.4.1), in Gegenwart des Hilfsvektors PEC86, in *E. coli* BL21(DE3) Zellen heterolog exprimiert (DM18 V83A/Y8V). Anzucht und Aufreinigung erfolgten entsprechend dem Wildtyp-Protein, ebenso die spektrophotometrische Beurteilung der Aufreinigungsqualität und -quantität. Die kinetischen Rückfaltungsexperimente werden im Labor von C. Travaglini-Allocatelli (Universität "La Sapienza" Rom) untersucht.

3.8 Konstruktion des *Thermus/E.coli*-Shuttlevektors pDM12

Für die homologe Expression in *T. thermophilus* wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Shuttlevektor konstruiert, der zur vegetativen Replikation sowohl in *E. coli* als auch in *T. thermophilus* in der Lage ist. Die Grundlage für dieses Konstrukt bildet der Vektor pNTsp2 (NEB, Beverly, MA). Dieser Vektor weist eine Kanamycin-Resistenz bis zu einer Anzuchttemperatur von 65°C auf. Für die optimale *Thermus*-Anzucht werden jedoch 70°C benötigt. Aus diesem Grund wurde die von H. Kagamiyama (Osaka, Japan) auf dem Vektor pUC18-JHK3-1 zur Verfügung gestellte Kanamycin-Resistenzkassette (HTK) eingesetzt (pMA34), die nun eine Selektion bei 70°C zulässt. Für die Expression des *bc*-Komplexes wurde das gesamte Operon mit vorangestellter Promotorregion über die Schnittstellen KpnI/PstI in den Vektor pMA34 kloniert (siehe Kap. 3.2.2.1). Um diesen Vektor für die Expression weiterer Proteine zu nutzen und vielfältige Klonierungsstrategien zu ermöglichen, sollte der Vektor optimiert werden. Der *bc*-Promotor führte bisher zu guten Expressionsraten bzw. Proteinausbeuten und bleibt deshalb zunächst erhalten.

Ausgehend von dem Konstrukt pDM6 soll der Transkriptionsstart dahingehend verändert werden, dass ein beliebiges Strukturgen im direkten Anschluß an den Promotor kloniert werden kann. Um einen Aminosäureaustausch am Genanfang zu vermeiden, wird hierfür die Restriktionsschnittstelle für NdeI gewählt, die ein Start-ATG in der Erkennungssequenz enthält und entsprechend für ein Methionin kodiert. Da der Vektor pDM6 bereits eine NdeI-Schnittstelle enthält, muss diese zunächst entfernt werden. Dazu wird pDM6 mit NdeI verdaut, das Restriktionsenzym wird anschließend für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Die überhängenden DNA-Enden des geöffneten Vektors werden durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt und der resultierende Vektor pDM8 in einer *blunt end* Ligation geschlossen. Die anschließende Einführung einer neuen NdeI-Schnittstelle am Genbeginn erfolgt über *QuikChange*-Mutagenese. Dazu werden die Basen -1 und -3 vor Genbeginn ausgetauscht (**GAGATG** in **CATATG**). Die Mutagenesereaktion wird mit dem Primer DTh10-M auf dem Plasmid pDM5 (pBlueskript+*fb*cC_XFB) durchgeführt (pDM9) und die erfolgreiche Mutation über die Schnittstellen KpnI/XhoI in das Plasmid pDM8 überführt (pDM10). Weiterhin sollte die Auswahl der zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen vergrößert werden. Es wurde deshalb eine kleine MCS konstruiert, die neben gängigen Restriktionsenzymen mit einer 6er-Basenerkennungssequenz auch solche mit achter Erkennungssequenz und *blunt*-schneidende Restriktionsenzyme enthält. Für die einfachere Handhabung und um eventuelle Selektionsmöglichkeiten zu geben, ist eine

Gentamycinresistenzkassette von diesen neuen Schnittstellen flankiert. Dazu wird die Resistenz per PCR amplifizierte, als Template dient dabei der Vektor pBBR1MCS5 und die verwendeten Primer DTh15-F/DTh16-R generieren die gewünschten Schnittstellen. Das dabei entstandene 887 bp große Fragment NGP (von NdeI bis PstI, siehe Abb. 32) wurde mit den Enzymen NdeI/PstI verdaut und in den auf gleiche Weise geöffneten Vektor pDM10 kloniert. Der so entstandene *Thermus/E.coli*-Shuttlevektor pDM12 (Abb. 32) ist nun vielseitig verwendbar, zum einen können beliebige Strukturgene hinter den *bc*-Promotor kloniert werden, aber auch die Promotorregion kann ausgetauscht und damit eventuell verstärkt werden.

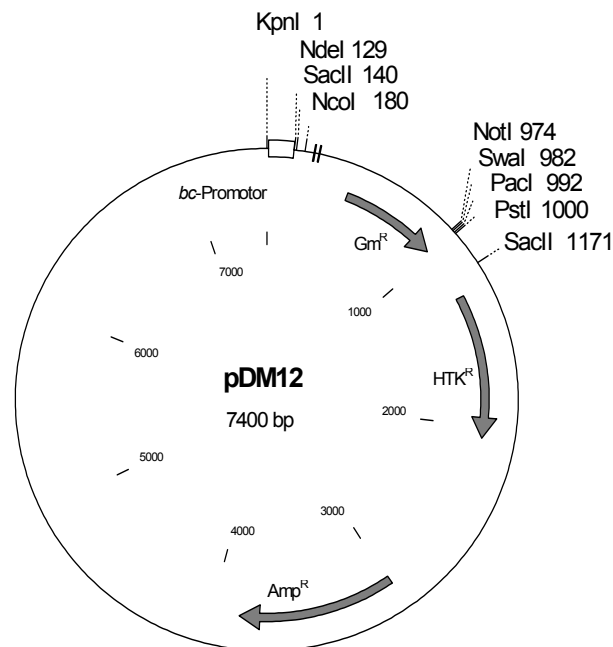


Abb. 32: Der *Thermus/E.coli*-Shuttlevektor pDM12 verfügt über jeweils einen Ursprung für die Replikation in *E. coli* und in *T. thermophilus*. Die Selektion kann in *E. coli* sowohl über Ampicillin (100 µg/ml) als auch über Kanamycin (25 µg/ml) erfolgen. In *Thermus* wird die bis zu einer Temperatur von ca. 70°C stabile Kanamycin-Resistenz (HTK) verwendet. Die Proteinexpression erfolgt aerob und wird über den *bc*-Promotor reguliert. Für abweichende Anwendungen kann der Promotor über die Schnittstellen KpnI/NdeI ausgetauscht werden. Die NdeI-Schnittstelle kodiert das Start-ATG, so dass Strukturgene ohne dieses direkt anschließend kloniert werden können. Am 3'-Ende können die Schnittstellen NotI, SwaI, PacI und PstI gewählt werden.

3.9 Aufreinigung weiterer *T. thermophilus* Proteine

3.9.1 Versuche zur *ba*₃-Expression

Die *ba*₃-Oxidase ist eine der zwei alternativen Endoxidasen in *T. thermophilus*. Sie wird bevorzugt bei niedrigem O₂-Partialdruck exprimiert. Versuche, die Expression durch intensive Belüftung während des Wachstums vollständig zu unterdrücken, schlugen jedoch fehl. Aus diesem Grund sollte die *ba*₃-Oxidase Plasmid-kodiert zur Expression in *T. thermophilus* HB27 angeboten werden. Dazu wurden verschiedene Konstrukte des *ba*₃-Operons kloniert und zur homologen Expression eingesetzt (siehe O. Maneg, Dissertation 2004). Der Stamm MA37 enthält das vollständige *cba*-Operon mit C-terminalem His₆-Tag an Untereinheit I und vorangestelltem Promotor der Kanamycinresistenz. Dieses Konstrukt konnte erfolgreich exprimiert und mit sehr hoher Reinheit über eine Metallaffinitätssäule aufgereinigt werden. Im Vergleich zur endogenen Oxidase, die von T. Soulimane (University of Limerick, Irland) für vergleichende Messungen zur Verfügung gestellt wurde, weist das His-Tag Konstrukt jedoch nur etwa 7% der enzymatischen Aktivität auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb versucht werden die Enzymaktivität zu steigern, indem weitere Varianten des Expressionsvektors kloniert wurden.

So wurde zunächst überprüft, ob dem bisher gewählten Genanfang der UE IIa ein Einfluss auf die Aktivität zugeschrieben werden kann. In Abb. 33 ist dargestellt, dass zwei Start-Kodons (ATG) mit einem Abstand von 72 bp im Bereich des Transkriptionsstarts von UE IIa zu finden sind. Beide kodieren im gleichen Leserahmen und kommen deshalb als Startpunkt der Translation in Frage. Anhand der gelösten Kristallstruktur der *ba*₃-Oxidase ist der Beginn am zweiten ATG anzunehmen, die entsprechende DNA-Sequenz wurde deshalb für den Vektor pMA37 verwendet.

Für das Konstrukt pDM16 wurde nun eine nach 5' verlängerte UE IIa kloniert. Die stomaufwärtsliegende Sequenz könnte die Funktion einer Signal- oder Erkennungssequenz übernehmen, die im reifen Protein nicht mehr nachzuweisen, für die korrekte Faltung oder Assoziierung des Proteinkomplexes aber u. U. unerlässlich ist. Weiterhin ist eine kurze palindrome Sequenz in diesem Bereich enthalten (Abb. 33), die eventuell für eine Rolle bei der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren o. ä. von Bedeutung ist. Die ausgewählte DNA-Sequenz wurde mit den Primern DTh17-F und DTh18-R per PCR von dem Vektor pBS_{cba} (O. Maneg, Dissertation 2004) amplifiziert. Der *reverse*-Primer trägt zusätzlich zur DNA-bindenden Sequenz die Kodierungsinformation für die Schnittstelle der TEV-Protease und einen verlängerten His₁₀-Tag für den C-Terminus der UE I. Das Amplikon wurde mit den

Restriktionsenzymen NdeI und NotI verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pDM12 gerichtet ligiert. Der Expressionsstamm DM16 enthält somit eine 5' verlängerte UE IIa und steht unter der Kontrolle des *bc*-Promotors. Der verlängerte His₁₀-Tag ist bei Bedarf nach der Proteinisolierung durch Verdau mit der TEV-Protease abspaltbar.

5' ATG CCC CTC ACC GCA AAG CCC GGT TTC CGC TAC CAT GGA GGC CGT ATA CGG
CAC CTG CCG TTA GGG AGG AGG GGT **ATG** GAA GAA AAG CCC AAA GGC GCA CTG
GCG GTC ATC CTG GTC CTG ACC CTC ACC ATC CTG GTC TTC TGG CTG GGA GTG TAC
GCC GTC TTC TTC GCT AGG GGG TAG...3'

Abb. 33: 5'-Bereich des *cba*-Operons. Die zwei alternativen Start-Kodons sind rot dargestellt, das zweite konnte als Methionin in der Kristallstruktur dargestellt werden. Die 12 bp palindrome Sequenz ist unterstrichen.

Die Anzucht erfolgte im 10 l Brunswick-Fermenter Ü/N bei 70°C in LB-Medium (25 µg/ml Kanamycin) und einer Luftzugabe von 5 l/min. Daraus konnten 4.000 mg Gesamtmembranprotein präpariert werden, die Aufreinigung erfolgte nach Standard-Protokoll. Die UE I (63,3 kDa) und II (18,5) können deutlich als isolierte Einzelbande im SDS-Gel dargestellt werden (nicht gezeigt), UE I kann zusätzlich im Western-Bot mit Anti-His Antikörpern identifiziert werden. UE IIa lässt sich dagegen weder in einem hoch konzentrierten Tricine/SDS-Gel durch Coomassie-Färbung noch durch die 10-fach empfindlichere Silberfärbung darstellen. Diese Beobachtung wurde bereits mit den früheren Proben und auch mit dem endogenen von T. Soulimane aufgereinigten Protein gemacht. Der Nachweis dieser kleinsten UE IIa erfolgte bisher durch HPLC und die eindeutige Darstellung in der Kristallstruktur (NCBI: 1EHK). Im anschließend durchgeführten Redoxspektrum (nicht gezeigt) stellen sich die Absorptionsspeaks der gebundenen Cofaktoren im erwarteten Bereich von 556 nm (Häm *b*) und 613 nm (Häm *a*₃) im Verhältnis 1:1 dar. Anhand des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{(613-658\text{ nm})} = 6,3\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ konnte eine Ausbeute von 3 mg aufgereinigte *ba*₃-Oxidase pro Liter-Kultur ermittelt werden. Die Expression und Aufreinigung der *ba*₃-Oxidase konnte mit dem Konstrukt DM16 somit erfolgreich durchgeführt werden. Der im Anschluß durchgeführte Aktivitätstest wurde vergleichend zur endogenen *ba*₃-Oxidase durchgeführt und ergab eine mittlere Wechselzahl von 100 s⁻¹ (endogen) und 12 s⁻¹ (DM16) bei RT. Die mit dem Stamm MA37 erreichte Aktivität von 7% konnte mit 12% nicht signifikant verbessert werden.

In einer von C. Rittmeyer (AK Prof. Kolbesen, Universität Frankfurt/M.) durchgeführten TXRF-Analyse sollte festgestellt werden, ob die für die Aktivität des Enzyms notwendigen Metallzentren ausreichend besetzt sind. Zusätzlich sollte eine Wechselwirkung und eventueller Austausch von Ni-Ionen der Metallaffinitätssäule mit dem Kupferzentrum des Proteins ausgeschlossen werden. Die aufgereinigte Probe aus DM16 sowie die endogene *ba*₃-Oxidase mit einer Konzentration von je 50 µM wurden deshalb auf die Metallionen Cu, Fe und Ni hin in einem 20 mM Tris/Acetat-Puffer pH 8 mit 0,2 g/l DM analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt und zeigen das erwartete Verhältnis von Cu- zu Fe-Ionen von 3:2. Die Konzentration der Ni-Ionen ist mit 0,009 mmol/l (endogen) und 0,01 mmol/l (DM16) etwa gleich niedrig, so dass der Austausch von Metallionen nicht zum Verlust der Enzymaktivität führen kann. Bei dieser Analyse wurde auch der Gehalt an Mn-Ionen ermittelt. Überraschenderweise ergibt sich für diesen Wert der größte Unterschied zwischen den zwei untersuchten Enzymen: 0,036 mmol/l (endogen) und kein messbarer Wert für DM16. Es wurde deshalb versucht DM16 in Mn-haltigem Medium anzuziehen um einen eventuellen Mangel auszugleichen (Diplomarbeit, S. Funke) doch auch dieser Versuchsansatz erbrachte keine Steigerung der Aktivität.

Tab. 8: Vergleichende TXRF-Analyse *ba*₃-Oxidase

mmol/l	endogene <i>ba</i> ₃ -Oxidase	DM16 <i>ba</i> ₃ -Oxidase
Cu	0,123	0,14
Ni	0,009	0,01
Ca	0,037	0,014
Fe	0,097	0,116
Zn	0,09	0,058
Mn	0,036	-

Im Rahmen der erwähnten Diplomarbeit wurde darüber hinaus der *bc*-Promotorbereich von DM6 gegen einen ausreichend großen stromaufwärts des *cba*-Operons liegenden Sequenzbereich ausgetauscht, um die native Umgebung der *ba*₃-Oxidase auf dem Expressionsvektor darzustellen (pSF4). Dieser Ansatz erzielte eine weitere geringe Steigerung der Aktivität des isolierten Proteins von 20% gegenüber dem Wildtyp-Enzym. Ein klarer Nachteil dieses Stammes SF4 liegt in der Notwendigkeit bei vermindertem O₂-Partialdruck anzuziehen, was zu einer wesentlich verminderten Zelldichte führt und damit die Protein-Gesamtausbeute pro Liter deutlich

reduziert. Das Projekt wird im Rahmen einer Promotionsarbeit in unserem Arbeitskreis weitergeführt.

3.9.2 Ein MDR-ähnlicher ABC-Transporter

Das in unserer Arbeitsgruppe etablierte System zur homologen Expression in *T. thermophilus* sollte neben den bisher erwähnten Enzymkomplexen der zellulären Atmung auch für andere Proteine getestet werden. Dazu wurde ein bisher nur in der Sequenz bekannter ABC-Transporter ausgewählt, der sowohl homolog in *T. thermophilus* als auch heterolog in *E. coli* exprimiert werden sollte. Die beiden aufgereinigten Proteine wurden im Anschluß mit verschiedenen biochemischen Verfahren auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede hin untersucht.

3.9.2.1 Homologe Expression des ABC-Transporters

Das Operon dieses Transport-Proteins umfaßt 3536 bp mit einem GC-Gehalt von 69% und ist aus zwei offenen Leserahmen ORF-1 und ORF-2 zusammengesetzt (Abb. 34). Diese zwei Strukturgene überschneiden sich in vier Basenpaaren, d.h. das TGA-Stopp-Kodon des ersten Gens umfaßt bereits zwei Basen des alternativen GTG Start-Kodons des folgenden Gens (5'...GTGA...3'), das somit in einem verschobenen Leseraster vorliegt.

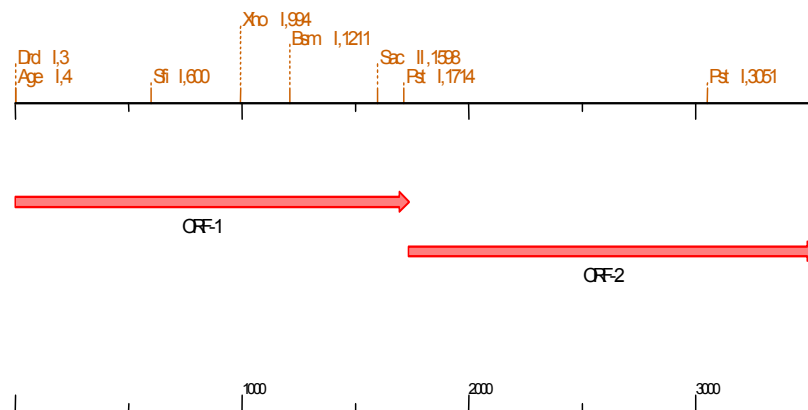


Abb. 34: Gen-Locus des MDR-ähnlichen ABC-Transporters (3536 bp). Im Bereich des Operons können zwei Gene mit verschobenem Leseraster identifiziert werden. Die Gene (ORF-1 und ORF-2) überlappen in einem Bereich von 4 bp und kodieren für zwei etwa gleich große Untereinheiten: 578 aa (UE-1) und 600 aa (UE-2).

Die zwei Strukturgene kodieren für zwei etwa gleich große Proteine (siehe Tab. 9) UE I und UE II. Beide Untereinheiten bestehen aus einer sehr hydrophoben N-terminalen

Domäne, für diese erste Proteinhälfte (ca. bis Position 300) werden sechs ausgeprägte Transmembranhelices vorhergesagt. Vergleicht man die zwei Untereinheiten in einem direkten Alignment (Abb. 35), so ist eine hohe Identität der beiden Proteine festzustellen, besonders im löslichen C-terminalen Teil, der die typischen Konsensus-Motive für ABC-Transporter enthält.

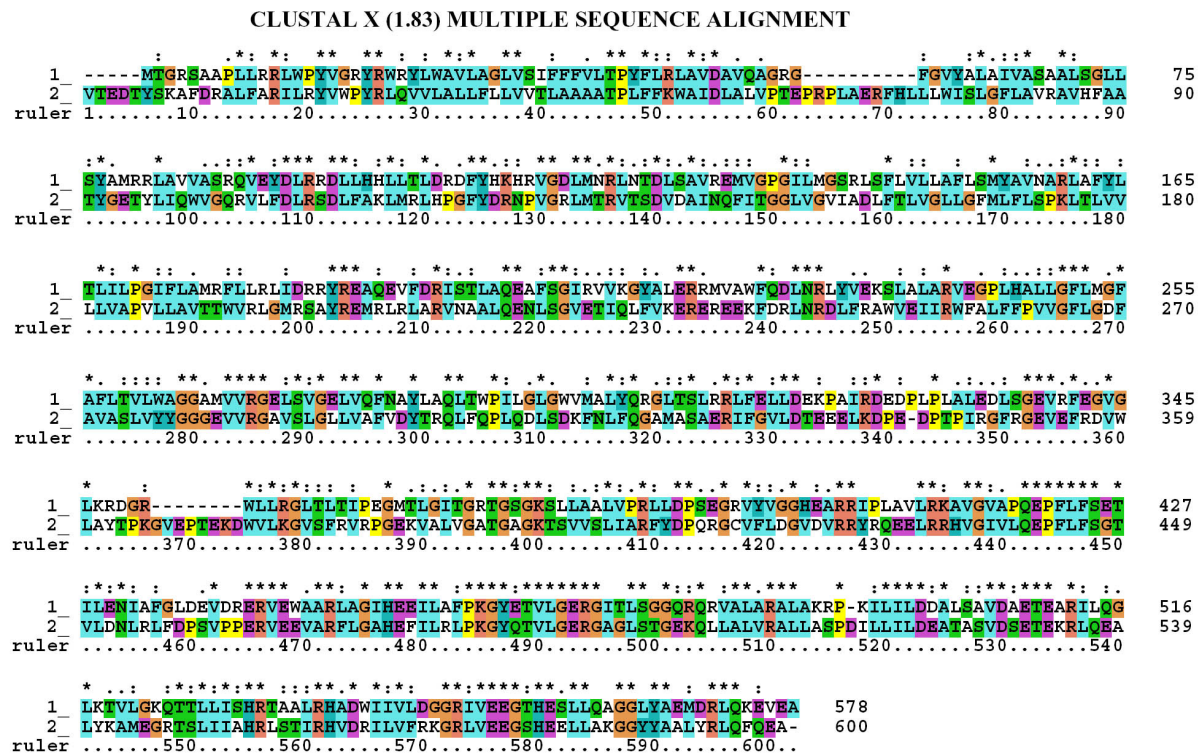


Abb. 35: Sequenz-Alignment der beiden *T. thermophilus* ABC-Transporter Untereinheiten UE I und UE II mit Clustal X (1.83). Aus der Darstellung ergibt sich eine Identität der Untereinheiten von 33% und darüber hinaus eine Ähnlichkeit von 32%.

Klonierung des Vektors pDM15

Das ABC-Operon enthält zwei interne PstI-Schnittstellen und war damit nicht mit dem zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren pDM6 und pMA39 kompatibel, für die eine Klonierung mit den Schnittstellen KpnI/PstI vorgesehen war. Aus diesem Grund wurde der Vektor zunächst für eine breitere Anwendung optimiert (siehe Kap. 3.8) und im Speziellen zur Nutzung der internen SacII-Schnittstelle vorbereitet (siehe pDM12 Abb. 32). Anschließend wurde das ABC-Operon in zwei Fragmenten per PCR von genomischer HB27-DNA amplifiziert. Dazu wurden die

Primerpaare DTh11-F, DTh12-R und DTh13-F, DTh14-R verwendet, die die Schnittstellen NdeI (5'), NotI (3') und die interne SacII-Schnittstelle einführen. Diese wurden genutzt um die spezifisch restringierten Amplikons sukzessive in den Hilfsvektor pBlueskript zu klonieren (pDM13/14). Im Anschluß wurde das gesamte Operon über die Schnittstellen NdeI und NotI hinter den *bc*-Promotor des Expressionsvektors pDM12 transferiert. Das neue Konstrukt pDM15 wurde durch eine spezifische PCR-Reaktion identifiziert, indem das zweite PCR-Fragment in Angrenzung an das HTK-Gen mit den Primern DTh13-F, HTK-R amplifiziert wurde. Der Vektor pDM15 wurde mittels Elektroporation in *T. thermophilus* HB27 transferiert und auf einer LB-Platte mit 25 µg/ml Kanamycin selektioniert.

Tab. 9: Aus der DNA-Sequenz des *fb*cXFB abgeleitete Informationen

Protein	Anzahl der Basenpaare	Anzahl der Aminosäuren	M _r /kDa	M _{app} /kDa	errechneter pI
ABC UE I	1737	578	64,6	52	9,8
ABC UE II	1803	600	67,8	58*	8,7
Cu-ATPase	2064	687	73,9	76	6,5

*Die im Tricin/SDS-Gel dargestellte UE II enthält zusätzlich einen C-terminalen His₆-Tag.

Anzucht und Aufreinigung von DM15

Die Zellanzucht des Stammes DM15 erfolgte im 2,5 l Kolben oder im 10 l Brunswick-Fermenter Ü/N bei 70°C in LB-Medium (Kanamycin 25 µg/ml). Die Zellen wurden geerntet, in 50 mM NaP_i pH 7 aufgenommen und mit Pefabloc und Lysozym bei -80°C eingefroren. Für die Proteinisolierung wurden die Zellen bei RT unter Rühren aufgetaut und je nach Volumen durch Ultraschallbehandlung oder in der Manton-Gaulin Presse aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde durch Ultrazentrifugation bei 120.000 g innerhalb 1 h geschichtet und die Membranfraktion in Puffer (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl) resuspendiert. Nach Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration nach Lowry wurde die Solubilisierung mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml angesetzt (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl) und Dodecyl-Maltosid in einem Protein zu Detergenz-Verhältnis von 1:2 zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 4°C gerührt und anschließend erneut für 1 h bei 120.000 g ultrazentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und vor der chromatographischen Aufreinigung filtriert. Das klare Solubilisat wurde auf eine mit Wasch-Puffer (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl, 0,5 g/l DM) äquilibrierte Cobalt-Talon Säule mit einer Geschwindigkeit von

0,1 ml/min aufgetragen. Am UV-Detektor konnte der im Anschluss durchgeführte Waschschrift (2 ml/min) bei 280 nm verfolgt werden, unspezifisch gebundenes Material wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Wasch-Puffer entfernt. Für die Elution wurde dem Waschpuffer 200 mM Imidazol zugesetzt und in einem ersten Versuch ein Gradient von 0-100 mM Imidazol angelegt. Anhand des Elutionsprofils wurden Fraktionen ausgewählt und im Tricin/SDS-PAGE aufgetrennt. Dieses Ergebnis ist in Abb. 36A dargestellt und lässt eine erste Proteinanreicherung erkennen. Die Fraktionen 2-5 wurden gepoolt, ankonzentriert und über eine ACA34 Säule mit einer Geschwindigkeit von 0,02 ml/min Ü/N in Wasch-Puffer gelfiltriert. Das farblose Protein wurde anhand des bei 280 nm detektierten Peaks gepoolt, die ankonzentrierte Probe ist in Abb. 36B dargestellt. Es war deutlich zu erkennen, dass die kleineren Proteinverunreinigungen mit der Gelfiltration abgereinigt werden konnten. Im hochmolekularen Bereich dagegen wurden drei Proteinbanden in ähnlicher Intensität angefärbt. Die zwei Untereinheiten des ABC-Transporters werden bei 65 bzw. 69 kDa (inklusive His₆-Tag) erwartet, aufgrund der starken Hydrophobizität könnte das apparente Laufverhalten aber auch deutlich abweichen. Zur Identifizierung der Untereinheit mit His₆-Tag wurde ein Western-Blot mit Anti-His durchgeführt (nicht gezeigt), auf dem Untereinheit II (mittlere Bande b) bei ca. 58 kDa angefärbt wird. Eine weitere Bande konnte nicht angefärbt werden, so dass es sich bei der darüberliegenden Bande nicht um Aggregate oder Dimere handelte.

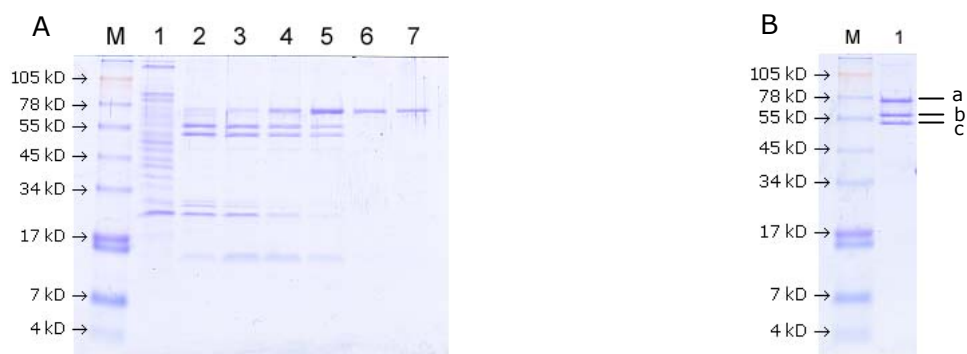


Abb. 36: Chromatographische Aufreinigung des ABC-Transporters aus *T. thermophilus*. A Fraktionen nach Cobalt-Talon Elution; 1: Waschfraktion, 2-7: Einzelfraktionen des Imidazol-Elutionsgradienten. **B** 1: Pool nach der Gelfiltration; a: Cu-ATPase, b: ABC UE II (mit His₆-Tag), c: ABC UE I. M: Proteinmarker.

Zur weiteren Analyse wurden alle drei Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit MALDI-MS und MS/MS identifiziert (T. Beckhaus, AK Prof. Karas). Dabei ergab sich die eindeutige Zuordnung zu den erwarteten Untereinheiten des ABC-Transporters UE I+II für Bande c und b. Bande a konnte überraschenderweise als Cu-ATPase aus *T. thermophilus* HB27 identifiziert werden. Betrachtet man das in Abb. 36 dargestellte Elutionsprofil nach der Metallaffinitätssäule, so ist deutlich zu erkennen, dass der Elutionspeak von Bande a zu höheren Imidazolkonzentrationen hin verschoben ist im Vergleich zu der etwas darunter liegenden Doppelbande. Die Cu-ATPase muß somit eine stärkere Wechselwirkung mit der Cobalt-Talon Säule aufweisen, als das für das His-getaggte Protein der Fall ist. Betrachtet man sich die Aminosäuresequenz dieses Proteins (Abb. 37) so fallen 15 Histidine im N-terminalen Bereich des 74 kDa Proteins auf, die vermutlich für diese starke Bindung an der Metallaffinitätssäule verantwortlich sind.

```
MKHENPHHKHSHPHSEPQHAHPSGGHAAHTGHDKHAGHTPEMFRDRFFVSLLLTLPILYFSEHFQDW
FGYRAAQFPGSAWVNPLGTILYFYGGLVFLK GALREL RARTPGM MTLIALGITAAYGYSLAVSLGLPGKP
FYW ELATLIDVMLLGHWLEMASVQAASRALEELSKLMPTTAHRILGDRIEDIPVSALKEGDLI.....687 aa
```

Abb. 37: N-terminale Aminosäuresequenz der Cu-ATPase aus *T. thermophilus*. Die 15 Histidinreste sind rot dargestellt.

Der ABC-Transporter und die als Verunreinigung auftretende Cu-ATPase unterscheiden sich sowohl in ihrem Molekulargewicht (ABC-Dimer 133 kDa, Cu-ATPase 74 kDa) als auch in ihrem errechneten pI (siehe Tab. 9). Es wurden deshalb beide Parameter für den Versuch herangezogen, Transporter und ATPase noch nach der Affinitätssäule zutrennen, doch es gelang in keinem der Versuche die Proteine auch nur teilweise zu separieren. Möglicherweise entstehen aber auch beim Konzentrationsvorgang Verschmelzungen der Detergenzmicellen, die eine weitere Trennung verhindern.

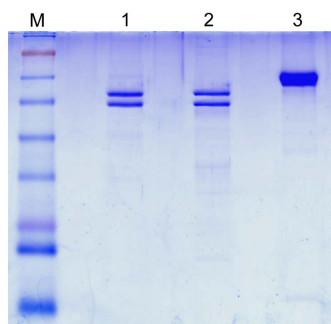


Abb. 38: 12%iges Tricin/SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung des *T. thermophilus* ABC-Transporter Dimers. 1: Homolog aus *T. Thermophilus* HB27 nach optimierter Aufreinigung. 2: Heterolog aus *E. coli*. 3: Cu-ATPase, isoliert aus *T. thermophilus* HB27 Wildtyp-Membranen. M: Protein-Marker.

Für die saubere Isolierung des ABC-Transporters wurden die Wasch- und Elutionsschritte dahingehend optimiert, dass die als Verunreinigung auftretende Cu-ATPase abgetrennt werden konnte. Dazu wurde nach dem Probenauftrag ein zusätzlicher Waschschriff mit 10 mM Imidazol eingeführt. Anschließend wurde ein sehr flacher Elutionsgradient von 10-70 mM angelegt, der die His-getagte Proteinprobe innerhalb von 40 min von der Affinitätssäule löste. Auf diese Weise konnte der Elutionspeak der Cu-ATPase soweit abgetrennt werden, dass der überwiegende Teil des ABC-Transporters für die folgende Gelfiltration (siehe oben) vereinigt und ankonzentriert werden konnte. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in Abb. 38 dargestellt. Die Konzentration der Proteinprobe wurde sowohl photometrisch als auch nach Lowry bestimmt. Für die spektrophotometrische Bestimmung wurde die Extinktion der Probe bei 280 nm gemessen und die Konzentration mit einem aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten Extinktionskoeffizienten (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam> ermittelt ($\epsilon_{280 \text{ nm}}: 154.190 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Ausbeute von ca. 3 mg/l Kultur angegeben werden.

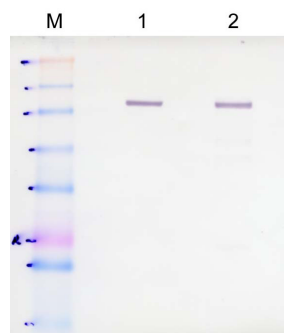


Abb. 39: Vergleichender Western-Blot mit Anti-His Antikörper des isolierten homolog (1) und heterolog (2) exprimierten ABC-Transporters. M: Protein-Marker.

3.9.2.2 Heterologe Expression des ABC-Transporters in *E. coli*

Für die heterologe Expression des *T. thermophilus* ABC-Transporters in *E. coli* wurde das gesamte Operon über die Schnittstellen NdeI/NotI aus dem Plasmid pDM15 in den Expressionsvektor pET22b transferiert. Das neue Expressionsplasmid pDM20 wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) selektioniert. Die Anzucht erfolgt in 2,5 l Schüttelkolben mit geöffnetem Deckel bei 32°C Ü/N. Die weitere Präparation und Aufreinigung wurde wie für das homolog exprimierte Protein (siehe oben) durchgeführt. Das Ergebnis der Aufreinigung ist in

Abb. 38 dargestellt. Die im Tricin/SDS-Gel aufgetrennten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und in einer MALDI-MS und MS/MS Analyse (T. Beckhaus, AK Prof. Karas, Universität Frankfurt/M.) eindeutig als ABC-UE I und II aus *T. thermophilus* HB27 identifiziert. Die Ausbeute dieses heterolog exprimierten Membranproteins kann mit 1 mg/l Kultur angegeben werden.

3.9.2.3 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität

In Cooperation mit S. Dinkelaker (AK Prof. Tampé, Universität Frankfurt/M.) wurden die homolog bzw. heterolog exprimierten und aufgereinigten ABC-Transporter hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Dafür wurde das im Anschluss an die ATP-Hydrolyse freigesetzte Phosphat in einem für thermophile Enzyme optimierten Test gemessen (Abb. 40). Die vergleichenden Ergebnisse sind in Abb. 39 dargestellt und zeigen, dass beide isolierten ABC-Transporter, der homolog aus *Thermus* wie auch der heterolog aus *E. coli* aufgereinigte zu einem schnellen Substratumsatz von ca. einem ATP pro sec in der Lage sind. Um einen Beitrag der Cu-ATPase am Phosphatumsatz des homolog exprimierten Proteins ausschließen zu können, wurde die Cu-ATPase separat aufgereinigt (siehe unten) und ebenfalls in den vergleichenden Test eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 41 dargestellt und zeigt, dass sowohl das homolog aus *Thermus* isolierte Protein als auch das heterolog exprimierte Äquivalent zu etwa gleichem Substratumsatz in der Lage ist. Der Kontrolltest mit der isolierten Cu-ATPase zeigt hingegen keine signifikante Aktivität und ist somit nicht in der Lage, ATP zu hydrolysieren, womit eine auf Verunreinigung zurückzuführende Aktivität des homolog exprimierten und aufgereinigten Transporters ausgeschlossen werden kann.

Darüber hinaus wurde die Temperaturabhängigkeit des Substratumsatzes bestimmt, die Ergebnisse sind in Abb. 42 dargestellt. Das Maximum kann mit ca. 75°C angegeben werden. Die Temperaturstabilität der aufgereinigten Transporter Proteine wurde außerdem in einem CD-Spektrum bestimmt. Dabei wurde die thermische Entfaltung der α -helikalen Strukturen bei 222 nm in einem Temperaturbereich von 15-97°C verfolgt (siehe auch Kap. 3.5.2). Die sigmoidale Schmelzkurve konnte mit diesen Membranproteinen bereits ohne denaturierende Zusätze dargestellt werden (Abb. 43). und über die 1. Ableitung konnte der Schmelzpunkt sowohl für das homolog als auch das heterolog in *E. coli* exprimierte Protein mit ca. 85°C angegeben werden. Der in Abb. 43A dargestellte Entfaltungsprozess zeigt jedoch einen deutlichen Unterschied des heterologexprimierten Proteins im Bereich beginnender Denaturierung bei ca. 70°C. Auch wiederholte Messungen mit verschiedenen Proteinpräparationen

weisen diese Schulter auf und lassen auf ein verändertes Entfaltungsintermediat schließen.

Das Gesamtprojekt wurde im Rahmen einer Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Tampé weitergeführt.

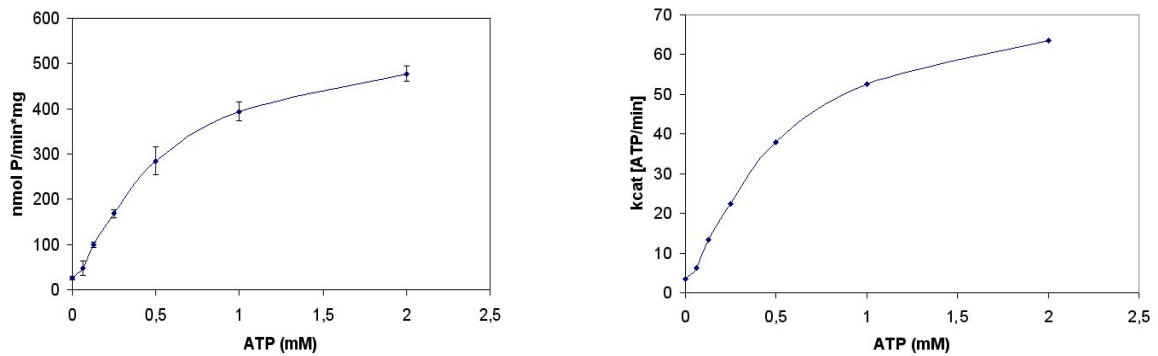


Abb. 40: Umsatzrate in Abhängigkeit der ATP-Konzentration nach der Malachit-Grün Methode (Baykov, *et al.* 1988). Gezeigt sind die Daten für den aus *T. thermophilus* isolierten MDL-ähnlichen ABC-Transporter.

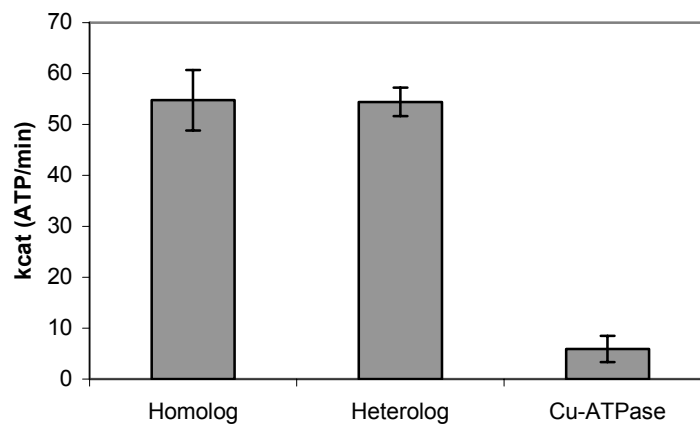


Abb. 41: Vergleichende Darstellung der ATPase Aktivität. Der aus *T. thermophilus* isolierte ABC-Transporter zeigt dabei die gleiche Umsatzrate wie sein heterolog exprimiertes und aus *E. coli* aufgereinigte Äquivalent. Dagegen ist für die Cu-ATPase aus *T. thermophilus* nur ein schwacher ATP-Umsatz zu messen.

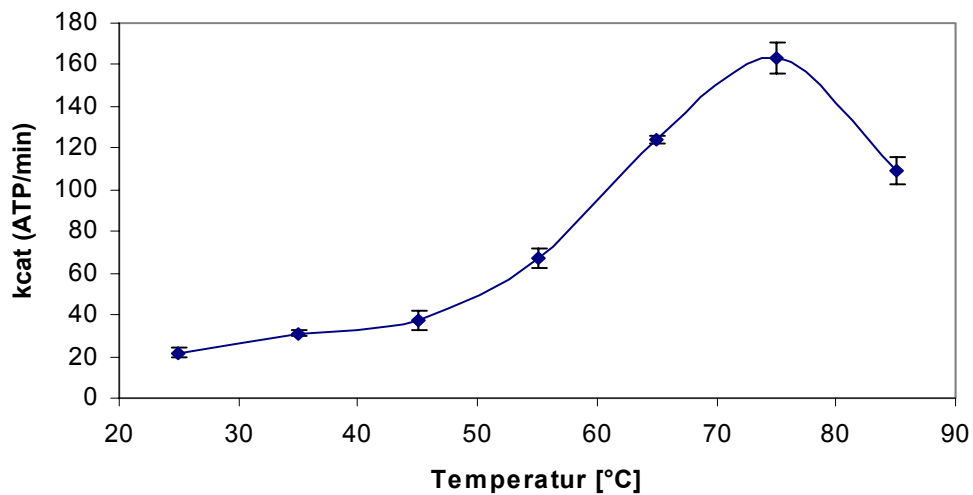


Abb. 42: Substratumsatz in Abhängigkeit der Messtemperatur. Die ATP-Hydrolyse des homolog aus *T. thermophilus* aufgereinigten ABC-Transporters wurde im Bereich von 15-95°C bestimmt.

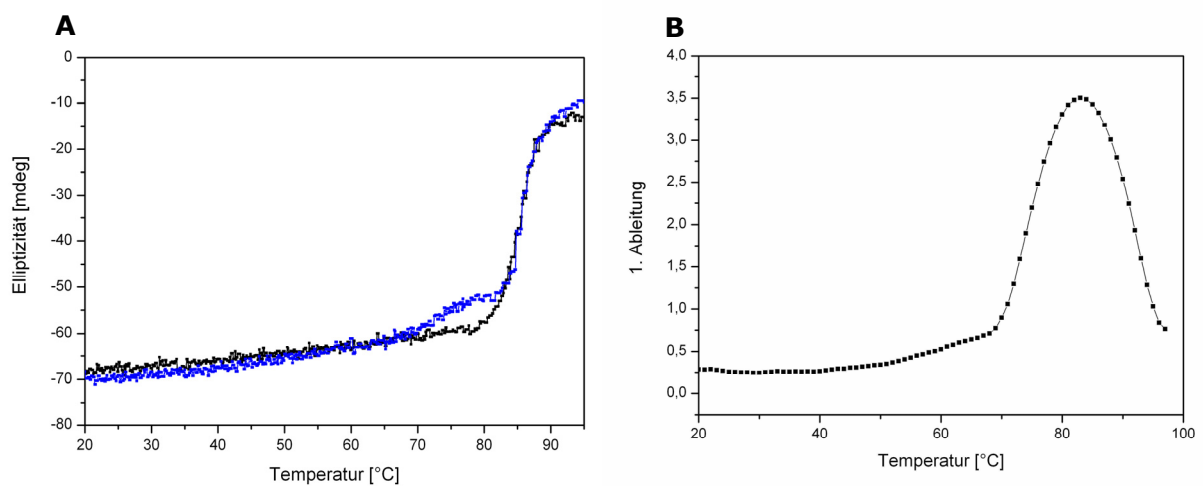


Abb. 43: Vergleichendes CD-Spektrum des *Thermus* ABC-Transporters. A: Schmelzkurve des homolog (schwarz) und heterolog (blau) exprimierten ABC-Transporter Dimers. B: 1. Ableitung des Spektrums zur Ermittlung des Schmelzpunktes (am Beispiel des homolog aus *Thermus* isolierten ABC-Transporters).

3.9.3 Aufreinigung der nativen Cu-ATPase

Für vergleichende Aktivitätstests wurde die endogene Cu-ATPase aus *T. thermophilus* HB27 aufgereinigt. Dazu wurde eine Wildtyp-Kultur bei 70°C in LB-Medium ohne Zugabe von Antibiotika Ü/N angezogen. Die Zellen wurden geerntet und in 50 mM NaP_i pH 7 resuspendiert. Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall wurde die

Membranfraktion durch Ultrazentrifugation (1 h bei 120.000 g) abgetrennt und in Puffer (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl) resuspendiert. Da die Cu-ATPase als Verunreinigung bei der Isolierung des ABC-Transporters aufgetreten ist, wurde die Solubilisierung und die nachfolgenden chromatographischen Schritte in Anlehnung an das in Kap 3.9.2.1 beschriebene Protokoll durchgeführt. Es wurde Dodecyl-Maltosid in einem Verhältnis von 2:1 zur Gesamtmembran-Proteinmenge (10 mg/ml) eingesetzt und die Solubilisierung für 2 h bei 4°C in 50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl durchgeführt. Die Aufreinigung konnte aufgrund der im nativen Protein vorhandenen N-terminalen Histidine über die Cobalt-Talon Säule erfolgen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule bis zum Erreichen der Basislinie mit Waschpuffer gespült (50 mM NaP_i pH 7, 300 mM NaCl, 0,5 g/l DM). Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit 20 mM Imidazol durchgeführt, bevor ein Gradient von 20-120 mM Imidazol im Elutionspuffer (Waschpuffer mit 200 mM Imidazol) angelegt wurde. In der anschließenden Gelfiltration (AcA34) mit Waschpuffer wurde das Imidazol entfernt und eine weitere Abtrennung von Verunreinigungen erreicht. Die aufgereinigte native Cu-ATPase ist nach Tricine/SDS-PAGE in Abb. 38 dargestellt und konnte mit einer Ausbeute von 0,2 mg/l Kultur aus *T. thermophilus* HB27 isoliert werden. Das Projekt wird im Rahmen einer Diplomarbeit in unserem Arbeitskreis fortgesetzt.

4 Diskussion

4.1 Das extrem thermophile Bakterium *T. thermophilus*

Seit der Entdeckung thermophiler Organismen steigt das wissenschaftliche und industrielle Interesse stetig (Pantazaki *et al.*, 2002; Niehaus *et al.*, 1999). Besonders Vertreter der Spezies *T. thermophilus* beeindrucken durch maximale Wachstumstemperaturen von ca. 85°C und erlangen damit nicht nur Bedeutung für die Grundlagenforschung. Neben der allgemeinen Hitzestabilität der Bakterien sind besonders die thermostabilen Eigenschaften der Genprodukte für verschiedenste Bereiche der Forschung wie auch der industriellen Anwendung von großem Interesse (siehe Einleitung). Themenschwerpunkte sind dabei die Aufklärung thermostabiler Proteinstrukturen und allgemeingültiger Strategien zum Überleben bei diesen hohen Temperaturen. Besonders die Strukturaufklärung konnte entscheidend von der erhöhten Stabilität dieser Proteine profitieren und dazu beitragen, eine Vielzahl an Proteinstrukturen von *T. thermophilus* aufzuklären. Für biotechnologische Anwendungen ist neben der Thermostabilität auch die generelle Erhöhung der Proteinstabilität z. B. gegen physikalische und chemische Einwirkungen sowie die erhöhte Salztoleranz als entscheidender Vorteil besonders im Hinblick auf eine effiziente industrielle Nutzung zu nennen. Neben diesen Besonderheiten entwickelte sich *T. thermophilus* auch wegen seiner guten Transformationskompetenz, die diesen Organismus leicht zugänglich für genetische Manipulationen macht, zu einem Modellorganismus thermophiler Prokaryoten. Die Genome der Subspezies HB8 und HB27 sind beide seit 2004 vollständig sequenziert und allgemein zugänglich, so dass ein weiterer Anstieg der wissenschaftlichen Erkenntnisse erwartet werden kann.

Das Hauptinteresse meiner Arbeit bestand in der Untersuchung der thermophilen Atmungskette dieses Bakteriums. Einige dieser transmembranen Elektronentransfer-Komplexe wurden bereits detailliert untersucht, doch konnte bisher kein vollständiger Ablauf von NADH bis zur Reduktion von molekularem Sauerstoff beschrieben werden. Für die Lücke zwischen den bekannten Komponenten der NADH- bzw. Succinat-Oxidation und den zwei alternativen Oxidasen konnte als fehlendes Glied lediglich ein lösliches Fragment des Rieske-Proteins, als ersten Hinweis eines *bc*-Komplexes, aufgezeigt werden. Diese Arbeit beschreibt den Weg von der Identifizierung des Gen-Locus, über die Aufreinigung und den Nachweis eines vollständigen *bc*-Komplexes

aus vier Untereinheiten, bis hin zur biochemischen und beginnenden funktionellen Charakterisierung dieses thermostabilen Enzyms. Darüber hinaus konnten Erkenntnisse zur Thermostabilität des isolierten Komplexes und weiterer membranständiger *Thermus*-Proteine in Detergenzumgebung gewonnen werden. Außerdem konnten lösliche Module wie auch vollständige Membrankomplexe heterolog in *E. coli* exprimiert und auf ihre Funktionalität hin überprüft werden.

4.2 Aufbau des *fbcCXFB*-Operons

Auf Grundlage der Genomsequenz konnte dem *Thermus bc*-Komplex in dieser Arbeit ein Gen-Locus zugeordnet und als Operon identifiziert werden. Dieses setzt sich aus vier offenen Leserahmen zusammen, die, nur durch 8-10 bp getrennt, direkt aufeinander folgen. Jedem Gen ist eine eindeutige RBS vorangestellt und es können keine Überlappungen festgestellt werden. Co-Lokalisationen waren bisher vor allem in Virusgenomen bekannt, bis 2003 ähnliche Anordnungen erstmalig in Bakterien des Genus *Thermus* beschrieben werden konnten (Ellis & Brown, 2003). Es handelt sich dabei um die Strukturgene der Proteine RNase P und L34, die z.B. in *E. coli* sukzessive mit eigener RBS in einem Operon angeordnet sind. In *T. thermophilus* dagegen ist das zweite Gen vollständig in der Sequenz des Ersten enthalten und es wird ein gemeinsamer Translationsstart verwendet.

Den *bc*-Strukturgenen ist eine typische Promotorregion vorangestellt, der einzige Terminationsbereich kann 16 bp stromabwärts des letzten Gens identifiziert werden und ist mit einer 24 bp-langen palindromen Sequenz sehr ausgeprägt. Die bisher beschriebenen Charakteristika des Gen-Locus und des angrenzenden Sequenzbereichs weisen sehr deutlich auf die Synthese eines einzigen polycistronischen mRNA-Transkripts der vier *bc*-Komponenten hin, die somit in einem 3,1 kb Operon mit der Abfolge *fbcCXFB* organisiert sind. Der endgültige Beweis dieser Annahme könnte über die spezifische Isolierung und anschließende Identifizierung der entsprechenden mRNA erfolgen.

Zwei der vier Gensequenzen (*fbcF*, *fbcB*) können in einem DNA-Sequenzvergleich direkt typischen *bc*-Komponenten zugeordnet werden. Das erste Gen (*fbcC*) zeigt zwar homologe Bereiche zu bekannten Cytochrom c_1 -Untereinheiten, doch stellt sich gleichzeitig auch eine unerwartete Beziehung zu den *caa*₃-Oxidasen dar (näheres siehe unten). Für das zweite Gen (*fbcX*) jedoch kann in den Datenbanken keine Sequenzidentität zu bisher bekannten Untereinheiten festgestellt werden. Wird das

vollständige *bc*-Operon homolog in *T. thermophilus* exprimiert und aufgereinigt, sind alle vier Genprodukte als Bestandteil eines stabilen Proteinkomplexes nachzuweisen. Die isolierten Proteinkomponenten wurden über eine Massenbestimmung auf ihre Vollständigkeit hin überprüft und es wurde festgestellt, dass alle Untereinheiten als vollständiges Produkt ihrer Gensequenz vorliegen. Es finden somit keine posttranslationalen Modifikationen statt, auch werden keine Signalsequenzen prozessiert, und das Operon wird vollständig in Proteinkomponenten übersetzt, die als Bestandteil eines stabilen Membrankomplexes aufgereinigt werden können (siehe nächstes Kap. 4.3).

4.3 Proteindomänen und Untereinheiten des *bc*-Komplexes

Die identifizierten Strukturgene des *fbC*XFB-Operons wurden computergestützt in den äquivalenten Aminosäure-Kode translatiert und standen somit für weitergehende Vergleiche auf Proteinebene und zur Vorhersage der Membrantopologie zur Verfügung. Eine weitere Einordnung der *bc*-Untereinheiten erfolgte über den Nachweis und die Charakterisierung der eingebauten Cofaktoren, wofür besonders deren spektrale Eigenschaften genutzt wurden.

Zwei der Proteinuntereinheiten konnten leicht Komponenten bekannter *bc*-Komplexe zugeordnet werden: Cytochrom *b* und das Volllängen-Rieske-Protein, das bereits in einer löslichen Version ohne N-terminalem Membrananker identifiziert und detailliert untersucht worden war (Hunsicker-Wang *et al.*, 2003; Fee *et al.*, 1984). Beide Untereinheiten werden von benachbarten Genen kodiert und zeigen deutliche Ähnlichkeit zu homologen *bc*-Komponenten. Die Cytochrom *c*-Untereinheit wird trotz ihrer ungewöhnlichen Eigenschaften den *bc*-Komponenten zugerechnet, und auch das durch das zweite Gen im Operon kodierte FbcX kann als Bestandteil eines aktiven *Thermus bc*-Komplexes nachgewiesen werden.

4.3.1 Cytochrom *b* und Rieske-Protein

Die *T. thermophilus* Cytochrom *b*-Untereinheit besteht aus 420 aa mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Dem hydrophoben Protein können acht Transmembranhelices anhand von Hydrophathie-Plots und durch Sequenzvergleiche mit homologen Cytochrom *b*-Untereinheiten zugeordnet werden. Gemeinsam mit der Tatsache, dass zwei Häm *b*-Bindemotive, jedoch keines für Häm *c* vorliegt, lässt sich

diese Untereinheit eindeutig von den Komponenten der b_6f -Komplexe in Cyanobakterien, Chloroplasten und Teilen der Firmicuten abgrenzen (Schütz *et al.*, 2000). In diesen Organismen liegt die Cytochrom b -Untereinheit nicht wie in den meisten Bakterien als Bündel von acht Membrandurchgängen vor, sondern in einer gesplitteten Version aus Cytochrom b und Untereinheit IV. Diese Komponenten entsprechen weitestgehend dem N- und C-terminalen Bereich der langen (bc -Komplex) Cytochrom b -Untereinheit, ein wesentlicher Unterschied besteht in der Anzahl der Transmembranhelices: fusionierte man die gesplitteten Untereinheiten, so ergäbe sich eine reduzierte Anzahl von sieben Helices, da der Untereinheit IV nur drei dieser hydrophoben Bereiche zugeordnet werden können. Dieses Charakteristikum macht man sich für phylogenetische Fragestellungen zu Nutze (siehe Kap. 4.4). Die Anzahl der Transmembranhelices kann aber auch zur eindeutigen Abgrenzung gegenüber den Archaeen verwendet werden, die sich durch eine verlängerte Cytochrom b -Untereinheit von bis zu 12 Helices (z. B. *Aeropyrum pernix*) auszeichnen. Des Weiteren wird der Abstand der Häm-bindenden Histidine in Helix II und IV zur Charakterisierung herangezogen. In Proteobakterien wie auch in Mitochondrien wird ein 13/13 Abstandsmuster beobachtet, während sich die b_6f -Komplexe durch einen Abstand von 13/14 auszeichnen. Auch dieser Marker wird für phylogenetische Fragestellungen herangezogen und gibt möglicherweise einen Hinweis darauf, dass *T. thermophilus* mit seinem 13/14 Muster an einem evolutionären Übergangspunkt zwischen Cyano- und Proteobakterien anzusiedeln ist (siehe Kap. 4.4).

Anhand der Kristallstruktur eines b_6f -Komplexes (Breyton, 2000b) konnte ein weiterer wesentlicher Unterschied zu den homologen bc -Komplexen herausgestellt werden. Es handelt sich dabei um ein drittes Häm, das in der Nähe des N-Terminus kovalent in der Cytochrom b_6 -Untereinheit gebunden ist. Dieses markante Bindemotiv ist in der *Thermus* Cytochrom b -Proteinsequenz nicht zu finden.

Auch spektroskopische Unterschiede lassen sich zwischen den homologen Komplexen feststellen. So zeigen im Redox-Differenzspektrum alle b -Häme bei etwa 562 nm ein Maximum auf. Während die Cofaktoren der bc -Komplexe typischerweise einen gesplitteten spektralen Verlauf zeigen, weist das *Thermus* Cytochrom b ähnlich der b_6f -Komplexe ein einheitliches Redox-Differenzspektrum auf. Auch die Redoxpotentiale der *Thermus* Häm b_L (-205 mV) und b_H (-40 mV) ähneln im Wert mehr der b_6f -Gruppe mit etwa -180 und -85 mV als der bc -Gruppe mit Werten von etwa -90 und +50 mV (Darrouzet *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen sind als weiterer Hinweis einer Zwischenstellung des *Thermus* bc -Komplexes zwischen den Cyano- und Proteobakterien zu deuten und machen diese Spezies damit zu einem phylogenetisch sehr interessanten Organismus.

Das lösliche Rieske-Fragment konnte mit einer hohen Auflösung in der Kristallstruktur dargestellt werden (Hunsicker-Wang *et al.*, 2003) und wurde bereits detailliert biochemisch und biophysikalisch analysiert (Zu *et al.*, 2001; Gatti *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur des hydrophilen C-terminalen Teils zeigt eine Unterteilung in zwei Proteindomänen auf: die kleinere beinhaltet das Cluster-Bindemotiv und gewährleistet die kovalente Bindung des Fe_2S_2 -Cofaktors, die größere Domäne wird von β -Faltblättern dominiert, die eine unregelmäßige Faserstruktur bilden. Da das Bindemotiv mit seinen Sequenz-Boxen CTHLGC (Box I) und CPCHGS (Box II), die die zwei Cystein- sowie die zwei Histidin-Liganden enthalten, hoch konserviert ist, zeigt diese Domäne eine erwartete hohe Homologie zu bekannten Rieske-Proteinen. Im Gegensatz dazu variiert der restliche Proteinteil auch innerhalb der *bc*-Gruppe und gleicht sich lediglich in der globalen Struktur, die bei diesen Rieske-Proteinen nicht in Domänen untergliedert ist. Das *Thermus* Rieske-Protein weicht somit bereits durch die zwei-Domänen Struktur deutlich von der *bc*-Gruppe ab und lässt sich damit eher den *b₆f*-Rieske-Proteinen zuordnen.

In MALDI-MS Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass der N-terminale Membrananker inklusive der ausgeprägten TAT-Exportsequenz auch im reifen Rieske-Protein vorhanden ist, so dass diesem Membranabschnitt von etwa 15 aa eine Doppelfunktion als Signalsequenz und Membrananker zugeschrieben werden kann. Die instabile Verankerung der Rieske-Untereinheit im Gesamtkomplex hat sich auch in meinem Projekt als Problem bei der detergentenvermittelten Aufreinigung herausgestellt und hat in früheren Aufreinigungsversuchen nur zur Darstellung der hydrophilen Domäne geführt (Fee *et al.*, 1984).

In EPR-Experimenten kann das korrekt eingebaute Fe_2S_2 -Cluster im isolierten Gesamtkomplex nachgewiesen werden. Das Redoxzentrum lässt sich mit Dithionit im vollständig reduzierten Zustand darstellen. Die g-Werte des *Thermus*-Gesamtkomplexes liegen im EPR-Spektrum an gleicher Stelle, wie bereits für das Fragment beschrieben, und nehmen zahlenmäßig damit eine Mittelstellung zwischen Werten der *bc*- und der *b₆f*-Gruppe ein (Darrouzet *et al.*, 2004). Das Redoxpotential des Rieske-Proteins liegt bei 140 mV (Link *et al.*, 1999) und ist damit deutlich den *low-potential* Menachinol-oxidierenden Komplexen zuzuordnen.

4.3.2 Cytochrom c zeigt eine ungewöhnliche Topologie und Verwandtschaft

Das erste Genprodukt des Operons ist ein Monohäm c-Typ Cytochrom aus 243 aa mit einer errechneten molekularen Masse von 26 kDa. Im Hydropathie-Plot lässt sich ein einzelner Membranbereich von mindestens 18 aa berechnen, der in zentraler Lage

positioniert ist (Position 101-118) und das Protein somit in zwei hydrophile Domänen unterteilt. Die C-terminal hydrophile Domäne besteht aus 124 aa und trägt das typische Bindemotiv, CAACH (Pos. 171-175), für c-Typ Häm. Da der Häm-Einbau periplasmatisch erfolgt und der potentielle Reaktionspartner, das lösliche Cytochrom c_{552} , in diesem Kompartiment nachgewiesen werden kann, gehe ich davon aus, dass diese C-terminale Domäne in das Periplasma hineinragt.

Mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen die lösliche Domäne des Cytochrom *c*-Fragments generiert wurde, konnte die erwartete Molekülgröße des Vollängen-Proteins immunologisch bestätigt werden. Der spezifische Nachweis wurde im Western-Blot vergleichend anhand des isolierten, heterolog exprimierten Proteins, des isolierten Gesamtkomplexes und auch in nativen *Thermus*-Membranen erbracht. Darüber hinaus konnten Peptidfragmente der N-terminal hydrophilen Domäne in MALDI-Analysen detektiert und in MS/MS-Experimenten identifiziert werden. Es ist also sicher auszuschließen, dass dieser Proteinbereich als ungewöhnlich lange Signalsequenz fungiert und posttranslational entfernt wird. Bis jetzt gibt es noch keinen experimentellen Anhaltspunkt für die Orientierung der N-terminalen Domäne; aufgrund des Hydropathie-Plots gehe ich aber davon aus, dass diese der cytoplasmatischen Seite zugewandt sein wird.

Die Cytochrome c_1 und *f* konnten bereits mit hoher Auflösung in Kristallstrukturen dargestellt werden und wurden daraufhin einem detaillierten Vergleich unterzogen (Soriano *et al.*, 1999). Dabei wird deutlich, dass strukturelle Gemeinsamkeiten nur begrenzt vorhanden sind. Beide Komponenten weisen eine hydrophile, Häm-bindende Domäne auf, die durch eine C-terminale hydrophobe Helix in der Membran verankert ist. Doch bereits die generelle Struktur, wie auch die Orientierung des Häm-Cofaktors weisen auf wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Reaktionspartner hin: So werden die Elektronen der *bc*-Komplexe auf c-Typ Varianten (Cytochrom *c*, c_2 , c_y , c_8) oder Fe_2S_2 -Proteine übertragen, im Fall der b_6f -Komplexe findet der Transfer auf Plastocyanin oder c-Typ Cytochrome (Cytochrom c_6) statt (Darrouzet *et al.*, 2004). Die Häm-Bindung wird in beiden Cytochromen über die Bindung von je zwei Thioetherbrücken gewährleistet, doch unterscheiden sie sich hinsichtlich des sechsten Liganden: In Cytochrom c_1 wird diese durch ein Methionin besetzt, in Cytochrom *f* durch den N-Terminus der Polypeptidkette (Martinez *et al.*, 1994). Dadurch ergeben sich spektroskopische Unterschiede anhand derer die beiden Cytochrome-Typen charakterisiert werden können. So ist in der hier beschriebenen *Thermus* Untereinheit eine für c-Typ Cytochrome typische *Charge Transfer*-Bande bei 695 nm im oxidierten Redoxspektrum sichtbar, die auf eine Methionin-Ligandierung hindeutet (Moore &

Pettigrew, 1990). Auch der direkte Sequenzvergleich mit homologen Cytochrom *c*-Komponenten (siehe unten) weist auf eine hohe allgemeine Übereinstimmung und ein konserviertes Methionin (Position 212) als sechsten Häm-Liganden hin, so dass diese Untereinheit der Gruppe der *c*-Typ Cytochrome zuzuordnen ist.

Die Cytochrom *c*-Untereinheit der *bc*-Komplexe variiert stark innerhalb der verschiedenen Phyla. So werden unterschiedliche Positionen des Strukturgens innerhalb des Operons beschrieben, aber auch die Position des singulären Membranankers kann am C- sowie auch am N-terminalen Ende der Polypeptidkette lokalisiert sein (Schütz *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden Varianten eines Dihäm-Cytochroms in *Heliobacillus mobilis* (Xiong *et al.*, 1998) und *Clostridium glutamicum* (Bott & Niebisch, 2003) beschrieben. Das *Thermus* Cytochrom enthält nur ein Häm-Bindemotiv, fällt jedoch durch die ungewöhnliche Positionierung des Membranankers in der Proteinmitte und die dadurch gegebene Topologie auf.

```

1  mivdrievyl dqgtepvavl keppyrwkld trnlpdgeht lrvvthfrgg gqeirvipft vnnypdvlvl
71  gvdeggevag evelrmhvge pelpvvetprf nplwyavaav vvlggiwsyf alsppaeria eevappaqea
141 qahgggqaaa apagvdpalm ekgkaiyeaa caachqangq gmpafpala gnpnlqdaqm ilnivknrg
211 ampavganfs eeeliavaty irnsfgnsfg pve

```

Abb. 44: Aminosäuresequenz der Cytochrom *c*-Untereinheit. Das Häm-Bindemotiv und der 6. Häm-Ligand sind in rot dargestellt. Die mit der DAS-Methode vorhergesagte Transmembranhelix ist grau unterlegt. Der zur *D. radiodurans* Cytochrom *c*-Untereinheit homologe Bereich ist fett markiert. In blau ist der Sequenzbereich dargestellt, der den *caa*₃-Oxidase homolog ist (siehe Ergebnisteil) und als lösliches Fragment heterolog in *E. coli* exprimiert wurde.

Führt man einen programmgestützten Homologie-Vergleich durch (FASTA3), so erzielt man keinen Treffer, der sich über die gesamte Länge des Proteins erstreckt. Es können lediglich homologe Bereiche aufgezeigt werden, im Besonderen die Häm-tragende C-terminale Domäne (Position 158-243) und der zentrale Proteinbereich (Pos. 58-157, siehe nächstes Kapitel). Für die ersten 50 aa der N-terminal hydrophilen-Domäne ergibt sich hingegen keine sinnvolle Homologie zu den bisher öffentlichen Sequenzen. Überraschenderweise zeigt die aus etwa 86 aa bestehende C-terminale Häm-Domäne eine größere Homologie zur Untereinheit II der *caa*₃-Oxidase der γ -Proteobakterien (C-terminal an eine typische hydrophile Cu_A-Domäne fusioniert) als zu den Cytochrom *c*-Komponenten der *bc*-Komplexe. Die im Ergebnisteil dargestellte Homologie erstreckt sich über die gesamte *Thermus* Cytochrom *c* Häm-Domäne und geht damit deutlich über das Häm-Bindemotiv hinaus.

Die *Thermus* eigene *caa*₃-Oxidase wird in den oben beschriebenen Sequenzvergleichen deutlich nachrangig angezeigt. Erst ein direkter Sequenzvergleich unter Zulassung von Sequenzlücken zeigt homologe Bereiche auch dieser zwei Komponenten auf. Eine direkte Reaktion zwischen beiden Enzymkomplexen ist vorstellbar und konnte bereits für die löslichen Fragmente der *c*-Komponenten nachgewiesen werden (J. Janzon, Dissertation 2007), näheres siehe Kap. 4.11.

T. thermophilus ist somit ein weiteres Beispiel für die große Diversität der *c*-Komponenten innerhalb der verschiedenen *bc*-Komplexe. Die *Thermus* Untereinheit weist deutliche Unterschiede zu der gut beschriebenen Cytochrom *c*₁-Untereinheit der Mitochondrien auf, die sich vermutlich aus einem kollabierten Dihäm der ϵ -Proteobakterien entwickelt hat (Baymann *et al.*, 2004). Dennoch ist sie Bestandteil einer typischen *fbc*-Operonstruktur und wird deshalb als Cytochrom *c*-Untereinheit des *T. thermophilus bc*-Komplexes bezeichnet.

4.3.3 Die zusätzliche vierte Untereinheit FbcX

Bei dem zweiten Genprodukt des Operons handelt es sich um ein kleines (17,6 kDa) und sehr hydrophobes Protein, das sicher als Bestandteil des aktiven *Thermus bc*-Komplexes nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.3). Die vier Transmembranhelices sind 11-20 aa lang und weisen keine erkennbare Identität zu beschriebenen *bc*-Untereinheiten auf; aufgrund der Ladungsverteilung (Claros & von Heijne, 1994) wird sowohl der N- als auch der C-Terminus auf der cytosolischen Seite erwartet. Anhand der Sequenzinformationen konnten auf Protein-Ebene keinerlei konservierte Bereiche aufgezeigt werden, die einen Hinweis auf die Funktionalität dieser Untereinheit geben könnten. Die einzig sinnvolle Homologie ergibt sich in Sequenzvergleichen zur Genomsequenz des Genus *Deinococcus*. Die Monohäm *c*-Typ Untereinheiten der Spezies *D. radiodurans* und *D. geothermalis* (White *et al.*, 1999; NCBI: *Deinococcus geothermalis* DSM 11300) weisen im Hydrophathie-Plot vier Transmembranhelices auf, wovon jeweils eine nahe des N-Terminus liegt. Weitere drei befinden sich am C-terminalen Ende der Polypeptidkette und zeigen hohe Sequenzidentität zur *Thermus* Untereinheit FbcX auf. Die dazwischen liegende hydrophile Domäne von etwa 150 aa enthält das Bindemotiv des *c*-Typ Häms (Position 111-115) und zeigt darüber hinaus eine klare Homologie zur *Thermus* Cytochrom *c*-Untereinheit. Die hier diskutierten Proteinkomponenten könnten somit das Ergebnis von Fusions- oder Spaltungs-Ereignissen eines phylogenetisch gemeinsamen Ursprungs sein.

4.4 Der *bc*-Komplex ist die zentrale Komponente der *T. thermophilus* Atmungskette

Mit der Identifizierung und Charakterisierung typischer Untereinheiten eines *bc*-Komplexes kann nun die Minimalversion einer Elektronentransfer-Kette in *T. thermophilus* beschrieben werden. Die bisher beschriebenen Redox-Komponenten können somit um das fehlende Bindeglied ergänzt und eine funktionelle aerobe Atmungskette von NADH bis zu molekularem Sauerstoff beschrieben werden.

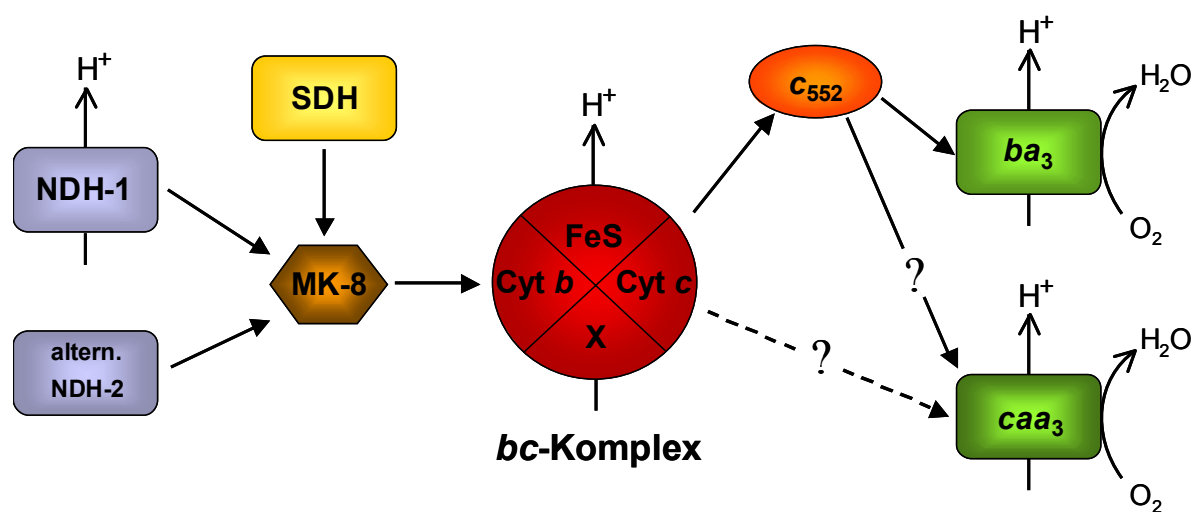


Abb. 45: Schematische Darstellung der *T. thermophilus* Atmungskette mit dem neu identifizierten *bc*-Komplex und den damit verbundenen Elektronentransferwegen.

Das in *Thermus*-Membranen überwiegend vorkommende Menachinon-8 wird von Komplex I reduziert und leitet die Elektronen direkt an den hier beschriebenen Komplex III weiter. In unserer Arbeitsgruppe konnte anhand kinetischer Studien gezeigt werden, dass die Elektronen der reduzierten Cytochrom *c*-Untereinheit über das lösliche Cytochrom c_{552} zum Cu_A -Zentrum der ba_3 -Oxidase weitergeleitet werden. Dazu wurden lösliche Fragmente der Redox-Komponenten heterolog in *E. coli* exprimiert (Mooser *et al.*, 2005; Than *et al.*, 1997 und diese Arbeit) und in *stopped flow*-Experimenten analysiert. Für das Cytochrom *c*-Fragment (des *bc*-Komplexes) und c_{552} konnte eine sehr schnelle Reaktion mit Elektronentransfer-Raten von $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt und als spezifische Reaktion interpretiert werden, an der nur etwa eine effektive Ladung beteiligt ist. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu

vermeiden, müssen Kontakte zwischen physiologischen Reaktionspartnern hoch spezifisch sein, aber dennoch mit einer sehr schnellen Umsatzrate erfolgen. Das wird in mesophilen Organismen erreicht, indem direkte Interaktionen wie z. B. Salzbrücken zwischen den Reaktionspartnern gering gehalten werden. Die geringe Beteiligung von Ladungen an der Reaktion zwischen Cytochrom *c* und *c*₅₅₂ macht hingegen gerade die Bedeutung der nicht-elektrostatischen Kräfte deutlich (Mooser *et al.*, 2005).

Eine ähnliche Situation konnte für den Elektronentransfer zwischen Cytochrom *c*₅₅₂ und der löslichen Cu_A-Domäne der *ba*₃-Oxidase beschrieben werden. Auch an dieser Reaktion sind nur einige wenige Ladungen beteiligt (Maneg *et al.*, 2003), so dass auch hier ein nicht-elektrostatischer Charakter der Reaktion als Anpassung an die erhöhte Temperatur vermutet werden kann. In gleicher Weise wurde auch der alternative Elektronenweg zur *caa*₃-Oxidase in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die jeweiligen Redox-Fragmente liefern schnelle Elektronentransferraten und unterstützen damit die Vermutung eines direkten Kontaktes zwischen Cytochrom *c* und der *caa*₃-Oxidase. Eine ebenso schnelle Reaktion konnte zwischen Cytochrom *c*₅₅₂ und der löslichen Cytochrom *c*-Domäne der *caa*₃-Oxidase gemessen werden. Diesen Ergebnissen zufolge ist Cytochrom *c*₅₅₂ in der Lage, beide alternativen Oxidasen mit Elektronen zu versorgen (J. Janzon, Dissertation 2007). In Kapitel 4.3.2 wurde bereits auf die Homologie der *c*-Typ Komponenten hingewiesen und diese diskutiert. In zukünftigen Projekten soll deshalb der Reaktionsmechanismus dieser gleichartigen Cytochrom *c*-Module besonders hinsichtlich komplementärer Domänen geklärt werden.

4.5 *T. thermophilus* und sein *bc*-Komplex - eine phylogenetische Betrachtung

Spezies der Genera *Thermus* (Gram negativ) und *Deinococcus* (Gram positiv) werden innerhalb der Prokaryoten einem gemeinsamen Abstammungszweig, der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe zugerechnet (Omelchenko *et al.*, 2005). Der gemeinsame Ursprung wird aufgrund phylogenetischer Untersuchungen an ribosomaler RNA abgeleitet und durch das Vorkommen einer Reihe von konservierten Proteinen wie z. B. ribosomaler Proteine und Untereinheiten der RNA Polymerase bekräftigt. Zum Genus *Thermus* werden momentan 14 thermophile Spezies gerechnet, dem Genus *Deinococcus* gehören dagegen mindestens 11 Spezies an, die sich durch eine extreme Resistenz gegenüber γ -Strahlung und Austrocknung auszeichnen (Makarova *et al.*, 2001; Battista *et al.*, 1999). Die Spezies *D. geothermalis* und

murrayi sind darüber hinaus moderat thermophil bis zu Temperaturen von 45°C (Ferreira *et al.*, 1997).

Dennoch können auch große Unterschiede im Genrepertoire von *Thermus* und *Deinococcus* festgestellt werden, die auf den Verlust zahlreicher Gene eines gemeinsamen Vorläufer-Stammes hinweisen. Demgegenüber wurde andererseits eine Vielzahl an Genen dazugewonnen, die teilweise die Anpassung an ökologische Nischen gewährleisten. Die neuen Gene wurden vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben und stammen im Fall von *Thermus* von (Hyper)Thermophilen und Archaeen ab. *Deinococcus* hat dagegen von diversen Bakterien Gene dazugewonnen, deren Proteine an Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress und anderen "house-cleaning"-Funktionen beteiligt sind (Omelchenko *et al.*, 2005).

Erstaunlicherweise weist auch die Genzusammensetzung der Megaplasme pTT27 und DR177 von *Thermus* bzw. *Deinococcus* eine deutliche Ähnlichkeit auf. Es kann deshalb ein gemeinsamer Ursprung vermutet werden, der damit ein erstes Beispiel für die Genus-übergreifende Weitergabe eines Megaplasms wäre. Darüber hinaus tragen auch die jeweiligen Megaplasme wesentlich zur Adaptation an besondere Umweltbedingungen bei und sind für beide Organismen überlebenswichtig. Die unterschiedlichen Megaplasme der *T. thermophilus* Subspezies HB8 und HB27 deuten dabei auf einen hoch dynamischen Vorgang des Genverlustes und des Zugewinns von neuen Genen über horizontalen Gentransfer im Verlauf der Evolution hin. So weisen die Megaplasme einen Unterschied von 28% hinsichtlich der Genzusammensetzung auf, auf chromosomaler Ebene macht dieser Unterschied nur etwa 6% aus (Bruggemann & Chen, 2006).

Phylogramme, die auf Grundlage von Untereinheiten des *bc*-Komplexes erstellt werden, zeigen eine generelle Ähnlichkeit zu solchen, denen andere phylogenetische Marker zugrunde liegen (z. B. die kleine Untereinheit der rRNA). Die *bc*-Superfamilie weist also eine hohe Konstanz im Verlauf der Evolution auf, in der nur selten Ereignisse des lateralen Gentransfers auftraten. Einziges bisher bekanntes Beispiel dieser Art ist der Transfer eines ϵ -proteobakteriellen *bc*₁-Komplexes in das Genom von *Aquifex* (Schütz *et al.*, 2003). Die Komponenten der *bc*-Komplexe scheinen somit besonders geeignet, evolutionäre Zusammenhänge verschiedenster Organismen aufzuklären und es wurden dafür die markantesten Unterschiede zwischen den *bc*-Komplexen einer phylogenetisch divergenten Gruppe zu einem Vergleich herangezogen: der Abstand der Häm-Liganden in Cytochrom *b*, die Cytochrom *c*-Untereinheit, das Redoxpotential der Fe₂S₂-Untereinheit, die verwendete

Elektronenquelle und das Vorliegen einer langen oder gesplitteten Cytochrom *b*-Untereinheit (Schütz *et al.*, 2000).

Im Reich der Bakterien ist ein Häm-Liganden Abstand von 13/14 aa vorherrschend (siehe auch Kap. 4.3.1), wohingegen in Proteobakterien und Mitochondrien ein 13/13-Muster vorzufinden ist. Der Verlust einer Aminosäure im zweiten Häm-Motiv scheint jedoch erst zu einem späten evolutionären Zeitpunkt in der γ -Gruppe erfolgt zu sein, da auch Proteobakterien mit einem 13/14-Abstand bekannt sind. Archaeen weisen ebenfalls ein 13/13-Muster auf, so dass ungeklärt bleibt, welches Abstandsmuster einer Urform des Cytochrom *b* zugesprochen werden kann.

Die Cytochrom *c*-Untereinheit variiert signifikant zwischen den Phyla (siehe auch Kap. 4.4), doch gerade daran lassen sich kürzere evolutionäre Abstände gut darstellen. So zeichnen sich die meisten proteobakteriellen Komplexe und der von *Aquifex* (siehe oben) durch ein typisches Cytochrom c_1 aus, abweichende *c*-Typ Cytochrome sind ein Merkmal der gram-positiven *Bacilli* und der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe. Organismen, die zur Photosynthese in der Lage sind, weisen ein Cytochrom *f* als gemeinsames Charakteristikum auf, das von den Cyanobakterien bis hin zu den Chloroplasten gut konserviert geblieben ist.

Die meisten bakteriellen Cytochrom *b*-Untereinheiten bestehen aus acht zusammenhängenden Transmembranhelices. An diese Grundeinheit sind in Archaeen C-terminal noch zwei bis vier weitere Helices angefügt, die Gruppe der *Chlorobiaceae* weist dagegen nur insgesamt sieben Helices auf. Cyanobakterien und die Firmicuten bestehen aus zwei separaten Proteinen: Cytochrom b_6 und Untereinheit IV, die dem N- bzw. C-terminalen Bereich der langen *b*-Cytochrome der *bc*-Komplexe entsprechen. Fusionierte man diese beiden Untereinheiten, so ergäbe sich eine Anzahl von sieben Helices, die die Situation der *Chlorobiaceae* widerspiegeln würde (Schütz *et al.*, 2000). Anhand dieser Beobachtungen können phylogenetische Einordnungen stattfinden und mögliche Eigenschaften eines gemeinsamen Vorgängers abgeleitet werden. Auffällig ist die weitgehende Übereinstimmung auf der Ebene der Rieske- und Cytochrom *b*-Untereinheit und deren einheitliche genetische Anordnung. Diese beiden Proteinkomponenten werden deshalb als Teil eines Urenzyms gesehen. Der diverse Charakter der Cytochrom *c*-Komponente lässt dagegen vermuten, dass nicht alle Untereinheiten gleichen Ursprungs (monophyletisch) sind; vielmehr der konservierten Transkriptionseinheit aus Rieske- und Cytochrom *b*-Gen im Laufe der Evolution ein verfügbares Cytochrom *c*-Strukturgen stromauf- oder -abwärts angefügt wurde.

Das Basisenzym der meisten Organismen, besonders aber solche, die an einem frühen Verzweigungspunkt vermutet werden, gehören zu der Menachinol-oxidierenden Klasse mit niedrigem Redoxpotential. Diese Beobachtung passt zu der Vorstellung einer

Uratmosphäre mit niedrigerem O₂-Partialdruck (Knoll, 1992). Aufgrund der zunehmenden Photosynthese-Prozesse haben im Laufe der Evolution verschiedene Anpassungen an einen steigenden Sauerstoffgehalt stattgefunden. Die Erhöhung des elektrochemischen Potentials von -70 mV (Menachinon) auf ca. +100 mV wurde letztendlich durch drei chemisch verschiedene Substrate erreicht: Ubichinon (Proteobakterien), Plastochinon (Cyanobakterien) und Caldariellachinon (*Sulfolobales*) (Schütz *et al.*, 2000).

Bemerkenswert ist dabei, dass die phylogenetische Analyse der verschiedenen Parameter die *Thermus/Deinococcus*-Gruppe an eine sehr frühe Abzweigung eines gemeinsamen Vorgängers positioniert. Die Studie des *T. thermophilus bc*-Komplexes kann somit einen weiteren Beitrag zur Beantwortung dieser phylogenetischen Fragestellungen leisten und auch die Sequenzierung von Genomen der *Thermus/Deinococcus*-Gruppe sollte weitere Hinweise auf die Eigenschaften eines gemeinsamen Vorläufer-Bakteriums liefern.

4.6 Aspekte der Thermostabilität

Die meisten Organismen wachsen bei Temperaturen zwischen 20 und 50°C, doch einige Prokaryoten, darunter Archaeen und Bakterien sind in der Lage, biologische Nischen mit Temperaturen von 60 bis über 100°C zu besiedeln. Proteine und Biomoleküle müssen unter diesen Temperaturbedingungen ausreichend stabil sein und besonders die Enzymaktivität darf nicht beeinträchtigt werden. In den letzten Jahren konnten Forschungsergebnisse zu zahlreichen Hypothesen zusammengefasst, eine allgemeingültige Theorie der Thermostabilität aber bis heute noch nicht formuliert werden. Vermutlich haben sich in der Evolution verschiedene Strategien zur Anpassung an heiße Lebensräume parallel entwickelt oder sind in den heutigen Organismen als Relikte einer Anpassung an die Uratmosphäre zu beobachten.

Der Vergleich von Mesophilen und Thermophilen auf den Ebenen der Nukleotide, der *codon-usage* und des Aminosäure-Musters ergab auf allen Ebenen wesentliche Unterschiede, die eine Unterscheidung anhand der Genomsequenz ermöglichen sollen (Singer & Hickey, 2003). Dieses Ergebnis verweist auf eine koordinierte evolutionäre Anpassung, die nicht nur die Proteinebene umfasst, sondern auch deren Vorstufen. So ist eine thermostabile mRNA ebenso wie eine stabile Kodon-Antikodon Wechselwirkung als zwingende Voraussetzung zu nennen. Auf der Ebene der Nukleinsäurezusammensetzung wird eine Zunahme des Purinanteils (Lao & Forsdyke, 2000) und im

Besonderen des Adenins (Singer & Hickey, 2003) beobachtet, was zu einer stabilisierenden Wirkung der RNA-Tertiärstruktur führen kann. Beide Charakteristika können anhand des *fbC*XFB-Operons nicht bestätigt werden, der Anteil des Adenins beträgt lediglich 14% im Gegensatz zu 37% Cytosin und 33% Guanin.

In einer vergleichenden Proteomanalyse treten bei thermophilen Organismen bestimmte Aminosäuren häufiger, andere mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit auf als in den untersuchten mesophilen Proteinen (Singer & Hickey, 2003; De Farias & Bonato, 2002). So wird ein erhöhtes Verhältnis von Glu und Lys gegenüber einem verringerten Vorkommen von Gln und His bei hyperthermophilen Proteomen beobachtet. Vergleicht man die Proteinsequenzen der Hefe, der mesophilen *Deinococcus bc*-Untereinheiten und den thermostabilen *Thermus bc*-Komplex, so kann dieser Trend für die Proteinkomponenten des *bc*-Komplexes nur teilweise bestätigt werden. Zwar ist ein deutlich häufigeres Vorkommen der Aminosäuren Glu und Lys zu beobachten, eine Verminderung von Gln und His ist dagegen nicht aufzuzeigen. Dabei ist anzumerken, dass die vorhandenen Histidine hauptsächlich in die hochkonservierten Häm-Binde-Motive integriert sind und deshalb eine weitgehende Konstanz zu erwarten war. Doch auch die These, dass die *codon-usage* einen eindeutigen Hinweis auf thermophile Organismen gibt, lässt sich anhand der verwendeten Triplets in *Thermus* nicht bestätigen. So wurde eine Präferenz des AGR-Kodons für Arginin angenommen (De Farias & Bonato, 2002), doch werden in *T. thermophilus* hauptsächlich CGG (33%) und CGC (30%), dagegen nur in 15% der Fälle das AGR-Kodon für Arginin verwendet.

Vergleichende Studien von mesophilen und thermophilen Proteinen stellen teilweise unterschiedliche Charakteristika in den Fokus, so dass eine generelle Aussage nicht getroffen werden kann. Doch wird immer wieder auf die erhöhte Anzahl an Salzbrücken (Robinson-Rechavi *et al.*, 2006) und die ausgeprägte Wechselwirkung ionischer Netzwerke hingewiesen (Aguilar *et al.*, 1997; Perutz & Raidt, 1975). Diese Beobachtung wurde besonders durch die zahlreichen Strukturinformationen thermostabiler Proteine wie z. B. der Glutamat-Dehydrogenase (Yip *et al.*, 1998) oder der Citrat Synthase (Russell *et al.*, 1997) gewonnen. Darüber hinaus konnten anhand der Strukturinformationen zusätzliche Bindungen beschrieben werden, die eine stabile Verknüpfung von einzelnen Untereinheiten und auch die Fixierung des C-Terminus gewährleisten; eine C-terminale Verlängerung der Polypeptidkette, die als Thermoklammer fungiert, wurde für das *Thermus* Cytochrom *c*₅₅₂ beschrieben (Than *et al.*, 1997). Die globale Proteinstruktur ist häufig kompakter und zeichnet sich durch Netzwerke aus Lösungsmittelmolekülen aus (Aguilar *et al.*, 1997), die eine erhöhte Elastizität der Struktur zulassen. Dadurch wird Stabilität bei höheren Temperaturen

gewährleistet unter Beibehaltung der notwendigen Flexibilität (Tehei *et al.*, 2004). Diese Theorie steht dabei im Kontrast zur weit verbreiteten Annahme, dass eine erhöhte Thermostabilität mit einer höheren Rigidität assoziiert sein müsste.

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, dass sich die *Thermus*-Subspezies HB8 und HB27 auf der chromosomalen Ebene nur geringfügig unterscheiden, dass aber die extrachromosomalen Plasmide eine größere Flexibilität aufweisen. Es wird vermutet, dass beide Megaplasmide wesentlicher Bestandteil der Überlebensstrategie bei hohen Temperaturen sind. Ein Großteil ihrer Genprodukte ist an DNA-Reparaturfunktionen beteiligt; etwa 30 plasmidkodierte Gene weisen ähnliche Sequenz- und Domänenmuster auf wie ein speziell für thermophile Archaeen und Bakterien postuliertes DNA-Reparatursystem. Darüber hinaus sind die plasmidkodierten Gen-Cluster für die Karotinoid-Synthese direkt mit Genen der UV-induzierten DNA-Reparatur verknüpft (Bruggemann & Chen, 2006).

Im Rahmen meiner Ergebnisse konnte ich zeigen, dass die thermostabilen Eigenschaften sowohl des isolierten *bc*-Komplexes als auch des isolierten ABC-Transporters in Detergenzumgebung erhalten bleiben. Der *bc*-Komplex wurde dafür thermisch und z.T. in Gegenwart von Guanidiniumhydrochlorid denaturiert, doch der genaue Schmelzpunkt lässt sich auch in Anwesenheit von 2 M Guanidiniumhydrochlorid nicht eindeutig bestimmen. Vermutlich wirken Bestandteile des verwendeten Messpuffers störend auf den Entfaltungsprozess, hier zu nennen sind besonders das verwendete Detergenz Decyl-Maltosid und die hohe Glycerinkonzentration von 30% (v/v). Grund zu dieser Annahme gibt die vollständige Darstellung einer Schmelzkurve des isolierten *Thermus* ABC-Transporters mit einem Schmelzpunkt bei ca. 85°C. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein sehr hydrophobes Membranprotein, das jedoch auch ohne den Zusatz von Glycerin stabil in Lösung gehalten werden kann. Ein weiterer Unterschied besteht in der Verwendung des Detergenz Dodecyl-Maltosid, während alle weiteren Pufferkomponenten dem *bc*-Puffersystem entsprechen. Möglicherweise ist auch die thermisch induzierte Denaturierung eines zwei-Komponenten Proteinkomplexes einfacher zu erreichen als bei einem vier-Komponenten System, wie im Fall des *bc*-Komplexes. Besonders herauszustellen ist auch die Thermostabilität des heterolog in *E. coli* exprimierten ABC-Transporters. In der CD-Entfaltungskurve stellt sich der Schmelzpunkt bei derselben Temperatur von ca. 85°C dar und auch der Verlauf der Denaturierung findet fast deckungsgleich zum homolog exprimierten Protein statt. Ein kleiner Unterschied ist jedoch im beginnenden Schmelzprozess zu beobachten, der auch mit

verschiedenen Proteinchargen reproduzierbar darzustellen ist und auf geringfügige Faltungsvariationen oder auf unterschiedliche Entfaltungs-Zwischenprodukte schließen lässt. Dieses Ergebnis gibt einen eindeutigen Hinweis darauf, dass die thermostabilen Eigenschaften des Transporter-Proteins bereits allein mit der Proteinprimärsequenz vorgegeben sind und somit der mesophile *E. coli* Wirtsorganismus in die Lage versetzt wurde, ein thermostabiles Membranprotein zu produzieren. Die These, dass spezielle Chaperone am Faltungsprozess von thermostabilen Proteinen beteiligt sind, kann für diesen Fall und auch für die löslichen *bc*-Komponenten, die heterolog in *E. coli* exprimiert wurden, ausgeschlossen werden. Die Verfügbarkeit unterschiedlicher Chaperon-Gruppen kann aber durchaus für gewisse Faltungsvarianzen verantwortlich sein (siehe oben und heterolog exprimiertes *Thermus* Cytochrom *c*₅₅₂).

Um die Einwirkung von Hitze auf die Aktivität des isolierten *bc*-Komplexes in Detergenz-Umgebung zu überprüfen, wurde das Protein jeweils für 10 Minuten bei bis zu 121°C inkubiert; diese Hitzeinkubation wurde in identischer Weise für eine konzentrierte und eine 10-fach verdünnte Probe vorgenommen. Die verbleibende Restaktivität wurde, nach Abkühlung auf Eis, in einem Standardassay bei 45°C vergleichend zu einer unbehandelten Probe getestet. Die konzentriertere Proteinprobe erweist sich in diesem Versuch deutlich stabiler. Die 10-fach verdünnte Proteinlösung dagegen ist einer größeren Anzahl an Lösungsmittelmolekülen ausgesetzt, die vermutlich eine thermische Denaturierung beschleunigen und damit die Restaktivität bereits bei Temperaturen unter 90°C herabsetzen. Eine höhere Proteinkonzentration könnte somit stabilisierend auf den Gesamtkomplex wirken, ein allgemein beobachteter Effekt, der auch für eine thermostabile Glutamat-Dehydrogenase beschrieben wurde (Consalvi *et al.*, 1993). In weiteren CD-Experimenten konnte die Entfaltung von Sekundärstruktur-Elementen in einem ähnlichen Temperaturbereich von ca. 90°C gezeigt werden. Im darüberliegenden Temperaturbereich kommt es zur irreversiblen Denaturierung der Proteinstrukturen, die mit einem drastischen Abfall der Aktivität einhergehen.

4.7 Aufreinigung des vier-Untereinheiten *bc*-Komplexes

Zur Identifizierung und biochemischen Charakterisierung des *Thermus bc*-Komplexes wurde die gesamte Kodierungsregion einschließlich der stromaufwärts liegenden Promotorbereich von genomischer DNA des Stammes HB8 amplifiziert. Ein C-terminaler His₆-Tag wurde an das *fbcb* Gen angefügt und das Amplikon in den

Thermus/E.coli-Shuttlevektor pDM12 (Kap. 3.8) kloniert. Das entstandene Plasmid pDM6 wurde über Elektroporation in den Expressionsstamm HB27 eingeführt und ein resultierender Klon selektiv über die vektorvermittelt hitzestabile Kanamycin-Resistenz (HTK) angezogen.

Für die Isolierung des *bc*-Komplexes wurden *Thermus* Membranen präpariert und mit n-Decyl- β -D-Maltosid (DEC) solubilisiert. Bei der Aufreinigung konnte der Proteinkomplex aufgrund des His₆-Tags spezifisch an eine Metall-Affinitätssäule gebunden und nach Waschschritten über einen pH-Sprung eluiert werden. Zur weiteren Reinigung folgte eine Gelfiltration.

Der gereinigte *bc*-Komplex wurde mit verschiedenen proteinchemischen Methoden analysiert und es konnten alle vier durch das *fb*cC_XFB-Operon kodierten Untereinheiten nachgewiesen werden. Im Tricine/SDS-Gel werden die Untereinheiten weitgehend entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt, in der Reihenfolge: Cytochrom *b* (420 aa plus His₆-Tag), Cytochrom *c* (243 aa), Rieske-Protein (210 aa) und FbcX (160 aa); Cytochrom *b* stellt sich bei zu niedrigem Molekulargewicht dar. Dieses Phänomen wurde bereits für einige Proteine, besonders aber für Membranproteine beschrieben und ist vermutlich auf ein ungewöhnliches Bindungsverhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäurerest oder die unzureichende Entfaltung der hydrophoben Bereiche zurückzuführen (Membrane Protein Purification and Crystallization, 2003). Andere Ergebnisse deuten auf hydrophobe Wechselwirkungen als Ursache dieses abweichenden Laufverhaltens hin (Rais *et al.*, 2004).

Eine umfangreiche MALDI-Analyse konnte Aufschluß über Identität und Vollständigkeit der aufgereinigten Proteine geben und darüber hinaus wurden zusätzliche N-terminale Informationen über Proteinsequenzierung gewonnen. Lediglich für die Cytochrom *c*-Untereinheit war eine erfolgreiche Durchgeführung der N-terminalen Sequenzierung nicht möglich. Bei dieser Untereinheit kann jedoch auf die Identifizierung eines N-terminalen MALDI-Fragmentes (Pos. 6-26) verwiesen werden. Weiterhin erfolgte eine immunologische Detektion der aufgereinigten Cytochrom *c*-Untereinheit, die vergleichend zur endogenen Untereinheit in einer Membranfraktion nachgewiesen wurde. Analog konnte die Cytochrom *b*-Untereinheit immunologisch anhand ihres C-terminalen His₆-Tags identifiziert werden. Nach homologer Expression der extrachromosomal vorgegeben Strukturgene gelang somit der experimentelle Nachweis aller vier Genprodukte als Bestandteil des aufgereinigten Proteinkomplexes.

Der Versuch, den vollständigen *bc*-Komplex über Co-Immunpräzipitation nachzuweisen, ist fehlgeschlagen. Zwar konnten die Untereinheiten Cytochrom *b* und Cytochrom *c* im SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden anschließend in MALDI-Analysen identifiziert werden, doch besonders die Darstellung der zwei kleineren Untereinheiten, das Rieske-Protein und FbcX gelang aufgrund des geringeren Massenanteils im Gesamtkomplex nur unzureichend. Eine Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge verschaffte dabei keine Abhilfe, denn Verunreinigungen und die kleine Untereinheit des polyklonalen IgG-Antikörpers führten gleichzeitig zu einer verstärkten Überlagerung, die die Isolierung von Einzelbanden unmöglich machte. Zu Beginn wurde für diesen Versuch Triton X-100 bzw. Dodecyl-Maltosid für die Solubilisierung eingesetzt. Wie sich später herausstellte, kann unter diesen Detergenzbedingungen kein vollständiger vier-Untereinheiten Komplex isoliert werden (siehe unten). Doch auch bei Verwendung von Decyl-Maltosid stieß die Methode aus oben genannten Gründen an ihre Grenzen und konnte nicht zum Nachweis aller *bc*-Komponenten herangezogen werden.

Die Solubilisierung und anschließende chromatographische Reinigung des Enzymkomplexes mit Triton X-100, einem Detergenz der Polyoxyethylen-Gruppe, führte zur ausschließlichen Isolierung der Cytochrom *b*-Untereinheit. Für weitere Versuche wurde deshalb Dodecyl-Maltosid eingesetzt. Mit diesem glykosidischen Detergenz konnte dann ein drei-Komponenten Komplex dargestellt werden, lediglich die Rieske-Untereinheit wurde unter diesen Bedingungen herausgelöst. Auch die Verwendung eines pH-Sprunges zur Proteinelution führte nicht zu einer weiteren Vervollständigung. Erst unter Verwendung von Decyl-Maltosid, das ebenfalls zur Gruppe der glykosidischen Detergenzien zählt, konnte die Isolierung eines vier-Komponenten Komplexes erreicht werden. Die ersten Proben dieser Versuche waren im SDS-Gel noch stark durch Verunreinigungen überlagert und ergaben eine unvollständige Stöchiometrie der Untereinheiten. Durch die Einführung stringenterer Waschschrte wurde die Zusammensetzung des Proteinkomplexes durch Verlust von Rieske-Protein weiterhin verschlechtert, so dass Abhilfe in der Optimierung der Solubilisierung und des verwendeten Puffersystems gesucht wurde.

Die Solubilisierung konnte wesentlich durch eine höhere Zugabe von NaCl verbessert werden (Membrane Protein Purification and Crystallization, 2003) und kann mit einem Verhältnis von 1:2 (Protein:Detergenz) ohne weiteres über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Eine Inkubation für weniger als zwei Stunden und 4°C führt nur zu einer unvollständigen Solubilisierung der *Thermus* Membranen, was durch ein deutliches Restpellet im Anschluss an die Ultrazentrifugation aufgezeigt wird. Sollte für zukünftige

Projekte dennoch eine kürzere Inkubationszeit benötigt werden, so könnte die Solubilisierung bei erhöhter Temperatur durchgeführt werden, die allgemein erhöhte Stabilität der *Thermus* Proteine bedeutet auch einen erhöhten Schutz vor Proteasen.

Der Zusatz von 30% Glycerin sowohl zum Solubilisierungsansatz als auch zu den im weiteren Aufreinigungsprozess verwendeten Puffern trägt erheblich zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen und damit zu einer guten Abtrennung von Verunreinigungen bei. Glycerin wie auch Ethanol reduzieren hydrophobe Protein-Wechselwirkungen, wobei die Verwendung von Glycerin in meinem Versuchsansatz zu den besseren Ergebnissen führte. Der wesentliche Nachteil einer Zugabe von 30% Glycerin (v/v) besteht, besonders für Arbeiten bei 4°C, in der erhöhten Viskosität der Puffer. Die vom Hersteller des Säulenmaterials angegebene Fließgeschwindigkeit konnte deshalb nicht annähernd erreicht werden und auch das Ankonzentrieren in Zentrifugations-Konzentratoren wurde durch die hohe Viskosität stark beeinträchtigt. Wurde die Glycerin-Konzentration jedoch auf nur 10% (v/v) herabgesetzt, so stellte sich der ankonzentrierte Probenpool im SDS-Gel mit wesentlich mehr unspezifischen Nebenbanden dar. Der Zusatz von 30% Glycerin wurde somit beibehalten und die unerwünschten Begleiterscheinungen in Kauf genommen. Darüber hinaus wird Glycerin als allgemeine Kryohilfe eingesetzt und wirkt vermutlich stabilisierend auf die bei -80°C gelagerten isolierten Proteinproben.

Eine weitere Verbesserung in der Aufreinigung wurde durch die Verwendung eines anderen Säulenmaterials beladen mit Cobalt-Ionen erzielt werden (Kap. 3.2.2.3). Die meisten Trägermaterialien von Metallaffinitätssäulen können mit diversen zweiwertigen Ionen beladen werden. In Studien stellte sich dabei heraus, dass die Metallionen unterschiedlich starke Wechselwirkungen zu den Poly-Histidinen der Proteine ausbilden, die zusätzlich durch die Position des His-Tags beeinflusst wird. Es können sich somit, je nach Beladung des Säulenmaterials, abweichende Bedingungen für die Stringenz der Waschschritte und die Elution ergeben (Heijbel, 2003; Yang *et al.*, 1997). Unter Verwendung von Cobalt zur Ausbildung eines Metall-Chelatkomplexes und dem vom Hersteller vorgeschlagenen Puffersystem (NaP_i pH 7) können die Waschschritte auf ein Minimum beschränkt werden, was sich sehr positiv auf die Gesamtstöchiometrie des isolierten *bc*-Komplexes auswirkte. Vermutlich bindet der Histidin-Tag schwächer an das Trägermaterial, gleichzeitig werden aber auch unspezifische Wechselwirkungen reduziert. Die Verwendung von Cobalt hat darüber hinaus den Vorteil, dass die Proteinprobe bei milderem Bedingungen von der Säule eluiert werden kann. So muß bei Nickel-beladenem Säulenmaterial Puffer mit einem pH-Wert von 4,5 verwendet werden, um den Gesamtkomplex von der Säule zu lösen. Das entspricht den vom Hersteller gemachten Angaben zur Elution von Dimeren, als

welcher der *bc*-Komplex vermutlich vorliegt. Besonders die Rieske-Untereinheit erweist sich im Aufreinigungsprozess als instabil und wird bereits durch einen zu niedrigen pH-Wert oder verlängerte und stringentere Waschschrte z. B. mit Imidazol aus dem Komplex herausgelöst. Diese Untereinheit profitiert somit am stärksten von der Verwendung des mit Cobalt gekoppelten Säulenmaterials, was neben den reduzierten Waschschrten auch eine Proteinelution bei pH 5,3 ermöglicht.

4.8 Der isolierte *bc*-Komplex zeigt *in vitro* enzymatische Aktivität

Bisher sind nur einige wenige *bc*-Komplexe von Thermophilen bekannt, die Menachinol als Substrat verwenden (siehe 1.3.1). Das besondere Interesse lag deshalb in der Darstellung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten hinsichtlich Mechanismus und katalytischer Aktivität zu bereits bekannten Komplexen. Der aufgereinigte *Thermus bc*-Komplex wurde deshalb mit verschiedenen Elektronendonoren und -akzeptoren auf spezifische Aktivität überprüft. Doch erwies sich besonders der fehlende Membranverbund aber auch das Temperaturoptimum von *T. thermophilus* bei ca. 70°C als Hindernis bei der Etablierung eines stabilen enzymatischen Tests. Für den *in vitro* Ansatz in Pufferumgebung mussten entsprechend hydrophile-Testsubstrate als Ersatz für das native aber stark hydrophobe Menachinon-8 gewählt werden. Doch im wässrigen Milieu konnten diese ihre Elektronen bereits direkt, ohne die enzymatische Katalyse des *bc*-Komplexes, auf den löslichen Akzeptor übertragen. Begünstigt wurde diese Autoxidation weiterhin durch teilweise große Unterschiede der Redoxpotentiale. Ein stabiler Enzymtest konnte dagegen mit dem nicht-physiologischen Redoxpaar Decyl-Ubichinol (DQ) und Cytochrom c_{550} aus Pferdeherz etabliert werden. Doch auch hier wurde die Messung im Bereich des Temperaturoptimums durch zunehmende Autoxidation verhindert. Dieser Effekt ist bei 45°C nur gering und kann für die Berechnung einer Netto-Aktivität subtrahiert werden. Unter den im Ergebnisteil beschriebenen Pufferbedingungen ergibt sich für den *Thermus bc*-Komplex bei 45°C und der Verwendung von DQ und Cytochrom c_{550} eine Wechselzahl von ca. 1 s^{-1} . Eine ähnliche Größenordnung des Substratumsatzes konnte auch für andere Thermophile, z.B. für das thermohalophile Bakterium *Rhodothermus marinus*, beschrieben werden. Für diesen *bc*-Komplex wurde ebenfalls mit den nicht-physiologischen Substraten DQ und Cytochrom c_{550} eine Aktivität von $0,37 \text{ s}^{-1}$ bei RT gemessen (Pereira *et al.*, 1999). Die Aktivität des thermophilen Bacillus PS3 konnte durch Vorinkubation mit endogenen Phospholipiden um das 3- bis 4-fache auf 5 s^{-1} bei 40°C gesteigert werden; 50 s^{-1} bei

60°C (Kutoh & Sone, 1988). Für den detailliert beschriebenen Naphthochinol-oxidierenden bc_1 -Komplex des hyperthermophilen Knallgasbakteriums *Aquifex aeolicus* konnten in der Literatur keine Angaben zu Substratumsatz und enzymatischer Aktivität gefunden werden (Schütz *et al.*, 2003).

Die Spezifität einer enzymatischen Reaktion wird im Allgemeinen durch eine gezielte Inhibierung nachgewiesen. Doch führte die Verwendung klassischer *bc*-Inhibitoren auch in hohen Konzentrationen zu keiner wesentlichen Verringerung der *Thermus bc*-Aktivität (siehe 3.4). Eine ähnliche Beobachtung wurde für den in *Halobacterium halobium* vermuteten Komplex III beschrieben (Schäfer *et al.*, 1996). In *Bacillus PS3* wird dagegen eine Empfindlichkeit gegenüber Myxothiazol, nicht aber gegen Antimycin A beobachtet (Kutoh & Sone, 1988). Die veränderte Empfindlichkeit gegenüber den typischen *bc*-Inhibitoren lässt somit strukturelle Abweichungen in der Umgebung der Substrattasche bzw. einen anderen Reaktionsmechanismus des *Thermus bc*-Komplexes vermuten.

Erst die äquimolare Zugabe verschiedener oxidiertes Naphthochinon-Substratanaloga führte zu einer nachweislichen Verringerung der Enzymaktivität. Doch dies war nicht für alle der 20 getesteten Substanzen zu beobachten. Es lässt sich vielmehr aufgrund dieser Ergebnisse eine Rangfolge in der Effektivität der Verdrängung an der Substrattasche des *Thermus bc*-Komplexes aufstellen (siehe 3.4). Die Verringerung der Aktivität wird dabei vermutlich durch zwei sich überlagernde Einflüsse verursacht: die in äquimolaren Mengen vorhandenen Substrate (reduziertes DQ und oxidiertes Naphthochinon-Substrat) konkurrieren um Bindung an der Substrattasche, dabei wird diese Wirkung durch eine vermutlich bessere Affinität des Naphthochinon-Analogons noch verstärkt; Testsubstrate mit sterisch ausgeprägten Seitenketten zeigen diesen Verdrängungseffekt dagegen nicht.

4.9 Homologe und heterologe Expression von *Thermus* Proteinen

In Prokaryoten und Eukaryoten kodieren 20-30% aller Gene für Membranproteine, doch sind bis heute nur 122 Strukturen gelöst [http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_proteins_xtal.html]. Das liegt zum einen an einer schlechteren Zugänglichkeit der membranintegralen Proteine, zum anderen werden besonders die sehr materialintensiven Methoden der Strukturforschung (Torres *et al.*, 2003) durch die verfügbare Proteinmenge limitiert. So hat die Zahl gelöster Strukturen von Membranproteinen zwar in der Vergangenheit zugenommen, doch liegt diesem

erhöhten Anteil zu mehr als 50% überexprimiertes Proteinmaterial aus *E. coli* zugrunde (Wagner *et al.*, 2006). Die Optimierung von Aufreinigungsstrategien und Systemen zur Überexpression von Membranproteinen steht somit im Blickpunkt zur Erforschung weiterer Strukturen.

Membranproteine können in zwei strukturelle Gruppen unterteilt werden: β -*barrel* und Helix-Bündel Membranproteine (von Heijne, 1999). β -*barrel* Proteine können als *inclusion bodies* exprimiert werden, aus denen sie isoliert und rückgefaltet werden können (Bannwarth *et al.*, 2003). Dies ist bisher nur mit wenigen Helix-Bündel Proteinen gelungen (Kiefer, 2003), so dass diese bevorzugt in Membransystemen überexprimiert und für die Isolierung mit Detergenz herausgelöst werden.

Das in dieser Arbeit verwendete *Thermus*-Expressionsplasmid konnte weiter optimiert werden, so dass es nun für einen breiteren Anwendungsbereich zur Verfügung steht. Membranproteine der *Thermus*-Atmungskette, aber auch ein membranintegroaler ABC-Transporter konnten mit diesem System erfolgreich und mit guter Effizienz unter Kontrolle des *bc*-Promotors exprimiert werden. Dieser Promotorbereich kann über nun vorhandene Schnittstellen ausgetauscht und damit eine höhere oder eine induzierte Transkription erreicht werden. Darüber hinaus stehen verschiedene Restriktionsschnittstellen zur Verfügung, die das Einfügen eines beliebigen Amplikons ermöglichen. So wurden neben 8ter-Erkennungssequenzen, die statistisch selten in der zu exprimierenden DNA-Sequenz vorkommen, auch solche eingebaut, die eine *blunt end*-Ligation zulassen.

Der Vektor wurde in dieser Arbeit verwendet, um verschiedene endogene Membranproteine in *Thermus* überzuexprimieren. So konnten unter Kontrolle des *bc*-Promotors und bei ausreichend aeroben Bedingungen der *bc*-Komplex, die *ba*₃-Oxidase und ein ABC-Transporter mit mittleren Ausbeuten von 2 bis 5 mg pro Liter Kultur isoliert werden. Die vergleichende Expression der *ba*₃-Oxidase unter Verwendung des *cba*-Promotors und entsprechend sauerstoffarmen Anzuchtbedingungen ergab neben einer stark verminderten Zellmasse auch eine reduzierte Proteinausbeute. Darüber hinaus wurde bei allen drei isolierten Membranproteinen Aktivität nachgewiesen. Es konnte somit gezeigt werden, dass der *Thermus/E.coli*-Shuttlevektor unter Kontrolle des *bc*-Promotors die Überexpression verschiedener funktioneller Membranproteine ermöglicht.

Eine weitere Möglichkeit zur Überexpression von Membranproteinen besteht in der Verwendung eines heterologen Expressionssystems. Dafür stehen etablierte pro- und auch eukaryotische Systeme zur Verfügung (Opekarova & Tanner, 2003), die speziell für membranintegrale Proteine optimiert wurden. Für prokaryotische Proteine ist *E. coli*

als Wirtsorganismus weit verbreitet und es stehen eine ganze Reihe von Plasmiden (z. B. das pET-System) und Expressionsstämme zur Auswahl (Sørensen & Mortensen, 2005). Dabei müssen sowohl auf DNA-Ebene als auch bei der Proteinexpression die spezifischen Unterschiede der verwendeten Organismen bedacht werden. So können sich Abweichungen in der *codon-usage* zwischen Donor-Stamm und Wirtsorganismus ergeben, es können aber auch spezielle Systeme z. B. Chaperone zur exakten Faltung oder zum korrekten Einbau von Cofaktoren notwendig sein. Darüber hinaus kann bei Membranproteinen auch die spezifische Zusammensetzung der Lipidumgebung essentiell für die Stabilität und Funktionalität der Proteine sein; eventuell müssen also Hilfsproteine co-exprimiert werden (Opekarova & Tanner, 2003).

In dieser Arbeit konnten verschiedene *Thermus* c-Typ Cytochrome, sowie das Rieske-Protein in löslicher Form und als Vollängen-Protein erfolgreich in *E. coli* überexprimiert werden. Der korrekte Einbau der Häm- bzw. Fe₂S₂-Cofaktoren konnte anschließend in den aufgereinigten Protein nachgewiesen und die Funktionalität in kinetischen sowie spektralen Assays, teilweise in Zusammenarbeiten, überprüft werden. Weiterhin wurde der vermutlich aus 12 Transmembranhelices bestehende ABC-Transporter erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert. Das Protein konnte mit guter Reinheit isoliert werden und zeigt im Vergleich zu dem aus *Thermus* isolierten Protein keine Beeinträchtigung der Aktivität, lediglich die Ausbeute wird durch die *E. coli*-Expression vermindert und muß künftig optimiert werden. Auch der vollständige *Thermus bc*-Komplex sollte in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert werden, was bisher nur unzureichend gelungen ist. Die letzte im Operon kodierte Untereinheit Cytochrom *b* ist zwar immunologisch in *E. coli*-Membranen detektierbar, so dass eine vollständige Transkription des *fbcC*XFB-Operons angenommen werden kann, doch hat eine unzureichende Aufreinigung des vier-Untereinheiten Komplexes weitere Untersuchungen bisher verhindert. Die Verwendung von optimierten *E. coli*-Stämmen C41/43(DE3) zur Expression von Membranproteinen (Sørensen & Mortensen, 2005) führte zu einer entscheidenden Verbesserung mit der vollständigen Darstellung aller vier Untereinheiten, die eindeutige Identifizierung (z. B. über MALDI-MS) für die zwei kleineren Untereinheiten, Rieske-Proteine und FbcX, steht jedoch noch aus. Wie bereits oben für den ABC-Transporter beschrieben, kann auch der *bc*-Komplex in *E. coli* nur mit stark reduzierten Ausbeuten exprimiert werden, was zurzeit keine Alternative zur homologen Expression darstellt. Sollte sich jedoch herausstellen, dass *Thermus* ohne *bc*-Komplex nicht überlebensfähig und eine Deletion somit nicht möglich ist, wäre die heterologe Expression eine Alternative zur spezifischen Aufreinigung von mutierten Versionen.

4.10 Zusammenfassung

Das Bakterium *Thermus thermophilus* hat sich in den letzten Jahren zu einem Modell für thermophile Organismen entwickelt. Die maximale Wachstumstemperatur liegt bei bis zu 85°C, so dass auch Proteine und die gesamte Zellstruktur an diese hohen Temperaturen adaptiert sein müssen. Aufgrund der allgemein erhöhten Stabilität werden diese Proteine zunehmend für biotechnologische Prozesse und zur Strukturbestimmung verwendet.

Im Energiehaushalt der Zelle ist der Elektronentransfer von NADH zu molekularem Sauerstoff ein wesentlicher Bestandteil und wird durch transmembrane Enzymkomplexe vermittelt. In dieser Arbeit konnten vier direkt aufeinanderfolgende Gene (*fbcC*, *fbcX*, *fbcF*, *fbcB*) identifiziert werden, die in einem 3,1 kb großen Operon mit einem GC-Gehalt von 69% organisiert sind und für die Untereinheiten eines putativen *Thermus bc*-Komplexes kodieren. Die *in silico* translatierte DNA-Information konnte für ausführliche Sequenzvergleiche und eine erste Charakterisierung der *bc*-Untereinheiten genutzt werden. Während Cytochrom *b* und das Rieske-Protein typische Eigenschaften zu anderen prokaryotischen Untereinheiten aufweisen, unterscheidet sich die Cytochrom *c*-Untereinheit hinsichtlich Topologie und Verwandtschaft von klassischen *c*₁-Komponenten. Darüber hinaus wurde eine zusätzliche Untereinheit FbcX identifiziert, die keine Entsprechung in bisher bekannten *bc*-Komplexen hat.

Das gesamte Operon mit vorangestellter σ^{70} Promotorregion wurde amplifiziert, in einen *Thermus/E.coli*-Shuttlevektor mit hitzeoptimierter Kanamycinresistenz eingefügt und so plasmidkodiert für die Überexpression in *T. thermophilus* HB27 genutzt.

Der membranständige Gesamtkomplex wurde nach Solubilisierung mit β -D-Decyl-Maltosid stabil in Lösung gebracht und anschließend über eine Metallaffinitätssäule stöchiometrisch als vier-Untereinheiten Komplex aufgereinigt. Der Gesamtkomplex sowie seine Einzelkomponenten und deren Cofaktoren waren somit für eine nähere Charakterisierung verfügbar. Alle vier Genprodukte konnten als Untereinheiten des *bc*-Komplexes in *T. thermophilus* über N-terminale Sequenzierung und MALDI-MS/MS eindeutig identifiziert werden. Der *in vitro* Aktivitätstest zeigte keine Hemmbarkeit des aufgereinigten *Thermus* Komplexes durch klassische *bc*-Inhibitoren, was auf eine deutlich abweichende Substratbindung dieses Menachinol-oxidierenden Komplexes hinweist.

Durch Optimierung des *Thermus/E.coli*-Shuttlevektors wurde auch die homologe Überexpression weiterer *Thermus*-Membranproteine ermöglicht. Dazu gehört neben der ba_3 -Oxidase auch ein MDL-ähnlicher ABC-Transporter. Weiterhin wurde gezeigt, dass die thermostabilen Eigenschaften sowohl des *bc*-Komplexes als auch des ABC-Transporters in Detergenzumgebung erhalten bleiben. Dieser Nachweis konnte darüber hinaus auch für den heterolog exprimierten und aus *E. coli* aufgereinigten ABC-Transporter erbracht werden, der im isolierten Zustand die gleiche Aktivität wie das aus *Thermus* aufgereinigte Äquivalent aufweist.

Neben dem *bc*-Gesamtkomplex, der ba_3 -Oxidase und Cytochrom c_{552} wurden in dieser Arbeit weitere Komponenten der thermophilen Atmungskette in löslicher Form oder mit Membrananker, zum Teil auch heterolog in *E. coli* exprimiert und unter Erhalt der Redox-Cofaktoren aufgereinigt.

Mit der Identifizierung und Charakterisierung eines intakten Cytochrom *bc*-Komplexes konnte die Lücke im Verständnis der thermophilen Atmungskette von *T. thermophilus* geschlossen und die Grundlage für weitere Struktur- und Funktionsanalysen dieses membranintegralen Enzymkomplexes geschaffen werden.

5 Literaturverzeichnis

Adams M.W.W. and Kelly R.M., Finding and using hyperthermophilic enzymes, *Trends Biotechnol.*, 16 (1998) 329-332.

Aguilar C.F., Sanderson I., Moracci M., Ciaramella M., Nucci R., Rossi M. and Pearl L.H., Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability, *J. Mol. Biol. Sep* 5;271/5 (1997) 789-802.

Anthony C., The microbial metabolism of C_1 compounds. The cytochromes of *Pseudomonas* AM1, *Biochem. J.*, Feb. 146/2 (1975) 189-298.

Arslan E., Schulz H., Zufferey R., Kunzler P., Thöny-Meyer L., Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the *cbb₃* oxidase in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 744-747.

Bachmann J., Bauer B., Zwicker K., Ludwig B. and Anderka O., The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase, *FEBS J.* 273/21 (2006) 4817.

Bannwarth M. and Schulz G.E., The expression of outer membrane proteins for crystallization, *Biochim. Biophys. Acta*, 1610/1 (2003) 37-45.

Battista J.R., Earl A.M. and Park M.J., Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation?, *Trends Microbiol. Sep.* 7/9 1999 362-365.

Baykov A.A., Evtushenko O.A. and Avaeva S.M., A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay, *Anal. Biochem.*, Jun. 171/2 (1988) 266-270.

Baymann F., Lebrun E. and Nietschke W., Mitochondrial cytochrome c_1 is a collapsed di-heme cytochrome, *PNAS* 101 (2004) 17737-17740.

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

Berry E.A., Guergova-Kuras M., Huang L. and Crofts A.R., Structure and function of cytochrome *bc* complexes, *Biochemistry* 69 (2000) 1005-1075.

Birnboim H.C. and Doly J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7 (1979) 1513-1523.

Bott M., Niebisch A., The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*, *J. Biotech.* 104 (2003) 129-153.

Breyton C., The cytochrome *b₆f* complex: structural studies and comparison with the *bc₁* complex, *Biochim. Biophys. Acta* 1459 (2000b) 467-474.

Brock T.D. and Freeze H., *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile, *J. Bacteriol.* Apr;98/1 (1969) 289-297.

Bruggemann H. and Chen C., Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: Plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle, *J. Biotechnol.*, Aug 5;124/4 (2006) 654-661.

Buse G., Hensel S. and Fee J.A., Evidence for cytochrome oxidase subunit I and a cytochrome *c*-subunit II fused protein in the cytochrome '*c_{1aa3}*' of *Thermus thermophilus*. How old is cytochrome oxidase?, *Eur. J. Biochem.* 181 (1989) 261-268.

Castresana, J. and Moreira, D., Respiratory chains in the last common ancestor of living organisms, *J. Mol. Evol.* 49 (1999) 453-460.

Chung A.P., Rainey F.A., Valente M., Nobre M.F. and da Costa M.S., *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Jan;50 (2000) 209-217.

Claros M.G., von Heijne G., TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions, *CABIOS* 10 (1994) 685-686.

Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., Pasquo A., De Rosa M. and Scandurra R., Glutamate dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*: studies on thermal and guanidine-dependent inactivation., *Biochim. Biophys. Acta* 1202/2 (1993) 207-215.

Cserzo M., Wallin E., Simon I., von Heijne G. and Elofsson A., Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10** (6) (1997) 673-676.

Darrouzet E., Cooley J.W., Daldal F., The cytochrome *bc*₁ complex and its homologue the *b₆f* complex: similarities and differences, *Photosynth. Res.* 79 (2004) 25-44.

De Farias, S.T. and Bonato M.C., Preferred codons and amino acid couples in hyperthermophiles, *Genome Biol. Jul.* 19;3/8 (2002).

Ellis J.C and Brown J.W., Genes within genes within bacteria, *Trends Biochem. Sci.* Oct;28/10 2003521-2003523.

Fee, J.A.; Choc, G.M.; Findling, K.L.; Lorence, R. and Yoshida, T., Properties of a copper-containing cytochrome *c₁aa₃* complex: a terminal oxidase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77/1 (1980) 147-151.

Fee, J.A.; Findling, K.L.; Yoshida, T.; Hille, R.; Tarr, G.E.; Hearshen, D.O.; Dunham, W.R.; Day, E.P.; Kent, T.A. and Münck, E, Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus*. Evidence for a [2Fe-2S] cluster having non-cysteine ligands, *Journal of Biological Chemistry* 259 (1984) 124-133.

Feltens R., Gossmann M., Willkomm D.K., Urlaub H. and Hartmann R.K., An unusual mechanism of bacterial gene expression revealed for the RNase P protein in *Thermus* strains, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 5724-5729.

Ferreira A.C., Nobre M.F, Rainey F.A., Silva M.T., Wait R., Burghardt J, Chung A.P. and da Costa M.S., *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs, *Int. J. Syst. Bacteriol.* Oct;47/4 1997 939-947.

Friedrich A., Prust C., Hartsch T., Henne A. and Averhoff B., Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27, Appl. Environ. Microbiol. Feb;68/2 2002 745-755.

Gatti D.L., Tarr G., Fee J.A. and Ackerman S.H., Cloning and sequence analysis of the structural gene for the *bc*₁-type Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus* HB8. J. Bioenerg. Biomembr., 30 (1998) 223-233.

Gerscher S., Hildebrandt P., Soulimane T. and Buse G., Resonance Raman spectroscopic study of the *caa*₃ oxidase from *Thermus thermophilus*, Biospectroscopy 4 (1998) 365-377.

Hanahan D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol. 166 (1983) 557-580

Hellwig P., Soulimane T. and Mäntele W., Electrochemical, FT-IR and UV/VIS spectroscopic properties of the *caa*₃ oxidase from *T. thermophilus*, Eur. J. Biochem., 269, (2002) 4830-4838.

Heijbel A., Purification of a protein tagged with (His)₆ at its N-terminus, C-terminus, and both N- and C-termini using different metal ions, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden (2003).

Heijne von G., Recent advances in the understanding of membrane protein assembly and structure, Q. Rev. Biophys. 32 (1999) 285-307.

Holland V.R., Saunders B.C., Rose F.L. and Walpole A.L., A safer substitute for benzidine in the detection of blood, Tetrahedron 30 (1974) 3299-3302.

Hon-Nami K. and Oshima T., Purification and some properties of cytochrome *c*-552 from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8, J. Biochem. (Tokyo) 82 (1977) 769-776.

Hunsicker-Wang L.M., Heine A., Chen Y., Luna E.P., Todaro T., Zhang Y.M., Williams P.A., McRee D.E., Hirst J., Stout C.D. and Fee J.A., High-resolution structure of the

soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison, *Biochemistry* 42 (2003) 7303-7317.

Kannt A., Soulimane T., Buse G., Bamberg, E. and Michel H., Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba₃*-type cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*, *FEBS Lett.* 434 (1998) 17-22.

Kiefer H., *In vitro* folding of α -helical membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 57-62.

Knoll A.H., The early evolution of eukaryotes: a geological perspective, *Science*, May 1;256/5057 (1992) 622-627.

Kovach M.E., Elzer P.H., Hill D.S., Robertson G.T., Farris M.A., Roop R.M. and Peterson K.M., Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, *Gene* Dec 1;166/1 (1995) 175-176.

Koyama Y., Hoshino T., Tomizuka N. and Furukawa K., Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp., *J. Bacteriol.*, Apr 166/1 (1986) 338-340.

Kumar S. und Nussinov R., Close-range electrostatic interactions in proteins, *Chembiochem.* Jul 2;3/7 (2002) 604-617.

Kutoh E. and Sone N., Quinol-cytochrome c Oxidoreductase from the Thermophilic Bacterium PS3, *The Journal of Biological Chemistry*, 263 (1988) 9020-9026.

Laemmli U.K., Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.

Lao P.J. and Forsdyke D.R, Thermophilic bacteria strictly obey Szybalski's transcription direction rule and politely purine-load RNAs with both adenine and guanine. *Genome Res.* Feb;10/2 2000228-2000236.

Lehmann I.R., DNA ligase: structure, mechanism, and function *Science* 186 (1974) 790.

Link T.A., The structures of Rieske and Rieske-type proteins, *Adv. Inorg. Chem.* 47 (1999) 213-287.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V. and Daily M.J., Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Mar;65/1 2001 44-79.

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

Martinez S.E., Huang D., Szczepaniak A., Cramer W. A. and Smith J.L., Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation, *Structure* 2 (1994) 95-105.

Membrane Protein Purification and Crystallization, Hunte C., von Jagow G. and Schägger H., second Edition (2003) Academic Press, Elsevier Science USA.

Miroux B. and Walker J.E., Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J. Mol. Biol.* 260 (1996) 289-298.

Mitchell, P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, 191 (1961) 144-148.

Moore G.R., Pettigrew G.W., Axial Ligation of Cytochrome *f* and Cytochrome c_1 , in: *Cytochromes c, Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*, Springer-Verlag, Berlin (1990) 66-71.

Mooser D., Maneg O., Corvey C., Steiner T., Malatesta F., Karas M., Soulimane T. and Ludwig B., A four-subunit cytochrome bc_1 complex complements the respiratory chain of *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1708 (2005) 262-274.

NCBI: *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, unfinished sequence, whole genome shotgun sequencing project. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genome-&cmd=search&term=deinococcus+geothermalis

Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M. and Antranikian G., Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 711-729.

Omelchenko M.V., Wolf Y.I., Gaidamakova E.K., Matosova V.Y, Vasilenko A., Zhai M., Daly M.J., Koonin E.V. and Makarova K.S., Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance, *BMC Evolutionary Biology* 5 (2005) 57-78.

Opekarova M. and Tanner W., Specific lipid requirements of membrane proteins – a putative bottleneck in heterologous expression, *Biochim. et Biophys. Acta* 1610 (2003) 11-22.

Oshima T. and Imahori K., Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb-nov, a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24 (1974) 289-297.

Oshima T. and Imahori K., *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17 (1971) 513-517.

Pace N.R., A molecular view of microbial diversity and the biosphere, *Science* May 2;276/5313 (1997) 734-740.

Pantazaki A.A., Pritsa A.A. and Kyriakidis D.A., Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 1-12.

Pereira M.M., Carita J.N. and Teixeira M., Membrane-Bound Elektron Transfer Chain of the Thermohalophilic Bacterium *Rhodothermus marinus*: A Novel Multihemic Cytochrome *bc*, a New Complex III, *Biochemistry* 38 (1999) 1268-1275.

Perutz M.F. and Raidt H., Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2, *Nature* May 15;255/5505 (1975) 256-9.

Rais J., Karas M. and Schägger H., Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification, *Proteomics Sep*;4/9 (2004) 2567-2571.

Robinson-Rechavi M., Alibes A. and Godzik A., Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*, *J. Mol. Biol.* Feb 17;356/2 (2006) 547-557.

Rothery R.A. and Weiner J.H., Interaction of a menaquinol binding site with the [3Fe-4S] cluster of *Escherichia coli* fumarate reductase. *Eur. J. Biochem.* 15;254(3): (1998) 588-595.

Russell, R.J.M., Ferguson, J.M.C, Hough, D.W., Danson, M.J. & Taylor, G.L., The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution, *Biochemistry USA* 36, (1997) 9983-9994.

Sambrook J., *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition pp. 5.40-5.43) Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74 (1977) 5463-5467.

Schäfer G., Purschke w.g., Gleissner M. and Schmidt C.L., Respiratory chain of archaea and extremophiles, *Biochim. et Biophys. Acta* 1275 (1996) 16-20.

Schägger H. and von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368-379.

Schütz M., Brugna M., Lebrun E., Baymann F., Huber R., Stetter K. O., Hauska G., Toci R., Lemesle-Meunier D., Tron P., Schmidt C., Nitschke W., Early evolution of cytochrome *bc* complexes, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 663-675.

Schütz M., Schoepp-Cothenet B., Lojou E., Woodsta M., Lexa D., Tron P., Dolla A., Stetter M.C., Baymann F., The naphthoquinol oxidizing cytochrome *bc*₁ complex of the

hyperthermophilic knallgasbacterium *Aquifex aeolicus*: properties and phylogenetic relationships, *Biochemistry* (36) 16;42 (2003) 10800-108008.

Singer, G.A. and Hickey D.A., Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content, *Gene* Oct 23;317/1-2 (2003) 39-47.

Sørensen H.P. and Mortensen K.K., Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. of Biotechnology* 115 (2005) 113-128.

Soriano G.M., Ponomarev M.V., Carrell C.J., Xia D., Smith J.L. and Cramer W.A., Comparison of cytochrome *bc₁* complex with the anticipated structure of the cytochrome *b₆f* complex: de plus ça change de plus c'est la même chose, *J. Bioenerg. Biomembr.* 31 (1999) 201-213.

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

Soulimane T., von Walter M., Hof P., Than M.E.; Huber R. and Buse G., Cytochrome-*c₅₅₂* from *Thermus thermophilus*: a functional and crystallographic investigation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Aug 28;237(3) (1997) 572-6.

Steuber J., The Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: implications for the mechanism of redox-driven cation translocation by complex I, *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 179-186.

Tehei M., Franzetti B., Madern D., Ginzburg M., Ginzburg B.Z., Giudici-Orticoni M.T., Bruschi M. and Zaccai G., Adaptation to extreme environments: Macromolecular thermal dynamics in psychrophile, mesophile and thermophile bacteria compared, in-vivo, by neutron scattering, *EMBO Rep.* 5 (2004) 66-70.

Than M.E., Hof P., Huber R., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Buse G., Soulimane T., *Thermus thermophilus* cytochrome-*c₅₅₂*: A new highly thermostable cytochrome-*c* structure obtained by MAD phasing, *J. Mol. Biol.* 271 (1997) 629-644.

The Prokaryotes: Barlow, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. and Schleifer, K.H., Springer-Verlag, 2. Edition, Vol. IV.

Thomas P.E., Ryan D. and Levin W., An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 75 (1976) 168-176.

Thöny-Meyer, L., Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 337-376.

Torres J., Stevens T. J. and Samsó M., Membrane proteins: the 'Wild West' of structural biology, *Trends Biochem. Sci.* Mar;28/3 (2003) 137-144.

Travaglini-Allocatelli C., Gianni S. and Brunori M., A common folding mechanism in the cytochrome c family, *TRENDS in Biochemical Sciences* 29 (2004) 535-541.

Wagner S., Lerch M., Bader M.L., Drew D. and de Gier J.W., Rationalizing membrane protein overexpression, *TRENDS in Biotechnology* 24 (2006) 8.

White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey E.K., Peterson J.D., Dodson R.J., Haft D.H., Gwinn M.L., Nelson W.C., Richardson D.L., Moffat K.S., Qin H., Jiang L., Pamphile W., Crosby M., Shen M., Vamathevan J.J., Lam P., McDonald L., Utterback T., Zalewski C., Makarova K.S., Aravind L., Daly M.J., Minton K.W., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Nelson K.E., Salzberg S., Smith H.O., Venter J.C., Fraser C.M., Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1, *Science* 286 (1999) 1571-1577.

Williams, R.A.D. (1989) in: *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*, 82-97, Elsevier London.

Xiong J., Inoue K. and Bauer C.E., Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Helicobacillus mobilis*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95 (1998) 14851-14856.

Yagi, T., Hon-Nami, K. and Ohnishi, T., Purification and characterization of two types of NADH-quinone reductase from *Thermus thermophilus* HB-8, *Biochemistry* Mar 22;27/6 (1988) 2008-13.

Yang T., Sinai P. and Nelson P., Superior 6xHis-Protein Purification with TALON™ Metal Affinity Resin, Cell Biology and Nucleic Acid Chemistry Groups CLONTECH Laboratories, Inc. (1997).

Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J., Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33 (1985) 103-119.

Yip K.S. Bitton K.L., Stillmann T.J., Lebbink J., de Vos W.M., Robb F.T., Vetriani C., Maeder D. and Rice D.W., Insights into the molecular basis of thermal stability from the analysis of ion-pair networks in the glutamate dehydrogenase family, *Eur. J. Biochem.* Jul 15;255/2 (1998) 336-346.

Zimmermann B.H., Nitsche C.I., Fee J.A., Rusnak F. and Munck E., Properties of a copper-containing cytochrome *ba₃*: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85 (1988) 5779-5783.

Zu Y., Fee J.A. and Hirst J., Complete thermodynamic characterization of reduction and protonation of the *bc₍₁₎*-type Rieske [2Fe-2S] center of *Thermus thermophilus*, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 9906-9907.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin-Resistenz(gen)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Asc	Ascorbat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-inodylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cm	Chloramphenicol-Resistenz(gen)
Cyt	Cytochrom
DEC	n-Decyl- β -D-Maltopyranosid
DM	Dodecyl- β -D-Maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMN	Flavin-Mononukleotid
h	Stunde
His ₆ -Tag	Abfolge von 6 Histidinen
HTK	Hitzestabile Kanamycinresistenz
IPTG	β -D-Isopropylthiogalaktosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NADH	Nikotinamid-Adenosin-Dinukleotid
NaP _i	Natriumphosphatpuffer

NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NCS	Newborn-calf-serum
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte (Absorption)
ORF	open reading frame
ox	oxidiert
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNK	T4-Polynucleotidkinase
QCR	Ubichinol:Cytochrom c Reduktase
RBS	Ribosomenbindungsstelle
red	reduziert
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEG	Tris-EDTA-Glucose
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco etch virus
t_{\max}	maximale Wachstumstemperatur
TMBZ	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
TNM	Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid
U	Unit
Ü/N	über Nacht
UE	Untereinheit
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

7 Lebenslauf

Zur Person

Daniela Maneg, geb. Mooser
Diplom-Biochemikerin
geboren am 06.09.1972 in Frankfurt am Main
verheiratet, 1 Kind (10 Jahre)

Schulbildung

1979 - 1983	Michael-Grzimek-Schule, Grundschule
1983 - 1992	Ziehenschule, Gymnasium
Abschluß	Abitur (Biologie/Französisch)

Berufsausbildung

1992 - 1994	Ausbildung zur medizinisch-technischen Assistentin Fachrichtung Labor MTA-Schule Frankfurt am Main-Höchst
-------------	---

Berufliche Tätigkeiten

1995	Bakteriologisches Labor Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main
1996	Molekularbiologisches Labor Universitäts-Kinderklinik, Giessen Projekt zur „Auffindung neuer genetischer Risikofaktoren, die die Heilungsaussichten von an Leukämie erkrankten Kindern beeinflussen.“
1997	Erziehungszeit
1998 - 2002	Klinisch-chemisches Analyselabor A.H.L. Arbeitsgemeinschaft Hessischer Laborärzte bis 09/1998 in Teilzeit, dann auf Stundenbasis

Studium

1998 - 2002	Studium der Biochemie an der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
10/2002	Diplomprüfungen in Biochemie, Biophysikalischer Chemie und Zellbiologie
11/2002 - 05/2003	Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik, Prof. B. Ludwig J.W. Goethe-Universität
Abschluß	Diplom-Biochemikerin Abschlußnote: „sehr gut“
07/2003- 05/2007	Promotion am Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Genetik, Prof. B. Ludwig J.W. Goethe-Universität
	"Identifizierung und Charakterisierung eines Menachinol-oxidierenden Cytochrom <i>bc</i> -Komplexes aus <i>Thermus thermophilus</i> "
06/2004- 05/2007	Promotionsstipendium des Hessischen Ministeriums für Wissenschaft und Kunst

Sprachkenntnisse

Französisch, 1. Fremdsprache, 5 Jahre bilingualer Unterricht
Englisch, 3 Monate Auslandsaufenthalt in den USA

Bad Homburg vdH., den 25.05.2007

8 Publikationen

Mooser D., Maneg O., Corvey C., Steiner T., Malatesta F., Karas M., Soulimane T. and Ludwig B., A four-subunit cytochrome *bc*(1) complex complements the respiratory chain of *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1708/2 (2005) 262-274.

Mooser D., Maneg O., MacMillan F., Malatesta F., Soulimane T. and Ludwig B., The menaquinol-oxidizing cytochrome *bc* complex from *Thermus thermophilus*: protein domains and subunits, *Biochim. Biophys. Acta*. 1757/9-10 (2006) 1084-1095.

Maneg D.*, Anderka O.*, Ludwig B., Hellwig P., Mid and low infrared spectroscopic studies on protonation dependent events in Rieske iron sulfur proteins from *T. thermophilus* and *P. denitrificans*, in Vorbereitung. (*gleichwertiger Anteil beider Autoren)

9 Danksagung

Meine Dissertation wurde vielfältig bereichert und unterstützt. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle im Besonderen bedanken bei:

Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Bereitstellung des Themas, die großzügige Freiheit beim Forschen und Experimentieren, sowie die bereitwillige Hilfestellung und Anregung bei schwierigen Fragestellungen.

Dr. Oliver Richter für sein unerschöpfliches Fachwissen, ausführliche Diskussionen, experimentelle Anregungen, das kritische Lesen dieser Arbeit, seinen besonderen Humor und die Jagd nach etlichen Elefanten.

Werner Müller für die jahrelange Laborgemeinschaft, die vielfältige technische und fachliche Unterstützung meiner Arbeit, Zuspruch und aufbauende Worte wenn Experimente nicht geklappt haben, seine gewinnende Freude wenn dann mal was geklappt hat und vieles mehr.

Meinen lieben Kollegen Oliver Anderka, Alena Bundschuh, Peter Greiner, Christian Groß, Klaus Hoffmeier, Julia Janzon, Thomas Kleinschroth, Khalid Siddiqui und Carolin Werner für das tägliche Horoskop und die wahren Fachgespräche.

Bei Tewfik Soulimane bedanke ich mich für Anregungen und das zur Verfügung gestellte Probenmaterial rund um *Thermus thermophilus*.

Dr. Petra Hellwig danke ich für ihr Interesse am *Thermus* Rieske-Protein, den damit durchgeführten Messungen, sowie für die Bestimmung der Redoxpotentiale.

Carsten Corvey und Tobias Beckhaus danke ich für die erfolgreichen MALDI-Messungen.

Hamid Nasiri für die Synthese und Bereitstellung einer vielfältigen Auswahl an Naphthochinon-Derivate.

Gregor Madej für seinen Einsatz und immer neue Ideen zur Messung einer Aktivität.

Stephanie Dinkelaker und Steffen Grimm danke ich für die gemeinsame Studienzeit, die darüber hinaus andauernde Freundschaft und unsere erfolgreiche fachliche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die nicht nur alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre mit Geduld und Verständnis ertragen, sondern mich darüber hinaus auf vielfältige Weise unterstützt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniela Maneg, geborene Mooser am 06.09.1972 in Frankfurt am Main, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel "Identifizierung eines Menachinol-oxidierenden Cytochrom *bc*-Komplexes aus *Thermus thermophilus*" selbständig angefertigt und keine anderen Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegeben benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bad Homburg v.d.H., den 25.05.2007