

GOETHE



UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

**Untersuchung zur Struktur-Funktionsbeziehung
des Cytochrom bc_1 Komplexes
aus *Paracoccus denitrificans***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14

Biochemie, Chemie und Pharmazie

von Thomas Kleinschroth

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2008

(D30)

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Oxidative Phosphorylierung | 1 |
| 1.1.1 | Funktion und Aufbau der Atmungskette | 2 |
| 1.1.2 | Der Modellorganismus <i>Paracoccus denitrificans</i> | 4 |
| 1.2 | Der Cytochrom <i>bc</i>₁ Komplex | 6 |
| 1.2.1 | Untereinheiten des Cytochrom <i>bc</i>₁ Komplexes | 7 |
| 1.2.1.1 | Cytochrom <i>b</i> | 8 |
| 1.2.1.2 | Cytochrom <i>c</i> ₁ | 9 |
| 1.2.1.3 | Rieske Eisen-Schwefel-Protein (ISP)..... | 9 |
| 1.2.1.4 | Akzessorische Untereinheiten..... | 11 |
| 1.2.2 | Der Cytochrom <i>bc</i>₁ Komplex aus <i>P. denitrificans</i> | 12 |
| 1.2.2.1 | Genetische Organisation..... | 12 |
| 1.2.2.2 | Protein-Untereinheiten | 12 |
| 1.2.3 | Struktur des Cytochrom <i>bc</i>₁ Komplexes | 13 |
| 1.2.4 | Mechanismus des Cytochrom <i>bc</i>₁ Komplexes | 18 |
| 1.2.4.1 | Kopplung von Elektronentransfer und Protonengradient: Der modifizierte Q-Zyklus | 19 |
| 1.2.4.2 | Hydrochinon-Oxidation am Q _P -Zentrum..... | 21 |
| 1.2.4.3 | <i>Half-of-the-sites</i> -Reaktion und Asymmetrie..... | 24 |
| 1.3 | Kristallisation von Membranproteinen | 24 |
| 1.3.1 | Antikörper-vermittelte Kristallisation | 27 |
| 1.4 | Zielsetzung dieser Arbeit | 29 |
| 2 | Material und Methoden | 31 |
| 2.1 | Materialien | 31 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 2.1.1 | Chemikalien | 31 |
| 2.1.2 | Proteine | 32 |
| 2.1.2.1 | Enzyme für die Molekularbiologie | 33 |
| 2.1.2.2 | Antikörper..... | 33 |
| 2.1.2.3 | Verschiedene | 33 |
| 2.1.3 | Verwendete kits | 34 |
| 2.1.4 | Größenstandards | 35 |
| 2.1.5 | Chromatographiematerialien | 35 |
| 2.1.6 | Geräte | 36 |
| 2.1.7 | EDV | 37 |
| 2.1.7.1 | Programme | 37 |
| 2.1.7.2 | Datenbanken..... | 37 |
| 2.1.8 | Plasmide | 38 |
| 2.1.8.1 | vorhandene Plasmide | 38 |
| 2.1.8.2 | Erstellte Plasmide | 39 |
| 2.1.9 | Mikroorganismen | 41 |
| 2.1.9.1 | <i>Escherichia coli</i> K12-Stämme | 41 |
| 2.1.9.2 | <i>Paracoccus denitrificans</i> -Stämme..... | 41 |
| 2.1.10 | Oligonukleotide | 42 |
| 2.1.10.1 | Spezifische Oligonukleotide | 43 |
| 2.1.10.2 | Standardoligonukleotide..... | 44 |
| 2.1.11 | Lösungen | 44 |
| 2.1.12 | Antibiotika | 49 |
| 2.1.13 | Medien | 50 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 50 |
| 2.2.1 | Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen | 50 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|-----------|
| 2.2.1.1 | <i>Escherichia coli</i> | 50 |
| 2.2.1.2 | <i>Paracoccus denitrificans</i> | 51 |
| 2.2.2 | Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab („Minipräp“) | 51 |
| 2.2.3 | Restriktion von Plasmid DNA | 53 |
| 2.2.4 | Elektrophoretische Auftrennung von DNA | 53 |
| 2.2.5 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 54 |
| 2.2.6 | Ligation von DNA Fragmenten | 54 |
| 2.2.7 | Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen | 54 |
| 2.2.8 | Hitzeschocktransformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen | 55 |
| 2.2.9 | Konjugation: <i>Triparental Mating</i> | 55 |
| 2.2.10 | Phosphorylierung von Oligonukleotiden | 56 |
| 2.2.11 | <i>Polymerase Chain Reaction</i> | 56 |
| 2.2.12 | Gerichtete Mutagenese | 57 |
| 2.2.13 | DNA Sequenzierungen | 58 |
| 2.3 | Proteinbiochemische Arbeiten | 58 |
| 2.3.1 | Analytische Membranpräparation | 58 |
| 2.3.2 | Membranpräparation im großen Maßstab | 59 |
| 2.3.3 | Periplasmapräparation zur Isolierung des Fv-Fragments | 60 |
| 2.3.4 | Solubilisierung von Membranen | 60 |
| 2.3.4.1 | Klassischen Isolierung des <i>bc</i> ₁ -Komplexes..... | 60 |
| 2.3.4.2 | Isolierung mittels Ni ²⁺ -NTA-Material des <i>bc</i> ₁ -Komplexes | 60 |
| 2.3.4.3 | Isolierung mittels Streptactin-Material | 61 |
| 2.3.5 | Säulenchromatographie | 61 |
| 2.3.5.1 | Klassische Isolierung des <i>bc</i> ₁ -Komplexes..... | 61 |
| 2.3.5.2 | Klassische Isolierung des <i>bc</i> ₁ -Komplexes im Kleinstmaßstab | 61 |
| 2.3.5.3 | Isolierung des <i>bc</i> ₁ -Komplexes mittels Ni ²⁺ -NTA-Material | 62 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 2.3.5.4 | Isolierung des bc_1 -Komplexes mittels Core-Streptavidin | 62 |
| 2.3.5.5 | Isolierung des Fv-Fragments mittels Core-Streptavidin | 63 |
| 2.3.6 | Gelfiltration | 63 |
| 2.3.6.1 | Standard-Gelfiltration | 63 |
| 2.3.6.2 | Gelfiltration für die FTIR-Spektroskopie | 63 |
| 2.3.6.3 | Gelfiltration für die Kristallisation | 63 |
| 2.3.7 | Proteinbestimmung nach Lowry | 64 |
| 2.3.8 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) | 64 |
| 2.3.8.1 | Tricinsystem nach Schagger | 64 |
| 2.3.8.2 | Blau-Nativ-PAGE | 65 |
| 2.3.9 | Färbungen für Gele | 65 |
| 2.3.9.1 | Coomassie-Blaufärbung | 65 |
| 2.3.9.2 | Silberfärbung | 65 |
| 2.3.10 | Westernblot (Nassblot) | 66 |
| 2.3.10.1 | Behandlung und Färbung mit polyklonalem Erstantikörper | 66 |
| 2.3.10.2 | Behandlung und Färbung mit monoklonalem Erstantikörper | 67 |
| 2.3.10.3 | Behandlung und Färbung mit Streptavidin / AAP-Konjugat | 67 |
| 2.4 | Biophysikalische Methoden | 67 |
| 2.4.1 | Enzymaktivitätstests | 67 |
| 2.4.1.1 | Reduktion des Decylubichinons | 68 |
| 2.4.1.2 | Messungen | 68 |
| 2.4.1.3 | Redoxspektren | 69 |
| 2.5 | Proteinkristallisation | 69 |
| 2.5.1 | Silanisierung von Deckgläsern | 70 |
| 2.5.2 | Herstellung von Kristallisationslösungen | 70 |
| 2.5.3 | Kristallisationsansätze | 70 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------|---|------------|
| 3 | Ergebnisse | 71 |
| 3.1 | Kristallisation | 71 |
| 3.1.1 | Chimärer Cytochrom bc_1 Komplex mit modellierter Antikörper-Bindungsstelle..... | 71 |
| 3.1.1.1 | Konstruktion eines Codon-optimierten ISP-Gens..... | 72 |
| 3.1.1.2 | Biochemische Charakterisierung des Codon-optimierten chimären Komplexes | 74 |
| 3.1.1.3 | Aufreinigung des Cytochrom bc_1 Komplexes | 76 |
| 3.1.1.4 | Aufreinigung des Fv-Fragments | 77 |
| 3.1.1.5 | Gelfiltrationsuntersuchungen | 80 |
| 3.1.1.6 | Experimente zur Komplexstabilisierung und Änderung des Oligomerenzustands | 84 |
| 3.1.1.7 | Kristallisationsexperimente | 93 |
| 3.1.2 | Cytochrom bc_1 Komplex mit deletierter saurer Domäne des Cytochroms c_1..... | 94 |
| 3.1.2.1 | Aufreinigung des Δac Cytochrom bc_1 Komplexes | 95 |
| 3.1.2.2 | Gelfiltrationsuntersuchung | 97 |
| 3.1.2.3 | Kristallisationsexperimente | 98 |
| 3.1.2.4 | Untersuchung der Kristalle | 99 |
| 3.2 | Hetero-dimerer Cytochrom bc_1 Komplex..... | 100 |
| 3.2.1 | Klonierung von Cytochrom bc_1 Komplexen mit Affinitäts-tags..... | 102 |
| 3.2.2 | Mutagenese und Klonierung der inaktivierenden Mutanten | 106 |
| 3.2.3 | Biochemische Charakterisierung der Mutanten und der Cytochrom bc_1 Komplexe mit <i>affinity-tags</i>..... | 107 |
| 3.2.4 | Konstruktion eines stabilen <i>P. denitrificans</i>-Stamms mit zwei <i>fbc</i>-Operons | 113 |
| 3.2.5 | Biochemische Charakterisierung des mit zwei <i>Affinitäts-tags</i> versehenen Komplexes | 115 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.2.6 | Tandemaufreinigung des Cytochrom bc_1 Komplexes mit His- und Strep-tag II | 117 |
| 3.3 | Mutanten des Q_p -Zentrums | 123 |
| 3.3.1 | Klonierung und Mutagenese der Mutanten | 128 |
| 3.3.2 | Aufreinigung der Mutanten | 128 |
| 3.3.3 | Biochemische Charakterisierung der Mutanten | 128 |
| 3.3.4 | Elektrochemisch-gekoppelte FTIR-Untersuchungen | 132 |
| 3.4 | Assoziationsgrad des Cytochrom bc_1 Komplexes | 134 |
| 3.4.1 | Aufreinigung des Cytochrom bc_1 Komplexes | 135 |
| 3.4.2 | Blau-Nativ Polyacrylamidelektrophorese (BN-PAGE) | 135 |
| 3.4.3 | Gelfiltrationsuntersuchungen | 136 |
| 3.4.4 | LILBID-Messungen | 140 |
| 4 | Diskussion | 147 |
| 4.1 | Assoziationszustand des Cytochrom bc_1 Komplexes | 148 |
| 4.1.1 | BN-PAGE Untersuchungen | 149 |
| 4.1.2 | Gelfiltrationsuntersuchungen | 150 |
| 4.1.3 | LILBID-Untersuchungen | 151 |
| 4.1.4 | Zusammenfassung der Untersuchungen | 153 |
| 4.2 | Ansätze zur Strukturaufklärung | 153 |
| 4.2.1 | Chimärer Cytochrom bc_1 Komplex | 154 |
| 4.2.2 | Cytochrom bc_1 Komplex mit deletierter saurer Domäne | 155 |
| 4.2.3 | Struktur-Modellierung | 156 |
| 4.3 | Gemischtes Dimer des Cytochrom bc_1 Komplexes | 160 |
| 4.4 | Q_p -Zentrum Mutanten | 161 |
| 5 | Zusammenfassung | 165 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 167 |
| 7 | Publikationen | 185 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|------------|
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 187 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 191 |
| | Lebenslauf | 193 |
| | Danksagung | 195 |

1 Einleitung

Das Leben ist ein der Entropie entgegengesetzter, energieabhängiger Prozess. Der Zustand hoher Ordnung und Kompartimentierung, der in lebenden Zellen und Organismen herrscht, sowie ihre Vermehrung und die ständig ablaufenden anabolen Prozesse stehen ausserhalb des thermodynamischen Gleichgewichts. Er kann nur unter ständiger Energieumwandlung erhalten werden.

Diese Energie kann wie zunächst von den ersten Organismen chemolithotroph gewonnen werden, eine bis heute gerade unter anaeroben Bedingungen immer noch weit genutzte Möglichkeit. Jedoch erweist sich die phototroph-oxygene Energieumwandlung, wie sie von heutigen Pflanzen, Algen und einigen Bakterien betrieben wird, als der effizientere Weg. Dieser Prozess ist der biogeochemisch bedeutendste bis heute vorkommende Energieumwandlungsprozess der Erde. Der gesamte Sauerstoff der Erdatmosphäre wurde und wird durch ihn freigesetzt. Der entstehende Sauerstoff ist zunächst ein sehr toxisches Abfallprodukt, er konnte im Laufe der Evolution von Organismen aber nutzbar gemacht werden, um energiereiche Moleküle organochemotroph umzusetzen (1). Durch die Entwicklung dieser Möglichkeit der effizienten Energieumwandlung und Nutzbarmachung eines Elektronenakzeptors wurde ein weiterer Bereich des Lebens erschlossen.

1.1 Oxidative Phosphorylierung

Die Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) ist einer der bedeutendsten biochemischen Prozesse der aeroben Energiegewinnung in lebenden Organismen. Durch sie wird die aus der Oxidation von Wasserstoff zu Wasser (Knallgasreaktion) freigesetzte Freie Energie in für die Organismen verwertbare und speicherbare chemische Form, das Adenosintriphosphat (ATP), umgewandelt. Hierzu wird die Energie, die aus organischen Molekülen, also Nähr- und Speicherstoffen, stammt, zunächst durch vorgeschaltete, katabole Prozesse (z.B. Glykolyse und Citratzyklus) in den energiereichen, reduzierten Nukleotiden, Flavinadenindinukleotid (FADH_2) oder Nicotinamid-Adenosindinukleotid (NADH), zwischengespeichert. Der weitere Transfer der Elektronen von diesen Molekülen auf molekularen Sauerstoff wird von membranprotein-gebundenen Redoxzentren übernommen und mit der chemiosmotischen Hypothese beschrieben (2). Die Freie Energie kann so stufenweise freigesetzt werden. Dies ermöglicht die Kopplung des

Einleitung

Elektronentransfers an den Aufbau eines energiespeichernden Protonengradienten über eine Membran.

Die Folge von Membranproteinen wird Atmungskette genannt und ist in den Mitochondrien in der inneren Membran und bei Prokaryonten in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Der gerichtete Rückstrom der Protonen in Richtung des Gradienten über die Membran ist exergon und erlaubt die Nutzung der Freien Energie zur Phosphorylierung des Adenosindiphosphats (ADP). Dadurch wird die Phosphorylierung energetisch an den Protonengradienten gekoppelt.

Dieser mechanistisch komplexe Prozess ist bis heute noch nicht hinreichend geklärt. Vor allem die Kopplung des Elektronentransfers an den Aufbau des Protonengradienten kann nur unbefriedigend für alle Komplexe beantwortet werden. Die in den letzten Dekaden erhaltenen Raumstrukturen ermöglichten jedoch neue Einsichten in diese komplexen Membranproteine und lieferten weitere Denkanstöße und Forschungsziele, um den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der einzelnen Atmungskettenkomplexe und ihrer höheren Organisationsgrade aufzuklären.

1.1.1 Funktion und Aufbau der Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung besteht aus vier Komplexen, die funktionell hintereinander geschaltet sind. Das klassische Modell für die oxidative Phosphorylierung ist die mitochondriale Atmungskette (Abbildung 1), jedoch sind seit Jahren auch bakterielle Modellsysteme etabliert. Die Elektronentransportkette besteht aus drei membrangebundenen Proteinkomplexen: der NADH:Ubichinon-oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), der Ubichinol:Cytochrom *c*-Oxidoreduktase (Cytochrom *bc*₁ Komplex, Komplex III) und der Cytochrom *c*-Oxidase (Komplex IV). Sie vermitteln die Elektronenleitung vom NADH auf molekularen Sauerstoff, währenddessen sie einen Protonengradient über die Membran aufbauen. Hierfür sind zwei bewegliche Elektronenüberträger notwendig. Es handelt sich hierbei um das lipidlösliche Ubichinon und das meist wasserlösliche Protein Cytochrom *c*. Im zweiten Teil wird dieser Gradient von der ATP-Synthase (Komplex V) zur Synthese von ATP genutzt. Die Protonen fließen in Richtung des Gradienten durch den Komplex wieder auf die Matrixseite beziehungsweise die cytosolische Seite zurück.

Einleitung

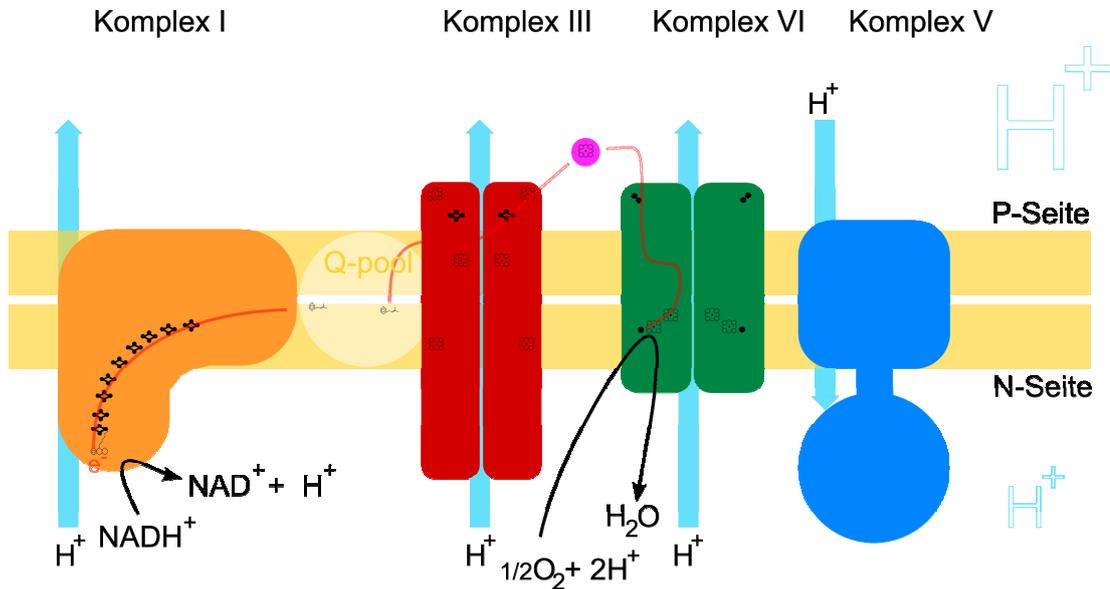


Abbildung 1: Modell der mitochondrialen Atmungskette, Komplex I ist in violett, Komplex III in rot, der mobile Elektronenüberträger Cyt c in magenta, Komplex IV in grün und Komplex V in blau. Der Nettoweg der Elektronen ist durch die rote Linie markiert, die schwarzen Pfeile stellen Reaktionspfeile dar, die hellblauen Pfeile deuten Protonentranslokation über die Membran an. Die angegebenen Protonen dienen nur der Verdeutlichung der Wege und stellen keine Stöchiometrie dar. Komplex II wird hier nicht dargestellt.

Der Eintrittspunkt der Elektronen in die Atmungskette ist im Falle des NADH der Komplex I. Der Komplex überträgt die Elektronen auf das Ubichinon, welches zu Ubihydrochinon reduziert wird. Der Komplex transferiert durch einen bisher noch ungeklärten Mechanismus zwei Protonen pro Elektron über die Membran (3, 4). Die Form des Komplexes ähnelt dem Buchstaben „L“, was in elektronenmikroskopischen und *single particle*-Untersuchungen gezeigt werden konnte (5). Er besteht aus einem in die Membran eingebetteten Teil und einem hydrophilen Arm, der in das wässrige Medium der N-Seite der Membran ragt. Die gesamte Raumstruktur des Komplexes ist bisher noch nicht geklärt, jedoch konnte der hydrophile Teil aus *T. thermophilus* kristallisiert werden (6). Die Cofaktoren des Komplexes sind acht Eisen-Schwefelzentren vom Typ [2Fe-2S] und [4Fe-4S], sowie ein Flavinmononukleotid (FMN) und ein kovalent gebundene Phosphopantethein.

Komplex III oxidiert das Ubihydrochinon mittels eines speziellen Redoxmechanismus, dem sogenannten Q-Zyklus (7) (siehe Abschnitt 1.2.4.). Das

Einleitung

Ubihydrochinon gibt dabei zwei Elektronen ab. Die Elektronen werden auf das Cyt *c* übertragen. Die Raumstruktur des Komplexes konnte mittlerweile aus mehreren Spezies aus den verschiedenen Bereichen des Lebens aufgeklärt werden, es zeigte sich, dass der Komplex als Homodimer vorliegt. Er trägt als Cofaktoren pro Monomer ein [2Fe-2S] Eisenschwefelzentrum, zwei Häm *b* und ein Häm *c*₁. Auf die Struktur und den Mechanismus wird im Folgenden noch näher eingegangen (1.2.4).

Das reduzierte Cyt *c* überträgt das Elektron auf die terminale Cytochrom *c* Oxidase, die über einen noch intensiv diskutierten Mechanismus Protonen von der N- auf die P-Seite der Membran pumpt (1 Proton pro Elektron) (8). Der Eintrittspunkt für das Elektron in das Enzym ist hierbei das in der Untereinheit II gelegene Cu_A-Zentrum. Die in der Untereinheit I gelegenen RedoxCofaktoren, ein Häm *a* und im binukleären Zentrum ein Häm *a*₃ und ein Cu_B, katalysieren die Bildung von Wasser. Die Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen, die hierfür benötigten sogenannten „chemischen“ Protonen werden ebenfalls von der N-Seite der Membran aufgenommen. Die Struktur dieses Komplexes konnte als erste der der Atmungskette gelöst werden (9).

Der Komplex V koppelt den gerichteten Rückstrom von Protonen durch den Komplex und damit die verfügbare werdende Freie Energie, an die Synthese von Adenosintriphosphat.

Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) bietet, neben weiteren Dehydrogenasen und unter Umgehung des Komplex I, einen alternativen Eintrittspunkt in die Atmungskette. Die Succinat-Dehydrogenase oxidiert Succinat zu Fumarat, sie ist damit ein Teil des Citratzyklus und überträgt die Elektronen auf Ubichinon. Sie trägt als Cofaktor ein FAD. Im Gegensatz zu Komplex I überträgt Komplex II keine Protonen über die Membran. Die Struktur des Komplexes konnte ebenfalls geklärt werden (10).

1.1.2 Der Modellorganismus *Paracoccus denitrificans*

Paracoccus denitrificans ist ein unbewegliches sphärisch- oder stäbchenförmiges, gram-negatives Bodenbakterium. Es wurde erstmals 1910 von Beijerinck (11) als *Micrococcus denitrificans* isoliert. *P. denitrificans* ließ sich über seine Fähigkeit, durch anaerobe Atmung Nitrat in molekularen Stickstoff umzusetzen, selektionieren. Lange galt dieses taxonomisch zur Gruppe der α_3 -*Proteobacteria* gehörende

Einleitung

Bakterium als einziger Vertreter der Gattung *Paracoccus*. Es konnte jedoch auf Grund von 16S-rRNA-Sequenzvergleichen gezeigt werden, dass es noch weitere Bakterien dieser Gattung gibt. Mit dieser Methode wurden in den letzten Jahren noch weitere Bakterien, wie z.B. *Thiobacillus versutus* (12), zugeordnet.

Allen *Paracoccus*-Spezies ist der hohe Guanosin/Cytosin-Gehalt der genomischen DNA ((zwischen 60-70%) (12)) gemein. Die Genomsequenz des hier verwendeten *P. denitrificans*-Stammes PD1222 wurde 2006 veröffentlicht, es besteht aus drei separaten DNA-Molekülen, den Chromosomen 1 (Genbankeintrag CP000489) und 2, (Genbankeintrag CP000490) sowie einem Megaplasmid (CP000491). Diese drei haben eine Größe von ca. 2,9, 1,7 und 0,65 Mbp und einen GC-Gehalt von 67 %. Das Gesamtgenom weist 2874 Gene auf, von denen 2799 proteinkodierend sind (13).

Weitere physiologische Merkmale sind das obligat respiratorische Wachstum und die Nutzung der Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase Reaktion zur CO₂-Fixierung während des chemoautotrophen und methylo-trophen Wachstums.

Gemäß der Endosymbiontentheorie sind die in Eukaryonten auftretenden Mitochondrien und Chloroplasten bakteriellen Ursprungs (14). Im Rahmen dieser Theorie wurde zur Entstehung von Mitochondrien ein aerobes Bakterium von einer amöboiden, fermentativ lebenden Zelle aufgenommen. Die Bakterienzelle verlor dabei ihre Autonomie und die endosymbiotisch aufgenommene Zelle spezialisierte sich, im Falle der Mitochondrien hauptsächlich auf die oxidative Phosphorylierung. Auf Grund der Endosymbiontentheorie werden Bakterien aus der Gruppe der α_3 -Proteobakterien wie *P. denitrificans* als möglicher bakterieller Nachkomme eines gemeinsamen Vorfahren der eukaryontischen Mitochondrien gesehen (15).

Die Atmungskette von *P. denitrificans* enthält alle zu den mitochondrialen Komplexen komplementären und darüber hinaus noch alternative Komplexe, um sich verschiedensten Umweltbedingungen anpassen zu können (16). Beispielsweise zu nennen sind die beiden alternativen Oxidasen; die Cytochrom *ba*₃-Oxidase, eine Chinoloxidase zur direkten Oxidation des Ubihydrochinons unter Verbrauch von Sauerstoff, und die *cbb*₃-Oxidase mit einer im Vergleich zur *aa*₃-Oxidase höheren Sauerstoffaffinität, die bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken exprimiert wird (17).

Einleitung

Beispiele für die unterschiedlichen Substrate sind Methanol oder Methylamin als C1-Substrate (18), Wasserstoff oder Thiosulfat für die anorganischen Substrate (15) sowie Succinat als organisches Substrat. Unter anaeroben Bedingungen kann Nitrat an Stelle von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor der Atmungskette verwendet werden (19).

P. denitrificans hat im Vergleich zu Mitochondrien eine deutlich geringere Zahl von Untereinheiten in den Atmungskettenkomplexen (14 in Komplex I, drei in Komplex III (20) und vier in Komplex IV). In Mitochondrien hat der Komplex I ca. 45-, der Komplex III zehn bis elf (21) und der Komplex IV bis zu 13 Untereinheiten. Die katalytischen Untereinheiten sind jedoch homolog. Die akzessorischen Untereinheiten der Mitochondrien fehlen in *P. denitrificans* vollständig.

Des Weiteren sind einfache genetische Zugänglichkeit und Aufbau sowie die mikrobiologisch problemlose Handhabbarkeit eines mesophilen Organismus weitere Gründe für die besondere Eignung als Modellsystem zur Untersuchung der Atmungskettenkomplexe (15).

1.2 Der Cytochrom bc_1 Komplex

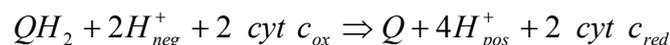
Der Cytochrom bc_1 Komplex (Ubihydrochinon:Cytochrom c -Oxidoreduktase, Komplex III) oder der b_6f Komplex (Plastochinol:Plastocyanin-Oxidoreduktase) bilden den zentralen Teil ihrer jeweiligen Elektronentransportkette. Sie sind in den meisten Elektronentransportketten vorhanden, unabhängig davon wie diese stromauf- und stromabwärts aufgebaut sind (22). Die Komplexe sind über einen weiten Teil der Reiche des Lebens verteilt, so findet sich der Cytochrom bc_1 Komplex bei respiratorischen Eubakterien, grünen Schwefelbakterien, Purpurbakterien (23), als auch bei Eukaryonten (24).

Der Prototyp des aus Mitochondrien stammenden bc_1 Komplexes gehört zu einer Familie von bc Komplexen, die etwa ein Drittel der globalen, biologischen Energieumwandlung bewerkstelligen (25). Darüber hinaus sind bc Komplexe an der Stickstofffixierung und der Denitrifikation in Bakterien beteiligt. Der b_6f Komplex findet sich bei Cyanobakterien (26) und Pflanzen (24, 27). Der hier nicht weiter beschriebene b_6f Komplex ist in photosynthetischen Organismen für den Aufbau des Protonengradienten während des Elektronentransports von Photosystem II zu Photosystem I beteiligt.

Einleitung

Der Cytochrom bc_1 Komplex ist ein transmembraner Enzymkomplex mit mehreren Untereinheiten. In eukaryontischen Zellen ist er in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, bei Prokaryonten in der Cytoplasmamembran. Während seines Reaktionszyklus überträgt er Elektronen vom Ubihydrochinon auf Cytochrom c . Hierbei findet eine Gabelung (*bifurcation*) der beiden Elektronen des Ubihydrochinons statt. Im ersten Reaktionsschritt wird das erste Elektron des Ubihydrochinons auf das Rieske-Protein (28) und von dort auf das Cytochrome c_1 (Cyt c_1), die sogenannte *high potential chain*, und final auf ein mobiles c -Typ Cytochrom übertragen. Das elektronenakzeptierende Cytochrom c (Cyt c) kann löslich (29) oder membrangebunden vorliegen (30, 31).

Das zweite Elektron wird nacheinander auf die beiden in der *low potential chain* liegenden b -Häme, Häm b_L und Häm b_H , übertragen; als Elektronen-Akzeptor dient ein Ubichinon, es entsteht ein Ubichinonanion. Durch die Oxidation eines zweiten Ubihydrochinonmoleküls wird ein weiteres Cyt c über die *high potential chain* reduziert. Das zweite Elektron des zweiten Ubihydrochinons wird über die *low potential chain* auf das Ubichinonanion übertragen. Während des Elektronentransports werden Protonen gegen den elektrochemischen Gradienten über die Membran transloziert. Dies wird durch die freie Enthalpie des Elektronentransports energetisiert.



Formel 1: Nettoformel der durch den Cytochrome bc_1 Komplex katalysierten Reaktion; Ubihydrochinon (QH_2), Ubichinon (Q), oxidiertes/reduziertes Cyt c (Cyt $c_{ox/red}$), negativ/positiv geladene Membranseite

Die Kopplung des Elektronentransports an die Protonentranslokation wird durch den Q-Zyklus beschrieben, der nachstehend im Detail dargestellt wird (Abschnitt 1.2.4.1).

1.2.1 Untereinheiten des Cytochrom bc_1 Komplexes

Die Strukturgene der eukaryontischen Komplexe sind bis auf das Cyt b -Gen alle kernlokalisiert. Das Cyt b ist mitochondrial kodiert (32). Diese räumliche Trennung der Gene mag der Grund für einige der unter 1.2.1.4 aufgeführten Funktionen der

Einleitung

akzessorischen Untereinheiten sein. Diese Situation erschwert die Untersuchungen des Komplexes in Eukaryonten.

1.2.1.1 Cytochrom *b*

Das Cyt *b* ist die größte der redoxaktiven Untereinheiten im Cytochrom *bc₁* Komplex und wird durch acht Transmembranhelices gebildet, wodurch der N- und C-Terminus auf der Matrix- beziehungsweise der cytosolischen Seite liegen. Vier Helices finden sich auf der Intermembranraumseite. Das Bündel aus den Helices A-D enthält die beiden Cofaktoren. Die *b* Häme sind um etwa 45 Grad, bezogen auf die Ringebene, zueinander verdreht angeordnet. Sie sind nicht kovalent gebunden und werden von axialen Histidinliganden auf den Helices B und D komplexiert. Durch die unterschiedliche Proteinumgebung haben die beiden chemisch identischen Häme verschiedene Mittelpunktspotentiale. Das der Intermembranraumseite zugewandte Häm *b_L* (niedriges Mittelpunktspotential) ~-30 mV und das der Matrixseite zugewandte Häm *b_H* (hohes Mittelpunktspotential) ~120 mV, wie in potentiometrischen Titrationsuntersuchungen gezeigt wurde (33). Die beiden Häme sind von der wässrigen Phase aus nicht zugänglich. Der Abstand der beiden Eisenatome in einem Cyt *b* beträgt in der Struktur aus Huhn 20,7 Å (34), der kürzeste Abstand zwischen den beiden Hämgruppen beträgt hier 7,9 Å.

Das Cyt *b* enthält zwei Substratbindungsstellen, das der Matrixseite zugewandte Q_N-Zentrum und das dem Intermembranraum zugewandte Q_P-Zentrum. Die beiden Zentren werden von Aminosäuren der Helices E-H geformt, wobei zum Q_P-Zentrum noch das ISP beiträgt. Die beiden Zentren binden unterschiedliche Inhibitoren, die in zwei Gruppen unterteilt werden (35, 36). Die Klasse I Inhibitoren binden im Q_P-Zentrum, die Klasse II Inhibitoren, zu denen als typischer Vertreter das Antimycin A zählt, binden im Q_N-Zentrum. Die Klasse I Inhibitoren werden in drei weitere Subklassen (Ia, Ib und Ic) unterteilt. Diese Einteilung erfolgt auf Grund der chemischen Charakteristika und der Eigenschaft, durch Bindung die biophysikalischen und spektralen Eigenschaften des Häm *b_L* und des Eisen-Schwefel-Zentrums des ISP zu verändern.

Zu den Klasse Ia Inhibitoren gehören Substanzen, die eine β-Methoxyacrylatgruppe (MOA) oder eine chemisch verwandte Gruppe enthalten. Hierzu gehören die natürlich vorkommenden Inhibitoren Strobilurin und Myxothiazol sowie das synthetische MOA-Stilben. Sie binden proximal zum Häm *b_L* (37) und blockieren

Einleitung

den Elektronentransfer vom Hydrochinon auf das ISP. Durch die Bindung wird das Spektrum des reduzierten Häm b_L in der α - und β -Bande rotverschoben.

Zur Klasse der Ib Inhibitoren gehören Substratanaloga, die ein Chromonringssystem aufweisen, wie das natürlich vorkommende Stigmatellin. Sie induzieren, wie die Klasse Ia Inhibitoren, eine Rotverschiebung des Häm b_L Spektrums. Desweiteren hebt die Bindung dieser Substanzen das Redoxpotential des Eisen-Schwefel-Zentrums. Sie inhibieren den Elektronentransfer vom ISP auf das Cyt c_1 durch die Fixierung des ISP am Cyt b . Dies hat für die Strukturen, wie unter Abschnitt 1.2.3 weiter ausgeführt, große Bedeutung.

Die dritte Subklasse (Ic) blockiert den Elektronentransport ähnlich wie die Klasse Ib, jedoch hat die Bindung keinen Effekt auf das Spektrum, und das Redoxpotential des Eisen-Schwefel-Zentrums wird nur geringfügig angehoben. Zur Gruppe dieser Inhibitoren gehören 2-Hydroxy-ubichinonderivate wie 5-Undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol (UHDBT). Die beiden letzten Gruppen binden in distaler Position zum Häm b_L . Von Esser *et al.* wurde 2004 eine neue Einteilung der Inhibitoren nach Strukturanalysen vorgeschlagen (38).

1.2.1.2 Cytochrom c_1

Das Cyt c_1 ist die zweitgrößte der redoxaktiven Untereinheiten des Komplex III und trägt ein c -Typ Häm als Cofaktor. Es wurde als zweites mitochondriales Protein nach dem Cyt c entdeckt und beschrieben (39). Das Cyt c_1 wird von der hydrophilen, redoxaktiven Domäne im Intermembranraum und einer C-terminalen Transmembranhelix gebildet. Es ist das einzige Protein des Cytochrom bc_1 Komplexes, bei dem der C-Terminus auf der Matrixseite und der N-Terminus im Intermembranraum liegen. Die hydrophile Domäne besteht aus sechs α -Helices und einem doppelsträngigem β -Faltblatt. Die Faltung gleicht dem des Cytochrome c . Die Hämgruppe ist kovalent durch Thioetherbindungen an die c -Typ Cytochrom Konsensussequenz, C-X-Y-C-H, mit dem Protein verbunden. Das zentrale Eisenatom des Häm c_1 wird durch zwei axiale Liganden koordiniert, einem Histidin und einem Methionin.

1.2.1.3 Rieske Eisen-Schwefel-Protein (ISP)

Die kleinste, redoxaktive Untereinheit des Komplexes besteht aus einer N-terminalen Transmembranhelix, daran schließt sich die Gelenk-Region (*hinge*) an,

Einleitung

gefolgt von der C-terminalen, redoxaktiven, hydrophilen Domäne (Ektodomäne). Der C-Terminus liegt im Intermembranraum. Die Gelenkregion lässt eine Bewegung der Ektodomäne zu, auf die später noch eingegangen wird (Abschnitt 1.2.3 und 1.2.4).

In der N-terminalen Region vor der Transmembranhelix weist die Primärstruktur der ISP aus Bakterien zwei Arginine in einer charakteristischen Signalsequenz (S/T-R-R-X-F-L-K) auf, die, wie positiv bestätigt wurde, auf einen Einbau durch das *twin arginine translocation*- (TAT) System hindeutet (40, 41). In Chloroplasten gilt dies gleichermaßen mit einer veränderten Signalsequenz, hier ist das Argininpaar durch ein Lysin-Argininpaar ersetzt (42). Untypischerweise bleibt die TAT-Signalsequenz im reifen Protein erhalten und bildet den Anfang der Transmembranhelix.

Die Ektodomäne konnte durch Proteolyse abgespalten und im Anschluss kristallisiert werden (43-45). Die Struktur des aus Rind isolierten Fragments zeigt die Ektodomäne als längliche Sphäre mit den Dimensionen 45*40*25 Å. Sie ist aus drei β -Faltblättern, die zwei anti-parallele β -Sandwiches ausbilden, einem längeren Loop und einer Helix aufgebaut. Die das Eisen-Schwefel-Zentrum bindende Region sitzt über dem zweiten β -Faltblatt an der Spitze eines eigenen Loops, der als getrennte Domäne (*cluster binding fold*) gesehen wird. Sie wird durch eine Disulfidbrücke stabilisiert und durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken an die Hauptdomäne (*base fold*) fixiert. Alle ISPs enthalten die Konsensussequenz (C-X-H-X-G-C-X₁₂₋₄₄-C-X-C-H). Die konservierten Reste liegen in den Loopregionen des Proteins. Die Strukturen der das Eisen-Schwefel-Zentrum bindenden Domänen der bekannten Rieske-Proteine ähneln sich sehr stark, die Gesamtstruktur jedoch kann sehr unterschiedlich sein (46).

Das [2Fe-2S]-Zentrum des ISP ist durch zwei Histidine und zwei Cysteine ligandiert, anders als bei klassischen Ferredoxinen, die durch vier Cysteinliganden das Zentrum komplexieren, wobei das innere Fe-1 durch die beiden Cysteine und das nach aussen gewandte Fe-2 durch die Histidine gebunden wird. Das [2Fe-2S]-Zentrum ist gegen die wässrige Phase nur durch die Seitengruppen der Histidine abgeschirmt. Die durch Reduktion aufgenommene Ladung ist auf dem Fe-2 lokalisiert, wodurch das [2Fe-2S]-Zentrum paramagnetisch wird. Die Besetzung des Q_P-Zentrums, mit Ubichinon oder Stigmatellin verstärken das EPR-Signal maßgeblich und verschieben es in Richtung eines höheren Magnetfelds (47). Das Redoxpotential von ~300 mV ist verglichen mit den oben genannten Ferredoxinen (~400 mV) ungewöhnlich hoch. Dies lässt sich durch die genannte

Einleitung

Lösungsmittelzugänglichkeit des Fe-2, die geringe Nettoladung, die elektronegativere Histidinligandierung und das ausgeprägte Wasserstoffbrückennetzwerk zum [2Fe-2S]-Zentrum erklären (43, 48, 49). Die Reduzierbarkeit des [2Fe-2S]-Zentrums ist massgeblich bestimmend für die Elektronentransferrate im Hochpotentialzweig des Gesamtkomplexes, wie durch Untersuchung von Mittelpunktspotential-herabsetzende Mutationen gezeigt wurde (50). Die Reduktion des ISP scheint damit entweder der geschwindigkeitsbestimmende Schritt oder der Schritt direkt davor zu sein (48, 51).

Die Erstaufreinigung des ISP aus dem Komplex III aus Rindermitchondrien gelang anhand der Verfolgung des charakteristischen EPR-Signals (28) und wurde ohne funktionelle Zuordnung als der „Oxidationsfaktor“ des Komplexes beschrieben (52).

1.2.1.4 Akzessorische Untereinheiten

Die Funktion der meisten akzessorischen Untereinheiten ist noch nicht hinlänglich bekannt. Sie tragen zu Komplexassemblierung, Transport über die Membran und Membraninsertion, Stabilität und Prozessierung der katalytischen Untereinheiten und Substratbindung bei.

Core I und Core II

Diese zwei größten Untereinheiten des Enzyms wurden nach ihrer Entdeckung fälschlicherweise für den katalytischen Kern des Komplexes gehalten. Sie zeigen in Sequenzalignments Homologien zu den heterodimeren Zinkproteasen, wie der Insulinase oder den *general mitochondrial processing peptidases* (53, 54). Tatsächlich fungieren die mitochondrialen Core-Untereinheiten ein einziges Mal als MMP, bei der Prozessierung des ISP. Die Untereinheiten Core I und Core II von Pflanzen und Vertebraten gleichen stärker den MMPs aus Hefe als den eigentlichen Core-Untereinheiten des bc_1 Komplexes. Die beiden Core-Proteine zeigen eine fast identische Faltung und bilden ein Heterodimer.

Hinge-Protein

Das Hinge-Protein ist ein α -helicales Polypeptid aus 78 AS, das zu mehr als 30 % saure Reste enthält. Es scheint hierbei eine „Landefläche“ für das Cyt c zu bilden: Diese Untereinheit vermittelt die Bindung zwischen Cyt c_1 und Cyt c (55-58); hierauf wird unter Abschnitt 1.2.2.2 eingegangen.

1.2.2 Der Cytochrom *bc*₁ Komplex aus *P. denitrificans*

Der Cytochrom *bc*₁ Komplex besteht aus den drei redoxaktiven Untereinheiten, wie er bereits von Trumpower *et al.* (20, 59) isoliert wurde. Er bildet damit den funktionellen Minimalkomplex.

1.2.2.1 Genetische Organisation

Die Gene für die drei Untereinheiten des *bc*₁-Komplexes von *P. denitrificans* sind im sogenannten *fbc*-Operon angeordnet, das auf dem Chromosom 1 zu finden ist. Sie sind in der Reihenfolge organisiert: *fbcF*, *fbcB* und *fbcC*. Die jeweiligen Genprodukte sind das Rieske-Protein, Cyt *b* und Cyt *c*₁. Die Strukturgene liegen direkt hintereinander und sind lediglich durch 10-12 Nukleotide getrennt. Es wird daraus nur eine polycistronische mRNA gebildet (60). Es konnte noch keine Promotorstruktur bestimmt werden, es gibt jedoch Hinweise auf eine Konsensussequenz in *P. denitrificans* (61), die denen für die σ^{70} -RNA-Polymerase in *E. coli* (16) und Bakterien der α_3 -Gruppe ähnelt.

1.2.2.2 Protein-Untereinheiten

Das Cyt *b* besteht aus 440 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von ~51 kDa und einem apparenten Molekulargewicht von 40 kDa. Es enthält auch in *P. denitrificans* acht Transmembranhelices und die beiden *b*-Häme. Die Sequenzhomologie der Cyt *b* vieler Organismen ist sehr hoch, vor allem jedoch zwischen diesem Organismus und anderen bakteriellen (90 % identische Aminosäurereste mit den Sequenzen aus der *Rhodobacter*-Gruppe) und den mitochondrialen Sequenzen (23, 62, 63). Das Protein weist hauptsächlich auf der cytoplasmatischen Seite drei Einschübe auf, die in den mitochondrialen Komplexen nicht zu finden sind. Auf der Intermembranseite gibt es nur einen Einschub im *ef*-Loop.

Cyt *c*₁ weist die größten Besonderheiten der drei Untereinheiten aus diesem Organismus auf. Es enthält als prozessiertes Protein 426 Aminosäuren und trägt das *c*₁-Typ Häm. Zunächst wird es als Präpeptid mit einer Signalsequenz und einer Gesamtlänge von 450 Aminosäuren synthetisiert. Das reife Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von ~45 kDa, jedoch ein apparentes von 60-68 kDa (60). Hierfür ist wahrscheinlich die saure, N-terminale Domäne (Aminosäure 46-197) verantwortlich. Sie ist einzigartig in *P. denitrificans* vorhanden und besteht zu 40 %

Einleitung

aus Alanin, 14 % Prolin und 38 % sauren Aminosäuren (hauptsächlich Glutamat). In diesem Bereich befindet sich keine basische Aminosäure. Diese Zusammensetzung findet ihre Entsprechung bei den kleinen, sauren, mitochondrialen Untereinheiten des Komplexes, die eng mit der hydrophilen Domäne des Cyt c_1 assoziiert sind ((55, 57, 64-66) Abschnitt 1.3.1, Abbildung 4, unten). Das Äquivalent in *S. cerevisiae*, die saure Untereinheit 6 (QCR6) unterstützt die Bindung von Cyt c (56, 57) wahrscheinlich durch eine Vororientierung (29), ihre Deletion führt zu einer drastisch verringerten Aktivität (67).

Das ISP aus *P. denitrificans* ist ein typischer Vertreter seiner Art mit dem [2Fe-2S]-Zentrum. Es besteht aus 190 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ~20 kDa.

1.2.3 Struktur des Cytochrom bc_1 Komplexes

Erste Versuche zur Strukturaufklärung des Cytochrom bc_1 Komplexes begannen bereits vor dem Vorliegen von beugenden Kristallen. Vor der Klärung der Struktur durch Röntgenkristallographie, trotz erster erzeugter Kristalle eines eukaryontischen Komplexes in den 1980 Jahren (68), wurde versucht durch chemische Modifizierung (69), Proteolyse (31) des Komplexes und molekulargenetische Verfahren (70) versucht einen Eindruck vom Aufbau des Komplexes zu erhalten. Darüber hinaus wurden spektroskopische Methoden zur Bestimmung der Anordnung der Redox-Cofaktoren (71) eingesetzt.

Ende der 1990 Jahre wurden die ersten Kristallstrukturen des Komplex III aus Eukaryonten gelöst. Zunächst konnte nur eine unvollständige Struktur des bovinen Komplexes präsentiert werden (72), jedoch schon kurz darauf die vollständige Struktur (73) sowie die Struktur aus Huhn (34) geklärt werden. Diese Komplexe wurden mit den Inhibitoren Stigmatellin oder Antimycin A kristallisiert. Die darauf folgende Struktur aus *Saccharomyces cerevisiae* hat eine deutlich bessere Auflösung von 2,3 Å, auch hier wurde das Protein mit dem Inhibitor Stigmatellin kristallisiert. Für diese Struktur wurde ein Fv-Fragment gegen die Rieske-Untereinheit zur Cokristallisation verwendet (74). Ein ternärer Komplex mit gebundenem Cyt c konnte kurz darauf aus dem gleichen Organismus strukturell geklärt werden (29). Im Folgenden wurden weitere Strukturen der bisher bekannten Komplexe vor allem mit verschiedenen Inhibitoren, veröffentlicht (38, 75-78). Die Struktur zweier b_6f -Komplexes schlossen sich dann an (79, 80) und schließlich

Einleitung

konnte auch ein prokaryontischer Komplex aus *Rhodobacter capsulatus* allerdings mit sehr niedriger Auflösung dargestellt werden ((81); diese Daten sind aus der *protein data base* leider nicht zugänglich). Schließlich wurde die Struktur des prokaryonten *Rhodobacter spheroides* mit guter Auflösung geklärt, jedoch fehlt die vierte und kleinste Untereinheit in dieser Struktur (82). Für diesen Strukturensatz wurde auch eine Doppelmutante verwendet, die eine Salzbrücke zwischen Cyt *b* und ISP ausbildet (83). Die Struktur mit der höchsten Auflösung ist im Moment die verfeinerte Struktur des ternären Komplexes mit gebundenem Cyt *c* aus *S. cerevisiae* mit einer Auflösung von unter 2 Å (66).

Alle kristallisierten *bc* Komplexe weisen eine Homodimer-Struktur auf, auch die prokaryontischen, was bisher vermutet, jedoch noch kontrovers diskutiert wurde. Desweiteren sind allen *bc*₁ Komplexen die redoxaktiven, Cofaktor-tragenden Untereinheiten, gewissermassen als kleinste gemeinsame Grundstruktur, gemeinsam. Die *R. sphaeroides* Struktur ohne die vierte, für diesen Komplex typische, kleinste Untereinheit zeigt diesen Mindestkomplex (Abbildung 2).

Die Strukturen aller Komplexe zeigen verschränkte ISP-Untereinheiten (Abbildung 2). Das ISP ist mit seinem Membrananker in Monomer A lokalisiert, wohingegen die Ektodomäne mit den Untereinheiten Cyt *c*₁ und Cyt *b* des Monomer B interagiert und an der Bildung des Q_P-Zentrums beteiligt ist.

Desweiteren berühren sich die beiden Helixbündel des Cyt *b* auf der Matrix-beziehungsweise der cytosolischen Seite berühren, in Richtung des Intermembranraums laufen sie auseinander und formen einen Hohlraum, von dem aus das Q_P-Zentrum zugänglich ist. Durch die Kristallisation mit gebundenen Inhibitoren für die beiden Reaktionszentren wurde ihre Lage im Komplex bestimmt.

Der Abstand der prosthetischen Gruppen konnte ermittelt werden, so liegen die Eisenatome des *b*_L- und des *b*_H-Häms ~21 Å auseinander, der Abstand der Porphyrinringe liegt bei etwa 8 Å. Erstaunlicherweise liegen die beiden Eisenatome der *b*_L-Häme der beiden Monomere ebenfalls nur ~21 Å auseinander. Dies lässt einen interdimeren Elektronentransfer zu, der anderweitig eindeutig in mitochondrialen Komplexen nachgewiesen werden konnte (84).

Einleitung

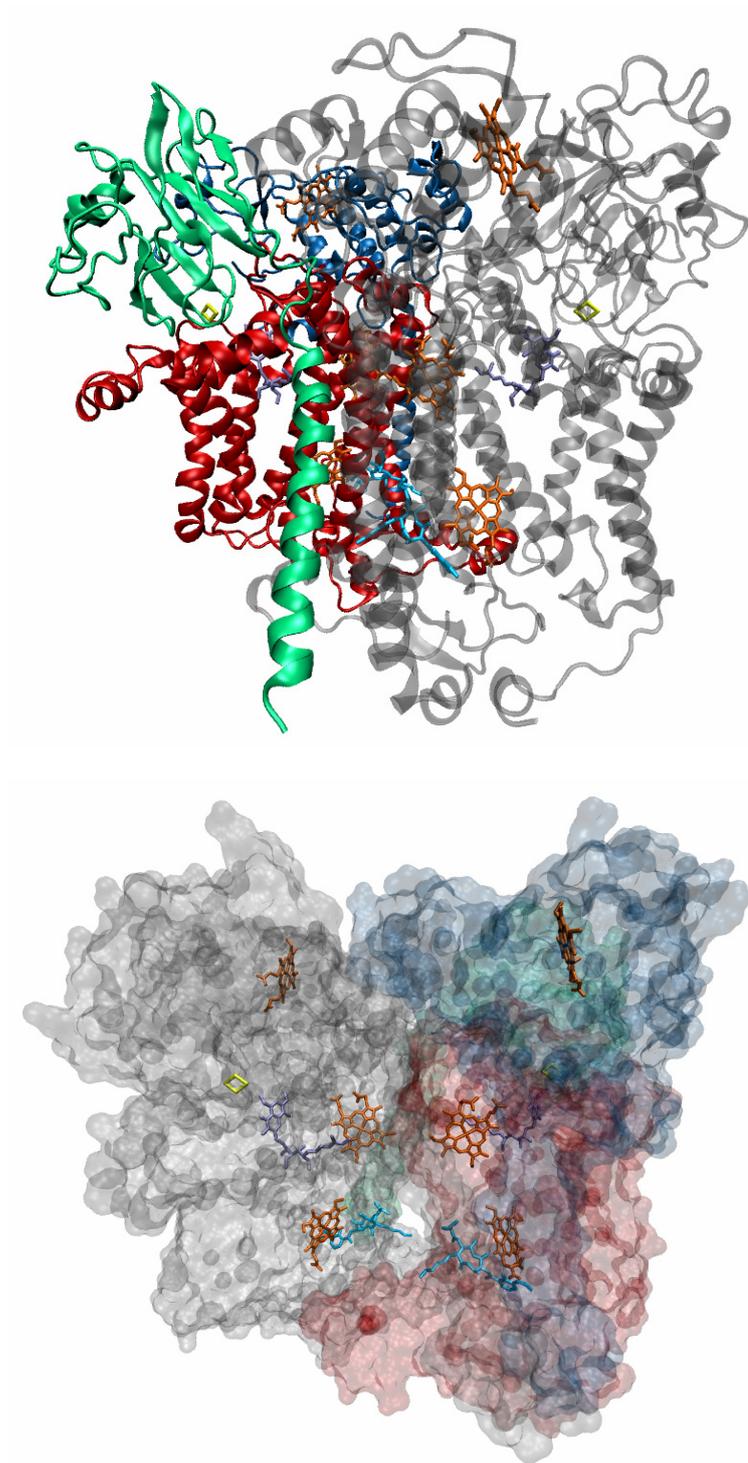


Abbildung 2: Struktur (2QJP) des dimeren Cytochrom bc_1 Komplex aus *R. sphaeroides* mit den gebundenen Inhibitoren Stigmatellin und Antimycin A in zwei unterschiedlichen Darstellungen.

Oben: Dimer mit Cofaktoren;

Unten: Dimer in der Oberflächendarstellung mit Cofaktoren.

Das Cyt *b* ist in rot, das Cyt *c*₁ in blau und das ISP in grün dargestellt.

Einleitung

Die ersten 3-D-Strukturen zeigten, dass die Elektronendichte für die Ektodomäne des ISP fehlte, jedoch für die anderen beiden redoxaktiven Untereinheiten geordnet vorlag. Dies gilt sowohl für die nativen Strukturen als auch für die, in denen Myxothiazol gebunden ist. Auf Grund der ungewöhnlichen Beugung am Eisen-Schwefel-Zentrum des ISP konnte das Zentrum in verschiedenen Positionen lokalisiert werden, auch wenn die Elektronendichte des Proteinanteils nicht sichtbar ist, darunter die beiden Extrempositionen am Cyt *b* (72) und am Cyt *c*₁ (85), die *b*- und *c*₁-Position. In folgenden Strukturen aus Kristallen mit Stigmatellin konnte eine geordnete Elektronendichte am Cyt *b* gezeigt und somit die *b*-Position induziert werden. In der intermediären Position konnten aus der Rinder-Struktur van-der-Waals-Kontakte zu einem in seiner Konformation veränderten *ef*-Loop gezeigt werden (73). Die Ektodomäne des ISP weist ebenfalls eine veränderte Konformation auf, in der sich der *cluster binding fold* vom *base fold* ablöst und die entstehende Spalte wasserzugänglich wird. In der *c*-Position hat die Ektodomäne dagegen eine Konformation wie das lösliche Fragment. Die Gelenkregion weist erst in dieser Position die Konformation einer 3₁₀-Helix auf (43).

Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass die Ektodomäne des ISP mobil sein muss und sich während des Reaktionszyklus vom Cyt *b* zum Cyt *c*₁ bewegt, somit als mobiler Elektronenüberträger fungiert (85, 86). Diese Bewegung ist auf Grund des großen Abstands zwischen dem [2Fe-2S]-Zentrum in der *b*-Position und dem Eisenatom des Häm *c*₁ von 31 Å notwendig für einen effizienten Elektronentransfer. Die Domänenbewegung umfasst eine Strecke von ~16 Å und eine Drehung um ~57°.

Die Beweglichkeit des ISP wurde weiter durch genetische und biochemische Studien untersucht. Obwohl dieser Bereich in den Strukturen schlecht aufgelöst ist, ist er hochkonserviert (87). Es ergab für das Modellsystem *R. sphaeroides*, dass ein Austausch der Aminosäuren f46-48 (ALA) gegen PLP die Aktivität des Komplexes auf die Hälfte reduziert. Andere Austauschexperimente, welche die Flexibilität in dieser Region verringern, führten zum Verlust der Aktivität. Das Einführen einer Disulfidbrücke durch Mutation in die Sequenz f40-42 (PSA→CSC), führt unter oxidierenden Bedingungen zu einem Verlust der Aktivität. Wird das Protein reduziert, kann die Aktivität wieder hergestellt werden und *visa versa* (88). Das ISP wurde durch eine Disulfidbrücke an das Cyt *b* fixiert, indem in die jeweilige Untereinheit ein Cystein (bA185C und fK70C) eingeführt wurde. Die Mutante verhielt sich unter

Einleitung

anaeroben Bedingungen wie Wildtyp, verlor jedoch unter oxidierenden Aufreinigungsbedingungen ihre Aktivität (89). In einem ähnlichen Experiment wurde das ISP an das Cyt c_1 durch eine Disulfidbrücke fixiert, ebenfalls unter Aktivitätsverlust (90).

Weitere Experimente zur Deletion in *R. capsulatus* (bis zu 5 AS) zeigten einen funktionsfähigen Komplex, jedoch mit substöchiometrischem ISP-Anteil (91). Eine Reihe von Insertionsexperimenten ergab einen Rückgang der Aktivität auf Grund langsamerer Bewegung der Ektodomäne, je länger die Insertion war (92). Dies könnte mit einer Federspannung erklärt werden, die nötig ist, um das reduzierte ISP aus der *b*-Position zu lösen (93).

Ähnliche Experimente in *S. cerevisiae* führten zu vergleichbaren Resultaten (94, 95). In den b_6f -Komplexen ist die gleiche Region Glycin-reich und unterliegt nicht derselben strikten Sequenz-Konservierung. Nur Mutationen, die die Flexibilität einschränken oder die Länge verändern, führen hier zum Verlust der Aktivität (96). An diesem Komplex konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit von der Viskosität des Mediums abhängt (97).

Vergleicht man die Strukturen aus *R. spheroides* und die des mitochondrialen Komplexes aus Rind, so wird eine weitreichende Übereinstimmung für die redoxaktiven Untereinheiten deutlich. Dies gilt nicht nur für ein Monomer, sondern auch für das Dimer. Im direkten Vergleich der Cyt *b*-Dimere, anhand der C_{α} -Atome, lässt sich feststellen, dass die Standardabweichung bei unter 1,1 Å liegt. Der Abstand und die Lage der Cofaktoren sind fast identisch. Im Gegensatz zum mitochondrialen Komplex verfügt der bakterielle nicht über die Untereinheiten Core I und Core II, die das Q_N - Zentrum gegen die wässrige Phase und damit den Kurzschluss von Protonen und Elektronen abschließen. Jedoch bilden die in Abschnitt 1.2.2.2 dargestellten Insertionen (beide terminale, helikale Insertionen und Insertion im *de*-loop) auf der N-Seite des bakteriellen Komplexes eine zusätzliche Lage Protein, die den Komplex gegen die wässrige Phase abdichtet. Die beiden Cyt *b* stehen durch ihre N-Termini in Kontakt miteinander.

Die periplasmatische Insertion, die *ef1*-Helix scheint für den Kontakt zu Lipiden wichtig zu sein, da in der Elektronendichtekarte Dichten für Lipide in dieser Region zu sehen sind. Ebenfalls bildet sie durch aromatische Wechselwirkungen Kristallkontakte zu dem Cyt *b* im nächsten Dimer. Eine ebenfalls der Lipidbindung

Einleitung

dienende Insertion weist das Cyt c_1 auf. In dieser Untereinheit gibt es eine weitere Insertion, die zu einer zusätzlichen, stabilisierenden Disulfidbrücke führt (83). Diese Insertion könnte dazu dienen, die Bewegung der ISP-Ektodomäne zu begrenzen.

Zwei Deletionen im Cyt c_1 unterscheiden den bakteriellen Komplex weiter von seinem mitochondrialen Gegenstück. Diese Regionen dienen im Komplex aus Rind dem Monomer-Monomer-Kontakt zwischen den beiden Untereinheiten, sie erhöhen die Komplexstabilität und lassen kein Eindringen von Wasser in den Komplex zu. Das ISP enthält nur eine Insertion diese bildet eine kleine globuläre Subdomäne, sie dient der Stabilisierung der globulären Struktur der Ektodomäne (98). Sie liegt über 20 Å vom Eisen-Schwefel-Zentrum entfernt.

1.2.4 Mechanismus des Cytochrom bc_1 Komplexes

Die von Peter Mitchell vorgeschlagene, chemiosmotische Hypothese (2) basiert auf dem Redoxschleifen-Mechanismus, durch den der Elektronentransport durch die Komplexe der Atmungskette an den Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran oder die Cytoplasmamembran bei Bakterien gekoppelt ist. Dieser Protonengradient speichert die bei der Reaktion verfügbare Freie Enthalpie. Mitchell schlug 1975 als allgemeines Prinzip für die Kopplung des Elektronentransports an den Protonentransport den Redoxschleifen-Mechanismus vor, demnach sich in der Atmungskette Protonen- und Elektronenüberträger, wie z.B. Ubihydrochinon, mit reinen Elektronenträgern wie Cytochrom c abwechseln. Die Protonen- und Elektronenträger nehmen Protonen auf der negativen Membranseite auf und geben sie, wenn sie von den reinen Elektronenträgern oxidiert werden, auf der positiven Membranseite wieder ab (7).

Es gab Versuche, einen linearen Mechanismus zu postulieren, gegen den jedoch thermodynamische Argumente und die Potentiale der Redoxzentren sprechen. Gibt man beispielsweise einen Sauerstoffpuls auf vorher langsam atmende Mitochondrien, führt dies erwartungsgemäß zu einer gesteigerten Oxidation von Cytochrom c_1 , ISP und Cytochrom c . Bei einem linearen Mechanismus würde man dasselbe für Cytochrom b erwarten. Die Experimente zeigen jedoch, dass es vorübergehend zur gleichzeitigen Reduktion von Cytochrom b kommt, was nicht mit einem linearen Transport in Einklang gebracht werden kann. Für eine gleichzeitige Oxidation müssen jedoch die Elektronen verschiedene Wege gehen. Das

Einleitung

Ubihydrochinon wird durch das, durch den Sauerstoffpuls oxidierte, Cyt c_1 oxidiert. Das entstandene Semichinon gibt das Elektron an das Cyt b ab (99).

1.2.4.1 Kopplung von Elektronentransfer und Protonengradient: Der modifizierte Q-Zyklus

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen leitete Mitchell den Q-Zyklus ab. Die Hydrochinon-Oxidation am Q_P -Zentrum spaltet sich dabei in zwei Teile auf (Abbildung 3). Zunächst wird ein Elektron auf das ISP übertragen, den Anfang der *high potential chain* (schwarze Pfeile), nach der Bewegung der Ektodomäne (grüner Pfeil) weiter auf das Cyt c_1 und schließlich auf das gebundene Cyt c , das nun abdiffundiert (magentafarbener Pfeil). Das zweite Elektron wird auf das Cyt b_L übertragen, die *low potential chain*. Die beiden Protonen des Hydrochinons werden auf der P-Seite abgegeben (gestrichelter Pfeil oben).

Vom Häm b_L aus wird das Elektron weiter über das Cyt b_H auf das Chinon im Q_N -Zentrum übertragen. Das hier entstandene Semichinon wird stabilisiert (100). Das entstandene Chinon am Q_P -Zentrum tauscht mit dem Chinon-Pool gegen ein Hydrochinon aus (gepunkteter Pfeil) und ein weiteres, oxidiertes Cyt c bindet an das Cyt c_1 . Die Reaktion am Q_P -Zentrum wiederholt sich und ein zweites Elektron wird jeweils auf die *high potential chain* und *low potential chain* übertragen (graue Pfeile). In der ersten wird es wieder auf Cyt c übertragen, welches vom Komplex abdiffundiert. Auch hier erfolgt die Abgabe von zwei weiteren Protonen auf die P-Seite der Membran. In der zweiten wird es auf das wartende Semichinon übertragen. Bei diesem Prozess werden zwei Protonen von der neutralen Seite der Membran aufgenommen (gestrichelter Pfeil). Das entstandene Hydrochinon tauscht dann mit dem Chinon-Pool gegen ein Chinon aus (gepunkteter Pfeil). Die Nettogleichung dieser Reaktion ist in Gleichung 1 dargestellt.

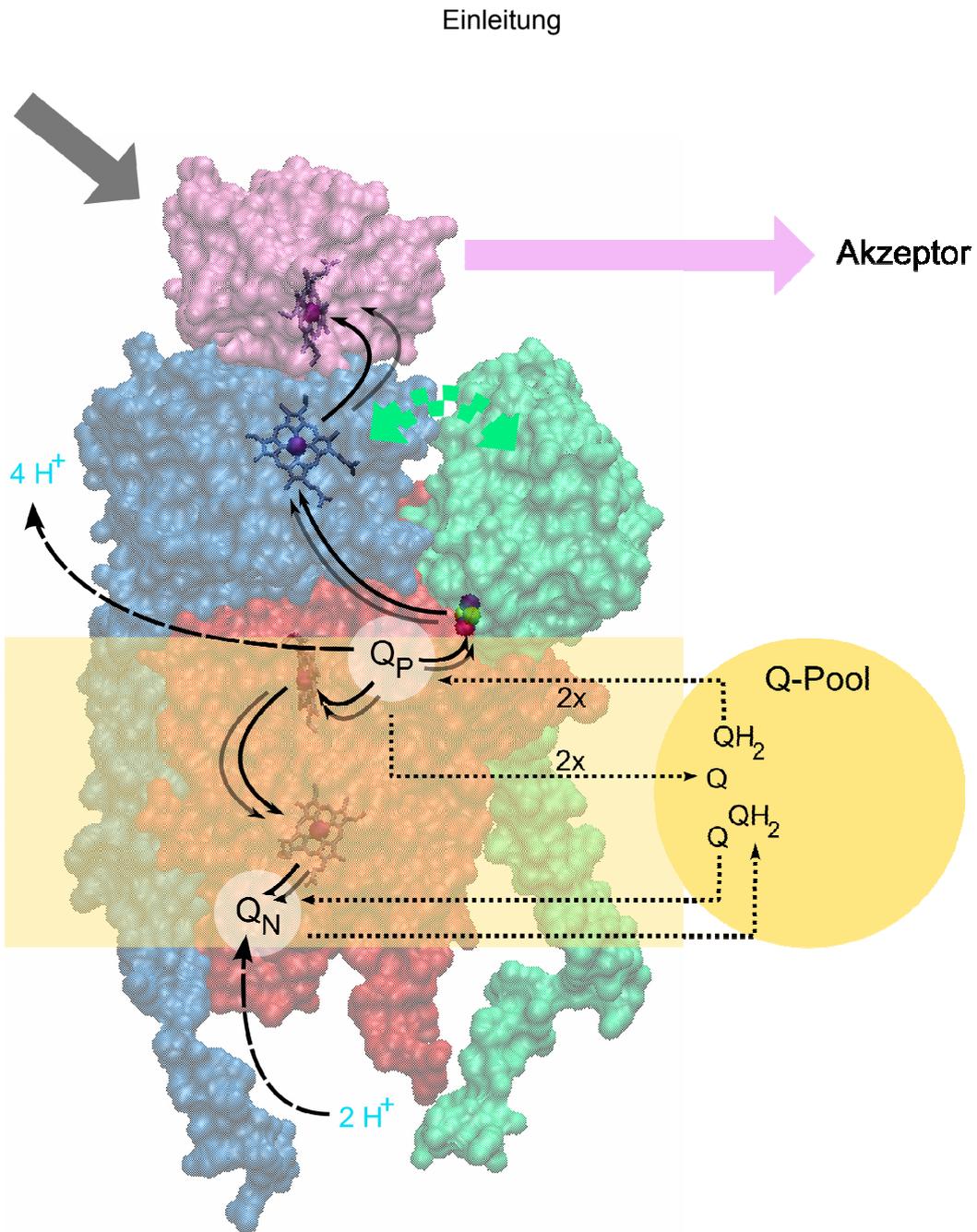


Abbildung 3: Der modifizierte Q-Zyklus; ein Monomer mit gebundenem Cyt c aus der Kristallstruktur 3XC5 des Cytochrom *bc*₁ Komplexes aus *S. cerevisiae* als Oberflächendarstellung.

Das Cyt *b* ist in rot dargestellt, das Cyt *c*₁ in blau und das ISP in grün, das Cyt *c* in magenta, das Eisen-Schwefelzentrum in violett und gelb in van der Waalsdarstellung, sowie die Hämgruppen in stahlblau mit dem zentralen Eisenatom in violett.

Die Membran ist durch den gelben Kasten angedeutet. Der gelbe Kreis deutet den Hydrochinon-Pool in der Membran an.

Die schwarzen Pfeile zeigen den Elektronentransfer der ersten beiden Elektronen, die in grau den Elektronentransfer der Elektronen des zweiten Hydrochinons.

Die gestrichelten Pfeile zeigen die Protonenaufnahme und -abgabe an.

Die gepunkteten Pfeile zeigen den Austausch von Substrat und Produkt.

Der grüne, breite Pfeil deutet die Bewegung der ISP Ektodomäne an, der magentafarbene, breite Pfeil das abdiffundieren des Cyt *c* nach Reduktion, der graue, breite Pfeil das Binden eines, zweiten, neuen, oxidierten Cyt *c*.

Einleitung

Die Reduktion des Chinons am Q_N-Zentrum wird ebenfalls bereits seit langem untersucht. So konnte in mehreren Strukturen ein Chinonmolekül in diesem Zentrum lokalisiert werden (29, 74, 75, 82, 85), das über ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, vermittelt durch Wassermoleküle, verschiedene Reste bindet (S.c. His202 (101), Asp229 und Ser206). Die Position des Chinonmoleküls ist in den Strukturen nicht eindeutig an einem Platz und auch die Liganden liegen in anderen Konformationen vor, dies wird mit einer räumlichen Variabilität der Bindungstasche zu erklären versucht (102). Der Rest His202 vermittelt möglicherweise über das spezifisch gebundene Cardiolipin den Elektronentransfer zur N-Seite der Membran (103).

1.2.4.2 Hydrochinon-Oxidation am Q_P-Zentrum

Die, auf den ersten Blick, thermodynamisch nicht favorisierte Elektronen-*bifurcation* am Q_P-Zentrum wird seit langem untersucht. Die Blockierung der *low potential chain* mit dem Inhibitor Antimycin A brachte die Erkenntnis, dass selbst dann das zweite Elektron nicht auf das ISP übertragen werden kann, wenn dieser zweite Weg blockiert ist (104). Der Mechanismus der *bifurcation* kann deshalb als obligat angesehen werden.

Die bisher erhaltenen Strukturen können im Punkt Chinoloxidation leider nicht herangezogen werden, da alle Strukturen, in denen die redoxaktiven Untereinheiten sichtbar sind, mit inhibierten Komplexen erhalten wurden. In diesen Strukturen ist allerdings ein Kontakt des äusseren Histidinliganden des Eisen-Schwefel-Zentrums des ISP mit den distal bindenden Klasse I-Inhibitoren (Stigmatellin, NQNO oder HHDBT) zu beobachten (66, 74, 75, 77, 82). Diese Bindung zwischen dem Histidin und dem Inhibitor ist schon lange durch EPR-Studien belegt (36, 92, 105). Durch weitere EPR-Studien konnte diese Bindung ebenfalls für das durch die Reaktion entstehende Produkt gezeigt werden (106). Die Oxidation des Chinols ist, wie mehrfach gezeigt werden konnte, pH-abhängig (25, 107). Der Protonierungszustand des erwähnten Histidinliganden ist für die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes wichtig, da er für die Bindung deprotoniert vorliegen muss (108, 109). Dies konnte durch Studien an Mutanten mit veränderten pK-Werten des ISP und darauf beruhendem veränderten pH-Optimum gezeigt werden (110).

Die Frage nach der Abfolge der Elektronentransfer-Schritte und damit nach dem genauen Mechanismus des Elektronentransfers ist seit langem diskutiert. Die

Einleitung

Forderung nach der Gabelung der Elektronen in Zusammenhang mit den bisherigen Ergebnissen lässt zwei im Folgenden beschriebene mögliche Szenarien zu: Durch die Übertragung des ersten Elektron auf das Rieske-Protein entsteht ein kurzlebiges Semichinon (A) oder das ISP und das Hydrochinon bilden einen Komplex (B), der sowohl ISP als auch Cyt *b* reduzieren kann. Erst danach dissoziieren die Produkte auseinander.

Das Modell A geht von einem instabilen Semichinon aus, welches auf Grund seiner Kurzlebigkeit nicht EPR-detektierbar ist. Dieses ist in der Lage, das Cyt b_L zu reduzieren. Für einen schnellen Elektronentransfer ist das in der distalen Position vorliegende Semichinon zu weit entfernt. Für diesen Mechanismus ist ein Wechsel in die proximale Position notwendig (37) oder ein weiteres, sich bereits in der proximalen Position befindendes Chinonmolekül gefordert, welches das Elektron überträgt (111). Das ebenfalls von zwei Chinonen ausgehende *proton-gated charge transfer*-Modell geht von einer Symproportionierung, also dem Entstehen zweier Semichinone aus, die gleichzeitig beide Ketten bedienen (112, 113). Alle Modelle die von zwei Chinonen ausgehen, werden als *double occupancy*-Modelle bezeichnet. Sie werden von verschiedenen Experimenten gestützt, die mehr als ein Chinon in der Bindungstasche detektieren (105) oder die pro Monomer drei Chinone nachweisen (114, 115).

Im Falle B wird ein stabiles Semichinonradikal gebildet (116), welches durch das reduzierte Rieske-Protein stabilisiert wird. Da das Semichinon eine höhere Affinität zum reduzierten ISP hat als zum oxidierten, bleibt dieses gebunden. Erst wenn das Semichinon das verbleibende Elektron auf das Cyt *b* übertragen hat, kann das ISP abdiffundieren und das Elektron auf Cyt c_1 übertragen, da die Affinität des verbleibenden Chinons um Größenordnungen geringer ist als die des Semichinons. Dies wurde aus dem höheren Redoxpotential des ISP geschlossen, wenn Stigmatellin, das als Analogon des Semichinons gesehen wurde, gebunden ist. Die Erklärung hierfür liegt in der höheren Affinität des Stigmatellins zum reduzierten ISP. Dieses Modell konnte bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht durch ein experimentell zweifelsfrei (117) nachgewiesenes Semichinonradikal (118) bestätigt werden (119, 120). Die vorgeschlagene ferromagnetische Kopplung zu einem EPR-unsichtbaren Komplex aus Semichinonradikal und reduziertem ISP umgeht dieses Problem jedoch (116) durch Delokalisation des Elektrons über das Eisen-Schwefel-Zentrum und das Hydrochinon. Dieser Zustand und die konzertierte Übertragung von zwei

Einleitung

Elektronen lassen sich im Moment jedoch nicht unterscheiden. Des Weiteren wird das Stigmatellin nicht mehr als Übergangszustand gesehen, sondern seine Rolle scheint in der Verdrängung des Chinols zu liegen (119). In weiteren Inhibitorstudien wurde gezeigt, dass die Ektodomäne auch ohne die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu dem das Eisen-Schwefelzentrum bindenden His (*B. taurus* 161) in der *b*-Position gebunden bleibt (76, 78). Der Konformationsschalter scheint also vielmehr ein intrinsisches Phänomen des Komplexes zu sein (121). Von allen Aminosäuren ist nach Beobachtungen aus den Kristallstrukturen das Ile (Cyt *b* *B.t.* 146) aus der *cd1* Helix immer in Kontakt zum Inhibitor. Die Wichtigkeit dieser Helix wird durch ihre hohe Sequenzhomologie (98,5 %) und die Tatsache, dass sie sich je nach gebundenem Inhibitor in einer anderen Position befindet, gestützt (121).

Die unter Abschnitt 1.2.3 beschriebene Beweglichkeit der ISP-Ektodomäne kompliziert die Situation, wenn in ihr auch ein Schlüsselereignis des Gabelungsmechanismus liegt. Diese Beweglichkeit kann jedoch nicht rein diffusionskontrolliert sein, da sie über eine Distanz bis 22 Å im Nanosekundenbereich liegt (122) der Elektronentransfer jedoch im Mikrosekundenbereich (123). Bereits Berry *et al.* vermuteten 2003 mehr als nur eine diffusionsgesteuerte Bewegung, sondern eine direkte oder indirekte Unterstützung der Bewegung (124), welche richtungskontrolliert sein muss (125).

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse lieferten Xia *et al.* 2007 einen neuen Vorschlag, wie die Oxidation ablaufen könnte (121): Die Ektodomäne des ISP befindet sich nicht fest gebunden in der *b*-Position, wenn sich kein Substrat in der Bindungstasche befindet. Sie kommt durch eine stochastische Bewegung immer wieder mit dem Cyt *b* in Kontakt. Wird Substrat gebunden, so kommt es zu einer Veränderung der Kontaktfläche zwischen ISP und dem Cyt *b* durch eine Verschiebung der Helix *cd1*. Durch diese Veränderung wird die Ektodomäne fest gebunden, und es bildet sich eine Wasserstoffbrücke durch das das Eisen-Schwefel-Zentrum bindende His (ISP *B. taurus* 161) zum Substrat aus, was zu einer festeren Substratbindung führt. Das erste Elektron wird auf das ISP übertragen, welches fest gebunden bleibt und das erste Proton aufnimmt. Das zweite Elektron wird simultan auf das Häm *b_L* übertragen (126). Erst wenn das Elektron auf das Häm *b_H* übertragen ist, kann die ISP-Ektodomäne abdiffundieren (90). Die Konformationsänderung wird möglicherweise durch die Reorientierung des entstandenen Chinons in die proximale Position, die durch die Reduktion des

Einleitung

Häm b_H ausgelöst wird, vermittelt. Dies stellt sicher, dass die beiden Elektronen getrennte Wege gehen.

Die direkte Substratbindung wurde bereits durch einige Mutationsstudien untersucht, jedoch gibt es immer noch Diskrepanzen in deren Aussagen (37, 102, 127-135). So wurde das Glutamat (S.c. 272) als Protonenakzeptor für das zweite Proton der Hydrochinon-Oxidation gesehen (74, 128). Es wird ein Protonenaustritt über eine Kette von Wassermolekülen, die entlang des Häm b_L Propionat führt, postuliert (110). Sie scheint jedoch auch an der Bindung des Inhibitors Stigmatellin beteiligt zu sein (136).

1.2.4.3 *Half-of-the-sites-Reaktion* und Asymmetrie

In den letzten Jahren ergaben sich immer mehr Hinweise darauf, dass die Rolle des Dimers im Cytochrom bc_1 Komplex nicht nur eine strukturelle, sondern auch funktionelle und regulatorische Funktion hat (113, 137, 138). In den Co-Kristallstrukturen zwischen dem Cytochrom bc_1 Komplex und seinem Substrat Cyt c zeigte sich eine überraschende Besetzung nur einer Bindungsstelle am Komplex. Weiter wurde beobachtet, dass nur im anderen Monomer das Q_N -Zentrum besetzt ist (29, 66). Dies führte zu einer Diskussion eines *half-of-the-sites-reactivity*. Der Monomer-Monomer-Elektronentransfer konnte bereits gezeigt werden (84), ebenso konnte eine antikooperative Ubihydrochinon-Oxidation (139) und eine asymmetrische Inhibitorenbindung und damit eine Monomer-Monomer-Kommunikation, sowohl im mitochondrialen als auch im bakteriellen Komplex gezeigt werden (140, 141). Es konnten auch Hinweise auf eine Kommunikation zwischen den beiden Q_N -Zentren gefunden werden (100).

1.3 Kristallisation von Membranproteinen

Die Strukturaufklärung von Membranproteinen ist ein interessantes und breites Forschungsfeld, da nach Genomanalysen vieler Spezies geschätzt wird, dass ~ 20-30 % aller offenen Leserahmen (ORFs) für integrale Membranproteine kodieren. Dieser Zahl stehen die Raumstrukturen von nur etwa 100 verschiedenen Membranproteinen gegenüber. Die Strukturforschung an Membranproteinen stößt schnell auf zwei grundlegende Probleme, einerseits darauf, das jeweilige Membranprotein in ausreichender Menge zu erhalten, und andererseits, daraus geeignete 3-D-Kristalle zu gewinnen.

Einleitung

Die meisten Membranproteine liegen nativ nur in geringen Konzentrationen in den Membranen vor, jedoch sind für die Kristallisation mehrere hundert Milligramm aufgereinigtes, funktionales und homogenes Protein nötig. Eine Ausnahme bilden hier die Proteine der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien, die in ungewöhnlich hoher Konzentration vorliegen. Es wird also deutlich, dass für diese Projekte Überexpressionssysteme von großer Bedeutung sind. Hierbei treten jedoch auch Probleme auf, so gibt es für viele homologe Wirte keine Überexpressionssysteme. Dies gilt in gleicher Weise für den hier verwendeten homologen Wirt *P. denitrificans*. Darüberhinaus können, gerade bei der Expression von Cofaktor-tragenden Proteinen, einige Wirte bestimmte Cofaktoren nicht zur Verfügung stellen, da sie nicht die genetische Ausstattung dafür haben. In diesem Fall müssen sie erst unter großem Aufwand dazu in die Lage versetzt werden (142). Die Überexpression von Membranproteinen kann sich jedoch auch schädlich für die Membranintegrität sein und sich so negativ auf den Wirtsorganismus und dessen Wachstum auswirken (143). Ein weiteres Problem gerade bei Überexpression von Membranproteinen ist die korrekte Faltung (144) und Insertion des Proteins in die Membran, da diese Prozesse hier limitieren können. Hierbei muss speziell dem Wirtssystem Rechnung getragen werden, da es sowohl innerhalb der Prokaryonten unterschiedliche Systeme gibt (41, 145) als auch zu Eukaryonten Unterschiede in den Maschinerien gibt (146). Im Weiteren soll hier noch die Glykosylierung, die bei Eukaryonten eine große Rolle spielt, erwähnt werden, auf die jedoch in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll.

Um die Membranproteine verfügbar zu machen, müssen sie aus ihrer nativen Umgebung, der Membran herausgelöst werden, dabei wird die Membran zerstört. Die Aufreinigung mit Detergenzien solubilisiert die Proteine, so dass man einen Protein-Detergenz-Komplex enthält. Die Wahl des geeigneten Detergenzes ist dabei ein kritischer Punkt, denn es muss auf der einen Seite die Proteine effizient aus der Membran solubilisieren und die stark hydrophoben Membranproteine, die zur Aggregation neigen, stabil in Lösung halten (147). Aggregation setzt sowohl die Ausbeute herab als auch die Effizienz aller verwendeten chromatografischen Techniken (148) und beeinflusst die Kristallisation negativ. Auf der anderen Seite muss es mild genug sein, um sicherzustellen, dass die Proteine nicht denaturiert, Komplexe nicht zerstört werden und Untereinheiten nicht verloren gehen. Beispielsweise sei hier die aa_3 Oxidase von *P. denitrificans* genannt, die unter

Einleitung

Verwendung von zwei verschiedenen Detergenzien einmal nur als Zwei-Untereinheiten-Komplex isoliert werden kann (149) und bei Verwendung eines mildereren Detergenzes als kristallisierbarer Vier-Untereinheiten-Komplex (9). Es können durch die Detergenzbehandlung jedoch für die Struktur oder Funktion wichtige Phospholipide verloren gehen (79, 150-153). Neben der Wahl des geeigneten Detergenzes sind für die Solubilisierung weitere Faktoren zu beachten. Hierzu zählen die Ionenstärke, die hoch genug sein muss, um das Protein stabil, homogen und quantitativ zu solubilisieren, auf der anderen Seite nicht so hoch sein darf, dass es zum Verlust von Untereinheiten kommen kann oder gar zur Denaturierung des Proteins. Der pH-Wert ist eine weitere wichtige Stellschraube, für den dieselben Argumente in Betracht gezogen werden müssen.

Eine von zwei Methoden zur Kristallisation von Membranproteinen (154) ist die der *lipidic cubic phase* (155), auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird. Sie konnten bisher nur selten mit Erfolg eingesetzt werden, wie im Falle des Rhodopsins (156). Abgesehen von weiteren Rhodopsin-artigen Proteinen konnte bisher nur noch ein weiterer Proteintyp mit dieser Methode kristallisiert werden (157).

Die auch in dieser Arbeit angewendete Methode das Membranprotein in solubiliertem Zustand, also in Detergenzmizellen, zu kristallisieren, ist momentan die Methode der Wahl. Die Kristalle der meisten Membranproteine, deren Raumstruktur gelöst werden konnte, wurden so erhalten (158). Sie kann analog zu löslichen Proteinen mit anderen Kristallisationsverfahren, beispielsweise dem *vapor-diffusion* und dem *microdialysis*, eingesetzt werden. Auch die bekannten Wege der Automation (Roboter-gestütztes *liquid-handling*, *crystal farming*) können besprochen werden. Doch auch diese Methode ist nicht ohne Probleme einsetzbar, wie im Folgenden dargelegt wird.

Die hydrophobe Oberfläche von Membranproteinen erschwert die Kristallisation, da Kristallkontakte typischerweise über hydrophile Proteinabschnitte ausgebildet werden. Die Detergenzmoleküle bedecken dann mit ihrem lipophilen Teil den hydrophoben Transmembranbereich des Proteins wie ein Gürtel und vermitteln den Kontakt zum Lösungsmittel mit ihren hydrophilen Kopfgruppen (159, 160). Bei solubiliertem Membranprotein können die Kristallkontakte durch die hydrophilen Bereiche des Proteins, die aus dem mizellaren Teil des Protein-Detergenz-Komplexes herausragen, vermittelt werden (161). Die Mizellen benötigen jedoch ebenfalls Raum im Kristallgitter. Dies stellt ein weiteres Problem dar, denn viele

Einleitung

Membranproteine, wie z.B. Transporter und Kanäle, besitzen keine großen hydrophilen Bereiche, die weit aus den Mizellen herausragen und so die Kristallkontakte vermitteln könnten. Diese Problematik kann durch die Verwendung von anderen Detergenzien, wie am Cytochrome bc_1 Komplex aus *S. cerevisiae* gezeigt, mit kürzeren oder veränderten Alkylketten durch Detergenzaustausch vor der Kristallisation (74) oder Zugabe bei der Kristallisation als Additiv zu lösen versucht werden (82, 161). Weiterhin kann durch die Zugabe kleiner amphiphiler Moleküle, wie Di- oder Triole, zum Kristallisationsansatz die Detergenzmizelle verkleinert werden, wie im Falle des bakteriellen Reaktionszentrums (161, 162) oder des Lichtsammelkomplexes (163). Auch wurden erfolgreich Mutationen eingeführt, um die hydrophilen Bereiche von Proteinen zu verändern und zu vergrößern (83, 164).

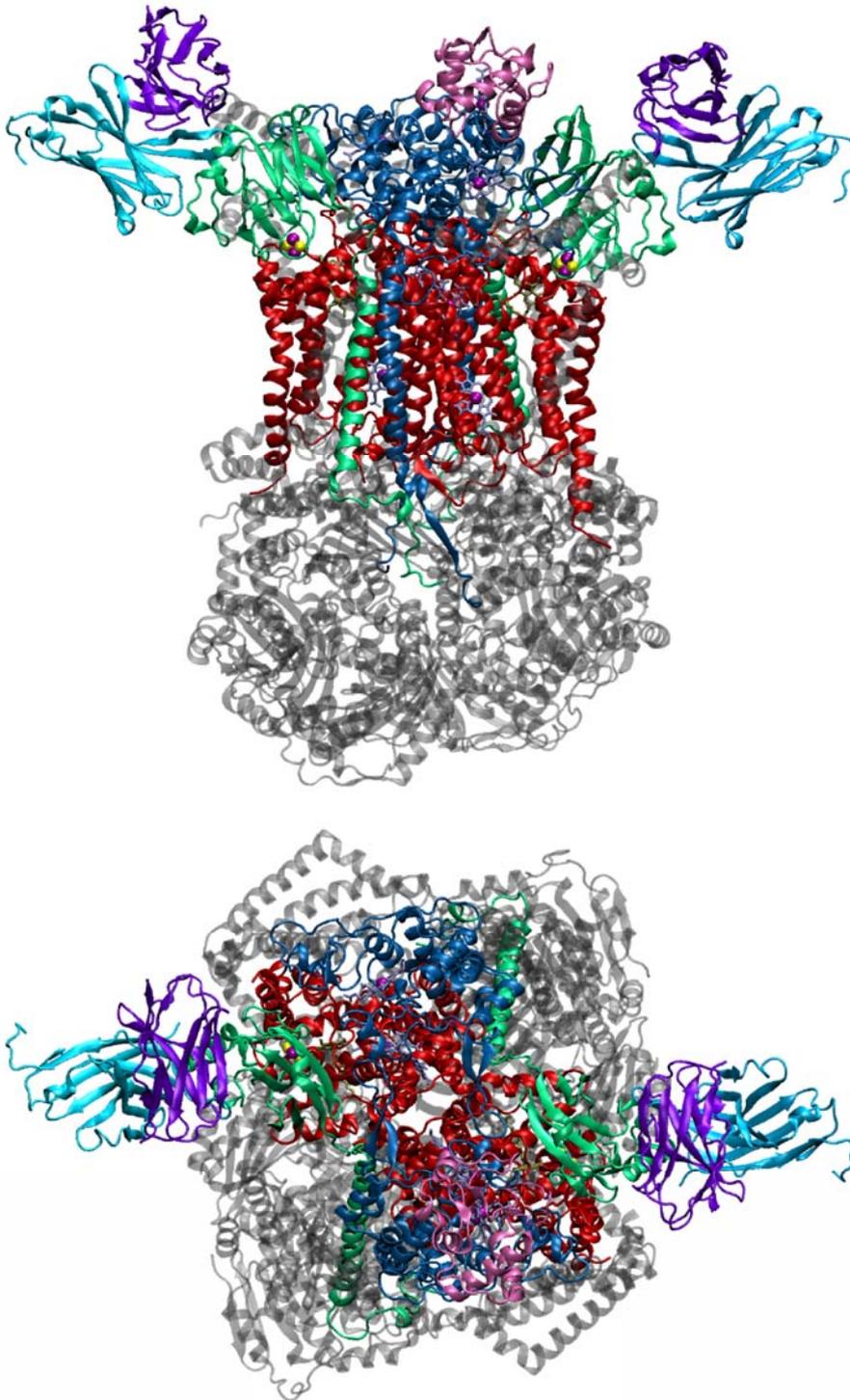
Als ein weiterer, Erfolg versprechender, Weg in derselben Richtung kann die Antikörper-vermittelte Kristallisation, die im folgenden (Abschnitt 1.3.1) weiter behandelt wird, aufgeführt werden. Neben dieser Methode konnte ebenfalls mit einem Ankyrin-basierten System, das auf dem selben Prinzip wie die Antikörper-vermittelte Kristallisation basiert, Strukturen gelöst werden (165).

1.3.1 Antikörper-vermittelte Kristallisation

Zur Antikörper-vermittelten Kristallisation wird ein spezifisch bindendes, monoklonales Antikörperfragment gegen das Zielprotein erzeugt und eingesetzt (166, 167). Verwendung bei der Kristallisation finden hauptsächlich rekombinante Antikörperfragmente entweder in Form des variablen Fragments (F_v , ~25 kD) oder eines größeren Antikörperfragments (F_{ab} , ~56 kD). Ein für die Co-Kristallisation geeigneter Antikörper bindet einen hydrophilen Teil des Membranproteins und vergrößert ihn dadurch. Er bindet das Membranprotein in seiner nativen Konformation und bildet einen stabilen Komplex.

Mit diesem Ansatz der Co-Kristallisation unter Verwendung eines F_v -Fragments wurden die Strukturen der Cytochrom *c* Oxidase von *P. denitrificans* (9, 166-168) und des Cytochrom bc_1 Komplex von *S. cerevisiae* ((29, 66, 74, 77) Abbildung 4) bestimmt. Das im letzteren Fall verwendete F_v -Fragment ist gegen die katalytische Domäne des ISP gerichtet.

Einleitung



**Abbildung 4: Kristallstruktur des Cytochrom bc_1 Komplex aus *S. cerevisiae* mit co-kristallisiertem Cytochrom c (3XC5).
Oben: Seitenansicht; unten Ansicht von oben auf den Komplex.
Das Cytochrom b ist in rot dargestellt, das Cyt c_1 in blau, das ISP in grün, das Cyt c in magenta, die schwere Kette des Fv-Fragments in hellblau, die leichte Kette in violett und die akzessorischen Untereinheiten in grau, die Häme in eisblau, Eisenatome in lila, Schwefelatome in gelb und das Stigmatellin in bronze.**

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Strukturen des Cytochrom bc_1 Komplexes wurden alle von Eukaryonten erhalten und nicht von Prokaryonten. In dieser Arbeit soll ein prokaryontischer Komplex aus *P. denitrificans* in geeigneter Form zur Verfügung gestellt und anschließend kristallisiert werden. Zur Kristallisation soll ein Antikörper-vermittelter Ansatz verfolgt werden, mit dem vorhandenen Antikörperfragment gegen den Komplex aus *S. cerevisiae*, wie bereits in Abschnitt 1.3.1 dargestellt wurde. Hierfür stand bereits ein in einer vorangegangenen Arbeit erzeugter Komplex aus *P. denitrificans* mit der modellierten Bindungsstelle aus *S. cerevisiae* zur Verfügung (169). Auf einem zweiten Weg sollte mit einer weiteren Mutante (170) ebenfalls der Weg der Kristallisation beschriftet werden.

In Abschnitt 1.2.4.3 wurde bereits beschrieben, dass die Rolle des Dimers über die der Struktur hinausgeht. Um die Struktur-Funktionsbeziehung und die Bedeutung des Dimers weiter aufzuklären, soll hier eine Mutante im homologen Expressionshintergrund *P. denitrificans* erzeugt werden, die einen Defekt in einem Monomer trägt, der die Hydrochinon-Oxidation dieses Monomers zum Erliegen bringt. Dieser Defekt soll aber weder die Struktur noch die Cofaktoren des Komplexes stören. Das andere Monomer soll der Wildtypsituation entsprechen und eine uneingeschränkte Hydrochinon-Oxidation erlauben. Zur Isolierung eines zweifelsfrei „gemischten“ Dimers soll an jedem Monomer ein anderer Affinitäts-tag angebracht werden. Durch eine sequenzielle Tandem-Aufreinigung mit den korrespondierenden Säulenmaterialien soll dann dieses gemischte Dimer erhalten und durch *steady-state* und *pre-steady-state* Kinetiken untersucht werden.

Des Weiteren sollen Mutanten des Q_P -Zentrums im Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans* erzeugt und zunächst biochemisch charakterisiert werden. Diese Mutanten sollen zum detaillierteren Verständnis der Substrat- und Inhibitorbindung beitragen und Informationen über den Protonierungszustand und mögliche Protonenleitung liefern. Sie sollen im Weiteren für elektrochemisch-gekoppelte FTIR-Untersuchungen verwendet werden.

Einleitung

In einem weiteren Ansatz soll der Oligomerenzustand des bakteriellen Cytochrom bc_1 Komplexes mittels einer neuen, auf diesem Gebiet erstmals eingesetzten Massenspektroskopie-Methode untersucht werden. Im Vergleich werden die beiden klassischen Methoden der Blau-Nativ-Elektrophorese und der Gelfiltration herangezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, auch hier nicht ausdrücklich aufgeführte Standardchemikalien werden in *p.a.* Qualität von AppliChem, Merck, Roche, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen. Wasser für alle proteinbiochemischen Anwendungen wird mit einer Anlage der Firma Seral entsalzt; für molekularbiologische Anwendungen und für Kristallisationsexperimente wird mit einer PRO 90 CN Anlage der Firma Seral entsalzt, sterilfiltriert und für molekularbiologische Zwecke autoklaviert.

| | |
|---|------------------|
| Acrylamid, Bis-Acrylamid | Roth |
| Antimycin A | Sigma-Aldrich |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose | peqlab |
| Aminocapronsäure | Applichem |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Roth |
| Ampicillin-Natriumsalz | Applichem |
| Avidin | Gebro |
| Bactotrypton | Becton-Dickinson |
| Bernsteinsäure | Fluka |
| 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) | Sigma-Aldrich |
| Coomassie Brilliant Blue R250 | Roth |
| Decylubichinon | Sigma-Aldrich |
| Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) | Fermentas |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck |
| Dithiothreitol | Roth |
| Eisenammoniumsulfat | Fluka |
| Eisen-III-chlorid | Fluka |
| Ethidiumbromid | Gibco BRL |
| Folin-Ciocalteu | Merck |
| Hefeextrakt | Gibco BRL |
| Histidin | Roth |

Material und Methoden

| | |
|---|---------------|
| Imidazol | Appllichem |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) | Fermentas |
| Kanamycinsulfat | Roth |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| (+/-)-2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) | Fluka |
| Mineralöl für die Molekularbiologie | Biomol |
| Natriumascorbat | Fluka |
| Natriumdithionit | Sigma-Aldrich |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) | Biomol/Roth |
| newborn calf serum (NCS) | Biochrom |
| Nicotinamidadenindinucleotid (NAD ⁺) | AppliChem |
| Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) | AppliChem |
| Nitroblautetrazolium (NBT) | Sigma-Aldrich |
| 2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure (MES) | AppliChem |
| 2-(N-morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) | Roth |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Roth |
| Pefabloc SC | Biomol |
| Polyethylenglycol 400 (PEG 400) | Fluka |
| Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000) | Fluka |
| Ponceau S | Merck |
| Rinderserumalbumin (BSA) | NEB/AppliChem |
| Rifampicin | Fluka |
| Rotiblock | Roth |
| Stigmatellin | Sigma-Aldrich |
| Streptomycinsulfat | Appllichem |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ) | Sigma-Aldrich |
| Triton X-100 | Roth |

2.1.2 Proteine

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

2.1.2.1 Enzyme für die Molekularbiologie

| | |
|---|----------------|
| Ampligase (thermostabile DNA-Ligase) | Epicentre |
| calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) | NEB |
| Mung Bean-Exonuclease | NEB |
| Phusion-DNA Polymerase | Finnzymes |
| <i>Pfu</i> DNA-Polymerase | Fermentas |
| <i>Pwo</i> DNA-Polymerase | Roche |
| Ribonuclease A (RNase) | Roche |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | Promega |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas |
| T4-Polynucleotidkinase (PNK) | Fermentas |
| Restriktionsenzyme | NEB, Fermentas |

2.1.2.2 Antikörper

| | |
|--|---------------|
| alle Antikörper gegen Ubihydrochinon-Cytochrom <i>c</i> -Oxidoreduktase, Cytochrom-Oxidase und Cytochrom <i>c</i> ₅₅₂ von <i>P. denitrificans</i> | Prof. Ludwig |
| Penta-His-Antikörper | Novagen |
| Protein A-Alkalische Phosphatase | Sigma-Aldrich |
| Ziege-anti-Maus IgG / Alkalische Phosphatase-Konjugat | Sigma-Aldrich |
| Streptavidin / Protein A-Alkalische Phosphatase Konjugat | Sigma-Aldrich |

2.1.2.3 Verschiedene

| | |
|---|---|
| Cytochrom <i>c</i> -Oxidase von <i>P. denitrificans</i> | Prof. Ludwig |
| Cytochrom <i>c</i> -Oxidase von <i>Bos taurus</i> | Prof. Kadenbach; Universität Marburg |
| Cytochrom <i>c</i> aus Pferdeherz | Sigma-Aldrich |
| Lysozym | Biomol |
| Ubihydrochinon-Cytochrom <i>c</i> -Oxidoreduktase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Prof. Hunte; MPI für Biophysik Frankfurt |
| lösliches Cyt <i>c</i> ₁ Fragment von <i>P. denitrificans</i> | Dr. Janzon/ Prof. Ludwig |
| Cyt <i>c</i> ₅₅₂ von <i>P. denitrificans</i> | Prof. Ludwig |
| ATP Synthase aus <i>Pyrococcus furiosus</i> | Prof. Müller; Universität Frankfurt |

2.1.3 Verwendete kits

| | |
|--|-----------------|
| Gel extraction/PCR purification | Qiagen |
| Qiaprep Miniprep | Qiagen |
| Crystallization Basic Kit for Membrane Proteins 73513 | Sigma-Aldrich |
| JBScreen Membrane 1 CS-301L | Jena Bioscience |
| JBScreen Membrane 2 CS-302L | Jena Bioscience |
| JBScreen Detergents 1 CD-101 | Jena Bioscience |
| JBScreen Detergents 2 CD-102 | Jena Bioscience |
| <i>Gel filtration calibration high molecular weight kit 28-4038-42</i> | GE Healthcare |

Auflistung der in den beiden Detergenz-kits, JBScreen Detergents 1 CD-101 (1-12) und JBScreen Detergents 2 CD-102 (13-24) enthaltenen Detergenzien, in der Reihenfolge wie sie für die Detergenztest verwendet wurden. Die Detergenzien 1-22 lagen in einer Stammlösung mit 10facher CMC und die Detergenzien 23-24 lagen in 5facher CMC vor.

| Nr. | Detergenz | Abkürzung | CMC [mM] |
|-----|--|-------------------|----------|
| 1 | 3-(N,N-Di-methyl-palmityl-ammonio)-propan-sulfonat | ZWITTERGENT®3-16 | 0,06 |
| 2 | Nonaethylen glycol monododecyl ether | C12E9 | 0,08 |
| 3 | Octaethylene glycol monododecyl ether | C12E8 | 0,11 |
| 4 | Dodecyl- β -D-glucopyranosid | | 0,13 |
| 5 | 3-(N,N-Dimethylmyristyl-ammonio)-propan-sulfonat | ZWITTERGENT®3-14 | 0,4 |
| 6 | Dodecyl- β -D-maltosid | | 0,6 |
| 7 | Decyl- β -D-maltopyranosid | | 1,8 |
| 8 | N,N-Dimethyldodecylamine N-oxid | LDAO | 2,0 |
| 9 | 3-(Dodecyldimethylammonio)-propan-sulfonat | ZWITTERGENT® 3-12 | 4,0 |
| 10 | Nonyl- β -D-glucopyranosid | | 6,5 |
| 11 | N-Decanoyl-N-methylglucamin | MEGA-10 | 7,0 |
| 12 | Tetraethylene glycol monoethyl ether | C8E4 | 7,0 |

Material und Methoden

| | | | |
|----|---|-----------------------------|-------|
| 13 | Pentaethylene glycol monoethyl ether | C8E5 | 7,1 |
| 14 | 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate | CHAPS | 8,0 |
| 15 | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate | CHAPSO | 8,0 |
| 16 | Pentaethylene glycol monodecyl ether | C10E5 | 8,1 |
| 17 | N,N-Dimethyldecylamine-N-oxid | DDAO | 10,4 |
| 18 | Octyl- β -D-glucopyranosid | Octyl- β -D-glucoside | 25,0 |
| 19 | N-Nonanoyl-N-methylglucamin | MEGA-9 | 25,0 |
| 20 | 3-(Decyldimethylammonio)propan-1-sulfonat | ZWITTERGENT®3-10 | 40,0 |
| 21 | Heptyl-b-D-glucopyranosid | | 74,0 |
| 22 | N-Octanoyl-N-methylglucamin | MEGA-8 | 74,0 |
| 23 | Hexyl-b-D-glucopyranosid | | 250,0 |
| 24 | 3-(N,N-Dimethyloctylammonio)-propan-sulfonat | ZWITTERGENT®3-8 | 330,0 |

2.1.4 Größenstandards

| | |
|---|-----------------------------|
| DNA Phage λ geschnitten EcoRI/HindIII | Hergestellt im Arbeitskreis |
| Gene Ruler 100 bp Ladder | Fermentas |
| 1 kb Ladder | NEB |
| Kombinationsmarker aus DNA Phage λ | Hergestellt im Arbeitskreis |
| Unstained Protein Molecular Weight Marker | Fermentas |
| PageRuler Protein Ladder | Fermentas |

2.1.5 Chromatographiematerialien

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

| | |
|--|-------------------|
| Diethylaminoethyl-(DEAE)-Sepharose CL-6B | GE Healthcare |
| Ni ²⁺ -NTA-Agarose Superflow | Qiagen |
| StrepTactin-Sepharose | Novagen |
| Core-Streptavidin | MPI für Biophysik |
| Sephadex G-25 | GE Healthcare |

Material und Methoden

| | |
|--------------|------------------|
| Superdex 200 | GE Healthcare |
| Superose 6 | GE Healthcare |
| TSK4000SW | Tosoh Bioscience |

2.1.6 Geräte

| | |
|---------------------------------------|--|
| Äkta Chromatographiesystem | GE Healthcare |
| Analysenwaage Basic | Sartorius |
| Autoklav Bioklav | Schütt |
| Brutschrank | Heraeus |
| Dialysepumpe | Gilson |
| Dialyseschläuche 4-6 kDa | Roth |
| Eismaschine | Ziegra |
| Elektrophorese-Kamera Powershot G5 | Canon |
| FPLC-Anlage Pharmacia LKB | GE Healthcare |
| Gefriertruhen | Heraeus |
| Heizblock | Bachofer |
| Konzentratoren | Millipore, Sartorius |
| Kristallisationsroboter Mosquito | Molecular Dimensions Ltd. |
| Kristallisationsroboter Cartesian | |
| Luftbadschüttler | New Brunswick Scientific, Multitron |
| Manton-Gaulin-Pressen | APV Schröder |
| Mikrowelle | Hitachi |
| Nitrocellulosemembran BA 85 | Whatman |
| pH-Meter pH340i | WTW |
| Pipetten | Eppendorf, Gilson |
| Proteinelektrophorese Mini Protean II | BIORAD |
| Proteinelektrophoresekammer | Harnischmacher |
| PVDF-Membran Immobilon-P | Millipore |
| Schüttelplattformen | New Brunswick Scientific |
| Spannungsgeber Powerpac 300 | Biorad |
| Spannungsgeber MBP 3000E | IBI |
| Spektrophotometer U-3000 | Hitachi |
| Spektrophotometer UVIKON | Kontron |
| Sterilbank | Heraeus |

Material und Methoden

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Thermocycler OmniGen | Hybaid |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf |
| Tischzentrifuge Biofuge 13 | Heraeus |
| Trockenschrank | Memmert |
| Ultraschallgerät Sonifier 250 | Branson |
| Ultra-Turax-Homogenisator T25 | IKA Labortechnik |
| Ultrazentrifuge L-70 | Beckman |
| Ultracentrifuge Optima Benchtop | Beckman |
| UV-Durchlichttisch | UVP |
| Vortexer Reax 2000 | Heidolph |
| Zentrifugen Sorvall RC 5B, RC 36 | Dupont |

2.1.7 EDV

2.1.7.1 Programme

| | |
|---|---|
| Clone Manager | Scientific & Educational Software |
| Visual Molecular Dynamics (VMD) Version 1.8.6 | http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/ (171) |
| Primer Generator | http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi (172) |
| ESyPred3D | http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred (173) |
| 3DJIGSAW | http://www.bmm.icnet.uk/3djigsaw/ (174-176) |
| UNICORN | GE Healthcare |
| Origin 6.1 | OriginLabCorporation |
| Inkscape 0.45 | www.inkscape.org |
| Gimp 2.4.5 | www.gimp.org |

2.1.7.2 Datenbanken

| | |
|--|---|
| NCBI Entrez Pubmed | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed |
| Expasy- Swissprot | http://www.expasy.org/sprot/ |
| Kazusa – Codon-usage Datenbank | http://www.kazusa.or.jp/codon/ |
| Protein Data Bank (PDB) | http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do |
| Elektronische Zeitschriften Bibliothek | http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=UBFM |

2.1.8 Plasmide

2.1.8.1 vorhandene Plasmide

| Plasmide | Beschreibung | Resistenz | Herkunft |
|-------------|---|-----------|--|
| pBluescript | Klonierungsvektor, <i>f1 ori</i> , <i>lacZα</i> | Amp | Stratagene (Heidelberg) |
| pRI2 | <i>broad host range</i> -Vektor, pBBR1MCSDerivat, Expressionsvektor | Sm, Cm | (177) |
| pRI2 (436) | <i>fbc</i> -Operon HindIII/SacI in pRI2, Expressionsvektor für w.t. Komplex III | Sm, Cm | M. Korn (Institut) |
| pSL1180 | Klonierungsvektor, superlinker, pMB1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , <i>lacZα</i> | Amp | Pharmazia |
| pUC 18 | Klonierungsvektor, <i>lacZα</i> | Amp | (178) |
| pMK703 | pBlueskript-Derivat; enthält <i>fbc</i> -Operon mit AatII, StuI, und NcoI Schnittstellen im <i>f</i> -Gen, aus Stamm 703 (Institut) | Amp | M. Korn (Institut) |
| pAN36 | Insertion NcoI-Schnittstelle im <i>fbcF</i> -Gen | Amp | (179) |
| pAN42 | Expressionsvektor pRI 2-Derivat für Rieske-Mutanten | Sm | (179) |
| pEG400 | <i>incP</i> , <i>broad host range</i> -Vektor, Expressionsvektor | Sm | (180) |
| pBBR1-MCS5 | <i>broad host range</i> -Vektor, Expressionsvektor | Gm | (181) |
| pTK7 | Expressionsvektor enthält <i>fbc</i> -Operon mit chimärem <i>fbcF</i> (Hinge + Kopfdomäne aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | Sm, Cm | (169) |
| pMC1 | Expressionsvektor enthält das <i>fbc</i> -Operon mit Δ acid <i>c</i> -Gen | Sm, Cm | (170) |
| pASK 68 | Expressionsvektor für das Fv-Fragment 18E11 | Amp, Sm | C. Hunte, MPI für Biophysik, Frankfurt |

2.1.8.2 Erstellte Plasmide

| Plasmide | Beschreibung | Resistenz |
|-----------------|--|------------------|
| pTK12 | pSL1180-Derivat (HindIII + SacI) + <i>fbc</i> -Operon aus Plasmid aus Stamm 703 (Institut) (HindIII + SacI) | Amp |
| pTK14 | pSL1180-Derivat (StuI + XhoI)+ <i>fbcB</i> -Gen (StuI + XhoI) aus <i>fbc</i> aus pTK12 | Amp |
| pTK15 | pUC18-Derivat (HindIII + SacI) + <i>fbc</i> -Operon aus Plasmid aus Stamm 703 (Institut) (HindIII + SacI) | Amp |
| pTK19 | pTK 15-Derivat (StuI+XhoI) + Fragment aus PCR 15 (StuI+XhoI) enthält deka-His-tag in <i>de-loop</i> von Cyt <i>b</i> | Amp |
| pTK20 | pTK 15-Derivat (StuI+XhoI) + Fragment aus PCR 16 (StuI+XhoI) enthält Strep-tagII in <i>de-loop</i> von Cyt <i>b</i> | Amp |
| pTK22 | pTK 15-Derivat (StuI+XhoI) + Fragment aus PCR 27 (StuI+XhoI) enthält C-term. Strep-tagII, Fehler im <i>fbcB</i> -Gen Pos. 1229 nach Sequenzierung <i>fbc</i> -Operon, deshalb Fragment Pfl23II/XhoI in pTK15 umklonieren | Amp |
| pTK23 | pTK 15-Derivat (StuI+XhoI) + Fragment aus PCR 26 (StuI+XhoI) + C-term. deka-His-tag Cyt <i>b</i> | Amp |
| pTK24 | pTK 15-Derivat (StuI+XhoI) + Fragment aus PCR 28 (StuI+XhoI) + N-term. Strep-tagII Cyt <i>b</i> | Amp |
| pTK25 | pTK15-Derivat (Pfl23II/XhoI) + Fragment aus pTK22 (Pfl23II/XhoI) enthält C-term. Strep-tagII | Amp |
| pTK26 | pTK 15-Derivat (StuI+XhoI) + Fragment aus PCR mit Soing 4 + 5-3-Cyt <i>b</i> N-term. deka-His-tag auf pTK 14 | Amp |
| pTK27 | pTK 14 + Mutagenese mit Primer Cyt <i>b</i> M140R enthält KpnI-Schnittstelle | Amp |
| pTK28 | pTK 14 + Mutagenese mit Primer Cyt <i>b</i> Y147S enthält Eco24I SS | Amp |
| pTK29 | pTK15-Derivat (XhoI +Eco147I) + Fragment (XhoI +Eco147I) aus pTK27 | Amp |
| pTK30 | pTK15-Derivat (XhoI +Eco147I) + Fragment aus pTK28 (XhoI +Eco147I) | Amp |
| pTK31 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 19 (HindIII/SacI) | Sm, Cm |
| pTK32 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 20 (HindIII/SacI) | Sm, Cm |

Material und Methoden

| | | |
|-------|---|------------|
| pTK33 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 23 (HindIII/SacI) | aus Sm, Cm |
| pTK34 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 24 (HindIII/SacI) | aus Sm, Cm |
| pTK35 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 25 (HindIII/SacI) | aus Sm, Cm |
| pTK36 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 26 (HindIII/SacI) | aus Sm, Cm |
| pTK37 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 29 (HindIII/SacI) | aus Sm, Cm |
| pTK38 | pRI 2 (436)-Derivat (HindIII/SacI) + Fragment aus pTK 30 (HindIII/SacI) | aus Sm, Cm |
| pTK39 | pRI 2 –Derivat + <i>fbc</i> -Operon aus Plasmid Stamm 703 (Institut) (HindIII + SacI) + per Mutagenese eingeführt bY302F | aus Sm, Cm |
| pTK40 | pAN42 + per Mutagenese eingeführt bE81Q | Sm |
| pTK41 | pBBR1-MCS-5-Derivat (HindIII+SacI) + Fragment aus pTK35 (HindIII+SacI) | Gm |
| pTK42 | pAN36 + per Mutagenese eingeführt bY147F | Amp |
| pTK43 | pAN36 + per Mutagenese eingeführt bD86N | Amp |
| pTK44 | pTK33-Derivat (Eco147I+Pfl23II) + Fragment aus pTK28 (Eco147I+Pfl23II) enthält bY147S-Mutation mit Eco24I Schnittstelle) + C-term. Deka-His-tag | aus Sm, Cm |
| pTK45 | pAN42-Derivat (NcoI+SmaI) + Fragment aus pTK42 (NcoI+SmaI) | Sm |
| pTK46 | pAN 42-Derivat (NcoI+SmaI) + Fragment aus pTK43 (NcoI+SmaI) | Sm |
| pTK47 | pTK7 (AatII+StuI) + optimiertes Gen für ISP-Kopfdomäne (AatII+StuI) | Sm |
| pTK50 | pSL1180-Derivat (HindIII+SacI) + <i>fbc</i> -Operon aus pTK41 (HindIII+SacI) | Amp |
| pTK51 | pBlueskript-Derivat (HindIII+SacI) + <i>fbc</i> -Operon aus pTK44 (HindIII, SacI) | Amp |
| pTK52 | pEG 400-Derivat (HindIII+SacI) + <i>fbc</i> -Operon (HindIII+SacI) aus pTK51 | Sm |
| pTK53 | pTK 41-Derivat (Eco147I+ Pfl23II) + <i>fbc</i> -Operon-Fragment (Eco147I+ Pfl23II) aus pTK12 | Gm |

2.1.9 Mikroorganismen

2.1.9.1 *Escherichia coli* K12-Stämme

| Stamm | Genetische Marker | Herkunft |
|--------------|--|--|
| JM109 | EndA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17(r_k^- , m_k^+), relA1, supE44, λ^- , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proA+B+, lacIq Δ M15] | (178) |
| JM83 | λ^- ara Δ (pro-lac) rpsL thi phi80 dlacZ Δ M15 λ^- strA, für pUC Plasmide | C. Hunte, MPI für Biophysik, Frankfurt |
| DH5 α | SupE44, Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi ⁻¹ , relA1 | (182, 183) |
| TK19 | DH5 α , enthält das pTK19 | diese Arbeit |
| TK20 | DH5 α , enthält das pTK20 | diese Arbeit |
| TK22 | DH5 α , enthält das pTK22 | diese Arbeit |
| TK23 | DH5 α , enthält das pTK23 | diese Arbeit |
| TK24 | DH5 α , enthält das pTK24 | diese Arbeit |
| TK25 | DH5 α , enthält das pTK25 | diese Arbeit |
| TK26 | DH5 α , enthält das pTK26 | diese Arbeit |
| TK27 | DH5 α , enthält das pTK27 | diese Arbeit |
| TK28 | DH5 α , enthält das pTK28 | diese Arbeit |
| TK29 | DH5 α , enthält das pTK29 | diese Arbeit |
| TK30 | DH5 α , enthält das pTK30 | diese Arbeit |
| TK42 | DH5 α , enthält das pTK42 | diese Arbeit |
| TK43 | DH5 α , enthält das pTK43 | diese Arbeit |

2.1.9.2 *Paracoccus denitrificans*-Stämme

| Stamm | Genetischer Marker | Herkunft |
|--------|---|--------------|
| Pd1222 | Spc ^R , Rif ^R , „enhanced mating frequency“ | (184) |
| MK6 | Pd1222-Derivat : chromosomale Deletionsmutante für fbc-Operon Δ (fbc::Km ^R), Spc ^R , Rif ^R | (49) |
| MC1 | MK6-Derivat, enthält das pMC1 | (170) |
| TK7 | MK6-Derivat, enthält das pTK7 | (169) |
| TK31 | MK6-Derivat, enthält das pTK31 | diese Arbeit |

Material und Methoden

| | | |
|------|--|--------------|
| TK32 | MK6-Derivat, enthält das pTK32 | diese Arbeit |
| TK33 | MK6-Derivat, enthält das pTK33 (Wild type mit <i>deka His-tag</i>) | diese Arbeit |
| TK34 | MK6-Derivat, enthält das pTK34 | diese Arbeit |
| TK35 | MK6-Derivat, enthält das pTK35 | diese Arbeit |
| TK36 | MK6-Derivat, enthält das pTK36 | diese Arbeit |
| TK37 | MK6-Derivat, enthält das pTK37 | diese Arbeit |
| TK38 | MK6-Derivat, enthält das pTK38 | diese Arbeit |
| TK39 | MK6-Derivat, enthält das pTK39 | diese Arbeit |
| TK40 | MK6-Derivat, enthält das pTK40 | diese Arbeit |
| TK41 | MK6-Derivat, enthält das pTK41 (Wild type mit <i>Strep-tag II</i>) | diese Arbeit |
| TK44 | MK6-Derivat, enthält das pTK44 | diese Arbeit |
| TK45 | MK6-Derivat, enthält das pTK45 | diese Arbeit |
| TK46 | MK6-Derivat, enthält das pTK46 | diese Arbeit |
| TK47 | MK6-Derivat, enthält das pTK47 | diese Arbeit |
| TK52 | MK6-Derivat, enthält das pTK52 | diese Arbeit |
| TK53 | MK6-Derivat, enthält das pTK53 | diese Arbeit |
| TK54 | MK6-Derivat, enthält das pTK52 und pTK53 | diese Arbeit |

2.1.10 Oligonukleotide

Spezielle Oligonukleotide wurden von Biospring und MWG bezogen, Standardoligonukleotide von Fermentas oder NEB.

2.1.10.1 Spezifische Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz |
|---|--|
| Soing 1 | 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGGCCA-3' |
| Soing 4 | 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3' |
| S_bH276L/D278N_2a | 5'-CTCGATATAGTTGT <u>IGGGC</u> AGGCCAG-3' |
| bY147S Eco24I | 5'-CCGCCTTCATGGGCT <u>CGGTC</u> CCTGCCCTGG-3' |
| bM140R KpnI | 5'-TATCTGATGATG <u>CGGGG</u> IACCGCCTTC-3' |
| seq_Cytb_mitte_hin | 5'-CCCTTCGTCATCGCGGCG-3' |
| 5'-3'-N-term Cyt b Strep-tagII | 5'AACTGGTCGCATCCGCAGTTCGAGAAGGCCG GAATCCCCACGACCATTA-3' |
| 5'-3'-Cyt b C-term 10x His-tag | 5'-CATCACCATCACCATCACCATCACCATCACTA AGGAGAGGCAACAATGAC-3' |
| 5'-3'-Cyt b de-loop His- tag | 5'-ACCTGGTTCGCATCCGCAGTTCGAGAAGCGCG GCTCGAAGGAAGAGGCGAA-3' |
| 5'-3'-Cyt b C-term strep-tag II | 5'-AACTGGTTCGCATCCGCAGTTCGAGAAGTAAG GAGAGGCAACAATGAC-3' |
| 5'-3'-Cyt b 10 His Cyt b | 5'-AAAAGGCCTACATGGGCCACCATCACCATCA CCATCACCATCACCATGCCGGAATCCCCACGA CCATTAC-3' |
| 5'-3'- Cyt b de-loop Strep-tag II | 5'-ACCTGGTTCGCATCCGCAGTTCGAGAAGCGC GGCTCGAAGGAAGAGGCGAA-3' |
| 3'-5'-Cyt b de-loop Strep-tag II rev | 5'-CTTCTCGAACTGCGGATGCGACCAGTTACGG ACCTCGACGCCGGTCGGGT-3' |
| 3'-5'-Cyt b N-term strep-tag II | 5'-CTTCTCGAACTGGCGGATGCGACCAGTTCAT GTAGGCCTATTA-3' |
| 3'-5'-Cyt b de-loop His- tag rev | 5'-GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGA CGGACCTCGACGCCGGTCGG-3' |
| 3'-5'- Cyt b C-term Strep-tag II | 5'-CTTCTCGAACTGCGGATGCGACCAGTTCG GCAGGATGGGTTTCAG-3' |
| 3'-5'-Cyt b C-term 10x His-tag | 5'-GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGC TCGGCAGGATGGGTTTCAG-3' |
| 3'-5'-Cyt b N-term RHHH | 5'-GTGATGGTGGCCCATGTAGGCCTATTAATA-3' |
| bY302F | 5'-GGTATTTCTGCCCTTCTTCGCCATCCTGCG-3' |
| bY147F | 5'-GCCTTCATGGGCTTCGTGCTGCCCTGG-3' |
| bE81Q | 5'-CGCCTCGGTCCAGCATATCATGCG-3' |

Material und Methoden

| | |
|-----------------|---|
| bd86N | 5'-GCATATCATGCGCAACGTGAACGGCGGCTAC -3' |
| Vor fbc an sacI | 5'-GGAGCTCGCCCATCGTCCATTCC-3' |

2.1.10.2 Standardoligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz |
|-------------------|--------------------------------|
| M13/pUC R3 | 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' |
| M13/pUC rev (-24) | 5'-AACAGCTATGACCATG-3' |
| M13/pUC rev (-21) | 5'-ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3' |
| M13/pUC RP2 | 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3' |

2.1.11 Lösungen

Alle Lösungen wurden mit oben erwähntem Wasser angesetzt. Lösungen zur Proteinaufreinigung wurden sterilfiltriert und im Besonderen für Gelfiltrationsanwendungen unter Vakuum entgast. Lösungen für die Molekularbiologie wurden sterilfiltriert oder autoklaviert.

Agarose-Gelelektrophorese

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

Aktivitätsmessungen

| | |
|---|---|
| <i>bc</i> ₁ -Enzym-verdünnungspuffer | 50 mM MOPS/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04 % DDM, 5 % Glycerin, 0,05 % BSA |
| <i>bc</i> ₁ -Messpuffer | 50 mM MOPS/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,04 % DDM, 1 mM EDTA, 1 mM KCN |

Aufreinigung *bc*₁-Komplex von *P. denitrificans* (per Anionentauscher)

| | |
|-----------------------------|---|
| Solubilisierungspuffer (2x) | 100 mM MES/NaOH pH 6, 600 mM Saccharose, 2,4 M NaCl |
| Verdünnungspuffer | 50 mM MES/NaOH pH 6, 0,02 % DDM |

Material und Methoden

| | |
|-----------------------|---|
| Äquilibrierungspuffer | 50 mM MES/NaOH pH 6, 350 mM NaCl |
| Niedersalzpuffer | 50 mM MES/NaOH pH 6, 350 mM NaCl, 0,02 %DDM |
| Hochsalzpuffer | 50 mM MES/NaOH pH 6, 600 mM NaCl, 0,02 % DDM |
| Waschpuffer | 50 mM MES/NaOH pH 6, 1 M NaCl |

Aufreinigung bc_1 -Komplex von *P. denitrificans* (per Ni^{2+} NTA, Imidazol)

| | |
|--------------------------------------|---|
| Solubilisierungspuffer Imidazol (2x) | 100 mM NaP_i pH 8, 600 mM Saccharose, 2,4 M NaCl, 20 mM Imidazol |
| Äquilibrierungspuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl |
| Niederimidazolpuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl, 0,02 %DDM, 10 mM Imidazol |
| Hochimidazolpuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM 250 mM Imidazol |
| Waschpuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 500 mM Imidazol, 1 M NaCl |

Aufreinigung bc_1 -Komplex von *P. denitrificans* (per Ni^{2+} NTA, Histidin)

| | |
|--------------------------------------|---|
| Solubilisierungspuffer Histidin (2x) | 100 mM NaP_i pH 8, 600 mM Saccharose, 2,4 M NaCl, 10 mM Histidin |
| Äquilibrierungspuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl |
| Niederhistidinpuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl, 0,02 %DDM, 10 mM Histidin |
| Hochhistidinpuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM 200 mM Histidin |
| Waschpuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 1 M NaCl |

Aufreinigung bc_1 -Komplex von *P. denitrificans* (per Streptactin-Sepharose)

| | |
|-----------------------------|---|
| Solubilisierungspuffer (2x) | 100 mM NaP_i pH 8, 600 mM Saccharose, 2,4 M NaCl, 200 μ M Avidin |
| Äquilibrierungspuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM |
| Elutionspuffer | 50 mM NaP_i pH 8, 300 mM NaCl, 0,02 % DDM, 2,5 mM Desthiobiotin |

Material und Methoden

Aufreinigung Fv Fragment mittels Streptactin-Sepharose

Aufreinigungspuffer Fv 50 mM KP_i pH 8, 1 mM EDTA

Blau-Nativ-Gelelektrophorese

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

Gelfiltration bc_1 -Komplex von *P. denitrificans* (allgemein)

Laufpuffer 50 mM 50 mM MES/NaOH pH 6, 300mM NaCl,
0,02 % DDM

Gelfiltration bc_1 -Komplex von *P. denitrificans* (für FTIR-Spektroskopie)

Laufpuffer 100 mM KP_i pH 7, 150 mM KCl, 0,02 % DDM

Gelfiltration bc_1 -Komplex von *P. denitrificans* (für Kristallisation)

Laufpuffer 50 mM NaP_i pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,02 % DDM
Laufpuffer – geringere
Pufferkapazität 10 mM NaP_i pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,02 % DDM
Kristallisationspuffer 50 mM NaP_i pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,02 % DDM,
2 M Saccharose
Kristallisationspuffer – geringere
Pufferkapazität 10 mM NaP_i pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,02 % DDM,
2 M Saccharose

Material und Methoden

Coomassiefärbung

| | |
|----------------|--|
| Färbelösung | 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R 250, 10 % Essigsäure, 20 % Methanol |
| Entfärbelösung | 10 % Essigsäure, 20 % Methanol |

Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräp)

| | |
|---------------------------|---|
| Mini I | TEG-Puffer 25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose |
| Mini II | NaOH/SDS 0,2 M NaOH, 1 % SDS |
| Mini III | KAc-Lösung 3 M Kaliumacetat, 11,5 % Eisessig, pH 5 (4 °C) |
| Chloroform/Isoamylalkohol | 24:1 (v/v) |

Kompetente Zellen

| | |
|---------------|---|
| TFB-I-Puffer | 30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 100 mM RbCl, 15 % Glycerin |
| TFB-II-Puffer | 10 mM MOPS/KOH pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin |
| TE-Puffer | 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA |

LILBID-Messungen

| | |
|-------------------|---|
| LILBID-Messpuffer | 50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 6,8, 0,02 % DDM |
|-------------------|---|

Membranpräparation

| | |
|---------------------------------------|---|
| Lysepuffer | 100 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA |
| Membranpuffer | 20 mM KPi pH 8, 1 mM EDTA |
| <i>bc</i> ₁ -Membranpuffer | 50 mM MES/NaOH pH 6, 300 mM Saccharose, 1 mM EDTA |
| Membranspektrenpuffer | 50 mM KPi pH 8, 0,5 % Triton X-100 |

Material und Methoden

Proteinbestimmung nach Lowry

| | |
|--------------|--|
| Lowry A | 2 % Na ₂ CO ₃ , 0,1 M NaOH |
| Lowry B1 | 1 % CuSO ₄ ·5H ₂ O |
| Lowry B2 | 2 % Kalium-Natrium-Tartrat |
| SDS-Lösung | 20 % SDS |
| Folin-Lösung | 50 % (v/v) Folin-Ciocalteu in H ₂ O |

Periplasmapräparation

| | |
|------------------|--|
| Periplasmapuffer | 100 mM Tris/HCl pH 8, 0,5 M Saccharose, 1 mM EDTA |
|------------------|--|

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

| | |
|---------------------|---|
| Anodenpuffer (10x) | 1 M Tris/HCl pH 8,9 |
| Kathodenpuffer (5x) | 0,5 M Tris/HCl, 0,5 M Tricin, 0,5 % SDS, pH 8,3 |
| Acrylamidlösung | 48 % Acrylamid, 1,5 % Bis-Acrylamid |
| Gelpuffer | 3 M Tris/HCl pH 8,5, 0,3 % SDS |
| Probenpuffer | 100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 200 mM DTT, 20 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau |

Silberfärbung

| | |
|----------------------------|--|
| Silberentwicklungslösung | 60 g/l Na ₂ CO ₃ , 0,2 mg/l NaS ₂ O ₃ , 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd |
| Silberfärbelösung | 0,2 % AgNO ₃ , 0,75 ml/l 37 % Formaldehyd |
| Silberfixierlösung | 50 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd |
| Silbervorbehandlungslösung | 0,2 g/l NaS ₂ O ₃ |

Spurenelementlösung für Succinatmedium

| | |
|---------------------|---|
| Spurenelementlösung | 15 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 24,5g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 10g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 3,4 g ZnCl_2 , 2,4 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 1,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,6 g $\text{H}_3\text{BO}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 2,4 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ und 250 ml H_2O lösen und mit H_2O ad 1 l |
|---------------------|---|

Western Blot (allgemein)

| | |
|----------------------------------|---|
| Transferpuffer (5x) | 30 g Tris, 0,1 % SDS, 142 g Glycin, H_2O ad 1 l |
| Transferpuffer (1x) | 400 ml Transferpuffer 5x, 400 ml Methanol, H_2O ad 2 l |
| Ponceau-Färbelösung | 0,2 % Ponceau, 3 % TCA |
| NCS | 5 % in TBS |
| Protein A-Alkalische Phosphatase | 0,1 mg Protein A-AP, 1 mg BSA, 1 ml Glycerin, 1 ml TBS |
| Rotiblock-Arbeitslösung | 1 % Rotiblock in H_2O |
| BSA-Lösung | 3 % BSA in TBS |
| TBS | 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl |
| TBS-Tween | 0,5 % (v/v) Tween-20 in TBS |
| TBS-TT | 0,05 % (v/v) Tween-20, 0,2 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl |
| TNM | 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 |
| BCIP | 25 mg/ml in Dimethylformamid (DMF) |
| NBT | 50 mg/ml in 70 % DMF |
| Färbe-Stopp-Lösung | 50 mM EDTA pH 8 |

2.1.12 Antibiotika

| Antibiotikum | Stammlösung |
|------------------|--|
| Ampicillin (Amp) | 50 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerin |
| Gentamycin (Gm) | 10 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerin (E. coli) |
| Gentamycin (Gm) | 20 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerin (P. denitrificans) |
| Kanamycin (Km) | 25 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerin |
| Rifamicin (Rif) | 15 mg/ml in Methanol |

Material und Methoden

Streptomycinsulfat (Sm) 25 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerin

Die Antibiotika werden mit Ausnahme von Rif nach dem Ansetzen der Stammlösung steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Jedes Aliquot wird nach dem Anbrechen bei -20°C gelagert, und vier bis sechs Wochen verwendet. In Kultur wird Rif 1:250 alle anderen Antibiotika 1:1000 verdünnt.

2.1.13 Medien

| | |
|--|--|
| Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook et al., 1989) | Pepton 1 % (w/v), Hefeextrakt 0,5 % (w/v), NaCl 0,5 % (w/v) |
| Succinatmedium (Ludwig, 1986) | 50 Mm K_2HPO_4 , 10 mM NH_4Cl , 1mM Citrat, 1 mM MgSO_4 , 40 mM Succinat, 0,2 ‰ (v/v) Spurenelementlösung, pH mit KOH auf 6,2 |
| Gefriermedium, (Sambrook et al., 1989) | Pepton 1,6 % (w/v), Hefeextrakt 1 % (w/v), NaCl 1 % (w/v), 20 % Glycerin |

Agar-Platten werden hergestellt, indem den Medien 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt wird. Die hergestellten Platten können bei 4°C gelagert und so vier bis sechs Wochen aufbewahrt werden. Bei mit Rif versetzten Platten muss darauf geachtet werden, diese schon beim Trocknen dunkel zu lagern, da Rif photolabil ist.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen

2.2.1.1 *Escherichia coli*

Allgemein

E. coli-Flüssigkulturen werden bei 37°C in LB-Medium im Luftbadschüttler (Multitron Inkubationsschüttler, Typ Aerotron, 37°C , 240 rpm) angezogen. Zur weiteren Lagerung wird der Stamm auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet (Heraeus B 6120). Die Platten können danach bei 4°C sechs Wochen lang aufbewahrt werden.

Für Gefrierkulturen von *E. coli* wird die Kultur von der Erhaltungsplatte in einer 2 ml Übernachtskultur (ÜNK) in LB-Medium angeimpft. Die Zellen werden sedimentiert

und in Gefriermedium resuspendiert, gevortext, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Kulturen zur Produktion des Fv-Fragments

Die pASK68/JM83 Kulturen werden zunächst in 50 ml LB-Medium/Amp mit 5 μl aus der Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wird am nächsten Tag in vortemperierte 5 l-Kolben mit 2 l LB-Medium/Amp überführt und bis zum Erreichen einer OD_{550} von 0,5 bei $22,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Nach Erreichen der OD wird IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Hiernach wird unter den Selben Bedingungen wie vorher weiter für 3 h inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Ernte in vorgekühlten Zentrifugenbechern (Sorvall RC36 bei 5000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2.1.2 *Paracoccus denitrificans*

P. denitrificans kann je nach Verwendungszweck entweder in LB-Medium oder Succinat-Medium angezogen werden. Die Aufzucht erfolgt im Luftbadschüttler (Multitron Inkubationsschüttler, Typ Aerotron, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, 240 rpm) für kleine Mengen. Wenn die Kulturen auf Platten angezogen werden, werden die Stämme ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrütet (Heraeus B 6120). Die Platten können danach bei Raumtemperatur eine Woche lang aufbewahrt werden.

Für eine Anzucht im großen Maßstab (10-50 l) von *P. denitrificans* wird zuerst von einer Gefrierkultur eine Plattenkultur ausgestrichen und diese über Nacht bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Der erhaltene Zellrasen wird in 2 ml LB-Medium resuspendiert und damit eine zweite 2 l Vorkultur 1 %ig angeimpft wird. Nach weiteren 24 h werden je 2,5 l Succinat-Medium 2 %ig aus der zweiten Vorkultur angeimpft. Die Ernte erfolgt nach 18-22 h bei einer OD_{600} von 3-5.

Für Gefrierkulturen von *P. denitrificans*: siehe Gefrierkulturen von *E.coli*

2.2.2 Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab („Minipräp“)

2 ml ÜNK werden angeimpft und im Luftbadschüttler kultiviert. Die ÜNK wird in 1,5 ml Eppendorf-Cups übertragen und in einer Tischzentrifuge (13.000 rpm, 2 min bei RT) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen, und das zurückbleibende

Material und Methoden

Zellpellet in 100 µl eiskaltem Mini-Puffer I aufgenommen und vollständig resuspendiert.

Es werden 200 µl der frisch angesetzten Mini-Lösung II (bei RT) zu den resuspendierten Zellen gegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wird die Lösung gemischt, so dass die gesamte Oberfläche des Gefäßes benetzt wird. Dies führt zur Lyse der Zellen. Das Gefäß darf nicht zu stark geschüttelt oder gevortext werden, da die entstehenden Scherkräfte zu Schwierigkeiten bei der Abtrennung der genomischen DNA führen können. Das Gefäß wird ca. 5 min auf Eis inkubiert, danach sollte eine schleimige Konsistenz erkennbar sein.

Es werden 150 µl eiskalter Mini-Lösung III zugesetzt. Das Gefäß wird wiederholt invertiert und dann wieder 5 min auf Eis inkubiert. Bei der Zugabe der Mini-III-Lösung kommt es zur Fällung von Komplexen aus SDS und genomischer DNA, Proteinen, Membranlipide in Form eines flockig-weißen Niederschlags. Hiernach werden die Gefäße in einer Tischzentrifuge (13000 rpm, 10 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, wobei darauf geachtet werden muss, dass der Niederschlag komplett zurückbleibt.

Der Überstand wird mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Gemisch versetzt und 1 min lang gevortext. Das Gemisch wird in einer Tischzentrifuge (13000 rpm, 5 min, RT) zentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und 1 min lang gevortext. Das Gemisch wird in einer Tischzentrifuge (13000 rpm, 5 min, RT) zentrifugiert.

Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 2 Vol. eiskaltem (-20 °C) abs. EtOH versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird dann 10 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wird vollständig abgesaugt. Um Salze zu entfernen, wird das Pellet mit 200 µl einer eiskalten 70 %igen EtOH-Lösung gewaschen, ohne es zu resuspendieren, und wieder zentrifugiert (10 min, 13000 rpm 4 °C). Der Überstand wird vollkommen abgesaugt, und das Pellet in einem Eppendorf Thermomixer 5 min bei 37 °C und geöffnetem Gefäß luftgetrocknet.

Das Pellet wird in 50 µl Wasser aufgenommen und vollkommen resuspendiert. Die isolierte, resuspendierte Plasmid-DNA wird mit RNase A inkubiert, um die mitisolierte RNA aus der Präparation zu entfernen. Pro 50 µl Plasmidlösung werden

1 μ l RNase [2 mg/ml] zugesetzt. Der Ansatz wird bei 37 °C mindestens 30 min inkubiert.

2.2.3 Restriktion von Plasmid DNA

Es wird ein 20 μ l Restriktionsansatz verwendet. Hierzu wird 10x Puffers laut Hersteller für das jeweilige Restriktionsenzym eingesetzt, sowie ca. 100-300 ng Plasmid DNA für eine analytische Restriktion. Wenn benötigt werden 2 μ l 10x-BSA (1 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz mit Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Für eine präparative Restriktion muss die Enzymmenge laut Herstellerangaben der Plasmidmenge angepasst werden. Standardmäßig werden 2,5 U des Restriktionsenzym zugegeben. Der Ansatz wird gevortext und für eine Stunde bei der für die jeweilige Restriktion optimalen Temperatur inkubiert. Je nach Enzym kann die Reaktion durch Hitzeinaktivierung gestoppt werden oder durch die Zugabe von 5 μ l DNA-Probenpuffer. Der Ansatz wird danach entweder bei -20 °C gelagert oder sofort auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgt in 0,7 bis 2 %igen Agarose-Gelen, jeweils an die relevante Fragmentgröße angepasst. Je kleiner die zu beobachtenden DNA-Fragmente sind, desto höherprozentig wird das Gel gewählt. Um die Gele herzustellen, wird TBE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die gesamte Agarose gelöst hat, etwaige Schlieren werden durch vorsichtiges Schütteln entfernt. Sobald die Lösung nicht mehr kocht, können pro 100 ml Agaroselösung 5 μ l Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] zugegeben und durch vorsichtiges Schütteln gemischt werden.

Die Lösung wird in eine Flachbettkammer gegossen und die Kämme in die Lösung gesteckt. Das Erstarren der Agarose muss abgewartet werden, die Kämme für die Taschen werden vorsichtig entfernt, dann wird das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben, so dass das Gel gerade mit Puffer überschichtet ist. Die DNA-Probe kann nun in die Taschen pipettiert werden. Der Lauf wird bei konstanter Feldstärke (5 V/cm Länge der Kammer zwischen den beiden Polen) durchgeführt.

Das Gel wird auf einem Transilluminator (TMW 20, Firma UVP) gelegt und die DNA-Fragmente werden mittels des in die DNA interkalierten, fluoreszierenden

Ethidiumbromids nachgewiesen, das mit UV-Licht angeregt wird. Zur Detektion von analytischen Gelen wird UV-Licht der Wellenlänge 254 nm eingesetzt. Soll die DNA noch weiter präparativ verwendet werden, wird UV-Strahlung der Wellenlänge 365 nm eingesetzt, dies verhindert Thymin-Dimerenbildung in der DNA. Das beleuchtete Gel wird mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die im UV-Licht sichtbaren Banden von Interesse werden aus dem Agarose-Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein vorher gewogenes Eppendorf-Gefäß überführt. Zur DNA-Extraktion wird das Qiagen Gel Extraction Kit verwendet. Am Ende wird die DNA entweder in 30 µl oder in 10 µl des mitgelieferten Elution Buffer (EB), in 1:5 verdünntem EB oder in H₂O aufgenommen.

2.2.6 Ligation von DNA Fragmenten

In einen 10 µl Ansatz werden 1 µl 10x Ligationspuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U), etwa äquimolare Mengen Insert und Vektor (mindestens 25 ng *sticky end*, 200 ng *blunt end*) eingesetzt und der Rest wird mit H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Reaktion wird mindestens 60 min bei 22 °C inkubiert, dann wird die Ligase durch 10 min bei 65 °C inaktiviert. Sollen *blunt end*-Reaktionen durchgeführt werden, wird derselbe Ansatz über Nacht inkubiert. Sollen intramolekulare Reaktionen verhindert werden, wie bei *blunt end*- oder zwei gleichen *sticky end*-Reaktionen innerhalb eines Fragments oder zweier gleicher Fragmente, so können entweder Vektor oder Insert mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert werden.

2.2.7 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Aus einer *E. coli* Gefrierkultur wird eine 2 ml ÜNK mit LB-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wird aus der ÜNK 0,5 %ig eine 50 ml LB-Kultur angeimpft. Diese wird bei 37 °C und unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0,45-0,5 erreicht ist. Danach wird die Kultur 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wird die Kultur abzentrifugiert (Megafuge 3400 rpm, bei 2000 g und 0 °C, 10 min). Der Überstand wird dekantiert und der Rest des Mediums mit einer Pipette abgenommen.

Das Pellet wird zunächst in 1 ml eiskaltem TFB-I-Puffer vorsichtig aufgenommen und resuspendiert. Dann werden noch einmal 6,5 ml eiskalter TFB-I-Puffer zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Zellen werden dann 1 h auf Eis

inkubiert. Die Zellsuspension wird noch einmal abzentrifugiert (BIORAD Megafuge 4800 rpm, bei 3000 g und 0 °C). Das Pellet wird in 2 ml eiskaltem TFB-II-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert (185). Die Zellsuspension wird in Gefäße auf Eis zu 100 µl aliquotiert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach können die Zellen bei –80 °C gelagert werden.

2.2.8 Hitzeschocktransformation kompetenter *E.coli* Zellen

Ein bei –80 °C gelagertes Aliquot kompetenter Zellen wird langsam auf Eis aufgetaut (20 min), dann werden ca. 20-50 ng (nach Ligation) des zu transformierenden oder 1 ng des zu retransformierenden Plasmids hinzugegeben. Es wird durch Rühren vorsichtig mit einer Pipettenspitze gemischt, aber nicht aufgezogen, und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird dann eine Minute bei 42 °C inkubiert, es werden 900 µl LB-Medium hinzupipettiert und der Ansatz 1 h bei 37 °C im HYBAID Inkubationsschrank (MWG BIOTECH) unter Rotation inkubiert. Anschließend werden entweder der gesamte Ansatz oder Verdünnungen (10 % und 90 %) auf LB-Platten, die ein geeignetes Antibiotikum enthalten, ausplattiert.

2.2.9 Konjugation: *Triparental Mating*

Der verwendete *P. denitrificans*-Stamm hat keine natürliche oder künstliche Kompetenz zur Aufnahme von Plasmiden. Es kann somit keine Transformation, wie oben beschrieben durchgeführt werden. Zur Einschleusung von Plasmiden in *P. denitrificans* wird deshalb die parasexuelle Konjugation genutzt.

Die verwendeten Plasmide und *E. coli*-Stämme verfügen jedoch nicht über die zur parasexuellen Konjugation benötigten *tra*-Gene. Diese Gene werden von einem sogenannten Helferstamm (*E. coli* MM294) zur Verfügung gestellt. Dieser Helferstamm verfügt über ein mobiles Plasmid (pRP4-7), das zunächst in den Donorstamm (DH5 α) transferiert, dort das Zielplasmid mobilisiert, das dann in den Akzeptorstamm (MK6: *bc*₁-Deletionsmutate) übertragen werden kann. Die drei Stämme werden in einer 1 ml ÜNK mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Am nächsten Tag werden 300 µl des MK6-Stammes mit je 100 µl der beiden *E. coli*-Stämme gemischt und in einer Tischzentrifuge (6000 rpm, 3 min, RT) abzentrifugiert. 400 µl des Überstands werden abgenommen, die Zellen in den restlichen 100 µl resuspendiert und dann auf eine antibiotikafreie LB-Platte als Tropfen übertragen. Die Platten werden dann 6 oder 18 h bei 32 °C inkubiert,

Material und Methoden

hierbei kommt es zur Konjugation. Im Anschluss wird der Tropfen mit einer Pipette aufgenommen und auf eine Rif/Km/Sm, Rif/Km/Gm²⁰ oder wenn zwei Plasmide in einen Stamm übertragen werden sollen auf Rif/Km/Sm/Gm²⁰-Platte übertragen. Es wird eine Verdünnungsreihe von 1:4 –1:32 hergestellt und ausplattiert.

Das Sm oder Gm²⁰ dient der Selektion der *P. denitrificans*-Zellen, die pRI2-, pEG400- oder pBBR1-MCS5-Derivate aufgenommen haben. Rif tötet *E. coli*-Zellen ab und Km selektiert auf die *P. denitrificans* Deletionsmutante MK6. Die Platten werden bei 32 °C über Nacht inkubiert. Daraus entstehende einzelne Klone werden gepickt und auf eine andere Platte mit denselben Antibiotika umgestrichen und wie oben beschrieben kultiviert.

2.2.10 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

In ein Eppendorf-Gefäß werden zunächst für einen 20 µl Ansatz 2 µl PNK 10x Reaktionspuffer, 4 µl 5 mM ATP-Lösung, 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase, 100 pmol des zu phosphorylierenden Oligonukleotids gemischt und mit destilliertem H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert und dann 10 min bei 70 °C inaktiviert.

2.2.11 Polymerase Chain Reaction

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR (186)) wird zur DNA-Amplifikation verwendet. Die verwendeten Polymerasen sind thermostabil, wodurch sie mehrere Reaktionszyklen im Thermocycler durchlaufen können, ohne dass nach dem denaturierenden Schritt frische Polymerase zugegeben werden muss. Ein Reaktionszyklus besteht aus dem denaturierenden Schritt bei 95 oder 98 °C, wodurch die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Der folgende Schritt dient dem *Annealing* kurzer Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz. Die Schmelztemperatur des Oligonukleotids wurde mit dem Programm Clone Manager *in silico* erstellt und analysiert, die Annealingtemperatur wurde als Faustregel zehn Grad niedriger gesetzt. Der im folgenden durchgeführte Elongationsschritt führt zur Verlängerung der Primer von 5'- nach 3'-Richtung durch die thermostabile Polymerase entlang des einzelsträngigen Templates. Dieser Schritt wird bei 72 °C durchgeführt.

Die Reaktion wird in einem HYBAID Thermocycler der Firma Omnicore durchgeführt. Die Zyklusanzahl und die Länge der einzelnen Schritte kann stark

Material und Methoden

variieren, abhängig von der Art der eingesetzten Polymerase (*Taq*: 1000 bp*min⁻¹, *Pfu*: 500 bp*min⁻¹, *Pwo*: 1000 bp*min⁻¹, Phusion: 3500 bp*min⁻¹) und von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Zur Amplifikation von Plasmid-DNA können 1-2 ng als Template dienen. Die Oligonukleotide werden in der Menge von je 25-50 ng eingesetzt. Für einen 50 µl Ansatz werden 2,5 U Polymerase und 100 µM dNTPs verwendet. Das verwendete Temperatur- und Zeitprotokoll wird an das verwendete Template und die Polymerase angepasst.

2.2.12 Gerichtete Mutagenese

In einem an die Quik-Change-Methode (Stratagene) angelehnten Protokoll können mit Hilfe eines oder mehrerer mutagener Oligonukleotide zielgerichtet Mutationen in ein Plasmid eingeführt werden. Hierzu wird eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt, in diesem Fall die DNA-Polymerasen *Pfu*, *Pwo* oder Phusion. Das Reaktionsgemisch aus 2,5 µl (im Fall der Phusion-Polymerase 5 µl da es sich um einen 5x DNA-Polymerase-Puffers handelt) des 10x DNA-Polymerase-Puffers, ca. 50 ng des Matrizenstrangs, 10 µl eines 2 mM Polydesoxynucleotidgemischs (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), je 200 pmol der mutagenen Primer, 2,5 µl einer 5 mM NAD⁺-Lösung, 1 µl (im Falle der Phusion-Polymerase 1 µl einer 1 zu 4 Verdünnung) der DNA-Polymerase, 1 µl Ampligase und 3 µl Wasser wird auf 95 °C erhitzt.

Hierbei trennt sich der parentale Matrizen-DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstrang-DNA-Moleküle (ssDNA) auf. Im Folgenden wird auf 55 °C abgekühlt, was zum *annealing* des mutagenen Primers an den parentalen ssDNA-Strang führt. Die Temperatur wird auf 72 °C angehoben, was zur Elongation des Primers und damit zur Vervollständigung des Plasmids zum Doppelstrang (ds) durch die Polymerase führt. Die thermostabile, NAD⁺-abhängige Ligase Ampligase[®] verknüpft dann das 3'-Ende des verlängerten Stranges mit dem 5'-Ende des Primers, womit das Plasmid geschlossen wird. Diese Schritte werden in einer zyklischen Folge 30mal wiederholt. Die Reaktion wird in einem HYBAID Thermocycler der Firma Omnigene durchgeführt.

| Zyklen | Schritt | Zeit [min] | Temperatur [°C] | Funktion |
|--------|---------|------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 1 | 1 | 95 | Trennung der dsDNA |
| 30 | 1 | 0:30 | 95 | Trennung der dsDNA |
| 30 | 2 | 0:20 | 55 | Annealing |

| | | | | |
|----|---|-----------------|----|-------------------------|
| 30 | 3 | nach Polymerase | 72 | Elongation und Ligation |
|----|---|-----------------|----|-------------------------|

Dem Ansatz wird im Anschluss 1 µl des Restriktionsenzym DpnI zugesetzt. Darauf folgt eine einstündige Inkubation bei 37 °C, hierauf wird der Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.2.13 DNA Sequenzierungen

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Scientific Research and Development GmbH (SRD GmbH) Köhlerweg 20 D-61440 Oberursel nach der Kettenabbruchmethode (187) durchgeführt.

2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

2.3.1 Analytische Membranpräparation

Zunächst wird eine 2 ml LB-Vorkultur des entsprechenden *P. denitrificans*-Stamm mit den benötigten Antibiotika bei 32 °C angezogen. Diese Vorkultur wird in einen 2 l-Kolben mit 200 ml Succinat-Medium überimpft und über Nacht bei 32°C und 250 rpm inkubiert.

Die Übernachtskulturen werden auf Eis abgekühlt. Die Zellen werden dann in einer Sorvall-Zentrifuge bei 6000 rpm und 4 °C in einem GS3-Rotor für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 5-10 mL 50 mM KP_i pH 7,10 mM EDTA resuspendiert. Zu den resuspendierten Zellen wird 100 µM Pefabloc SC gegeben. Zur Lyse der Zellen werden 0,1 mg/ml, Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Hiernach sollte die Lösung hochviskos sein, was durch die aus den lysierten Zellen stammende, genomische DNA verursacht wird. Zum weiteren Aufbrechen werden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es bilden sich Eiskristalle, die zur weiteren Zerstörung noch vorhandener Zellen und Zellteile dienen. Die Proben werden bei RT wieder aufgetaut. Anschließend werden sie mit einem Branson Sonifier 250 (duty cycle 30 %, output 40 %) für 5-10 min auf Eis beschallt, bis die Lösung nicht mehr viskos ist. Dies wird durch die Zerstörung der genomischen DNA beim Beschallen erreicht.

Die Lösung wird anschließend zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge SS34-Rotor in 10 ml-Röhrchen, 10 min bei 10000 rpm und 4 °C). Der Überstand wird in ein 10 ml-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und erneut abzentrifugiert (Beckman

Ultrazentrifuge Ti-70-Rotor 1 h, 35000 rpm bei 4 °C). Das entstandene Pellet enthält die Membranen. Das Pellet wird mit einem Spatel aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen, in ein Eppendorf-Cup überführt und mit einem Teflonstempel in 200 µl 20 mM KP_i pH 8, 1 mM EDTA, resuspendiert. Die Membranen werden in Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Membranpräparation im großen Maßstab

Größere Anzuchten von *P. denitrificans* werden wie oben beschrieben angesetzt. Diese werden dann bei einer OD_{600} von 3-5 auf Eis abgekühlt und die Zellen in einer Sorvall RC36 für 20 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die so pelletierten Zellen werden in 100-200 ml kaltem Puffer (100 mM KP_i , pH 8, 1 mM EDTA resuspendiert, anschließend werden die Zellen bei -80 °C eingefroren. Dies dient auch dem späteren Zellaufschluss. Die Zellen werden zum Aufschluss wieder aufgetaut und mit dem Proteaseinhibitor Pefabloc SC (Endkonzentration 100 µM) versetzt. Zum Aufschluss wird eine Manton-Gaulin-Pressen (APV Schröder, Lübeck), verwendet. Zunächst wird diese mit 1 l H_2O , anschließend mit 1 l 100 mM KP_i -Puffer pH 8 mit 1 mM EDTA gespült. Nach dem Einfüllen der Zellen wird der überschüssige Puffer abgepumpt, anschließend wird der Pumpenkreislauf geschlossen. Die Zellen werden nun 5 min bei 400 bar Druck aufgeschlossen. Die entstehende Wärme wird über eine Kühlspirale an ein Eisbad abgegeben. Die aufgeschlossenen Zellen werden abzentrifugiert (Sorvall RC36 Zentrifuge bei 5000 rpm für 15 min). Hierbei sedimentieren Speicherstoffe und große Zellfragmente.

Der Überstand wird über Nacht abzentrifugiert (Sorvallzentrifuge im GS 3 –Rotor bei 8000 rpm). Das entstandene Pellet besteht aus einem harten, weißen Kern aus Speicherstoffen, und einem weichen, roten Außenbereich, in dem die Membranen enthalten sind. Dieser Bereich wird mit einem Spatel abgenommen und in 50 mM MES/NaOH pH 6 mit 300 mM Saccharose mit Hilfe eines Ultra-Turax-Homogenisators resuspendiert. Die Membranen werden abermals sedimentiert (Beckmann UZ Ti 45-Rotor 1 h, 35000 rpm bei 4 °C). Aus dem entstandenen Pellet werden wiederum nur die Membranen entnommen und der speicherstoffhaltige weiße Kern verworfen. Die so gewonnenen Membranen werden in einem möglichst geringen Volumen 50 mM MES/NaOH pH 6 300 mM Saccharose resuspendiert, in Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

2.3.3 Periplasmapräparation zur Isolierung des Fv-Fragments

Die geernteten Zellen werden auf Eis gekühlt und in 30 ml eisgekühltem Periplasmapuffer pro 2 l Kulturmedium vorsichtig mit einer Glaspipette resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wird die Zellsuspension bei 5000 g abzentrifugiert, der erhaltene Überstand enthält das Periplasma. Diesem wird im Verhältnis 250:1 eine 10 mM Avidin-Stammlösung zugesetzt und im Folgenden für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Im Anschluss wird das Periplasma 30 min bei 4 °C und 17000 rpm in einem Sorvall SS34-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wird sterilfiltriert und kann bei -80 °C gelagert werden.

2.3.4 Solubilisierung von Membranen

2.3.4.1 Klassischen Isolierung des *bc*₁-Komplexes

Die Membranen werden aufgetaut und die Proteinkonzentration wenn möglich auf ca. 35 mg/ml mit *bc*₁-Membranpuffer eingestellt. Die Lösung wird mit 100 µM Pefabloc SC versetzt. Die verdünnten Membranen werden 1 h auf Eis solubilisiert (148). Es wird unter Rühren 1 Vol. 2x Solubilisierungspuffer zugesetzt, der die 1,2 fache Menge an DDM (w/w) relativ zur Menge an Gesamtmembranprotein enthält. Die Lösung wird bei 4 °C 1 h gerührt.

Das Solubilisat wird abzentrifugiert (Beckmann Ti 45 Rotor 35000 rpm, 1 h bei 4 °C). Der Überstand wird mit Verdünnungspuffer auf eine Salzkonzentration von 350 mM NaCl verdünnt und danach durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.4.2 Isolierung mittels Ni²⁺-NTA-Material des *bc*₁-Komplexes

Die Membranen werden aufgetaut und die Proteinkonzentration wenn möglich auf ca. 35 mg/ml mit *bc*₁-Membranpuffer eingestellt. Die Lösung wird mit 100 µM Pefabloc SC versetzt. Die verdünnten Membranen werden 1 h auf Eis solubilisiert (148). Es wird unter Rühren 1 Vol. 2x Solubilisierungspuffer Imidazol oder 2x Solubilisierungspuffer Histidin zugesetzt, der die 1,2 fache Menge an DDM (w/w) relativ zur Menge an Gesamtmembranprotein enthält. Die Lösung wird bei 4 °C 1 h gerührt.

Das Solubilisat wird abzentrifugiert (Beckmann Ti 45 Rotor 35000 rpm, 1 h bei 4 °C). Der Überstand wird durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.4.3 Isolierung mittels Streptactin-Material

Die Membranen werden aufgetaut und die Proteinkonzentration wenn möglich auf ca. 35 mg/ml mit *bc*₁-Membranpuffer eingestellt. Die verdünnten Membranen werden 1 h auf Eis solubilisiert (148). Es wird unter Rühren 1 Vol. 2x Solubilisierungspuffer mit Avidinzugesetzt, der die 1,2 fache Menge an DDM (w/w) relativ zur Menge an Gesamtmembranprotein enthält. Die Lösung wird bei 4 °C 1 h gerührt.

Das Solubilisat wird abzentrifugiert (Beckmann Ti 45 Rotor 35000 rpm, 1 h bei 4 °C). Der Überstand wird durch einen Faltenfilter filtriert.

2.3.5 Säulenchromatographie

Alle proteinchromatographischen Schritte werden bei 4 °C durchgeführt.

2.3.5.1 Klassische Isolierung des *bc*₁-Komplexes

Die Säule (DEAE-Sepharose CL-6B, ca. 250 ml, FPLC-Anlage: Pharmacia LKB) wird vor der Benutzung mit 4 Säulenvolumen (SV). Äquilibrationpuffer und mit 2 SV Niedersalzpuffer äquilibriert. Das Solubilisat wird auf die Säule aufgetragen (Flussgeschwindigkeit ca. 6 cm/h) und im Anschluss die Säule mit 1 SV Niedersalzpuffer gewaschen. Proteine, die nicht am Säulenmaterial binden, werden dabei entfernt.

Der *bc*₁-Komplex wird mit 6 SV eines Salzgradienten eluiert (350-600 mM NaCl). Das Elutionsprofil wird mit Hilfe einer optischen Einheit (Pharmacia Optical Unit UV-1, 280 nm) und einem Schreiber (Pharmacia Rec 102) aufgezeichnet. Die Elution der rötlichen *bc*₁-Komplex-Fraktion erfolgt ca. bei 420-450 mM NaCl. Die Fraktionen werden mit Redoxspektren und durch SDS-PAGE untersucht. Die Fraktionen, die nach Redoxspektren ein charakteristisches Spektrum und in der SDS-PAGE keine Verunreinigungs-banden aufweisen, werden vereinigt und mit Ultrafiltrationskammern (Satorius Vivaspin Ausschlussvolumen von 100 kDa) um einen Faktor von 150-200 eingeeengt.

2.3.5.2 Klassische Isolierung des *bc*₁-Komplexes im Kleinmaßstab

Es werden 500 µl mit Niedersalzpuffer voräquilibrierten Säulenmaterial (DEAE-Sepharose CL-6B) in einem Eppendorf-Gefäß bei 500 g sedimentiert. Der

Material und Methoden

Überstand wird abgenommen. Auf das Säulenmaterial wird 1 ml Solubilisat aufgegeben und 30 min so geschüttelt, dass das Säulenmaterial nicht sedimentiert. Danach wird es wieder bei 500 g sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Säulenmaterial zweimal mit je 1 ml mit Niedrigsalzpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wird der rötliche bc_1 -Komplex mit Hochsalzpuffer vom Säulenmaterial gewaschen, das Säulenmaterial sedimentiert und der entstandene Überstand abgenommen und kann so verwendet werden oder wird mit einem Spinkonzentrator (Ausschlussvolumen von 10 kDa) eingeeengt

2.3.5.3 Isolierung des bc_1 -Komplexes mittels Ni^{2+} -NTA-Material

Die Säule (Ni^{2+} -NTA-Superflow, ca. 20 ml, FPLC-Anlage: Pharmacia LKB) wird vor der Benutzung mit 4 SV Äquilibriumspuffer gewaschen und anschließend mit 2 SV Niederimidazol- oder Niederhistidinpuffer äquilibriert. Das Solubilisat wird mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Säule wird im Anschluss mit 1 SV gewaschen um ungebundenes Protein zu entfernen.

Der bc_1 -Komplex wird mit 5 SV eines Imidazol- (10-250 mM oder 10-200 mM Histidin)gradienten eluiert. Das Elutionsprofil wird mit Hilfe einer optischen Einheit (Pharmacia Optical Unit UV-1, 280 nm) und einem Schreiber (Pharmacia Rec 102) aufgezeichnet. Die Elution der rötlichen bc_1 -Komplex-Fraktion erfolgt ca. bei 150 mM Imidazol oder 80 mM Histidin. Die Fraktionen werden mit Redoxspektren und durch SDS-PAGE untersucht. Die Fraktionen, die nach Redoxspektren ein charakteristisches Spektrum und in der SDS-PAGE keine Verunreinigungsbanden aufweisen, werden vereinigt und mit Ultrafiltrationskammern (Satorius Vivaspin Ausschlussvolumen von 100 kDa) um einen Faktor von 150-200 eingeeengt.

2.3.5.4 Isolierung des bc_1 -Komplexes mittels Core-Streptavidin

Die Säule (Core-Streptavidin, 5 ml, Äkta Purifier, 0,5 ml/min) wird mit 6 SV Äquilibriumspuffer gewaschen. Das Solubilisat wird mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Säule wird im Anschluss mit 1 SV gewaschen um ungebundenes Protein zu entfernen. Der bc_1 -Komplex wird mit 2 SV des Elutionspuffers eluiert. Die Elution der rötlichen bc_1 -Komplex-Fraktion erfolgt in einem Schritt. Die Fraktion wird durch Redoxspektren und durch SDS-PAGE untersucht. Der Komplex wird in Ultrafiltrationskammern (Satorius Vivaspin Ausschlussvolumen von 100 kDa) um einen Faktor von 150-200 eingeeengt.

2.3.5.5 Isolierung des Fv-Fragments mittels Core-Streptavidin

Das Periplasma wird mit einer Flussrate von 0,7 ml/min auf eine 20 ml Sepharose Core-Streptavidin-Säule (MPI für Biophysik) geladen und das Profil mit Hilfe einer optischen Einheit (Pharmacia Optical Unit UV-1, 280 nm) und einem Schreiber (Pharmacia Rec 102) detektiert. Im Anschluss wird die Säule mit 1 SV Aufreinigungspuffer Fv gewaschen und im Weiteren mit 2 SV Aufreinigungspuffer mit 2,5 mM Avidin eluiert. Die erhaltene Fv-Fragment-Fraktion wurde ankonzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.3.6 Gelfiltration

Alle proteinchromatographischen Schritte werden bei 4 °C durchgeführt.

2.3.6.1 Standard-Gelfiltration

Das ankonzentrierte Protein wird zu analytischen Zwecken auf eine Säule (Superose 6 10/30, 24 ml, Flussrate 0,5 ml/min oder Superdex 200 10/30, 24 ml, 0,5 ml/min FPLC-Anlage: Pharmacia LKB) oder für präparative Zwecke auf eine Säule (Superose 6 25/400, 160 ml, Flussrate 2 ml/min FPLC-Anlage: Pharmacia LKB) geladen, welche mit Standardlaufpuffer voräquilibriert wird. Anschließend wird das Protein mit Laufpuffer eluiert und im Anschluss um ca. Faktor 10 ankonzentriert.

2.3.6.2 Gelfiltration für die FTIR-Spektroskopie

Die ankonzentrierten Proteinproben werden per Gelfiltrationschromatographie auf einer Sephadex G25-Säule (20 ml) in den FTIR-Laufpuffer äquilibriert. Im Anschluss werden die Proben um mindestens Faktor 10 mit Hilfe von Ultrafiltrationskammern (Satorius Vivaspin Ausschlussvolumen von 100 kDa) wieder ankonzentriert

2.3.6.3 Gelfiltration für die Kristallisation

Das ankonzentrierte und sterilfiltrierte Protein wird per Gelfiltrationschromatographie auf einer semipräparativen Säule mit vorgeschalteter Wächtersäule (TSK4000SW Gesamtvolumen von 30 ml, Äktasystem Purifier GE Healthcare, Flussrate 0,6 ml/min) in den Standard Laufpuffer für die Kristallisation, oder anwendungsgebunden in den Laufpuffer für die Kristallisation mit niedriger Pufferkapazität, überführt. Im Falle des chimären Proteins wird vorher das aufgereinigte Fv-Fragment im molaren Verhältnis von 1:1,25 zugegeben, 30 min auf

Material und Methoden

Eis inkubiert und der Co-Komplex im folgenden steriltrifriert. Anschließend wird der Lösung Stigmatellin in Ethanol (10 mM) zu einer Endkonzentration von 20 μ M zugesetzt und das Protein bis zu einer Konzentration von mindestens 40 mg/ml ankonzentriert.

2.3.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Lowry-Arbeitslösung muss frisch angesetzt werden, indem 20 ml Lowrylösung A, 0,5 ml Lowry-SDS-Lösung, 0,2 ml Lowrylösung B1 und 0,2 ml Lowrylösung B2 gemischt werden. Die Eichreihe wird aus einer 2 mg/mL BSA-Lösung hergestellt in den Verdünnungen 0/0,2/0,4/0,6/0,8/1,0/1,5 und 2,0 mg/mL. Eichreihe und Messproben werden auf 50 μ l mit Wasser aufgefüllt. 850 μ l der Arbeitslösung werden zu den Proben hinzupipettiert und gründlich gevortext. Die Proben werden für 10 min im Dunkeln inkubiert. Danach werden 100 μ l der Folinlösung hinzugegeben, gründlich gevortext und nochmals für 30 min im Dunkeln inkubiert. Auf Basis der Eichreihe und der Messwerte der Proben kann dann die Proteinkonzentration in der Eichreihe errechnet werden (188). Die Wellenlänge für die Messung liegt bei 750 nm Für die Eichreihe wurde eine lineare Regression verwendet.

2.3.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.3.8.1 Tricinsystem nach Schägger

Für die SDS-PAGE wird das System nach Schägger et al. verwendet. Dieses Gelsystem wurde speziell für die Auftrennung von Proteinen $M_r < 1-100$ kDa entwickelt [229]. Zur Herstellung eines 10 %igen Trenngels werden 2 ml Acrylamid, 3,5 ml H₂O, 3,3 ml Gelpuffer, 1 ml Glycerin, 20 μ l TEMED und 100 μ l APS gemischt und in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Nach der Polymerisation wird das Sammelgel, bestehend aus 0,5 ml Acrylamid-Lösung, 6 ml H₂O, 1,5 ml Gelpuffer, 20 μ l TEMED und 100 μ l 10 % APS darüber geschichtet. Die Lösung wird invertiert und dann zügig in die Elektrophoreseapparatur (Mini Protean II, BIORAD oder Harnischmacher) gegossen.

Die Membranproteinproben werden in Proteinprobenpuffer (Verhältnis mindestens Membranprotein zu Proteinprobenpuffer 1:1) aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Gelapparatur wird nach dem Polymerisieren des Gels in der

Material und Methoden

Elektrophoresekammer befestigt, der innere Teil mit Kathoden- und der äussere Teil mit Anodenpuffer befüllt. Die Taschen des Gels werden mit den Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze beladen. An das Gel werden 100 min lang 100 V konstanter Spannung angelegt.

2.3.8.2 Blau-Nativ-PAGE

Bei diesem Gelsystem wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine durch ihre native Größe und die Bindung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie-Blau geprägt; alle Proteine, die diesen Farbstoff binden, wandern bei pH 7,5 anodenwärts (189). Als Standard dienen die bekannten, aus Rinderherzmitochondrien solubilisierten Atmungskettenkomplexe, aufgereinigte Membranproteine bekannter Größe oder Nativgelmarker. Es werden 1 mm dicke Gele mit 3,5 % Sammelgel und einem 3,5 % → 13 % Gradiententrenngel verwendet. Die Gele werden mit einem Gradientenmischer bei RT unter Verwendung gekühlter Lösungen gegossen und bei 4 °C über Nacht auspolymerisiert.

Nach dem Beladen laufen die Gele zunächst bei einer Spannung von 100 V 30 min, danach bei 500 V 2 h bei 15 mA.

Für eine zweite, denaturierende Dimension wird die Bahn von Interesse als Streifen ausgeschnitten und auf ein Gel (10 % Nativgel, 10 % Tricin-Trenngel) übertragen. Das zweite Gel läuft mit 100 V analog zum Standard-Tricingel für 100 min.

2.3.9 Färbungen für Gele

2.3.9.1 Coomassie-Blaufärbung

Das Gel wird für 20 min in Coomassie-Färbelösung bei RT gelegt. Überschüssiger Farbstoff wird bis zum gewünschten Färbegrad mit Coomassier-Entferner ausgewaschen.

2.3.9.2 Silberfärbung

Das Gel wird nach dem Elektrophoreselauf für mindestens 2 h in Silberfixierlösung gelegt und bei RT langsam geschüttelt. Hierauf folgen drei Waschschriffe mit 50 %igem Ethanol jeweils für 20 min. Das Gel wird anschließend für 1 min in die Silbervorbehandlungslösung gelegt und im Folgenden dreimal für 20 s mit H₂O gewaschen. Die Silberfärbelösung wird dann zugegeben und das Gel für 20 min

Material und Methoden

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 20 s mit H₂O wird Silberentwicklungslösung zugegeben und so lange inkubiert, bis der gewünschte Färbegrad erreicht ist. Die Reaktion wird mit 50 mM EDTA pH 8 abgestoppt. Das Gel wird mit einem Epson Durchlichtscanner dokumentiert.

2.3.10 Westernblot (Nassblot)

In einer Kunststoffwanne werden 2 l Transferpuffer vorgelegt, in die Wanne werden dann von unten nach oben Kunststoffgitter, Filz, Filterpapier und das horizontal um 180° gedrehte Proteingel gelegt. Auf das Gel wird dann luftblasenfrei eine Nitrocellulosemembran (Whatman) gelegt und auf diese Filterpapier, Filz und Kunststoffgitter. Dieses mit Gummibändern fixierte „Sandwich“ wird in die Blot-Apparatur gestellt, so daß die Nitrocellulosemembran zwischen dem Proteingel und dem Pluspol der Apparatur zum Liegen kommt. Die Apparatur muss vollständig mit Transferpuffer gefüllt sein, dann werden für 1 h 400 mA Gleichstrom angelegt.

Anschließend wird das Sandwich herausgeholt und die Membran entnommen. Die Membran wird in Ponceau-Färbelösung 5 min angefärbt. Mit H₂O werden die überschüssigen Anteile der Färbelösung abgewaschen. Die Banden des Markers und die Bahnen werden mit einem Stift markiert. Die Membran kann nun noch auf einer Glasplatte mit einem Skalpell zurechtgeschnitten werden.

2.3.10.1 Behandlung und Färbung mit polyklonalem Erstantikörper

Die Membran wird für mindestens 30 min in NCS inkubiert. Dies soll späteres, unspezifisches Binden der Antikörper an der Membran verhindern („Blocken“). Das NCS wird von der Membran abgenommen. 20 ml frisches NCS mit Erstantikörper werden zugegeben und für mindestens 2 h oder über Nacht unter Schütteln inkubiert.

Die Membran wird dreimal mit jeweils 10 ml NCS für 10 min gewaschen. Dann wird der 1: 2000 verdünnte Zweitantikörper oder Protein A, die jeweils mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind, in 10 ml NCS zugegeben. Es wird für 2 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Membran für 10 min mit 10 ml frischem NCS, dann für 10 min mit 10 ml TBS-Triton und schließlich für 5 min mit 10 ml TBS gewaschen. Für die, durch alkalischen Phosphatase katalysierte Farbreaktion wird die Membran durch fünfminütige Inkubation in TMN-Puffer auf pH 9,5 gebracht. Der Puffer wird abgossen und die aus 10 ml TMN, 45 µl NBT und 45 µl BCIP

Material und Methoden

bestehende Färbelösung für einige Minuten bis Stunden aufgegeben und im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird mit 10 ml 50 mM EDTA pH 8 abgestoppt. Der Blot kann nun am besten in feuchtem Zustand eingescannt werden.

2.3.10.2 Behandlung und Färbung mit monoklonalem Erstantikörper

Die Membran wird zwei Mal mit TBS gewaschen für 10 min gewaschen und im Anschluss für 1 h in BSA-Lösung inkubiert. Die BSA-Lösung wird danach abgenommen, die Membran weiter zwei Mal mit TBS-TT und einmal mit TBS 10 min gewaschen. Hiernach wird der in TBS-BSA 1:1000 verdünnte anti-*penta* His-Antikörper aufgegeben und 1 h inkubiert. Anschließend werden die drei Waschschrte wie nach der BSA-Behandlung wiederholt. Nach dem verdünnen des *goat anti mouse* IgG-AP Konjugates 1:5000 in TBS-BSA, wird die Lösung für 1 h mit der Membran inkubiert. Die Lösung wird abgegossen und die aus 10 ml TMN, 66 µl NBT und 33 µl BCIP bestehende Färbelösung für einige Minuten aufgegeben und im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird mit 10 ml 50 mM EDTA pH 8 abgestoppt. Der Blot kann nun am besten in feuchtem Zustand eingescannt werden.

2.3.10.3 Behandlung und Färbung mit Streptavidin / AAP-Konjugat

Die Membran wird für mindestens 30 min in NCS mit 10 µg/ml Avidin inkubiert. Dies soll späteres, unspezifisches Binden der Antikörper an der Membran und an biotinylierte Proteine verhindern („Blocken“). Die Lösung wird von der Membran abgenommen. 20 ml frisches NCS mit Streptavidin/AAP-Konjugat werden zugegeben und für 30 min unter Schütteln inkubiert. In diesem Fall wird kein Zweitantikörper verwendet und es wird mit dem Waschen und Färben analog zum Westernblot mit polyklonalem erstantikörper fortgefahen.

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Enzymaktivitätstests

Zur Aktivitätsmessung des Cytochrom *bc*₁-Komplexes wird die Absorptionsänderung bei 550 nm, entsprechend der Änderung des Redoxzustands des Cytochrom *c* im UV/VIS Spektrometer verfolgt. Als Elektronenakzeptor wurde hier das Cytochrom *c* aus Pferdeherz verwendet, anstatt des angenommenen, nativen, membrangebundenen Cytochrom *c*₅₅₂ (20). Der Elektronendonator für diese

Material und Methoden

Messungen, Decylchinon, wurde vorher reduziert und als Analogon des nativen Ubihydrochinons verwendet.

2.4.1.1 Reduktion des Decylubichinons

Zur Reduktion des Substrats werden 50 mg Decylchinon in 3 ml Ethanol gelöst und mit 1,0 ml H₂O versetzt. Man erhält eine intensiv, gelbe Lösung. Es werden 100 µl 1 M HCl zur pH-Wert Einstellung zugegeben. Anschließend wird durch vorsichtige, kristallweise Zugabe von KBH₄ das Decylchinon reduziert, die zuvor gelbe Lösung schlägt nach farblos um und die Lösung zeigt Gasentwicklung. In 20 µl-Schritten wird weiter 1 M HCl zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Dies dient dem Verbrauch des überschüssigen KBH₄. Der pH-Wert wird mit Indikatorpapier überprüft und muss unter pH 4 liegen.

Es werden 2 ml H₂O zugegeben und danach die Lösung dreimal mit je 5 ml Cyclohexan ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt und noch 2x mit je 2 ml H₂O ausgeschüttelt. Die organische Phase wird in Aliquots von je 150 µl in 500 µl Eppendorf-Gefäße gefüllt. Das Lösungsmittel wird in der SpeedVac bis zur Trockne abrotiert. Die Aliquots werden mit Stickstoff überschichtet und bei -80 °C gelagert. Das reduzierte Decylubihydrochinon wird in ca 40-60 µl Ethanol/100 µM HCl zu einer 50 mM Lösung aufgenommen.

Nach Aufnahme eines Spektrums in 100-300-facher Verdünnung wird das Decylubihydrochinon mit wenigen Mikroliter frischer 1 M NaOH-Lösung oxidiert und erneut gemessen. Im Differenzspektrum lässt sich anhand des Absorptionsmaximums bei 275 nm ($\epsilon_{275, \text{oxred}} = 12,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Konzentration an Decylubihydrochinon bestimmen (190, 191).

2.4.1.2 Messungen

Die Aktivität des *bc*₁-Komplexes kann durch die Steigung der Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm verfolgt werden. In eine 1 ml Küvette wird 1 ml des Messpuffers pipettiert, 10 µl einer 2,5 mM Pferdeherzcytochrom *c*-Lösung, und 2 µl der oben erwähnten Decylubihydrochinonlösung (ca.80 µM). Wenn das Spektrometer eine stabile Basislinie zeigt, werden aufgereinigter *bc*₁-Komplex oder Membranen in einer Verdünnung zugegeben, dass sich eine Absorptionsänderung von 40-120 mOD*min⁻¹ ergibt. Die anfängliche Absorptionsveränderung wird über

einen Zeitraum von 10 s gemittelt und die Steigung durch lineare Regression ermittelt.

2.4.1.3 Redoxspektren

Redoxspektren können am aufgereinigten Protein direkt durchgeführt werden. Für die Analyse von Membranen müssen diese erst solubilisiert werden. Dies geschieht durch die Aufnahme der Membranen in Spektrenpuffer, der im Verhältnis 20:1 mit 25 % Triton X-100 zunächst gemischt wird. Die Proteinendkonzentration entspricht dann 2,5 mg/ml. Der Ansatz wird dann gevortext und zentrifugiert (30 min bei 4 °C in Heraeus Tischzentrifuge bei 13000 rpm). Hierbei setzt sich die nicht solubilisierten Bestandteile ab und das solubilierte Protein kann vermessen werden.

Die Probe wird in eine Glasküvette überführt und der bc_1 -Komplex mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in den oxidierten Zustand überführt. Das Spektrum des oxidierten Komplexes wird im Hitachi U-3000 Photometer zwischen 500-650 nm als Basislinie aufgenommen. Dann wird die Probe mit Natriumascorbat, zur differentiellen Reduktion von c-Typ Hämen, und oder Natriumdithionit, zur Reduktion der gesamten Proteinbestandteile, reduziert und ein Spektrum im selben Wellenlängenbereich aufgenommen. Dies führt zu einem charakteristischen Redoxspektrum, aus dem der Häm-Gehalt der Probe durch Bildung der Differenz der Intensitäten der Wellenlängen, charakteristisch für die jeweiligen Häme, bestimmt werden kann. Typischerweise werden die α - und β -Banden zwischen 500 und 650 nm ausgewertet.

| Protein | Häm | Wellenlänge λ [nm] | Extinktionskoeffizient ϵ [mM ⁻¹ cm ⁻¹] | Quelle |
|--------------------|----------------|-------------------------------|---|-----------------|
| Cyt b | b | 560-574 | 28,5 / 29,3 | (179, 192) |
| Cyt c | c | 550 | 19,4 | (193) |
| Cyt c ₁ | c ₁ | 553-540 | 20,1 / 23,2 | (194)/ (179) |

2.5 Proteinkristallisation

Die Proteinkristallisation wurde in Klimazellen oder –schränken bei 4, 10, 18 oder 30 °C durchgeführt. Es kam die Dampfdiffusionmethode im *sitting* und *hanging drop* zum Einsatz.

2.5.1 Silanisierung von Deckgläsern

Zunächst wurde eine 2 %ige Dichlormethylsilan-Silanisierungslösung in n-Hexan hergestellt. In einem Becherglas wurden die vereinzelt Deckgläser mit der Silanisierungslösung überschichtet und im Anschluss 20 min inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Deckgläser mit technischem Ethanol 10 min gewaschen. Schließ wurden die Deckgläser einzeln getrocknet, über Nacht oder im Stickstoffstrahl.

2.5.2 Herstellung von Kristallisationslösungen

Alle Kristallisationslösungen wurden mit steril filtriertem, vollentsalztem Wasser mit einer Leitfähigkeit von unter 0,05 μS und Chemikalien mit mindestens *p. a.* Qualität angesetzt. Nach ansetzen der Lösungen wurden diese nochmals steril filtriert um eventuelle Schwebeteilchen zu entfernen.

2.5.3 Kristallisationsansätze

Proteinlösungen aufgereinigt aus *P. denitrificans*-Stämmen welche das Plasmid pTK7 oder pTK47 tragen wurden direkt nach der oben unter Gelfiltration zur Kristallisation (2.3.6.3) angegebenen Prozedur in Kristallisationsexperimenten eingesetzt.

Das, aus dem das pMC1-Plasmid tragenden MK6-Stamm, aufgereinigte Protein wurde ebenfalls wie oben beschrieben direkt eingesetzt, jedoch auch in einer Verdünnung von mindestens 1:1 mit Kristallisationspuffer.

Erste Screenings wurden unter Verwendung der beiden oben genannten Kristallisationsroboter bei einer Tropfengröße von 200 oder 600 μl im Verhältnis 1:1 der Protein- und der Präzipitationslösung auf 96 well-Platten (Greiner) mit einem Präzipitationslösungsreservoirvolumen von 100 μl pipettiert.

Größere Tropfen wurden durch mischen in den Verhältnissen 1:1, 2:1 und 1:2 der Protein- mit der Präzipitationslösung in Größen von 2-5 μl über einem Präzipitationslösungsreservoir von 1 ml unter Verwendung von 24 well-Platten (Nextals oder Greiner) erhalten.

Entstandene Kristalle wurden mit Hilfe von *mounted cryo loops* (5-10 μm , 10-20 μm , Hampton Research) geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden in vier Teilbereichen dargelegt, wovon jeweils zwei aus den Struktur- (Abschnitt 3.1 und 3.4) und zwei aus den Funktionsuntersuchungen (Abschnitt 3.2 und 3.3) resultieren.

3.1 Kristallisation

Das Ziel dieses Teilbereiches ist, den Cytochrom bc_1 Komplex von *P. denitrificans* in einer für die Strukturaufklärung geeigneten Form zu kristallisieren. Hierzu lagen beide verwendeten Proteinkomplexe mit den nachfolgend beschriebenen gentechnischen Anpassungen und nicht als der Wildtyp vor.

3.1.1 Chimärer Cytochrom bc_1 Komplex mit modellierter Antikörper-Bindungsstelle

Der verwendete chimäre Cytochrom bc_1 Komplex wurde in einer vorangegangenen Arbeit (169) erzeugt und charakterisiert. Das Fv-Fragment 18E11 soll hier eingesetzt werden, da es bereits zur Kristallisation des Cytochrom bc_1 Komplexes aus *S. cerevisiae* verwendet wurde (74). Ein zur Cokristallisation geeignetes Fv-Fragment gegen den Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans* konnte in vorangegangenen Arbeiten nicht erzeugt werden (195), weshalb der umgekehrte Weg der Modellierung der Bindungsstelle gewählt wurde. Die Bindung des Fv-Fragments an den chimären Komplex konnte bereits an genannter Stelle gezeigt werden. In der erwähnten Arbeit wurden drei verschiedene Anpassungen zur Erlangung eines geeigneten, Fv-bindenden Komplexes erzeugt. Von diesen drei wurde nur der „S.c.-hinge“ Komplex in dieser Arbeit weiterverwendet, da er die stärkste Bindung an das zu verwendende Fv-Fragment 18E11 zeigt.

Der „S.c.-hinge“ Komplex weist einen Austausch der löslichen Domäne und der hinge-Region, die die lösliche Domäne und den N-terminalen, transmembranen Teil verbindet, auf. Dieser Komplex wird im Folgenden nur noch als chimärer Cytochrom bc_1 Komplex bezeichnet.

Ergebnisse

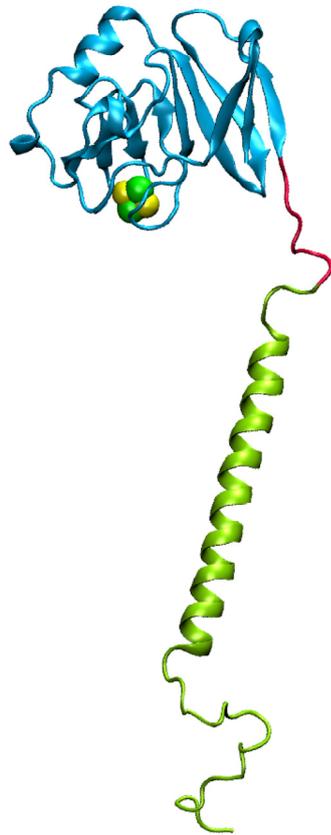


Abbildung 5: Einzelnes ISP aus der *S. cerevisiae* Struktur (1ezv). In grün dargestellt der N-terminale Bereich mit dem Membrananker, in rot die sogenannte „hinge“-Region, welche die Beweglichkeit der in cyan dargestellten, hydrophilen, redoxaktiven Kopfgruppe erlaubt. Sie trägt das Eisen-Schwefel-Cluster (van-der-Waals-Darstellung, Schwefel in gelb, Eisen in grün).

3.1.1.1 Konstruktion eines Codon-optimierten ISP-Gens

Die Expression des *in trans* eingebrachten chimären Cytochrom bc_1 Komplexes ist im Vergleich zum ebenfalls *in trans* eingebrachten Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex deutlich geringer. Sie beträgt etwa 0,25 mg/l Kulturmedium berechnet auf der Grundlage der Ausbeute nach der ersten Chromatographie, wohingegen der Wildtyp bei etwa 1,5 mg/l Kulturmedium liegt. Da für die Kristallisationsexperimente größere Mengen des aufgereinigten Komplexes zur Verfügung stehen mussten, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Expression zu steigern. Da für den homologen Wirt *P. denitrificans* kein Überexpressionssystem existiert und diese Methode bei Membranproteinen oft nicht zielführend ist, wurde hier ein anderer Weg beschritten.

Ergebnisse

Der chimäre Komplex wurde in einer vorangegangenen Arbeit erzeugt, indem das auszutauschende DNA-Stück der genomischen *S. cerevisiae*-DNA amplifiziert und in das *fbc*-Operon von *P. denitrificans* subkloniert wurde.

Zu diesem Zeitpunkt wurde keine Anpassung der Codonnutzung vorgenommen. Stichpunktartige Betrachtungen der Codonverwendung zeigen jedoch, dass viele Codons aus *S. cerevisiae* und *P. denitrificans* eine stark unterschiedliche Verwendungshäufigkeit aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass es im Zielorganismus möglicherweise zu einem Engpass der entsprechenden beladenen t-RNAs kommt, da diese nur in sehr geringer Kopienzahl vorliegen. Dies kann, neben weiteren Faktoren, für eine herabgesetzte Expression des Rieskeproteins und damit für eine geringere Menge des assemblierten chimären Cytochrom *bc*₁ Komplex verantwortlich zeichnen. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wird nach eingehender Analyse des Genabschnitts durch eine Fremdfirma (GENEART, Regensburg, Deutschland) unter Verwendung des GeneOptimizer® ein DNA-Fragment synthetisiert, welches an die Codonnutzung von *P. denitrificans* angepasst war.

Zur Subklonierung des synthetischen Gens wird am Anfang der Gen-Sequenz eine Aat II- und am Ende eine Stu I-Restriktionsschnittstelle festgelegt, die durch den Prozess der Codonanpassung nicht verändert werden durften. Diese Schnittstellen sind bereits in der Sequenz vorhanden. Mit Hilfe dieser beiden im verwendeten Expressionsplasmid (pTK7) einzigartigen Restriktionsschnittstellen kann das Fragment subkloniert werden. Es wird das neue Expressionsplasmid (pTK47) nach Transformation, Selektion auf Streptomycin und Reisolierung erhalten. Das Plasmid wird per Restriktionsanalyse überprüft und der Anfang des angepassten, chimären *fbc*-Operons in diesem Plasmid durch Sequenzierung verifiziert. Der dieses Plasmid tragende *E. coli*-Stamm kann erfolgreich einem triparentalen Mating mit dem *P. denitrificans*-Stamm MK6 als Empfänger unterzogen werden. Der Erfolg des Matings, somit die Übertragung des Expressionsplasmids, wird hiernach durch Isolierung der DNA und anschließende Restriktionsanalyse mit BstXI gezeigt. Dieser Stamm wird TK47 genannt.

Ergebnisse

3.1.1.2 Biochemische Charakterisierung des Codon-optimierten chimären Komplexes

Der Stamm TK47 wird zunächst in einer Anzucht im kleinen Maßstab zur Überprüfung angezogen, die Membranen isoliert und Redoxspektren und Westernblots angefertigt. Die Abbildung 6 zeigt ein charakteristisches Redoxspektrum der Membranen von *P. denitrificans* im Bereich der Wellenlängen von 500-650 nm.

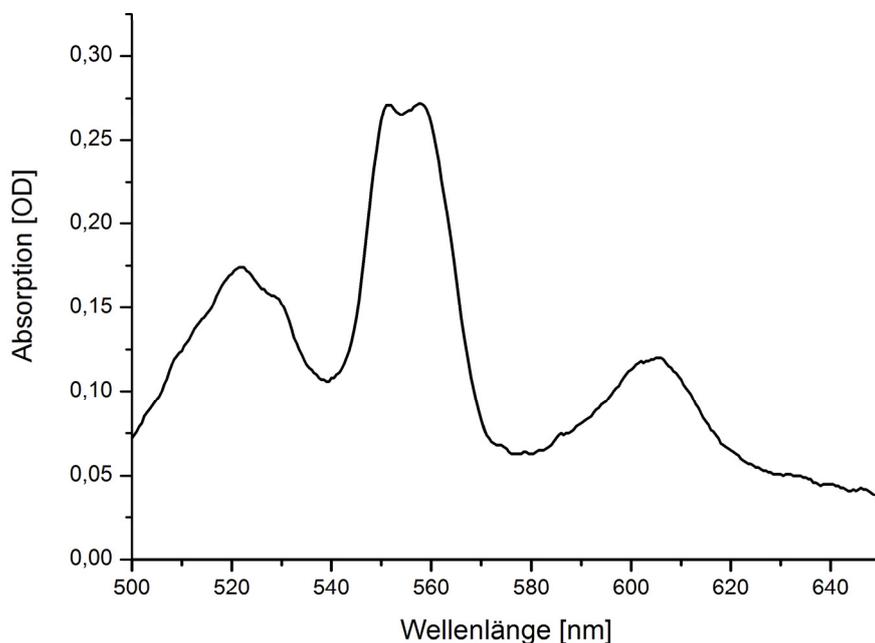


Abbildung 6: Redoxspektrum der solubilisierten Membranen des Stammes TK47

Das Maximum bei 550 nm entspricht der α -Bande der *c*-Typ Häm, die in Membranen von *P. denitrificans* in großer Zahl vorkommen, jedoch hier zu signifikanten Teilen vom membrangebundenen Cyt c_{522} und dem Cytochrom bc_1 Komplex stammt. Der Peak bei 560 nm zeigt die α -Bande der *b*-Typ Häm, die unter diesen Expressionsbedingungen zu großen Teilen vom Cytochrom bc_1 Komplex stammen, jedoch auch von der cbb_3 - oder der ba_3 -Oxidase Beiträge enthalten kann. Der Peak bei 605 nm kann den *a*-Typ Hämen zugeordnet werden, wobei der maßgebliche Beitrag von der aa_3 -Oxidase stammt.

Ergebnisse

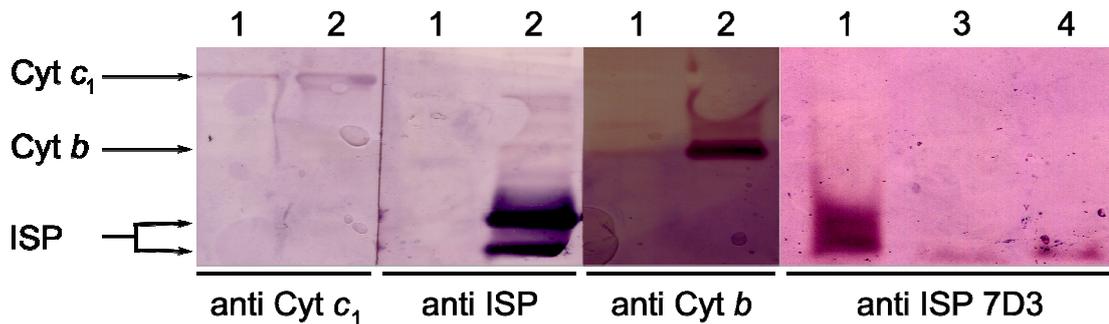


Abbildung 7: Westernblots der Membranen des Stammes TK47. Es wurden vier Antikörper verwendet: polyklonaler anti Cyt c_1 Antikörper, anti ISP Antikörper, anti Cyt b Antikörper, monoklonaler anti ISP (*P. denitrificans*) Antikörper (7D3).

- 1 chimäre Cytochrom bc_1 Komplex in Membranen (Stamm 47)
- 2 Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex in Membranen
- 3 Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex mit His-tag in Membranen
- 4 Membranen eines Stammes, der das Wildtyp *fbc*-Operon *in trans*

Die Westernblots der Membranen zeigen die drei Untereinheiten des Komplexes, das Cytochrom b , das Cytochrom c_1 und das Rieske-Protein. Das Rieske-Protein kann allerdings nur mit dem monoklonalen Antikörper 7D3 (196) dargestellt werden, da dieser auf der periplasmatischen Seite der α -Helix, direkt unterhalb der *hinge*-Region bindet. Diese Region entspricht noch der Originalsequenz aus *P. denitrificans* und nicht der *S. cerevisiae*-Sequenz. Auf einem Westernblot mit dem polyklonalen Antikörper anti ISP kann der chimäre Komplex nicht sichtbar gemacht werden (siehe Abschnitt 1.3.1, Abbildung 4), da dieser Antikörper vermutlich den hydrophilen Teil des ISP erkennt.

Weiter wurde die Enzymaktivität des Komplexes in den Membranen bestimmt, um die Charakterisierung zu vervollständigen. Die spezifische Aktivität errechnet sich als Mittelwert aus einer Serie von sechs Messungen. Da es sich bei der Probe um eine Membranpräparation handelt, kann nur die Aktivität bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration (25,5 mg/ml) angegeben werden. Der Anteil des chimären Cytochrome bc_1 Komplexes zur Gesamtproteinmenge kann zwischen verschiedenen Anzuchten stark variieren.

Der ermittelte Wert für die spezifische Aktivität (37 nmol cyt c /(mg*min)) liegt im Bereich wie der Wert für den aus Stamm TK7, der in der vorangegangenen Arbeit ermittelt wurde (~50 nmol cyt c /(mg*min)).

Ergebnisse

3.1.1.3 Aufreinigung des Cytochrom bc_1 Komplexes

Die Solubilisierung und Aufreinigung des chimären Cytochrom bc_1 Komplexes aus Membranen des Stammes TK47 erfolgt durch die Aufreinigung, wie oben beschrieben, mittels Bindung an eine Ionenaustauschersäule, in diesem Fall mit der funktionellen Gruppe DEAE. Durch Elution unter Verwendung eines Salzgradienten wird ein Peak bei 440 mM Natriumchlorid erhalten.

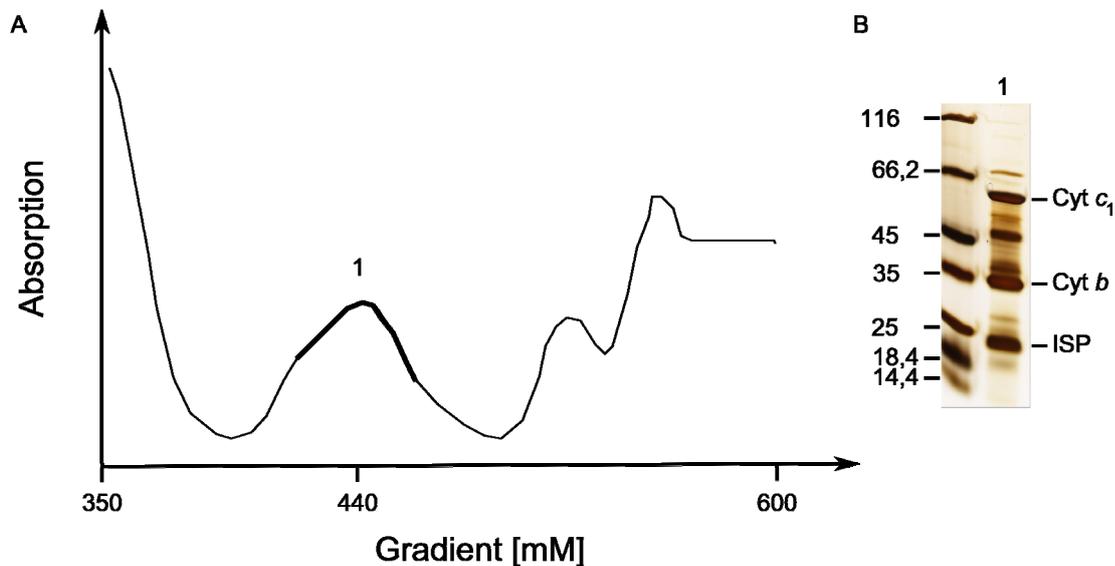


Abbildung 8: Aufreinigung des chimären Cytochrom bc_1 Komplexes

A) Elutionsprofil des chimären Cytochrom bc_1 Komplexes aus Stamm TK47 von einer DEAE-Sepharosechromatographie-Säule im präparativen Maßstab.

B) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung) des ankonzentrierten, markierten Bereichs 1

Die Fraktionen des Peaks 1 werden gesammelt, durch eine SDS-Gelelektrophorese überprüft und anschließend in Ultrafiltrations-Konzentratoren bis zu einer Konzentration von 100-200 μ M ankonzentriert. Im Anschluss wird das aufgereinigte Protein mit SDS-Gelelektrophorese und Redoxspektrum untersucht.

Die in Abbildung 8B gezeigte SDS-Gelelektrophorese lässt eine deutliche Anreicherung des Komplexes erkennen und weist nur noch wenige Verunreinigungen auf.

Ergebnisse

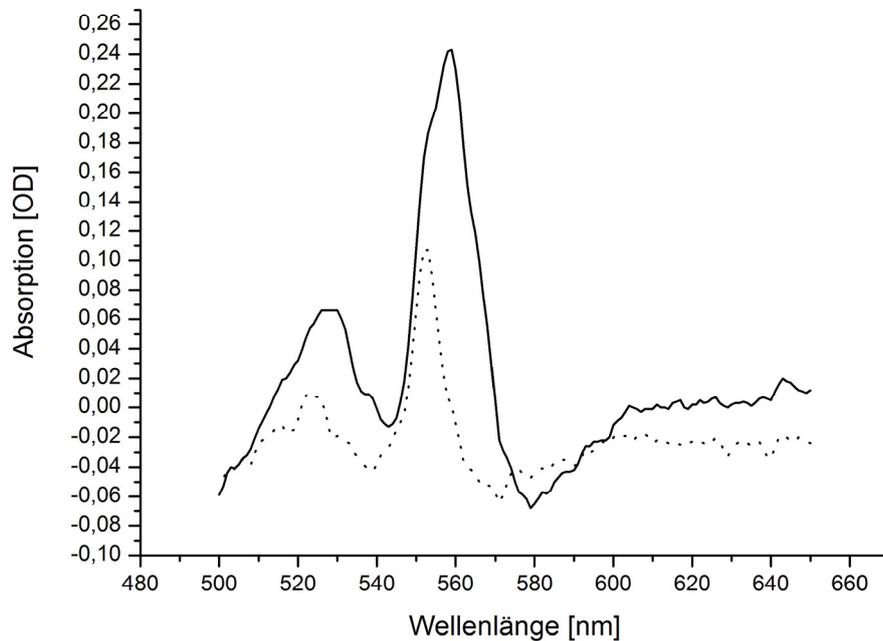


Abbildung 9: Redoxspektren des aufgereinigten, chimären Cytochrom bc_1 Komplex aus Stamm TK47. Die gepunktete Linie entspricht der Reduktion mit Ascorbat, die durchgezogene Linie der Reduktion mit Dithionit.

Das Redoxspektrum zeigt ein typisches Cytochrom bc_1 Komplexspektrum mit dem charakteristischen Hauptpeak bei 560 nm und einer Schulter bei 553 nm. Der Hauptpeak wird alleine durch Cyt b verursacht und die Schulter durch Cyt c_1 . Im Vergleich zu dem Membranredoxspektrum oben (siehe Abbildung 3) ist kein Maximum mehr bei 605 nm zu erkennen. Die Cytochrom aa_3 -Oxidase konnte neben vielen weiteren Proteinen erfolgreich entfernt werden, so dass im gezeigten Bereich des Spektrums keine weiteren Verunreinigungen mehr vorliegen.

Die Wechselzahl für diesen Komplex wird ebenfalls bestimmt. Die ermittelte Wechselzahl (13 s^{-1}) liegt ebenfalls im Bereich der des Komplexes, der aus dem Vorgängerstamm TK7 isoliert wurde (3 s^{-1}). Unter diesen Bedingungen erreicht der Wildtypkomplex eine Wechselzahl von $\sim 300 \text{ s}^{-1}$.

3.1.1.4 Aufreinigung des Fv-Fragments

Fv-Fragmente bestehen aus den beiden variablen Polypeptidenketten-Teilen eines Antikörpers, der leichten und der schweren Kette, die nicht kovalent verknüpft sind.

Ergebnisse

Das Fv-Fragment enthält neben der Sequenz für den Streptavidin-*tag* auch eine Signalsequenz (*pefB*) für den Export in das Periplasma von *E. coli*. Das pASK-Derivat (196) ist ein induzierbares Plasmid, das erst nach Zugabe von IPTG zur Expression des Fv-Fragments in *E. coli* führt. Die Zellen werden bei 22,5 °C angezogen, da bei höheren Temperaturen das im Periplasma exprimierte Fv-Fragment instabil ist.

Dieses Fv-Fragment wurde, wie oben erwähnt, bereits erfolgreich zur Co-Kristallisation des *S. cerevisiae* Cytochrome *bc*₁ Komplexes verwendet. Das Fv-Fragment wird im Unterschied zur Kristallisation der Oxidase (168) jedoch nicht zur Aufreinigung des Cytochrom *bc*₁ Komplexes verwendet, sondern, analog dem Komplex aus *S. cerevisiae* (74), erst dem aufgereinigten Komplex zugesetzt, da die leichte Kette durch einen langen Aufreinigungsprozess verloren geht.

Das Fv-Fragment wurde mittels des an der schweren Kette angebrachten Streptavidin-*tag* durch Bindung an Streptactin-Sepharose nach dem oben (Abschnitt 2.3.5.5) beschriebenen Protokoll aus dem Periplasma (Abschnitt 2.3.3) isoliert. Nachdem das Periplasma auf die Säule geladen wurde, wird sie mit Aufreinigungspuffer Fv gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder fast bis auf die Basislinie abgefallen ist (~ 1 Säulenvolumen). Dies ist abhängig vom verwendeten Periplasma. Im Anschluss wird das Fv-Fragment mit ~ 2 Säulenvolumen Aufreinigungspuffer Fv, dem 2,5 mM Desthiobiotin zugesetzt werden, eluiert.

Ergebnisse

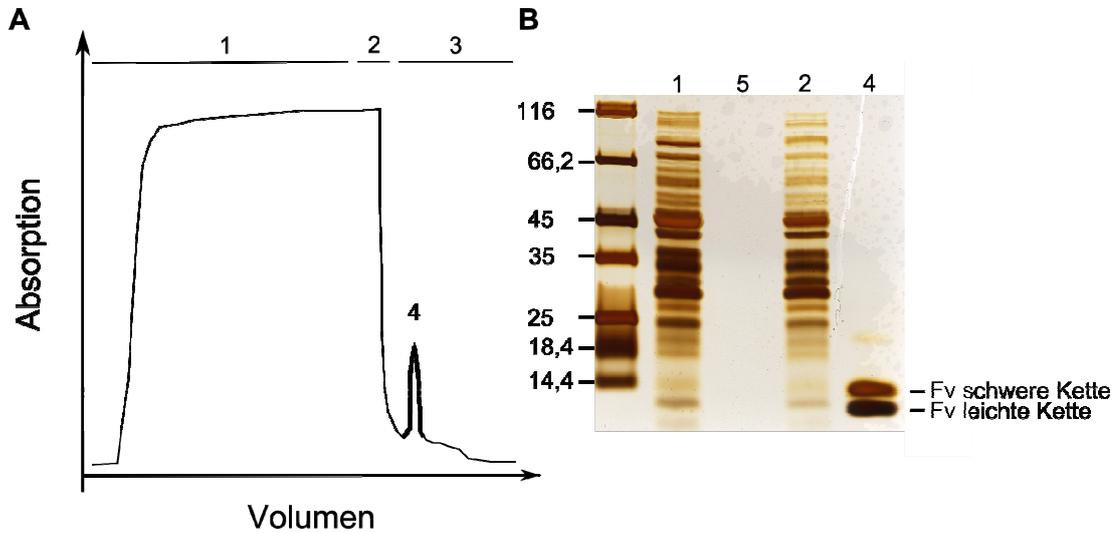


Abbildung 10: Aufreinigung des Fv-Fragments 18E11.

A) Elutionsprofil des Fv-Fragments 18E11 von Streptactin-Sepharosesäule;

B) SDS-Gelelektrophorese (10 % Tricin-Gel, Silberfärbung) der Fv Fragmentaufreinigung.

- 1 Säulendurchlauf
- 2 Waschschritt
- 3 Elution
- 4 Fv-Fragment
- 5 Konzentrator durchlauf

Das Elutionsprofil zeigt nur einen Peak, der, wie auf der nebenstehenden SDS-Gelelektrophorese deutlich wird, nur aus den beiden Polypeptidketten des Fv-Fragments besteht. Das Fv-Fragment (Peak 4) wird im Anschluss mit einem 2,5 ml Ultrafiltrationskonzentrator (10 kDa cut-off) ankonzentriert und zur Bindung an den chimären Cytochrom bc_1 -Komplex verwendet.

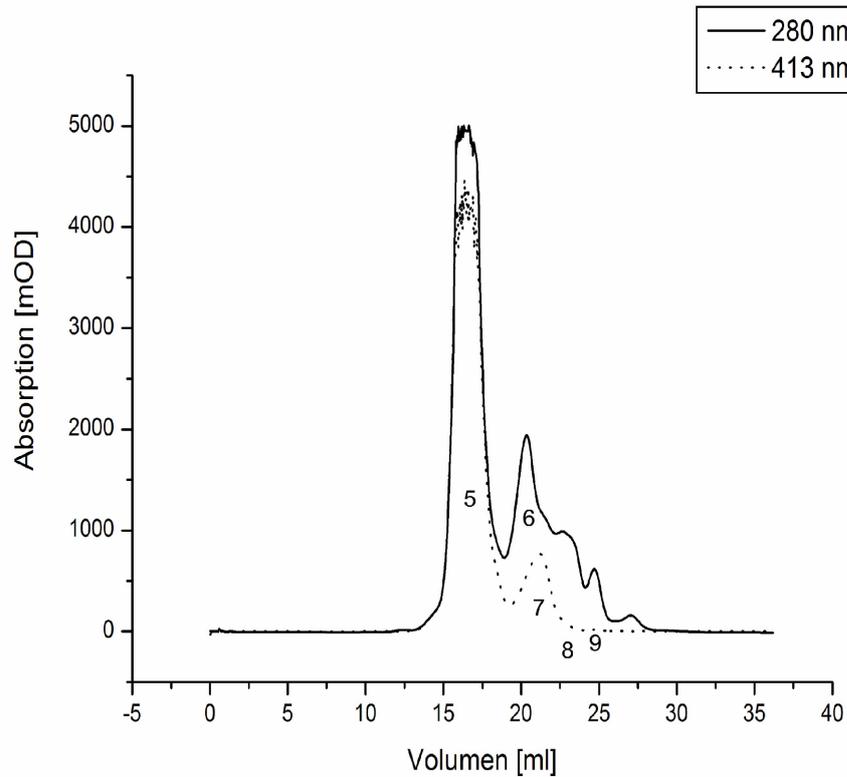
Ergebnisse

3.1.1.5 Gelfiltrationsuntersuchungen

Die Gelfiltration wird mit den beiden isolierten chimären Cytochrom *bc₁* Komplexen unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Abschnitt 2.3.6.3). Zunächst wird das Fv-Fragment mit dem chimären Komplex im molaren Verhältnis 2:1 (2 mg:4 mg) bezogen auf das Monomer des Komplexes gemischt, auf 1 ml Volumen mit Laufpuffer eingestellt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit bindet das Fv-Fragment die hydrophile Domäne des Rieske-Proteins, und es bildet sich der so genannte Co-Komplex. Danach wird die Probe sterilfiltriert, anschließend auf eine semipräparative TSK4000 Gelfiltrationssäule aufgetragen und, wie oben beschrieben, mit 1,5 Säulenvolumen eluiert.

Ergebnisse

A



B

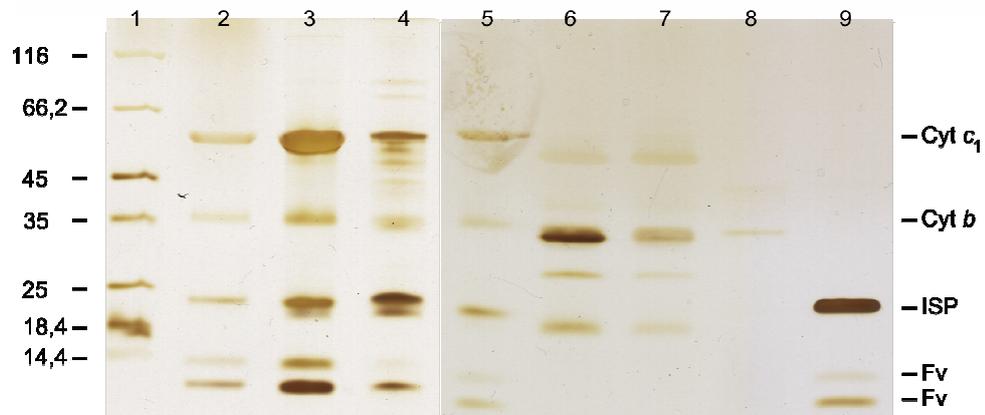


Abbildung 11: Gelfiltration des Cytochrom bc_1 Komplexes aus Stamm TK7 mit gebundenem Fv-Fragment einer TSK4000-Säule

A) Elutionsprofil;

B) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung) der Säulenchromatographie.

- 1 Co-Komplex
- 2 ankonzentrierter Hauptpeak
- 3 vereinigter Hauptpeak mit Stigmatellin versetzt
- 4 Cytochrom bc_1 -Komplex vor Co-Komplexansatz
- 5 Hauptpeak
- 6-8 Zerfallsprodukte und Verunreinigungen
- 9 Rieske-Protein mit gebundenem Fv-Fragment

Ergebnisse

Der eluierte Hauptpeak ist deutlich sichtbar (Abbildung 11, A 5) und enthält die Hauptproteinmenge, den Co-Komplex. Die vereinigten, mit Stigmatellin versetzten und ankonzentrierten Fraktionen zeigen in der SDS-Gelelektrophorese nur die Banden des Komplexes und des Fv-Fragments (Abbildung 11, B 3). Weiterhin ist eine minimale Schulter in der aufsteigenden Flanke des Hauptpeaks zu erkennen, die nach SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 11, B) ebenfalls nur die drei Untereinheiten des Komplexes sowie das Fv-Fragment enthält und Aggregaten zugeordnet wird.

In der abfallenden Flanke des Co-Komplexpeaks ist eine Schulter zu erkennen, die durch bereits zerfallenen Co-Komplex geprägt ist. Außerdem sind hin zu niedrigeren Molekulargewichten zusätzliche Peaks zu finden, die von Subpopulationen von Cytochrom *b* mit Cytochrom *c*₁, einer Verunreinigung, freiem Rieske-Protein mit gebundenen Fv-Fragment und freiem Fv-Fragment gebildet werden (siehe Abbildung 11, B Bahnen 6-9).

Die Gelfiltration zeigt deutlich, dass ein stabiler Co-Komplex zwischen Fv-Fragment und Cytochrom *bc*₁-Komplex ausgebildet wird, der auch unter den chromatographischen Bedingungen weitgehend stabil bleibt, jedoch einen geringen Zerfall zeigt. Dies kann auf eine Destabilisierung des Cytochrom *bc*₁ Komplexes, möglicherweise während der Aufreinigung, hindeuten. Der isolierte Hauptpeak liefert jedoch genügend Protein, um die Kristallisationsexperimente durchzuführen und zeigt bei Refiltration nur minimalen Zerfall (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse bestätigen den aus den vorangegangenen *magnetic-bead pull-down* Experimenten (169) erhaltenen Befund.

Ergebnisse

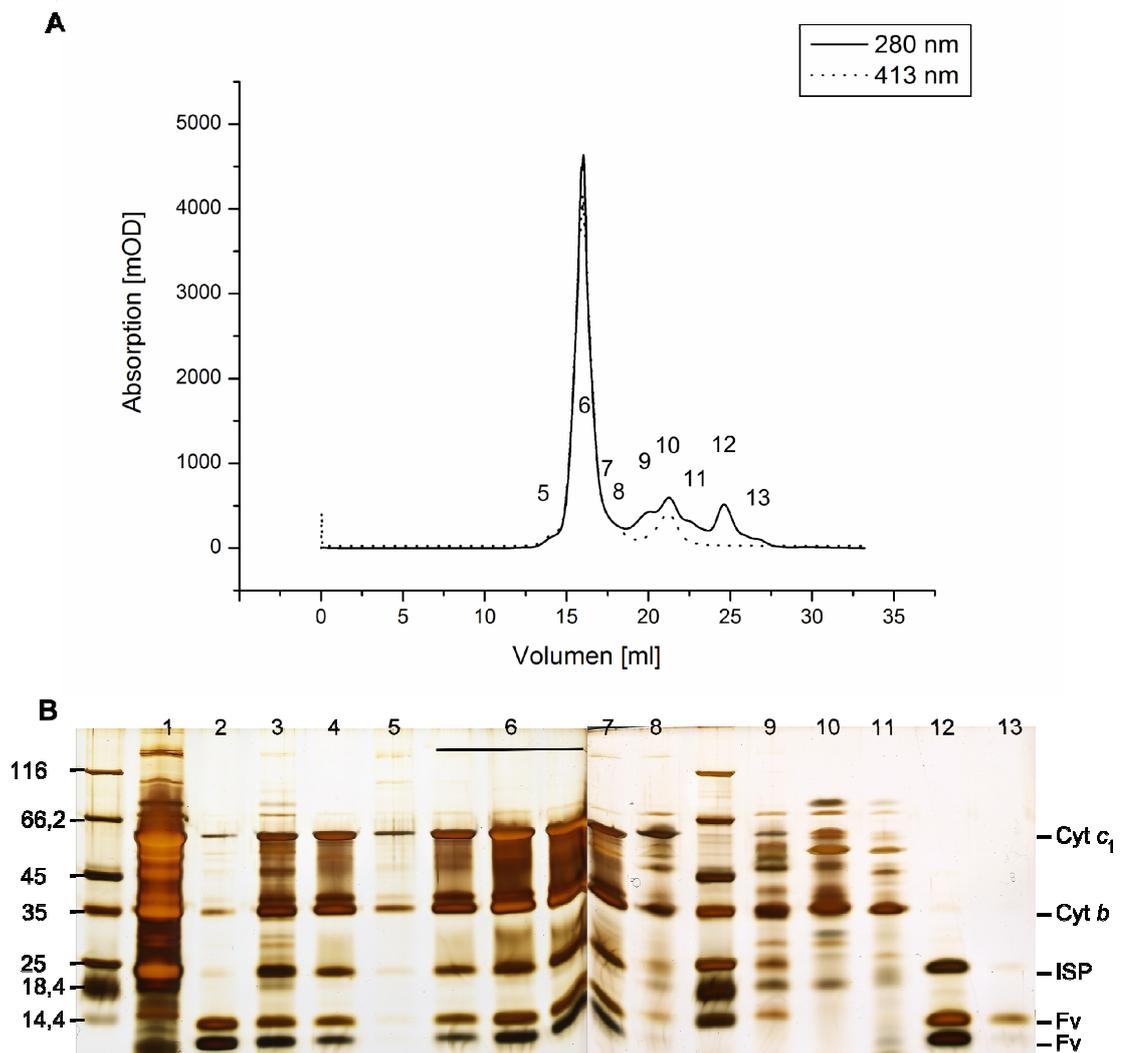


Abbildung 12: Gelfiltration des Cytochrom bc_1 Komplexes aus Stamm TK47 mit gebundenem Fv-Fragment einer TSK4000-Säule:

A) Elutionsprofil

B) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung) der eingesetzten Proteine und Säulenfraktion

- 1 Cytochrom bc_1 -Komplex
- 2 Fv-Fragment
- 3 Co-Komplexansatz vor Gelfiltration
- 4 ankonzentrierter Hauptpeak (6)
- 5 ansteigende Flanke des Hauptpeaks
- 6 Hauptpeak
- 7-8 abfallende Flanke des Hauptpeaks
- 9-11 Zerfallsprodukte und Verunreinigungen
- 12 Rieske-Protein mit gebundenem Fv-Fragment
- 13 freies Fv-Fragment

Ergebnisse

Die Abbildung 12 (TK47) zeigt analog zur Abbildung 11 (TK7) das entsprechende Ergebnis für den Codon-optimierten Komplex. Das Verhalten der beiden Proteinkomplexe auf der Gelfiltrationssäule kann als gleich angesehen werden, es ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Nach allen bisherigen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass die beiden Proteinkomplexe identisch sind. Es bleibt anzumerken, dass auch diese Chimäre keinen symmetrischen Hauptpeak ergibt. Deshalb werden, um jede Inhomogenität soweit wie möglich zu vermeiden, für die Kristallisationsexperimente nur die mittleren Fraktionen des Hauptpeaks (Abbildung 12, 6) verwendet. Im in Abbildung 12 gezeigten Experiment wurde eine geringere Proteinmenge eingesetzt als im Experiment in Abbildung 11, wodurch die Menge der Zerfallsprodukte geringer erscheint; dies zeigt sich im Vergleich der Intensitäten der Hauptpeaks.

3.1.1.6 Experimente zur Komplexstabilisierung und Änderung des Oligomerenzustands

Die Stabilität der chimären Cytochrom bc_1 Komplexe ist, wie in Abschnitt 3.1.1.5 dargestellt, nicht optimal und soll für den Zweck der Kristallisationsexperimente verbessert werden. Der Oligomerenzustand ist, wie unter Abschnitt 3.4 beschrieben, untypisch im Vergleich mit anderen Cytochrom bc_1 Komplexen, da vier Kopien jedes Monomers enthalten sind, statt nur zwei. Mit den folgenden Untersuchungen soll überprüft werden, ob sich dieser Zustand verändern lässt.

Die ersten Experimente in dieser Richtung erfolgen als Detergenzaustausch mit einer Superose 6 Gelfiltrationssäule. Die Probe wird mit dem entsprechenden Detergenz (2,5 fache CMC) eine Stunde auf Eis präinkubiert und anschließend gelfiltriert. Diese Untersuchungen werden auf einem Pharmacia Smartsystem durchgeführt, das sich durch geringe Säulenvolumina auszeichnet; es werden Undecyl- β -D-maltosid und Decyl- β -D-maltosid getestet. Diese Versuche zeigen jedoch nur, dass die Gelfiltration zum Detergenzaustausch ungenügend ist, da dieser im Vergleich zu einer Anionenaustauscher-Säule nicht vollständig ist. Auf der Gelfiltrationssäule können nur sehr starke Peakverbreiterungen beobachtet werden, vor allem auf der abfallenden Seite des Peaks. Dies liefert jedoch ein falsches Bild, da mit Undecyl- β -D-maltosid bei einem Detergenzaustausch auf einer Anionenaustauschersäule das ISP verloren geht und mit Decyl- β -D-maltosid nur noch Cyt c_1 mit einem substöchiometrischen Anteil von Cyt b verbleibt. Somit kann

Ergebnisse

keine Verbesserung der Komplexstabilität erzielt werden, da beide Detergenzien zum Zerfall des Komplexes führen.

Ein vollständiger Detergenzaustausch gegen Octyl- β -D-glucopyranosid auf einer Anionenaustauschersäule führt lediglich zur Isolierung der Cyt c_1 -Untereinheit ohne die beiden anderen Untereinheiten des Komplexes. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wird hier verzichtet.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird ein Ansatz auf breiterer Basis gewählt, wobei zwei Detergenzscreens der Firma Jena Bioscience eingesetzt werden. Die 24 enthaltenen Detergenzien werden in zwei- und vierfacher kritischer Mizellkonzentration (CMC) zur Probe zugegeben und diese eine Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Proben auf eine Blau-Nativ (BN)-PAGE zur Überprüfung auf einen veränderten nativen Zustandes des Komplexes aufgetragen.

Der aufgereinigte Komplex wird nach dem Zusatz verschiedener Detergenzien auf Veränderungen seines Laufverhaltens bei einer BN-Gelelektrophorese im Vergleich zum Komplex in DDM hin untersucht.

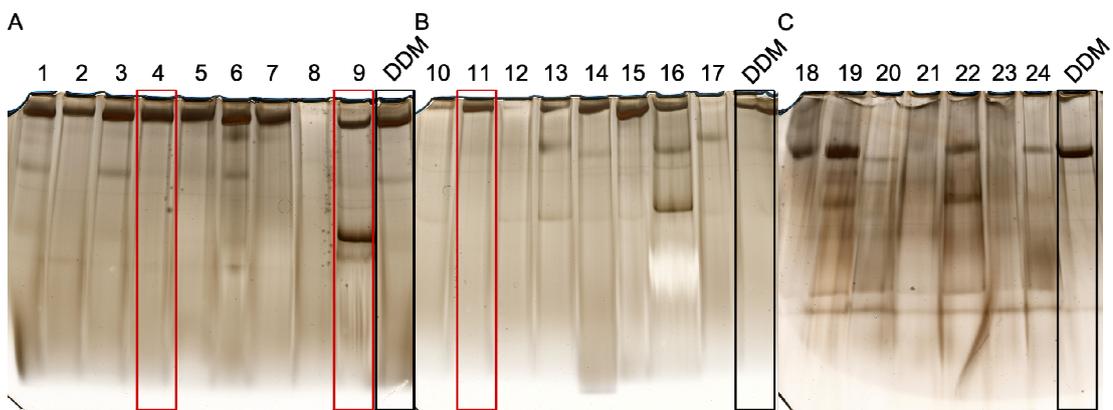


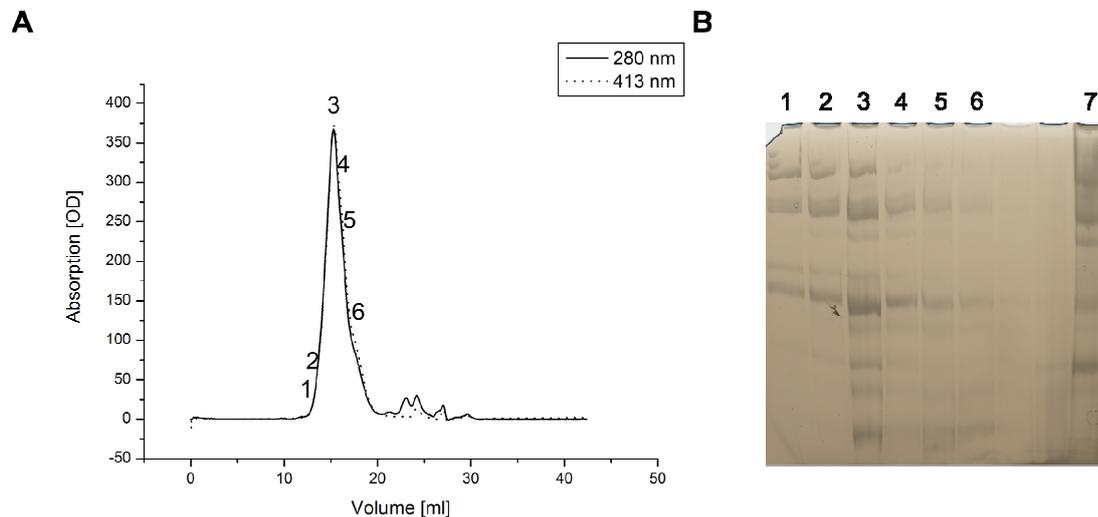
Abbildung 13: BN-Gelelektrophoresen A-C (3,5-13 %iges Gradientengel, Silberfärbung) mit verschiedenen Detergenzien bei doppelter CMC.

Es zeigt sich, dass unter den gewählten Bedingungen nur wenige Detergenzien einen Einfluss auf das Laufverhalten haben. Der erhoffte Effekt zur Verbesserung des Kristallisationsverhaltens ist die Stabilisierung des Di- oder Tetramers. Das Auftreten von Proteinbanden mit niedrigem Molekulargewicht ist in diesem Fall nicht wünschenswert, da dies auf einen Zerfall oder eine Destabilisierung des Komplexes hindeuten würde. Drei Detergenzien liefern ein Ergebnis, das den genannten

Ergebnisse

Kriterien nahe kommt: MEGA-10, Dodecyl- β -D-glucopyranoside und Zwittergent 3-12 (eingezeichnete Bahnen 4, 9 und 11).

Diese drei Detergenzien werden in drei Testaufreinigungen auf einer 50 ml DEAE-Sepharosesäule gegen das zur Solubilisierung und zum Säulenauftrag eingesetzte DDM ausgetauscht. Es wird mit dem Waschschrift begonnen, indem zunächst mit zwei Volumina Niedrigsalzpuffer mit dem jeweiligen Detergenz, aber ohne DDM gewaschen wird. Der Gradient zur Elution mit Hochsalzpuffer wird ebenfalls mit dem entsprechenden Detergenz in derselben Konzentration durchgeführt. Die eluierten Komplexe werden ankonzentriert und auf einer TSK4000-Säule gelfiltriert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14-16 dargestellt und jeweils nachfolgend beschrieben.



**Abbildung 14: Detergenzaustausch mit MEGA-10 (1,25 fache CMC);
A) Elutionsprofil der TSK4000-Gelfiltration nach vorherigem Detergenzaustausch;
B) BN-Gelelektrophoresen (3,5-13 % Gradientengel, Silberfärbung).**

- 1-2 Aufsteigende Flanke des Hauptpeaks**
- 3 Hauptpeak**
- 4-5 abfallende Flanke des Hauptpeaks**
- 6 Schulter des Hauptpeaks**
- 7 mit Detergenz präinkubierter Cytochrom bc_1 Komplexe vor der Gelfiltration**

Die Gelfiltrationsexperimente nach dem Detergenzaustausch zu MEGA-10 zeigen eine deutliche Schulter in der abfallenden Flanke des Hauptpeaks, die nicht abtrennbar ist. Die weiteren Peaks werden noch enthaltenen Verunreinigungen oder Untereinheiten des Komplexes nach Zerfall zugesprochen. Ein homogener Peak

Ergebnisse

und verringerter Zerfall können durch MEGA-10 nicht erreicht werden. Die angefertigte BN-Gelelektrophorese zeigt im Gegenteil diverse Banden unterschiedlicher Größe, die auf noch mehr Subspezies hindeuten als nach der Gelfiltration zu vermuten. Ein Redoxspektrum kann nicht erhalten werden, da bei Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat das Protein gefällt wird und eine Trübung auftritt, die das Spektrum überlagert. MEGA-10 zeigt sich zudem problematisch, da es unter den Aufreinigungsbedingungen im Hochsalzpuffer auszufallen droht, sobald die Temperatur auf 0 °C sinkt. Eine höhere Konzentration von MEGA-10 im Aufreinigungspuffer kann ebenfalls nicht verwendet werden, da es schon bei 4 °C in den Aufreinigungspuffern ausfällt.

Ergebnisse

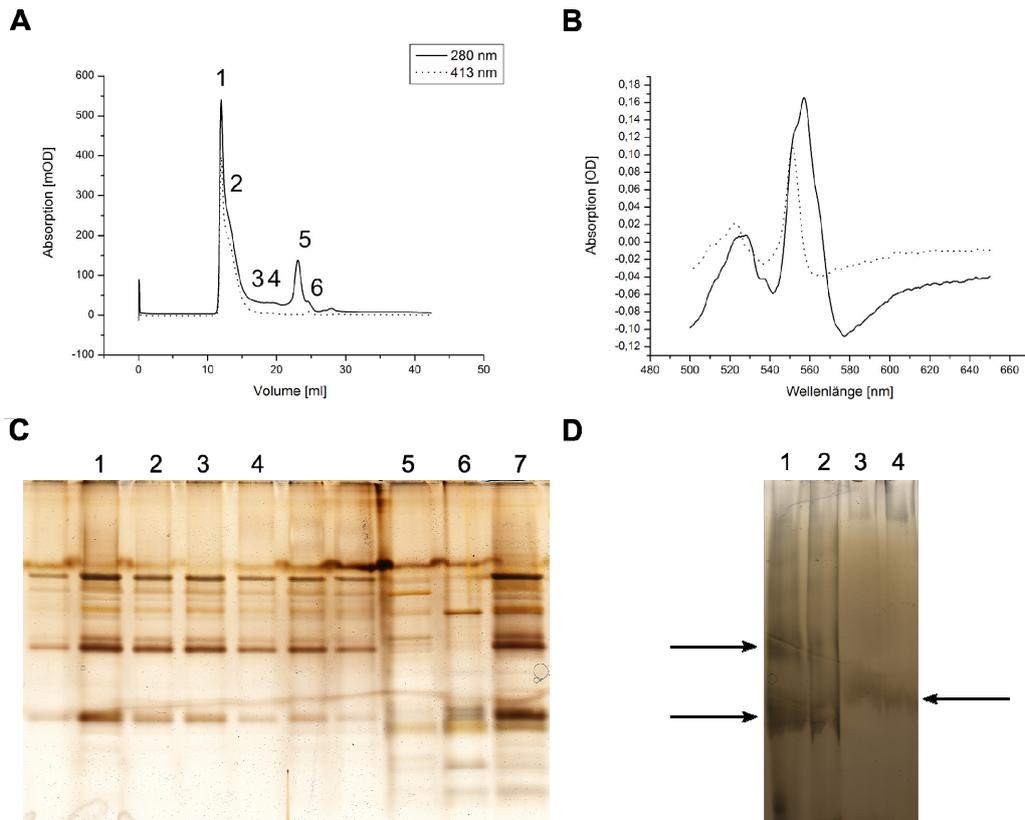


Abbildung 15: Detergenzaustausch gegen Dodecyl- β -D-glucopyranoside;
A) Elutionsprofil TKS4000-Gelfiltrationsäule nach Detergenzaustausch;
B) Redoxspektrum nach Detergenzaustausch und anschließender Ultrafiltration, die gepunktete Linie zeigt eine Reduktion mit Ascorbat, die durchgezogene Linie eine Reduktion mit Dithionit;
C) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung) der Säulenfraktionen;
D) BN-Gelelektrophorese (3,5-13 %iges Gradientengel, Silberfärbung) der Säulenfraktionen, die Pfeile sind auf der Höhe der Banden eingezeichnet

- 1 Hauptpeak**
- 2 Schulter im Hauptpeak**
- 3-4 Zerfallsprodukte**
- 5 Verunreinigung**
- 6 Rieske-Protein**
- 7 Komplex vor der Gelfiltration**

Die Elution von der DEAE-Sepharosesäule nach dem Detergenzaustausch gegen Dodecyl- β -D-glucopyranoside ist nicht vollständig durchführbar, wenn der oben aufgeführte Hochsalzpuffer verwendet wird. Auf der Säule bleibt eine deutliche Rotfärbung zurück, die auch durch Waschen mit modifiziertem Hochsalzpuffer (1 M Natriumchlorid) nicht eluiert werden kann. Es kann jedoch trotzdem ein gleichförmiger Peak eluiert werden (Elutionsprofil nicht dargestellt), der den Komplex enthält.

Ergebnisse

Die Gelfiltration ergibt auch hier in der abfallenden Seite des Hauptpeaks eine Schulter, die nicht abgetrennt werden kann. Bemerkenswert ist auch die deutlich früher beginnende Elution von der Gelfiltrationssäule. Dies deutet auf Aggregation hin, es kann jedoch auch eine für dieses Detergenz spezifische Änderung des Laufverhaltens sein, da auf der BN-Gelelektrophorese keine Aggregation zu sehen ist. Auch hier ist aber ein deutlicher Zerfall des Komplexes zu beobachten.

Eine SDS-Gelelektrophorese zeigt die charakteristischen Banden des Komplexes, es ist jedoch eine deutlich stärkere Verunreinigung dieser Aufreinigung zu sehen als bei einer Aufreinigung mit DDM, obwohl mit DDM solubilisiert wurde. Möglicherweise bleiben während des Detergenzaustausch beim Waschen mehr Proteine in der Präparation. Das erhaltene Redoxspektrum ist jedoch typisch für den Cytochrom *bc₁* Komplex aus *P. denitrificans*.

Die BN-PAGE zeigt in der Fraktion des Hauptpeaks (Abbildung 15 1) und in der Schulter des Hauptpeaks (Abbildung 15 2) einen starken Zerfall des Komplexes in Subkomplexe oder Untereinheiten. Die beiden weiteren Bahnen (Abbildung 15 3 und 4) in der BN-PAGE, enthalten wahrscheinlich Zerfallsprodukte, aber auch alle Untereinheiten des Komplexes, wie in (Abbildung 15, C) zu sehen ist.

Ergebnisse

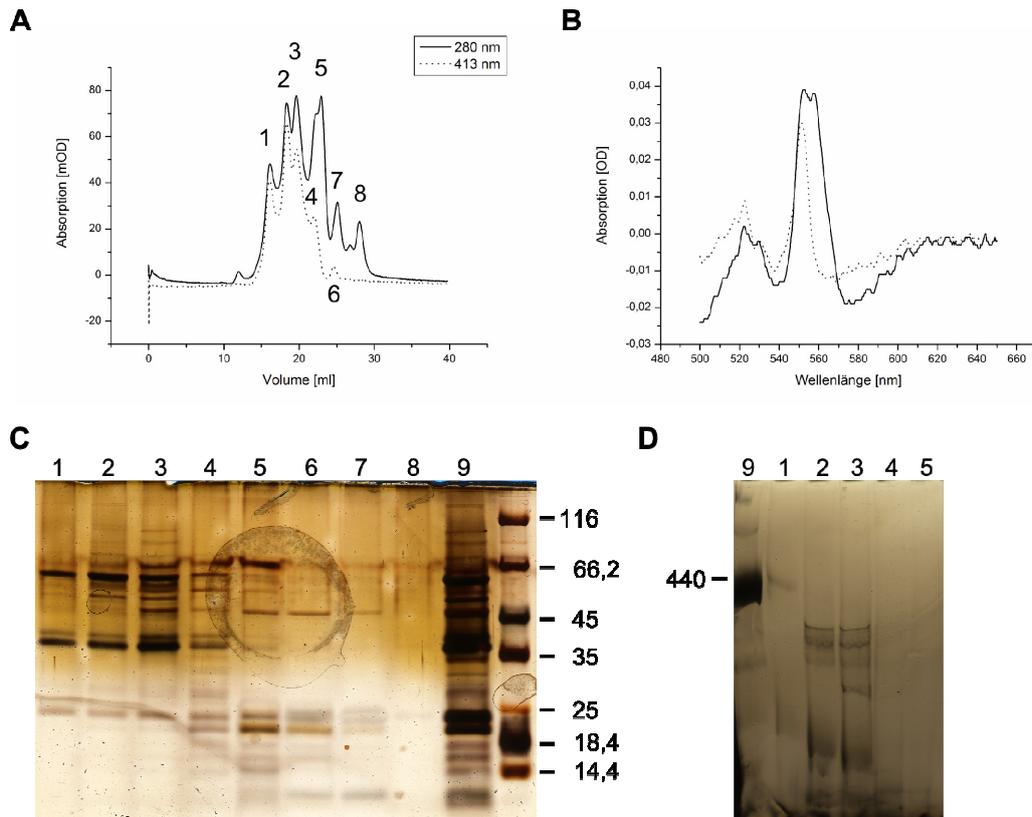


Abbildung 16: Detergenzaustausch gegen Zwittergent 3-12;
A) Elutionsprofil der TKS4000-Gelfiltrationssäule nach Detergenzaustausch;
B) Redoxspektrum nach Detergenzaustausch und anschließender Ultrafiltration, die gepunktete Linie: Reduktion mit Ascorbat, die durchgezogene Linie: Reduktion mit Dithionit;
C) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung) der Säulenfraktionen;
D) BN-Gelelektrophorese (3,5-13 %iges Gradientengel, Silberfärbung)

1-8 die verschiedenen im Elutionsprofil eingezeichneten Peaks

9) Co-Komplex vor der Gelfiltration

Das Elutionsprofil der Anionenaustauschersäule (nicht dargestellt) nach Detergenzaustausch gegen Zwittergent 3-12 zeigt einen inhomogenen Peak, der sowohl in der aufsteigenden, als auch in der absteigenden Flanke jeweils eine Schulter aufweist. Die Gelfiltration (Abbildung 16 A) ergibt einen extrem starken Zerfall des Komplexes, der auch auf einer BN-Gelelektrophorese gezeigt werden kann (Abbildung 16 D). Das Redoxspektrum zeigt Defizite im Cyt *b*-Peak im Verhältnis zu Cyt *c*₁ auf (Abbildung 16 B). Möglicherweise ist Zwittergent 3-12 nicht in der Lage das Cyt *b* stabil in Lösung zu halten, da es auch einen Subkomplex aus Cyt *c*₁ und dem Rieske-Protein zu geben scheint, der in den anderen Gelfiltrationen nicht auftritt (Abbildung 16 C 5).

Ergebnisse

Im Weiteren wird untersucht, ob verschiedene Solubilisierungsbedingungen den Multimerenzustand beeinflussen können. Zu Testzwecken wird der Komplex mit veränderter Natriumchlorid- sowie veränderten DDM-Konzentrationen solubilisiert.

Für diese Untersuchungen wird jeweils 1 ml einer Membranpräparation des Stammes TK47 unter Standardbedingungen, jedoch mit Variation entweder der DDM-Konzentration oder der Natriumchlorid-Konzentration, solubilisiert. Nach der Inkubation werden die Proben und das zu verwendende DEAE-Sepharosematerial auf die Bedingungen für die Standardaufreinigung des Komplexes eingestellt (350 mM NaCl). Im Batchverfahren mit 1 ml Säulenmaterial wird aus den Proben der chimäre Komplex angereichert. Dies geschieht durch Waschen mit 2 Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer nach 30 min Inkubation und anschließender Zentrifugation (2000 g, 10 min), sowie Elution mit 1 Säulenvolumen Hochsalzpuffer (mit 1 M NaCl) nach Inkubation (30 min) und Zentrifugation (2000 g, 10 min). Die Proben werden mittels Ultrafiltrationskammern (10 kDa cut-off) auf ein Zehntel ihres Volumens eingengt und anschließend mit Verdünnungspuffer auf 50 mM NaCl-Konzentration eingestellt. Für alle Proben werden die gleichen Mengen des erhaltenen Konzentrates auf die Gele aufgetragen, zusammen mit unter Standardbedingungen aufgereinigtem Wildtyp Cytochrom *bc₁* Komplex.

Ergebnisse

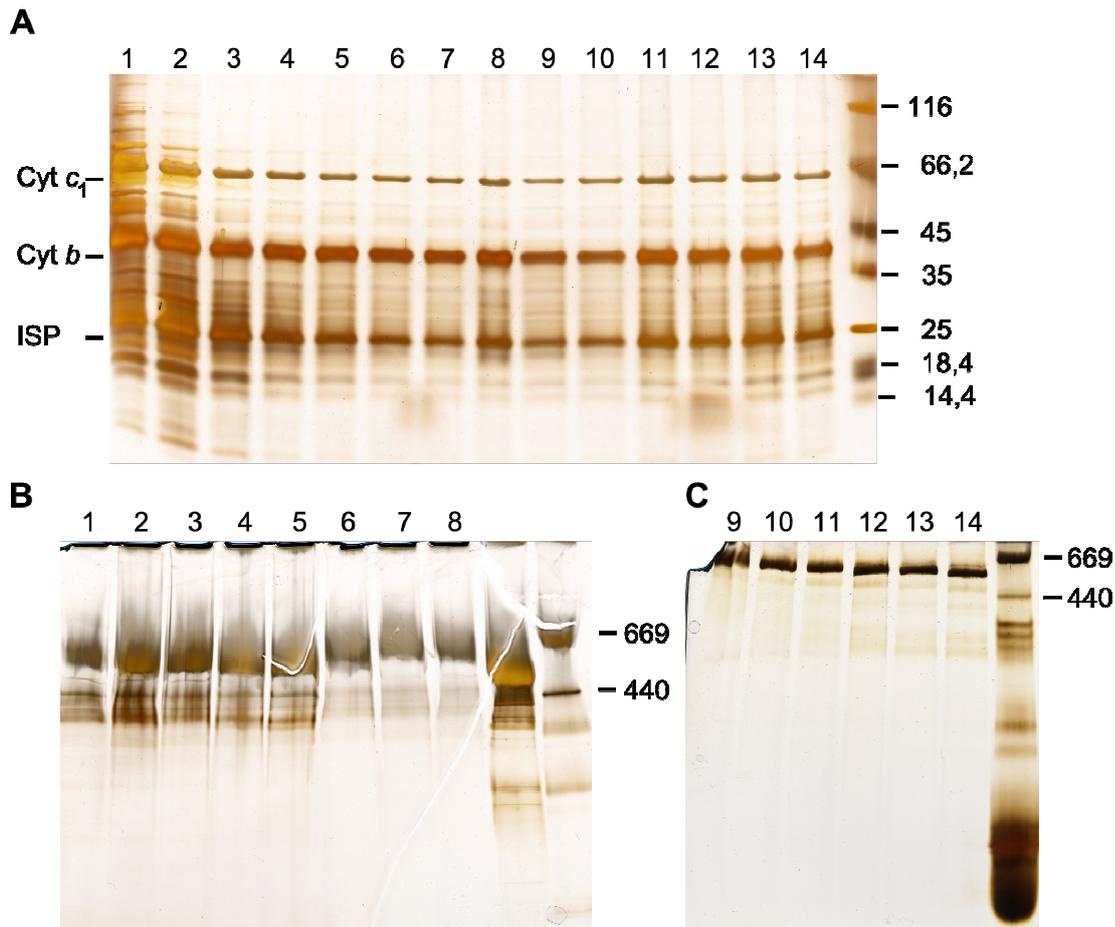


Abbildung 17: PAGE Untersuchungen der veränderten Solubilisierungsbedingungen:
A) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung)
B) BN-Gelelektrophorese (Gradientengele 3,5-13 %ig, Silberfärbung); Variation der NaCl-Konzentration zwischen 50, 100, 200, 300, 500, 600, 800 1000 mM (1-8),
C) steigende DDM Konzentration 1, 2, 3, 5, 8, 10 % (9-14),
 Die eingezeichneten Markerproteine sind Thyroglobulin (669 kDa) und Ferritin (440 kDa) aus dem *HMW calibration kit* (GE Healthcare)

Die Variation der Solubilisierungsbedingungen hat auf den Oligomerenzustand des Komplexes keinen Einfluss, wie aus den BN-Gelelektrophoresen zu erkennen ist (Abbildung 17 B und C), denn verglichen mit den Standardbedingungen (600 mM Natriumchlorid und 2 % DDM) ergeben sich keine neuen Populationen oder eine andere Verteilung der Proteingesamtmenge auf die Populationen. Es wird allerdings deutlich, dass bei niedrigen NaCl-Konzentrationen (50, 100, 200, 300 mM und 1 M) mehr Verunreinigungen enthalten sind und deshalb diese Bedingungen suboptimal sind. Auch zeigt sich, dass die standardmäßig verwendete DDM-Konzentration das beste Ergebnis im Hinblick auf die Reinheit des Proteins liefert, denn ab 3 % wird das Ergebnis wieder schlechter.

Ergebnisse

Der Komplex wird unter Standardbedingungen zur klassischen Aufreinigung, jedoch zusätzlich in Anwesenheit von 30 mM EDTA, solubilisiert, um Auswirkungen von zweiwertigen Ionen beurteilen zu können. Die Untersuchungen erfolgen wiederum durch Gelfiltration.

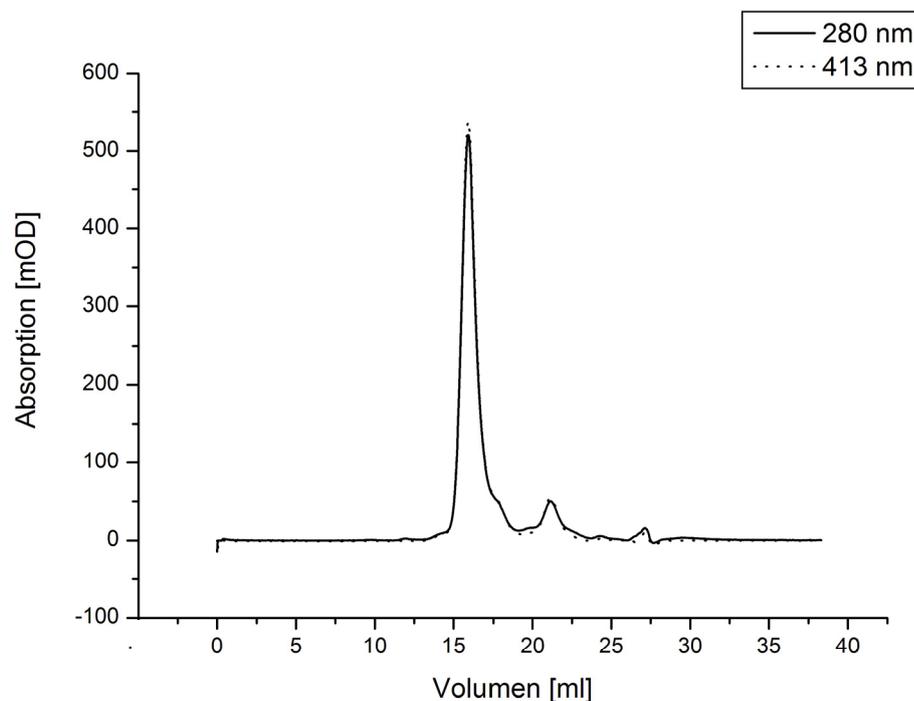


Abbildung 18: Elutionsprofil der TSK4000-Gelfiltrationssäule des unter Zusatz von 30 mM EDTA solubilisierten Cytochrom bc_1 Komplexes aus Stamm TK47

Aus dem Elutionsprofil kann keine Änderung des Oligomerenzustands abgeleitet werden, da der Hauptpeak, verglichen mit der Standard-aufreinigung, an gleicher Stelle eluiert.

3.1.1.7 Kristallisationsexperimente

Die Kristallisationsexperimente erfolgen direkt nach der Gelfiltration. Die erhaltenen Fraktionen werden vereinigt und ein 10facher molarer Überschuss Stigmatellin (in Ethanol) zur Probe gegeben. Im Anschluss wird die Probe bis auf mindestens 20 mg/ml in Ultrafiltrationskonzentratoren (30 kDa cut-off) eingeeengt. Die Probe wird dann in 300 nl oder 1 μ l Tropfen 1+1 mit den oben aufgeführten Kristallisations-Lösungen auf Kristallisationsplatten (Greiner) in der *sitting drop*-Version des *vapor diffusion*-Verfahrens gemischt. Die 300 nl Ansätze werden durch einen Karthesian

Ergebnisse

Pipettierroboter, die 1 µl Ansätze per Hand pipettiert und im Anschluss mit einer selbstklebenden, gasdichten Folie verschlossen. Die Platten werden dann bei verschiedenen Temperaturen (4, 10, 18, 25 und 30 °C) zwischen 4 Tagen und 6 Monaten gelagert.

Die Kristallisationsansätze zeigen keine Proteinkristallbildung, da das Protein unter allen Bedingungen präzipitiert. Das erhaltene Präzipitat weicht in seiner Färbung von der des Komplexes ab, es entsteht entweder grünes oder meistens braunes Präzipitat. Verfärbt sich der Kristallisationsansatz auf diese Weise, kann davon ausgegangen werden, dass der Komplex in diesen Bedingungen nicht stabil ist. Die Ansätze unter diesen Bedingungen werden verworfen.

Die Proteinstabilität scheint, nach Beobachtungen, bei der Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) am höchsten zu sein. Es werden weitere Kristallisationsexperimente unter der Verwendung von PEG 400 und PEG 4000 durchgeführt. Diese Experimente liefern jedoch auch keine Bedingungen, die zu mehr als Präzipitation mit mikrokristallinem Anteil führen.

Weitere Kristallisationsexperimente mit dieser Mutante werden zugunsten der im folgenden Abschnitt dargestellten Mutante eingestellt.

3.1.2 Cytochrom bc_1 Komplex mit deletierter saurer Domäne des Cytochroms c_1

Der Stamm MC1 enthält das oben beschriebene Plasmid pMC1, das ein modifiziertes *fbc*-Operon trägt und von Michela Castellani (170) kloniert wurde. In diesem Konstrukt wurde der, für den N-terminalen Teil der hydrophilen Domäne (Aminosäure 39 bis 201), kodierende Teil des *fbcC*-Gens deletiert (Abbildung 19). Der hiervon exprimierte Komplex wird im Folgenden als Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex bezeichnet. Der entfernte Teil zeichnet sich durch seinen großen Gehalt an sauren Aminosäure-Seitengruppen (über 40 %) aus. In vergleichenden Aligments mit anderen Modellorganismen für die Atmungskette lässt sich keine Entsprechung finden. Selbst in der nahe verwandten Rhodobaktergruppe fehlt dieser Einschub. Seine Funktion ist bisher ungeklärt und Teil weiterer Untersuchungen.

Ergebnisse

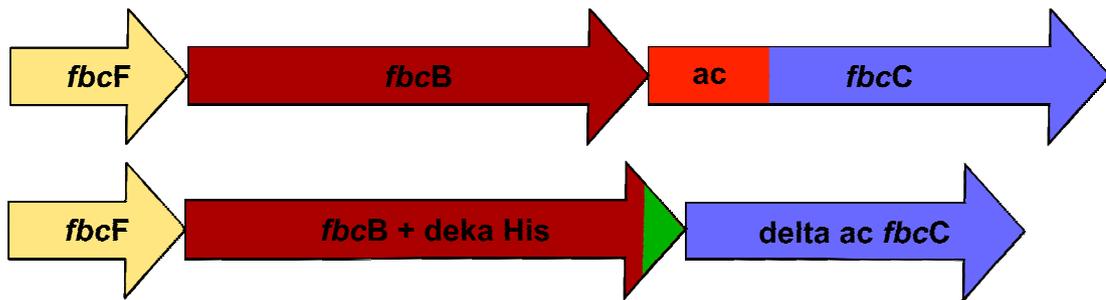


Abbildung 19: Ausschnitt aus dem *fbc*-Operon des Wildtyps und dem *fbc*-Operon der Δac -Mutante, der die saure Domäne im Cyt c_1 deletiert und ein *deka His-tag* am C-Terminus des Cyt *b* zur Aufreinigung eingeführt wurde.

3.1.2.1 Aufreinigung des Δac Cytochrom bc_1 Komplexes

Die Aufreinigung dieses Komplexes erfolgt über einen am C-Terminus des Cyt *b* angebrachten *deka His-tag*, da die Standardaufreinigung die stark saure Domäne des Cyt c_1 zur Präparation nutzt. Die Solubilisierungsbedingungen werden wie oben beschrieben an dieses Aufreinigungsprotokoll angepasst (2.3.4.2). Der Komplex kann nach Bindung an eine Ni^{2+} -NTA-Säule, mit Imidazol oder Histidin unter den angegebenen Bedingungen bei 145 beziehungsweise 50 mM eluiert werden. Die Elutionspeaks werden vereinigt, in Ultrafiltrationskonzentratoren (100 kDa cut-off) eingeeengt und mehrfach gewaschen, so dass sich ein Verdünnungsfaktor für das Imidazol oder Histidin von $1:10^4$ ergibt.

Ergebnisse

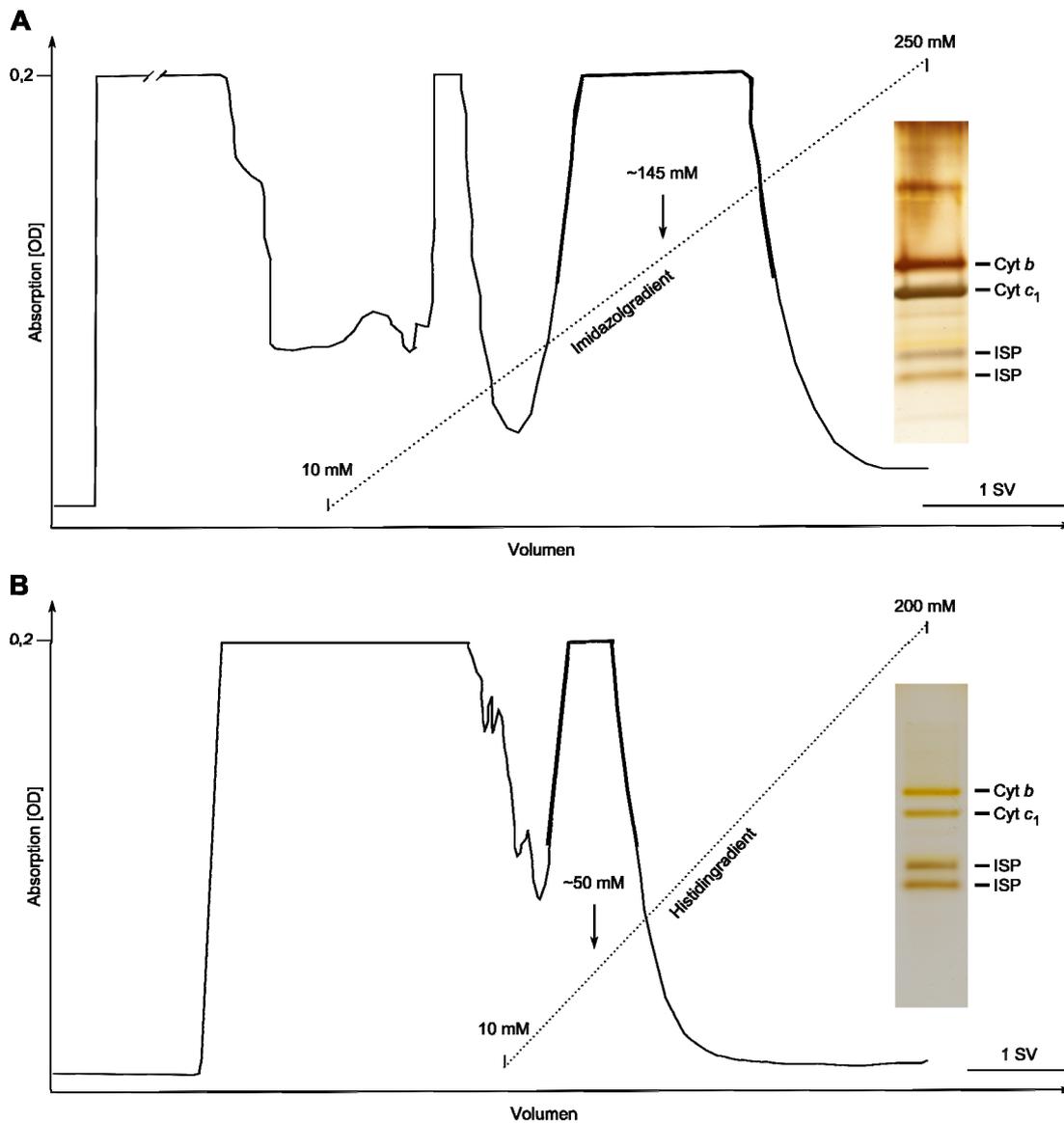


Abbildung 20: Elutionsprofile des Δ ac Cytochrom bc_1 Komplexes von einer Metallaffinitätssäule mit der jeweiligen SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10%, Silberfärbung) mit:

A) Imidazol

B) Histidin

Im Elutionsprofil ist in schwarz gezeigt, welcher Bereich ankonzentriert und in der SDS-Gelelektrophorese dargestellt ist.

Die Elution der Säule liefert in beiden Fällen den aufgereinigten Komplex in fast reiner Form. Das Ergebnis der beiden Aufreinigungarten unterscheidet sich nicht, wie in den Gelen dargestellt. Das Rieske Protein spaltet sich in zwei Banden auf, dieser Effekt tritt bei dem aus *P. denitrificans* isolierten Komplex häufig auf und ist durch Änderung der Gelbedingungen nicht zu verändern. Hierbei kann es sich um unterschiedliche Konformere handeln, nicht um Proteolyse.

Ergebnisse

Werden die Redoxspektren des aufgereinigten Komplexes beider Aufreinigungsarten mit Wildtypspektren verglichen, so zeigt sich, dass bei Elution mit Imidazol im Natriumascorbat-reduzierten Präparat nicht nur das Cyt c_1 (Peak bei 553 nm) reduziert wird, sondern auch Teile der b -Häme (Schulter bei 560 nm; Ergebnisse nicht dargestellt). Dies kann durch den Einsatz von Histidin als Elutionsmittel verhindert werden.

Ein Effekt der Verwendung von Histidin ist, dass die an die Säule gebundenen Nickelionen ebenfalls eluiert werden, was an dem Farbwechsel des Säulenmaterials von hellblau nach weiß gut zu verfolgen ist.

3.1.2.2 Gelfiltrationsuntersuchung

Die ankonzentrierte Probe (4 mg Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex in 1 ml Puffer) wird zunächst sterilfiltriert und dann auf eine semipräparative TSK4000 Gelfiltrationssäule aufgetragen und wie oben beschrieben (Abschnitt 2.3.6.3) mit 1,5 Säulenvolumen eluiert. Der verwendete Puffer ist der gleiche wie bei den oben angeführten Gelfiltrationen (Abschnitt 3.1.1.5).

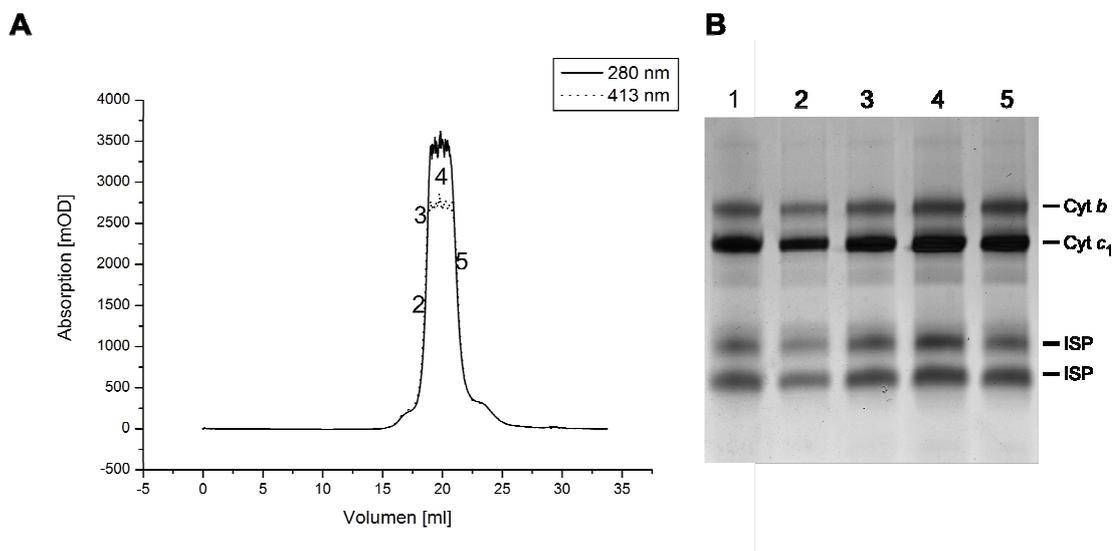


Abbildung 21: Gelfiltration des Δ ac Cytochrom bc_1 Komplexes einer TSK4000-Säule

A) Elutionsprofil;

B) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10%, Silberfärbung)

Die Fraktionen 2-5 sind die Proben über den Hauptpeak, die Spur 1 setzt sich aus den vereinigten und ankonzentrierten Fraktionen 2-5 nach Stigmatellinzugabe zusammen.

Das Elutionsprofil zeigt einen Hauptpeak, der nur kleine, abtrennbare Schultern in der an- und absteigenden Flanke aufweist. Im weiteren Verlauf der Elution sind

Ergebnisse

kaum Zerfallsprodukte des Komplexes oder Verunreinigungen zu sehen. Auffällig ist im Vergleich zu aus Wildtyp oder TK7- und TK47-Stämmen isolierten Komplexen, dass der Δac Cytochrom bc_1 Komplex deutlich später eluiert. Dieser Effekt wird im Folgenden noch weiter untersucht (Ergebnisse 3.4). Die Fraktionen der sehr uniformen Elution werden im Bereich der Fraktionen 2-5 vereinigt und in weiteren Experimenten für die Kristallisation eingesetzt (3.1.2.3).

3.1.2.3 Kristallisationsexperimente

Die oben eingezeichneten Fraktionen (siehe Abbildung 19) werden mit einem 10fachen molaren Überschuss Stigmatellin versetzt und auf eine Konzentration von mindestens 40 mg/ml eingengt. Im Anschluss wird der Komplex entweder direkt eingesetzt oder mit Kristallisationspuffer mindestens 1:1 verdünnt und dann auf Kristallisationsplatten ausgebracht.

In diesen Ansätzen konnten bei niedrigen pH-Werten mit Hilfe des Fällungsmittels (+/-)-2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) rot gefärbte Protein-kristalle in Größen zwischen <0,05 mm bis hin zu 0,2 mm erhalten werden. Die Kristalle traten immer im Zusammenhang mit Proteinpräzipitat auf, lassen sich jedoch mechanisch davon trennen. Die häufigsten Formen sind rechteckig oder keilförmig. In jedem Ansatz sind nicht nur einzelne Kristalle enthalten, sondern meist Schauer von kleinen Kristallen gemischt mit wenigen etwas größeren.

Ergebnisse

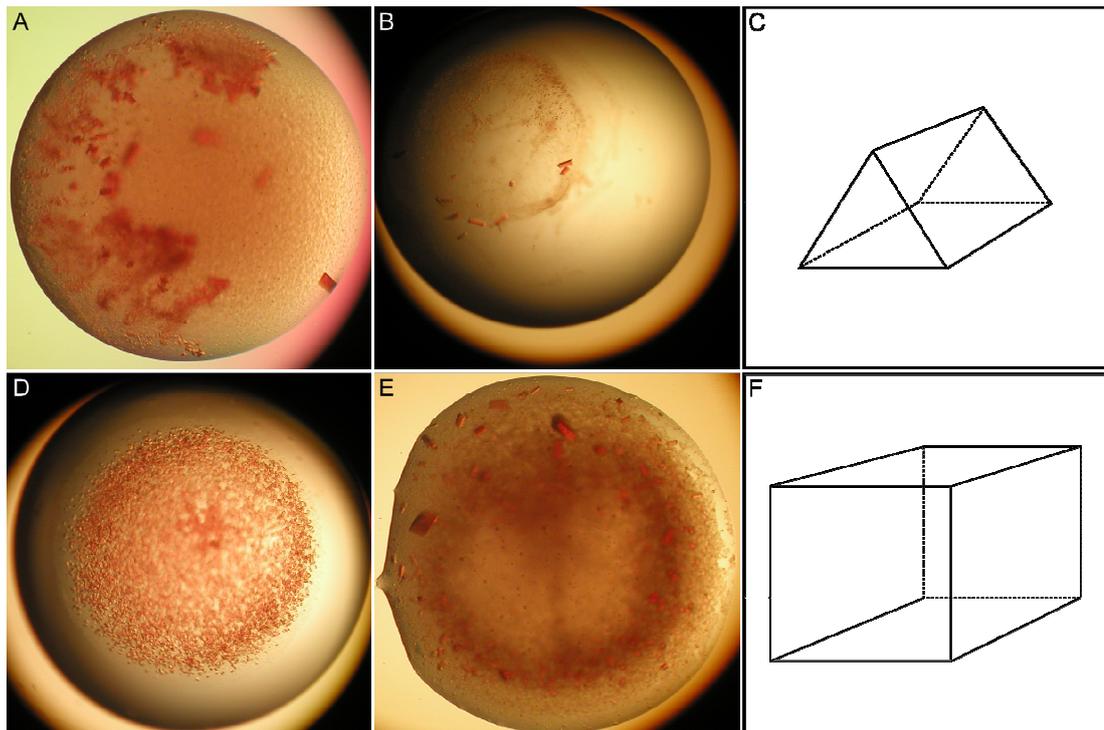


Abbildung 22: Bilder der erhaltenen Kristalle und Kristallformen;

- A** Kristalle des mit Histidinelution aufgereinigten Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex
- B** Kristalle des mit Imidazol aufgereinigten Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex
- C** Kristallform der Kristalle aus A und B
- D** Kristallschauer des mit Histidinelution aufgereinigten Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex, Kristallschauer können jedoch auch in der in (C) gezeigten Form auftreten
- E** große Kristalle des mit Histidinelution aufgereinigten Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex
- F** Kristallform der Kristalle aus D und E

Die Kristalle sind sehr empfindlich gegen Austrocknung und werden sofort nach Arretierung unter Lichtmikroskopkontrolle in einer Halterungsschleife in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.1.2.4 Untersuchung der Kristalle

Die erhaltenen Kristalle sind zu klein und die Diffraktion zu schwach, um eine Vorselektion auf der Röntngenerator-Hausanlage des MPI für Biophysik (Frankfurt am Main) durchzuführen. Die Kristalle werden deshalb mit Synchrotron-Röntgenquellen getestet (Beamline PXII am SLS des Paul-Scherrer-Institutes, Schweiz oder Beamline ID23-1 am ESRF in Grenoble, Frankreich). Hierbei werden Diffraktionsmuster bis zu einer Auflösung von etwa 3,5 Å erhalten, die jedoch eine

Ergebnisse

starke Mosaizität, wahrscheinlich bedingt durch Schäden beim Einfrieren, aufweisen. Bisher sind etwa 50 Kristalle in drei Synchrotronsitzungen getestet worden.

3.2 Hetero-dimerer Cytochrom bc_1 Komplex

Der folgende Teil der vorgelegten Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob der bereits in der Einleitung als Dimer beschriebene und kristallisierte Cytochrom bc_1 Komplex aus allen bisher gelösten Strukturen nur ein strukturelles oder auch ein funktionelles Dimer bildet. Ein funktionelles Dimer, wie es in der einschlägigen Literatur vorgeschlagen wird, sollte eine Zusammenarbeit der beiden monomeren Komplexe bedeuten, ein strukturelles Dimer hingegen sollte zwei von einander unabhängige Reaktionswege, die sich nicht gegenseitig beeinflussen, aufweisen.

Zur Klärung dieser Frage soll ein gemischtes Dimer erzeugt werden, das aus einem funktionsfähigen Monomer und einem Monomer mit einer inaktivierenden Mutation besteht, die die Aktivität auf zehn Prozent oder weniger senkt, (Abbildung 23). Sollte eine Kooperativität zwischen den beiden Untereinheiten bestehen, so müsste die Aktivität des Komplexes zumindest auf den Aktivitätswert der Mutante sinken. Liegt hingegen nur ein strukturelles Dimer vor, wird eine Aktivität von etwa 50 Prozent erwartet.

Für die Einführung der Mutation wird das Q_p -Zentrum in der Cyt b -Untereinheit, das der Oxidation von Ubihydrochinon dient, gewählt. Es werden zwei aus der Literatur bekannte Mutationen M140R und Y147S, die bereits in *Rhodobacter capsulatus* beschrieben wurden, verwendet (133). Diese beiden Mutationen führen in *R. capsulatus* zum gewünschten Aktivitätsverlust und beeinflussen die Proteinstabilität, den Einbau und die Umgebung der Cofaktoren nicht; sie führen zur Verringerung der Elektronenübertragung auf das Häm b_L .

Das gemischte Dimer (Abbildung 23) muss *in vivo* erzeugt werden, da sich der Komplex nicht *in vitro* assemblieren oder rekonstituieren lässt. Das bedeutet, dass die Information für die mutierte und die Wildtyp-Form der Untereinheit Cyt b in einer Zelle vorliegen muss. Da es sich bei den Genen des Cytochrom bc_1 Komplexes um ein Operon handelt, in dem der Promotor nur vor *fbcF* liegt und sich die Ribosomenbindestelle (RBS) für das *fbcB* direkt an *fbcF* anschließt, wird das gesamte Operon und nicht nur das Cyt b -Gen, zweimal in einen Stamm eingebracht.

Ergebnisse

Ein Operon enthält das *fbcb* mit der Mutation und der Sequenz für einen Affinitäts-tag, in diesem Fall einen *deka* His-tag am Ende von *fbcb*, das zweite Operon enthält das Wildtyp-Operon mit einem zweiten Affinitäts-tag, dem Strep-tag II.

Werden beide Operons in einem Stamm exprimiert, sollten sich in den Membranen drei verschiedene Dimere aus den Untereinheiten bilden, wobei bei gleicher Expressionsrate, mRNA- und Proteinstabilität ein Verhältnis von 1:2:1 (inaktives Dimer mit His-tag:gemischtes Dimer mit beiden tags: Wildtyp -Dimer mit strep-tag II) vorliegen sollte. Das gemischte Dimer kann unter diesen Bedingungen durch Einsatz von zwei Affinitätsmaterialien (Ni^{2+} -NTA-Sepharose und Streptactin-Sepharose) gewonnen werden. Im Anschluss soll diese Präparation dann biochemisch charakterisiert und mit Hilfe der *stopped flow*-Methode untersucht werden. Für diese Vorhaben werden zunächst mit Affinitäts-tag versehene Cytochrom *bc*₁ Komplexe benötigt, da diese für *P. denitrificans* nicht vorliegen. Gleiches gilt für die zu verwendenden inaktivierenden Mutationen in *P. denitrificans*.

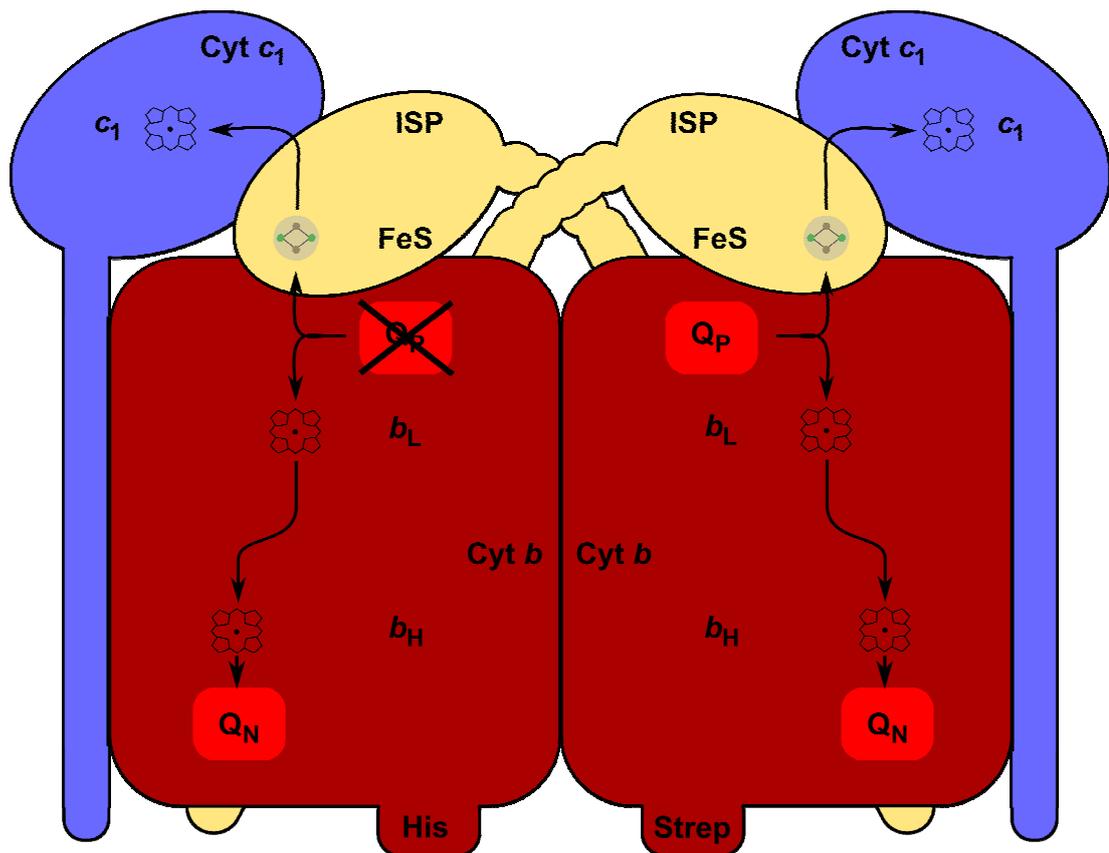


Abbildung 23: Schematische Darstellung des gemischten Dimers. Cyt *b* ist in rot, das Cyt *c*₁ in blau und das ISP in gelb dargestellt. Im linken Monomer wird die Mutation ein- und der Histidin-tag angebracht. Das rechte Monomer wird mit dem Strep-tag II versehen.

3.2.1 Klonierung von Cytochrom *bc*₁ Komplexen mit Affinitäts-*tags*

Die Affinitäts-*tags* werden zunächst per *splicing by overlap extension (SOEing)* PCR in das *fbcB*-Gen eingeführt (Abbildung 24) und dieses nach Subklonierung in *E. coli* eingebracht. Hiernach folgt das Umklonieren in einen das *fbc*-Operon enthaltenden Expressionsvektor und schließlich werden die erzeugten Expressionsvektoren durch Konjugation in *P. denitrificans* überführt (Abschnitt 2.2.9).

Die Wahl der Position der Affinitäts-*tags* ist wichtig, denn sie sollten die Proteinfaltung und -funktion nicht einschränken und Zugänglichkeit für die funktionelle Gruppe des Säulenmaterials bieten, die bei Membranproteinen auf Grund der sie im solubilisierten Zustand umgebenden Mizelle oft problematisch ist, da diese den Affinitäts-*tag* maskieren könnte. Eine Nachweisbarkeit der Affinitäts-*tags* in einer Westernblotanalyse ist ebenfalls eine Voraussetzung für dieses Projekt.

Es werden drei Positionen für die beiden Affinitäts-*tags* in der Cyt *b*-Untereinheit getestet, denn sie müssen direkt mit dem Merkmal Wildtyp oder Mutante korreliert sein, und auf ihre Tauglichkeit im Hinblick auf die oben genannten Kriterien untersucht. Die drei gewählten Positionen sind der N- und C-Terminus sowie eine Position zwischen den Helices D und E (*de*-Loop) auf der cytoplasmatischen Seite des Komplexes. Dieser Bereich wurde ausgewählt, da er sich im Alignment (Abbildung 24) als am wenigsten konserviert über alle Modellorganismen darstellt und somit eine Beeinträchtigung der Funktion am unwahrscheinlichsten erscheint. Alle Affinitäts-*tags* liegen somit auf der cytoplasmatischen Seite und sollten die oben beschriebene Beweglichkeit des ISP und die Annäherung des Cyt *c* nicht stören.

Die molekularbiologischen Arbeiten beginnen damit, das *fbc*-Operon aus dem Plasmid des Stammes #703 (Stammsammlung, Abteilung Molekulare Genetik), welches eine zusätzliche *StuI*-Schnittstelle direkt vor dem *fbcB*-Gen in der RBS enthält, in die Klonierungsvektoren pSL1180 und pUC18 mit einer Doppelrestriktion (*SacI*/*HindIII*) umzuklonieren (pTK12 und pTK15). Das *fbcB*-Gen wird mit einer *StuI*/*XhoI*-Restriktion in den Vektor pSL1180 eingebracht (pTK14). Dieses Plasmid dient als Vorlage für die *SOEing* PCR, die für beide Affinitäts-*tags* an den drei Positionen (siehe oben) zu sechs mal drei PCR-Ansätzen führt.

Ergebnisse

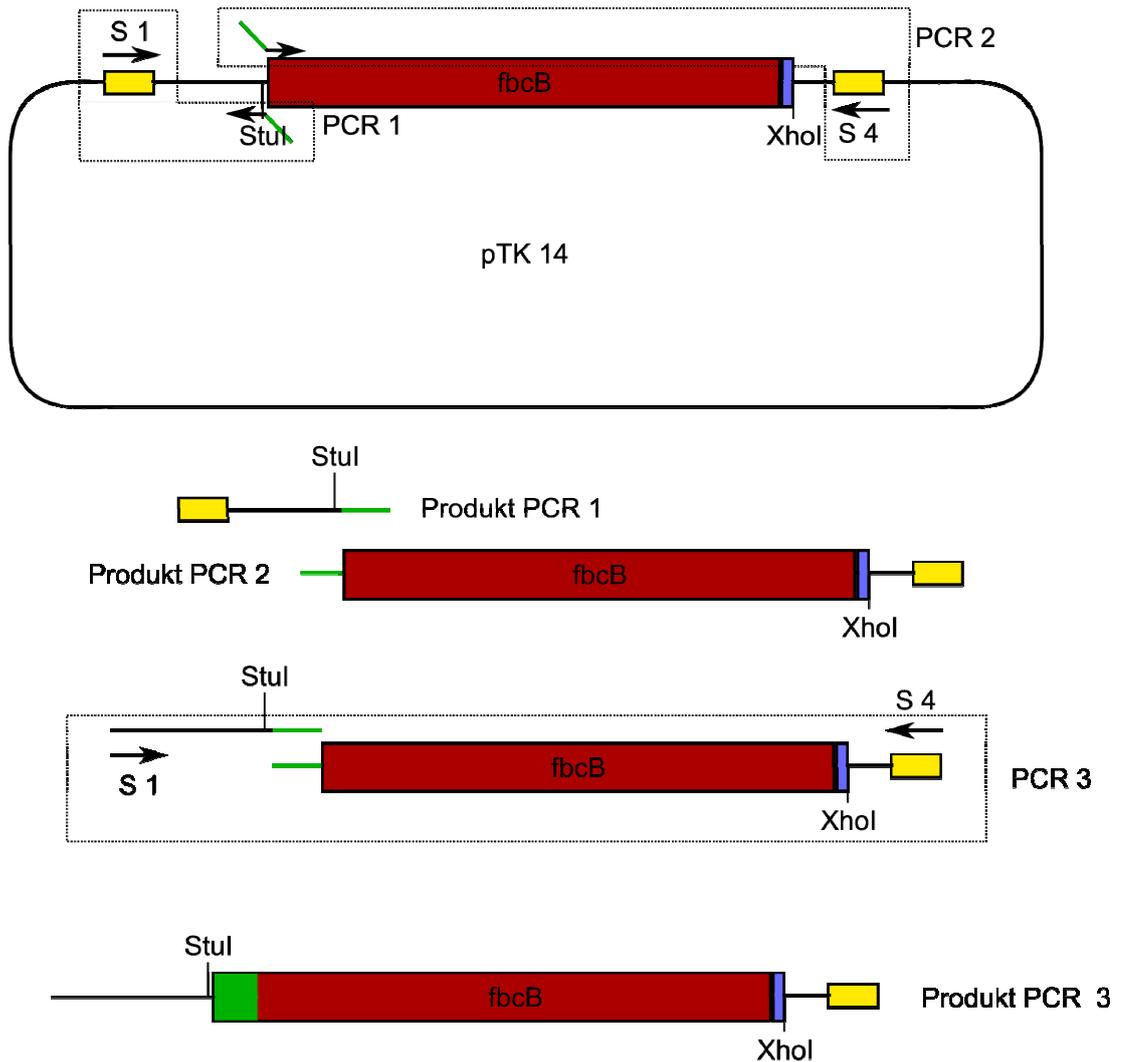


Abbildung 24: Beispiel für eine PCR-Abfolge am Beispiel eines *affinity-tags* zur Expression am N-Terminus des Cyt *b*.
 In gelb sind die universalen Primerbindungsstellen des pSL1180 eingezeichnet, in blau der Anfang des *fbcC* welcher mitkloniert wird, der eingeführte Affinitäts-tag ist in grün dargestellt, das *fbcB* in rot.
 S1 und S4 entsprechen den Primern SOEing1 und SOEing 4. Die Primer in dieser Abbildung werden durch die Pfeile dargestellt.

Die gewählten Bedingungen für PCR-Ansätze, die zu den gewünschten Ergebnissen führen, sind unten aufgelistet:

| PCR Nr. | Vorlage | Primer hin | Primer rev | Annealing-temp. [°C] | Polymerase | Amplifikationszeit [s] | Zyklen | Produktlänge [bp] |
|---------|---------|---------------------------------------|------------|----------------------|------------|------------------------|--------|-------------------|
| 5 | pTK 14 | 3-5 Primer Cyt b de-loop 10xHis-tag | Soeing-4 | 50 | <i>Pwo</i> | 60 | 30 | 970 |
| 6 | pTK 14 | 5-3 Primer Cyt b de-loop 10xHis-tag | Soeing-1 | 50 | <i>Pwo</i> | 60 | 30 | 860 |
| 7 | pTK 14 | 3-5 Primer Cyt b de-loop Strep-tag II | Soeing-4 | 50 | <i>Pwo</i> | 60 | 30 | 970 |
| 8 | pTK 14 | 5-3 Primer Cyt b de-loop Strep-tag II | Soeing-1 | 50 | <i>Pwo</i> | 60 | 30 | 860 |
| 18 | pTK14 | 3-5 Primer Cyt b c-term 10x His-tag | Soeing-4 | 55 | Phusion | 20 | 13 | 1600 |
| 19 | pTK14 | 5-3 Primer Cyt b c-term 10x His-tag | Soeing-1 | 50 | Phusion | 5 | 13 | 230 |
| 20 | pTK 14 | 3-5 Primer Cyt b c-term Strep-tag | Soeing-4 | 55 | Phusion | 20 | 13 | 1600 |
| 21 | pTK 14 | 5-3 Primer Cyt b c-term strep-tag | Soeing-1 | 50 | Phusion | 5 | 13 | 230 |
| 24 | pTK 14 | 3-5-Primer Cyt b strep-tag II n-term | Soeing-4 | 40 | Phusion | 5 | 13 | 280 |
| 25 | pTK 14 | 5-3 Primer Cyt b nterm strep-tag II | Soeing-1 | 55 | Phusion | 20 | 13 | 1550 |
| 9 | pTK 14 | 3-5-Primer Cyt b n-term RHHH | Soeing-4 | 40 | <i>Pwo</i> | 20 | 30 | 260 |

| PCR Nr. | Vorlage | Primer hin | Primer rev | Annealing-temp. [°C] | Polymerase | Amplifikationszeit [s] | Zyklen | Produktlänge [bp] |
|---------|-----------------|--------------------------|------------|----------------------|------------|------------------------|--------|-------------------|
| 29 | pTK 14 | 5'-3'-Cyt b 10 His Cyt b | Soeing-1 | 40 | Phusion | 25 | 30 | 1600 |
| 15 | PCR 5 + PCR 6 | Soeing-1 | Soeing-4 | 50 | Pwo | 60 | 13 | 1800 |
| 16 | PCR 7 + PCR 8 | Soeing-1 | Soeing-4 | 50 | Pwo | 60 | 13 | 1800 |
| 26 | PCR 18 + PCR 19 | Soeing-1 | Soeing-4 | 40 | Phusion | 30 | 13 | 1800 |
| 27 | PCR 20 + PCR 21 | Soeing-1 | Soeing-4 | 40 | Phusion | 30 | 13 | 1800 |
| 28 | PCR 24 + PCR 25 | Soeing-1 | Soeing-4 | 40 | Phusion | 30 | 13 | 1800 |
| 30 | PCR 9 + PCR 29 | Soeing-1 | Soeing-4 | 40 | Phusion | 30 | 13 | 1800 |

Tabelle 1: SOEing PCR-Ansätze zur Erzeugung der mit Affinitäts-tags versehenen Cyt *b*-Untereinheit

Ergebnisse

Die PCR-Ansätze werden zunächst durch ein analytisches Agarosegel aufgetrennt. Wenn die erwünschten Banden vorhanden sind, werden sie aufgereinigt und auf unter 10 µl einrotiert, bevor sie in einer weiteren PCR oder in einer präparativen Restriktion eingesetzt werden. Der Doppelrestriktionsansatz mit *Stu*I/*Xho*I wird danach in einem präparativen Gel aufgetrennt, die jeweiligen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und daraus aufgereinigt.

Die Fragmente werden in pTK15, der ebenfalls mit *Stu*I und *Xho*I geöffnet wurde, kloniert (Stämme TK19, TK20, TK22-24 und TK26) und per Sequenzierung des durch PCR erzeugten Bereiches auf die Anwesenheit der Affinitäts-*tags* und mögliche Fehler überprüft. In dem Plasmid pTK22 ist im Anfang des *Cyt b* eine Mutation vorhanden. Um diese zu beseitigen, wird ein den Affinitäts-*tag* enthaltendes Fragment durch eine Doppelrestriktion mit *Pfl*23II und *Xho*I ausgeschnitten. Das Fragment wird in einen entsprechend geöffneten pTK15-Vektor ligiert und im Anschluss wird der Bereich erneut sequenziert. Es ist keine Mutation mehr festzustellen, der neu erzeugte Stamm wird TK25 genannt. Die sechs *fbc*-Operons werden dann in den Expressionsvektor pRI2 umkloniert und nach Restriktionsanalyse durch Konjugation in den *P. denitrificans*-Deletionsstamm MK6 überführt. Die Plasmide werden wiederum isoliert und per Restriktionsanalyse die erfolgreiche Übertragung nachgewiesen.

3.2.2 Mutagenese und Klonierung der inaktivierenden Mutanten

Die oben erwähnten inaktivierenden Mutationen (bY145S und bM140R) werden mit einer von der Quik-Change-Methode (Stratagene) abgeleiteten Prozedur zur gerichteten Mutagenese, wie oben beschrieben, eingeführt. Als Vorlage für diese PCR-basierte Methode dient in beiden Fällen das Plasmid pTK14. Die mutagenen Oligonukleotide bY147S *Eco*24I und bM140R *Kpn*I fügen neben der eigentlichen Mutation noch eine weitere stille Mutation ein, um gleichzeitig eine Restriktionsschnittstelle zur Analyse zu erhalten; im Fall von bY147S eine *Eco*24I- und im Fall von bM140R eine *Kpn*I-Schnittstelle.

Die beiden Ansätze werden, wie oben beschrieben, nach dem Quik-change-Protokoll (Abschnitt 2.2.12) durchgeführt, im Anschluss in DH5α-Zellen transformiert und auf Amp-Selektionsplatten selektioniert. Aus Flüssigkulturen der Einzelkolonien wird jeweils die DNA isoliert und per Restriktionsanalyse mit den beiden eingeführten Schnittstellen auf eine erfolgreiche Mutagenese getestet. Jeweils ein

Ergebnisse

positiv getesteter Klon wird über den Insertbereich sequenziert. Die beiden Mutanten (pTK27 und pTK28) weisen ausser den erwünschten Mutationen keine weiteren auf und wurden mit einer *Stu*I und *Xho*I Doppelrestriktion jeweils in den Vektor pTK15 (pTK29 und pTK30) kloniert.

Die beiden *fbc*-Operons werden aus den beiden Plasmiden durch die Doppelrestriktion mit *Sac*I und *Hind*III herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pRI2, der mit der gleichen Doppelrestriktion geöffnet wird, umklontiert (pTK37 und pTK38). In einem folgenden triparentalen Mating werden die Plasmide in den *P. denitrificans bc*₁-Komplex Deletionsstamm MK6 übertragen. Auch hier wird die erfolgreiche Übertragung durch Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse nachgewiesen.

3.2.3 Biochemische Charakterisierung der Mutanten und der Cytochrom *bc*₁ Komplexe mit *affinity-tags*

Membranen der Stämme TK31-TK38 werden präpariert und bei -80 °C gelagert. Zur Analyse der Membranen werden Redoxspektren, Westernblots und Aktivitätsmessungen angefertigt.

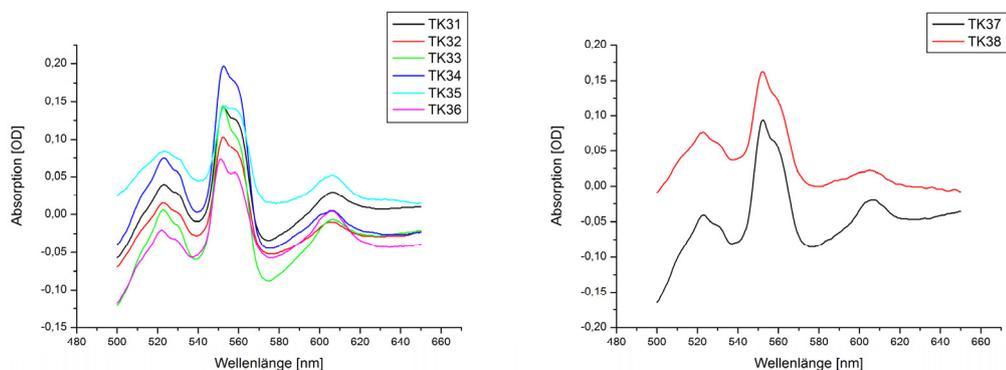


Abbildung 25: Redoxspektren der analytischen Membranpräparationen der Stämme TK31-TK38

| | |
|------|--|
| TK31 | <i>deka His-tag</i> im <i>de</i> -Loop |
| TK32 | <i>Strep-tag II</i> im <i>de</i> -Loop |
| TK33 | <i>deka His-tag</i> am C-Terminus |
| TK34 | <i>Strep-tag II</i> am N-Terminus |
| TK35 | <i>Strep-tag II</i> am C-Terminus |
| TK36 | <i>deka His-tag</i> am N-Terminus |
| TK37 | bM140R |
| TK38 | bY147S |

Ergebnisse

Die Redoxspektren zeigen deutlich die erwarteten Peaks für die *b*- (Schulter 560 nm) und *c*-Typ (Peak 550 nm) Häme sowie den für *a*-Typ Häme (Peak 610 nm) für alle Stämme. Die Spektren liegen alle im Rahmen typischer Redoxspektren von Membranen aus *P. denitrificans*. Der Verlust einzelner Häme oder Untereinheiten, die ein Häm tragen, ist unwahrscheinlich, jedoch nicht auszuschließen.

Die drei Untereinheiten des Komplexes werden durch immunologische Detektion in einem Westernblot mit den Membranen mit Hilfe von polyklonalen Standardantikörpern sichtbar gemacht (Abbildung 26 A-C). Mit dem Material aus den Stämmen TK31, TK33 und TK36 wird ein anti *penta*-His-*tag* Westernblot angefertigt (Abbildung 26 D), mit dem Membranmaterial aus den Stämmen TK32, TK34 und TK35 ein anti Strep-*tag* II Westernblot (Abbildung 26 E).

Die drei Untereinheiten können in den drei Blots gegen die Untereinheiten in allen Stämmen sichtbar gemacht werden (Abbildung 26 A-C). Auffällig ist der Stamm TK36, in dem eine deutlich geringere Expression oder Stabilität der drei Untereinheiten und damit des Komplexes vorliegt. Weiter zeigen nur die beiden Stämme TK33 und TK35 (Abbildung 26 D), die in den Blots gegen das Cyt *b* und den Strep-*tag* II nur schwach nachweisbar sind, eine Verschiebung im Vergleich zum Wildtyp zu höherem Molekulargewicht, wahrscheinlich durch den angehängten Affinitäts-*tag*.

Wie sich in den jeweils korrespondierenden Westernblots gegen die beiden Affinitäts-*tags* zeigt, lassen sie sich auch nur in diesen beiden Stämmen nachweisen, wenn auch im anti-Strep-*tag* II Westernblot nur sehr schwach unterhalb der unspezifischen Bande in der Mitte des Blots. In den anderen Fällen (TK31, TK32, TK34 und TK36) scheinen die Affinitäts-*tags* entweder abgeschirmt oder nicht vorhanden zu sein, was zumindest im Fall des N-terminalen Position durch Proteolyse vorstellbar ist. Die beiden Stämme, welche die inaktivierende Mutationen (TK37 und TK38) enthalten, zeigen in den Westernblots (Abbildung 26 A-C) alle drei Untereinheiten.

Ergebnisse

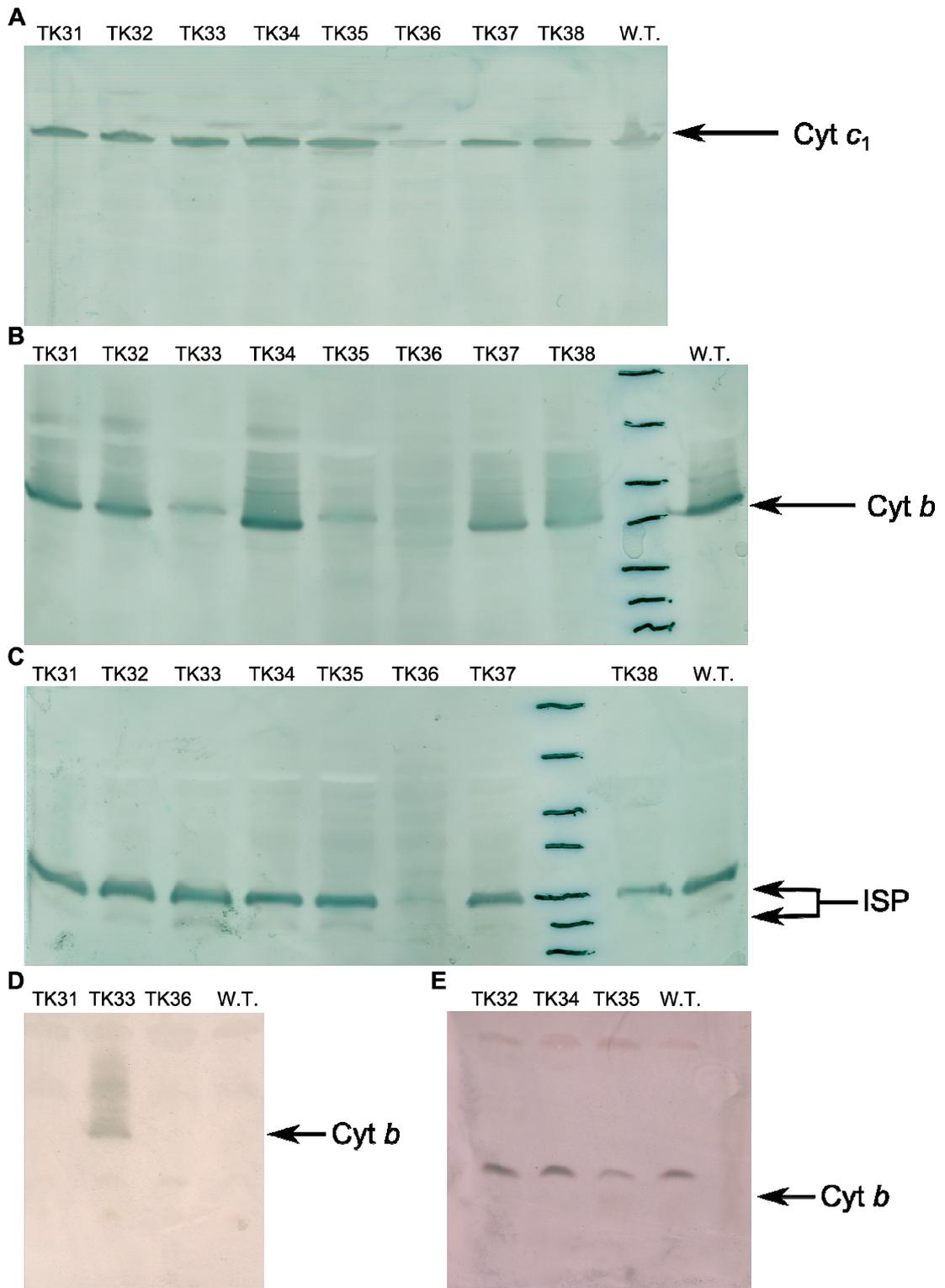


Abbildung 26: Westernblots mit Material aus der analytischen Membranpräparation der Stämme TK31-TK38 mit polyklonalen Antikörpern gegen: (A) Cyt *c*₁, (B) Cyt *b*, (C) ISP, sowie (D) His-tag und (E) Strep-tag II. Es wurden jeweils 100 µg Gesamtmembranprotein pro Spur aufgetragen.

Ergebnisse

Zur weiteren Charakterisierung werden von den Membranpräparationen der acht Stämme die spezifischen Aktivitäten bestimmt.

| Stamm | Modifikation | spezifische Aktivität [nmol cyt c/(mg*min)] |
|---------|---|--|
| Wildtyp | | 3342 |
| TK 31 | deka His- <i>tag</i> im <i>de</i> -Loop | 4933 |
| TK 32 | Strep- <i>tag</i> II im <i>de</i> -Loop | 2681 |
| TK 33 | deka His- <i>tag</i> am C-Terminus | 5544 |
| TK 34 | Strep- <i>tag</i> II am N-Terminus | 4579 |
| TK 35 | Strep- <i>tag</i> II am C-Terminus | 9611 |
| TK 36 | deka His- <i>tag</i> am N-Terminus | 89 |
| TK 37 | bM140R | 374 |
| TK 38 | bY147S | 289 |

Tabelle 2: Spezifische Membran-Aktivitäten der Stämme TK31 bis TK38; (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen)

In den Aktivitätsuntersuchungen zeigt sich, dass der Stamm TK36 im Vergleich mit allen anderen Stämmen eine sehr geringe spezifische Aktivität hat. Sie liegt noch deutlich unter den Aktivitäten der beiden inaktivierenden Mutanten. Dies ist wahrscheinlich eher auf die geringe Expression oder Stabilität des Komplexes zurückzuführen als auf eine tatsächliche Verringerung der Aktivität durch den N-terminalen *deka* His-*tag*. Weder scheint der Affinitäts-*tag* die Aktivität nicht wesentlich zu beeinflussen, wie die Ergebnisse aus Stamm TK31 und TK33 zeigen, die beide in der Größenordnung des Wildtyps liegen; auch der Ort der Insertion spielt für die Aktivität scheinbar keine Rolle, wie am Strep-*tag* II zu sehen ist, der an derselben Stelle eingeführt wurde (Stamm TK34 im Vergleich zu Stamm TK36). Die beiden inaktivierenden Mutanten zeigen eine um mehr als 90 % verringerte spezifische Aktivität und erfüllen damit die Anforderungen für die weiteren Experimente.

Anhand der bisherigen Ergebnisse wird die C-terminale Position für die beiden Affinitäts-*tags* zur weiteren Verwendung ausgewählt. Hierzu werden die beiden Komplexe aus den Stämmen TK33 und TK35 zunächst mit der klassischen Methode aufgereinigt und Redoxspektren und Aktivitätstests angefertigt.

Ergebnisse

Die Bindung an das jeweilige Säulenmaterial durch die Affinitäts-*tags* wird getestet. Für diese Untersuchungen werden jeweils 2 ml Membranen der Stämme TK33 und TK35 solubilisiert, im ersten Fall mit Solubilisierungspuffer mit Imidazol und im zweiten Fall mit demselben Solubilisierungspuffer jedoch ohne Imidazol. Im Anschluss daran werden die Solubilisate mit jeweils 1 ml des mit dem jeweiligen Aufreinigungspuffer voräquilibrierten Säulenmaterials gemischt und für eine halbe Stunde unter gelegentlichem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Danach werden die Ansätze abzentrifugiert (500 g, 4 °C), der Überstand abgenommen. Die Probe des Stammes TK35 wird zweimal mit 2 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen. Die Probe des Stammes TK33 wird mit 2 ml Äquilibrierungspuffer, mit 1 ml Puffer mit 150 mM Imidazol und dann mit 1 ml Puffer mit 300 mM Imidazol gewaschen.

Das Säulenmaterial mit dem Protein aus TK35 wird mit 1 ml Elutionspuffer für Strep-tactin Sepharose gemischt und wiederum für eine halbe Stunde unter gelegentlichem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Die Ansätze werden abzentrifugiert (500 g, 4 °C), das Eluat abgenommen und in einer Ultrafiltrationskammer ankonzentriert (*cut-off* 30 kDa). Mit dem erhaltenen Material wurden eine SDS-Gelelektrophorese und Westernblots angefertigt, sowie die Aktivitäten bestimmt.

Ergebnisse

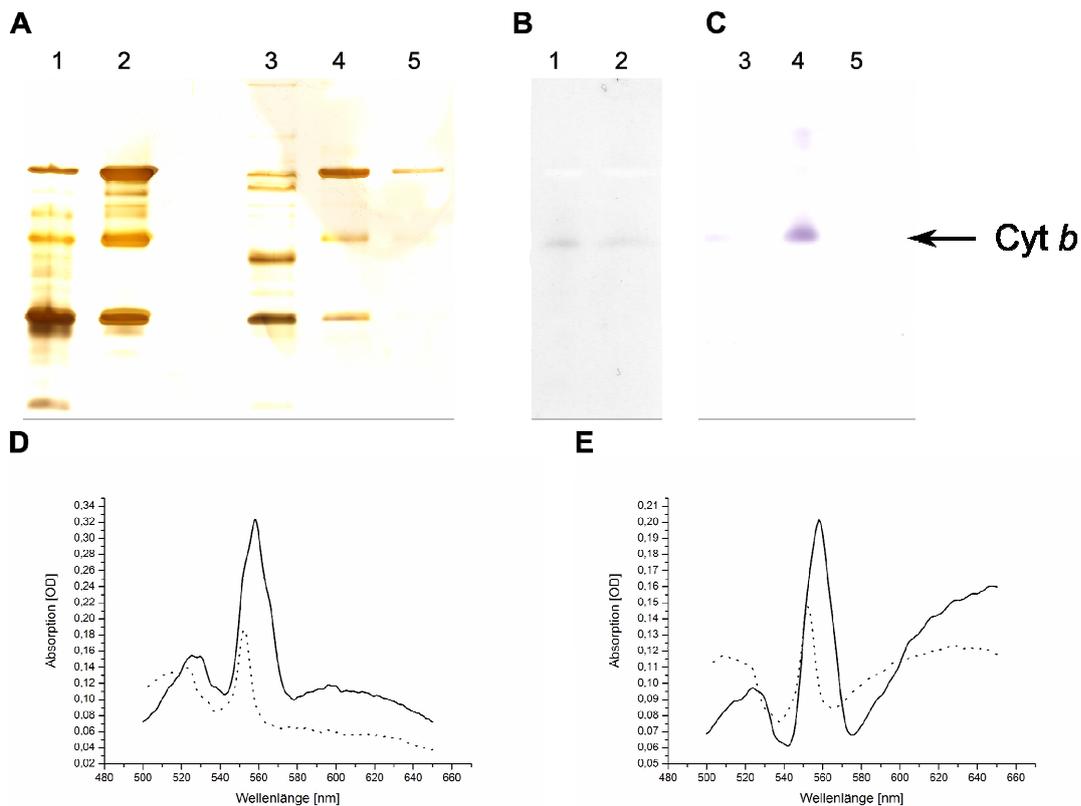


Abbildung 27: Vergleich der Cytochrom bc_1 Komplexe aus den Stämmen TK33 und TK35.

A) SDS-Gelelektrophorese (10 % Tricingel Silberfärbung),

B) anti Strep-tag II-Westernblot,

C) anti His-Westernblot. Redoxspektren der isolierten Komplexe aus:

D) TK33 (*deka His-tag*) und

E) TK35 (*Strep-tag II*) nach Bindung an das korrespondierende Säulenmaterial.

Die gestrichelte Linie zeigt das Redox-Spektrum nach Reduktion mit Ascorbat, die durchgezogene Linie nach Reduktion mit Dithionit.

- 1 Waschschrift Steptactin-Sepharose
- 2 Eluat Streptactin-Sepharose
- 3 Waschschrift Ni^{2+} -NTA-Agarose
- 4 Eluat bei 150 mM Imidazol von Ni^{2+} -NTA-Agarose
- 5 Eluat bei 300 mM Imidazol

| Stamm | Molare Aktivität [s^{-1}] |
|-------|-------------------------------|
| TK33 | 389 |
| TK35 | 350 |

Tabelle 3: Molare Aktivitäten der Cytochrom bc_1 Komplexe aus den Stämmen TK33 und TK35

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Cytochrom bc_1 Komplexe an das Säulenmaterial binden, angereichert und auch wieder eluiert werden können

Ergebnisse

(Abbildung 27 und Tabelle 4). Die Komplexe zeigen typische Redoxspektren nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat und anschließender Reduktion mit Natriumascorbat und Natriumdithionit. In den Westernblots können die Affinitäts-tags ebenfalls nachgewiesen werden. Die beiden Konstrukte (TK33 und TK35) bilden, hinsichtlich der Affinität, die Grundlage für die weiteren Experimente.

In Bezug auf die ebenfalls für dieses Projekt benötigte inaktivierende Mutation lassen die Ergebnisse die Mutante bY147S als die für das Experiment am vorteilhaftesten erscheinen (Abbildung 26, 27 und Tabelle 3). Aus diesem Grund wird das mutierte Gen mit einer StuI/Pfl23II-Doppelrestriktion aus dem Vektor pTK30 geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, aufgereinigt und im Anschluss in den gleichermaßen geöffneten und behandelten pTK33 umklont. Die Mutante (bY147S) trägt nunmehr den *deka* His-tag (TK44), während der Wildtyp einen Strep-tag II besitzt.

3.2.4 Konstruktion eines stabilen *P. denitrificans*-Stamms mit zwei *fbc*-Operons

Die Erzeugung eines *P. denitrificans*-Stamms, der zwei *fbc*-Operons stabil trägt und exprimiert, erweist sich als nicht trivial. Zunächst wird versucht, die beiden Operons (mutiertes Operon mit His-tag und das Wildtyp-Operon mit Strep-tag II) in einen Expressionsvektor vom Typ pRI2 zu klonieren. Hierzu wurden die beiden Operons mit einer HindIII/SacI-Doppelrestriktion aus den Vektoren geschnitten und isoliert. Der Vektor pRI2 wird dann mit einer SacI-Restriktion geöffnet und eine Drei-Fragmentligation versucht, die laut Restriktionsanalyse und Sequenzierung jedoch nicht zu dem erwünschten Ergebnis führt.

In einem weiteren Versuch, beide Operons in einen Vektor zu klonieren, wurde pRI2 mit SacI und AgeI verdaut. Der pTK44-Vektor wird mit einer AgeI/HindIII und pTK35 mit einer HindIII/SacI-Doppelrestriktion geöffnet. Im Anschluss daran werden die gewünschten Fragmente aufgereinigt und wiederum in einer Drei-Fragmentligation eingesetzt. Hierbei tritt dasselbe Problem wie oben beschrieben auf.

Auch die Anwendung verschiedener Klonierungsstrategien führt die Einvektorstrategie nicht zum Erfolg. Deshalb wird versucht, einen *P. denitrificans* MK6-Stamm zu erzeugen, der die beiden *fbc*-Operons auf zwei unterschiedlichen Plasmiden trägt. Für diese Strategie wird ein weiterer Expressionsvektor benötigt, der analog zum pRI2 sowohl in *E. coli* als auch in *P. denitrificans* stabil replizierbar

Ergebnisse

ist, jedoch eine andere Antibiotikumresistenz vermittelt, um beide Plasmide gleichzeitig durch den Selektionsdruck im Stamm zu erhalten. Es wird das Plasmid pBBR1-MCS5 gewählt, welches die Antibiotikumresistenz gegen Gentamycin vermittelt. Es geht auf denselben Vektor zurück, von dem auch pRI2 abstammt.

Das *fbc*-Operon mit den zusätzlichen Codons für das Strep-tag II wird mit einer HindIII/SacI-Doppelrestriktion aus dem Vektor pTK35 in den pBBR1-Expressionsvektor kloniert, woraus das Plasmid pTK41 resultiert.

Es werden mehrere Ansätze zur Erzeugung eines Stammes mit beiden Plasmiden versucht: die gleichzeitige und sequentielle Transformation oder Elektroporation der beiden Plasmide in verschiedene *E. coli*-Stämme (DH5 α , JM109 oder XL10-Gold) mit anschließender Selektion auf Gentamycin/Streptomycin-Kulturplatten. Es lassen sich jedoch keine Kolonien erzeugen, die auf den Doppelselektionsplatten mit Gentamycin/Streptomycin wachsen können.

Es wird ebenfalls versucht, durch sequenzielle Triparentalmatings und ein Parentalmating mit zwei Donorstämmen mit anschließender Selektion auf Gentamycin/Streptomycin/Kanamycin/Rifampicin-Kulturplatten direkt einen *P. denitrificans*-Stamm zu erhalten, der beide Plasmide trägt. Die Versuche mit *P. denitrificans* scheinen zunächst erfolgversprechender, da hier entsprechende Kolonien erhalten werden können. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA und ein Doppelrestriktionsverdau mit den beiden Restriktionsendonukleasen BglII und Bpu1102I zeigt jedoch, dass immer nur pTK44 vorliegt und pTK41 verloren gegangen ist.

Die Endonuklease BglII führt durch einen Einzelschnitt in der Resistenz des Vektors pTK41 zur Linearisierung, dies gilt ebenfalls für die Kombination der Restriktionsendonuklease Bpu1102I mit dem Vektor pTK44. Da die beiden Vektoren in ihrer Gesamtgröße um mehr als 1 kb differieren, können sie in einer anschließenden Agarosegelelektrophorese unterscheidbar getrennt werden.

Obwohl nur der die Streptomycinresistenz vermittelnde Vektor pTK44 nachweisbar ist, sind die erzeugten Stämme auch Gentamycin-resistent. Deshalb wird der *P. denitrificans*-Stamm TK44 zur Kontrolle ebenfalls auf Gentamycin-haltigen Selektionsplatten ausgestrichen und kultiviert. Dieser Stamm zeigt jedoch kein Wachstum auf den verwendeten Selektionsplatten. Möglicherweise ist

Ergebnisse

P. denitrificans in der Lage, die Gentamycinresistenz in sein Genom zu integrieren, was jedoch nicht weiter untersucht wird.

Die beiden Vektoren sind, wie oben erwähnt, Derivate eines Ursprungsplasmids und haben deshalb auch denselben *origin (ori)*, sie gehören damit auch einer *inc*-Gruppe an. Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb sie, selbst unter Selektionsdruck, nicht parallel im gleichen Stamm replizierbar sind. Für *P. denitrificans* gibt es einen weiteren *broad-host-range ori*, der auch in *E. coli* replizierbar ist. Dieser *ori* ist im Plasmid pEG400 vorhanden, das vor dem pRI2 im Institut für die Expression in *P. denitrificans* verwendet wird und eine Streptomycinresistenz vermittelt.

Das *fbc*-Operon aus pTK44 wird mit einer Doppelrestriktion mit HindIII und SacI über ein Derivat des pBlueskript-Klonierungsvektors (pTK51) in pEG400 umklontiert (pTK52). Das *fbc*-Operon aus diesem Plasmid und aus pTK41 wird sequenziert und dabei eine Mutation im vorderen Teil von *fbcB* des *fbc*-Operons aus pTK41 festgestellt. Diese unerwünschte Mutation wird durch den Austausch des Bereiches mit einer StuI/Pfl23II-Doppelrestriktion und Ersatz mit einem gleichartig isolierten Fragment aus pTK12 beseitigt. Es entsteht pTK53, das durch Sequenzierung verifiziert wird.

Die beiden Vektoren pTK52 und pTK53 werden den bereits oben erwähnten Bedingungen für eine Plasmidübertragung durch Konjugation unterzogen. Das Parental Mating mit zwei Donoren führt zum Erfolg (TK54) und die erfolgreiche Übertragung beider Plasmide kann durch die oben beschriebene Restriktionsanalyse nach DNA-Isolierung nachgewiesen werden. Dieser Stamm wurde zur Aufreinigung des gemischten Dimers herangezogen.

3.2.5 Biochemische Charakterisierung des mit zwei *Affinitäts-tags* versehenen Komplexes

Es werden Membranen des Stammes TK54 präpariert. Die Membranen (1 ml) werden unter den bereits unter Abschnitt 3.2.3 angegebenen Bedingungen solubilisiert und der Cytochrom *bc₁* Komplex mit DEAE-Sepharose, Ni²⁺NTA-Agarose und Streptactin-Sepharose aufgereinigt. Die Expression, das Vorhandensein und die Zugänglichkeit der beiden *Affinitäts-tags* soll hiermit gezeigt werden. Das isolierte Material wird durch SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert.

Ergebnisse

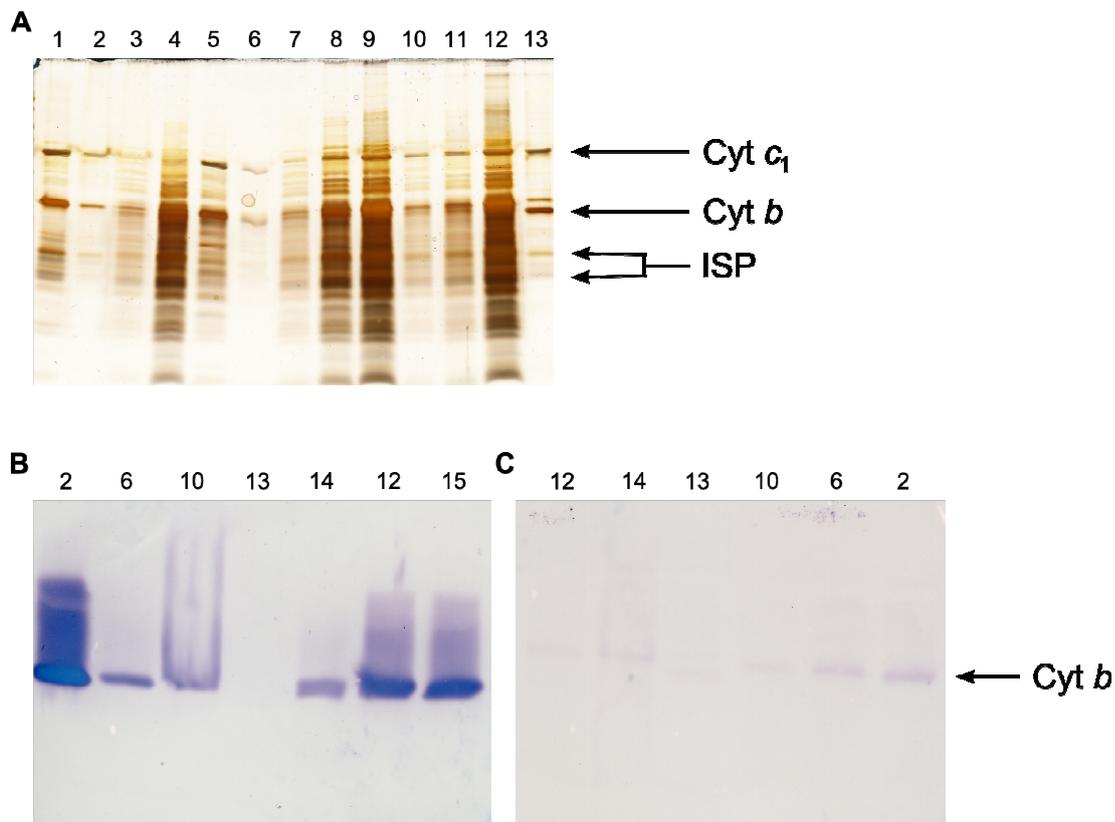


Abbildung 28: Analyse des Cytochrom bc_1 Komplexes aus Stamm TK54.
A) SDS-Gelelektrophorese (10 % Tricینگel, Silberfärbung) aller drei Aufreinigungen,
B) anti *penta*-His Westernblot,
C) anti Strep-tag II Westernblot.

- 1 Ankonzentrierte Elution von der DEAE-Sepharose
- 2 Elution von der DEAE-Sepharose
- 3 Waschschrift der DEAE-Sepharose
- 4 Überstand der DEAE-Sepharose nach Inkubation
- 5 Ankonzentrierte Elution von der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 6 Elution von der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 7 Waschschrift der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 8 Überstand der Ni^{2+} NTA-Agarose nach Inkubation
- 9 Ankonzentrierte Elution von der Streptactin-Sepharose
- 10 Elution von der Streptactin-Sepharose
- 11 Waschschrift der Streptactin-Sepharose
- 12 Überstand der Streptactin-Sepharose nach Inkubation
- 13 Cytochrom bc_1 Komplex Wildtyp
- 14 Membranen Stamm TK54
- 15 Cytochrom bc_1 Komplex mit His-tag aus Stamm TK33 Positivkontrolle

Die Westernblots und die SDS-Gelelektrophorese zeigen eindeutige Ergebnisse (Abbildung 28), bereits auf der Membranebene können beide Affinitäts-*tags*

Ergebnisse

nachgewiesen werden. Weiter ist auf dem *anti penta*-His-Westernblot zu sehen, dass die Affinitäts-*tags* nicht nur in den Eluaten der DEAE-Sepharose und der Ni²⁺NTA-Agarose, sondern auch der Streptactin-Sepharose vorliegen. Da in dem DEAE-Fall nicht über einen Affinitäts-*tag* aufgereinigt ist, muss ein Proteinkomplex enthalten sein, der beide Affinitäts-*tags* trägt. Im Überstand der Ni²⁺NTA-Agarose kann der Strep-*tag* II ebenfalls erwartungsgemäß nachgewiesen werden, da sich auch Komplexe bilden, die nur eine Art der Affinitäts-*tags* tragen. Dies gilt *vice versa* für den Strep-*tag* II. Es werden nicht nur beide Operons exprimiert, es bilden sich auch in der Membran stabile Mischkomplexe, die nachweisbar beide Affinitäts-*tags* tragen.

Aktivitätsmessungen mit den isolierten Membranen (3373 nmol cyt c/mg*min) ergeben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (3342 nmol cyt c/mg*min).

3.2.6 Tandemaufreinigung des Cytochrom *bc*₁ Komplexes mit His- und Strep-*tag* II

Der gemischte Cytochrom *bc*₁ Komplex soll nun aus der in den Membranen vorliegenden Verteilung aus gemischten und nicht-gemischten Komplexen (Abschnitt 3.2.7) isoliert werden. Diese Population von Komplexen trägt beide Affinitäts-*tags*, wodurch sie mit einer sequenziellen Tandemaufreinigung mit Ni²⁺NTA-Agarose und Streptactin-Sepharose aufgereinigt werden kann. Die Membranen werden nach dem Standardprotokoll für die konventionell chromatografische Aufreinigung solubilisiert, denn zunächst wird der Komplex über eine DEAE-Sepharosesäule aufgereinigt. Dies geschieht zur effektiven Vorreinigung, da mehrere Populationen von Cytochrom *bc*₁ Komplexen erwartet werden, und somit die spätere Trennung der Subpopulationen besser verfolgt werden kann (Abbildung 29 A).

Das Eluat der DEAE-Sepharosesäule wird in drei Stufen gegen den Nidrigsalzpuffer ohne DDM der Ni²⁺NTA-Agarosesäule dialysiert (2 mal 1 h und anschließend über Nacht; 4 °C). Ein pH-Wert von 8 ist notwendig, um eine optimale Bindung des Komplexes durch das Säulenmaterial zu gewährleisten, aber auch seine effektive Elution vom Säulenmaterial. Wird ein pH-Wert unter 7,5 gewählt, kommt es zu einer unscharfen Elution, die immer schlechter wird, je niedriger der pH-Wert (bis 6,0) gewählt wird, sowohl durch Imidazol als auch Histidin.

Ergebnisse

In anderen Untersuchungen wurde gezeigt (hier nicht dargestellt, persönliche Mitteilung M. Castellani), dass die Elution des Cytochrom *bc₁* Komplexes mit Imidazol zur teilweisen Reduzierbarkeit des Häms *b* mit Ascorbat führt, statt nur auf das Häm *c₁* beschränkt zu bleiben. Dies kann an einer veränderten Ligandierung des Häm *b* liegen. Aus diesem Grund wurde hier Histidin zur Elution verwendet. Wird das Dialysat auf die Säule aufgetragen, ist bereits im Säulendurchlauf eine deutliche Rotfärbung zu sehen, aber auch die Säule färbt sich rot. Hieraus wird, wie später bestätigt, geschlossen, dass der Teil der Komplexe, die nur den Strep-*tag* II tragen, nicht an dieses Material bindet. Die Säule wird mit zwei Säulenvolumen Niedrighistidinpuffer gewaschen (Abschnitt 2.3.5.3) und anschließend mit einem Gradienten (0-150 mM Histidin) eluiert (Abbildung 29 B).

Der zweite Peak (Abbildung 29 B) der Ni²⁺NTA-Agarosesäule wird direkt auf die Streptactin-Sepharose aufgetragen. Hier ist ebenfalls zu beobachten, dass der Teil des Materials, der nur den His-*tag* trägt, nicht an das Säulenmaterial bindet. Der Komplex wird mit zwei Säulenvolumen des Elutionspuffer von der Säule gewaschen (Abbildung 29 C).

Ergebnisse

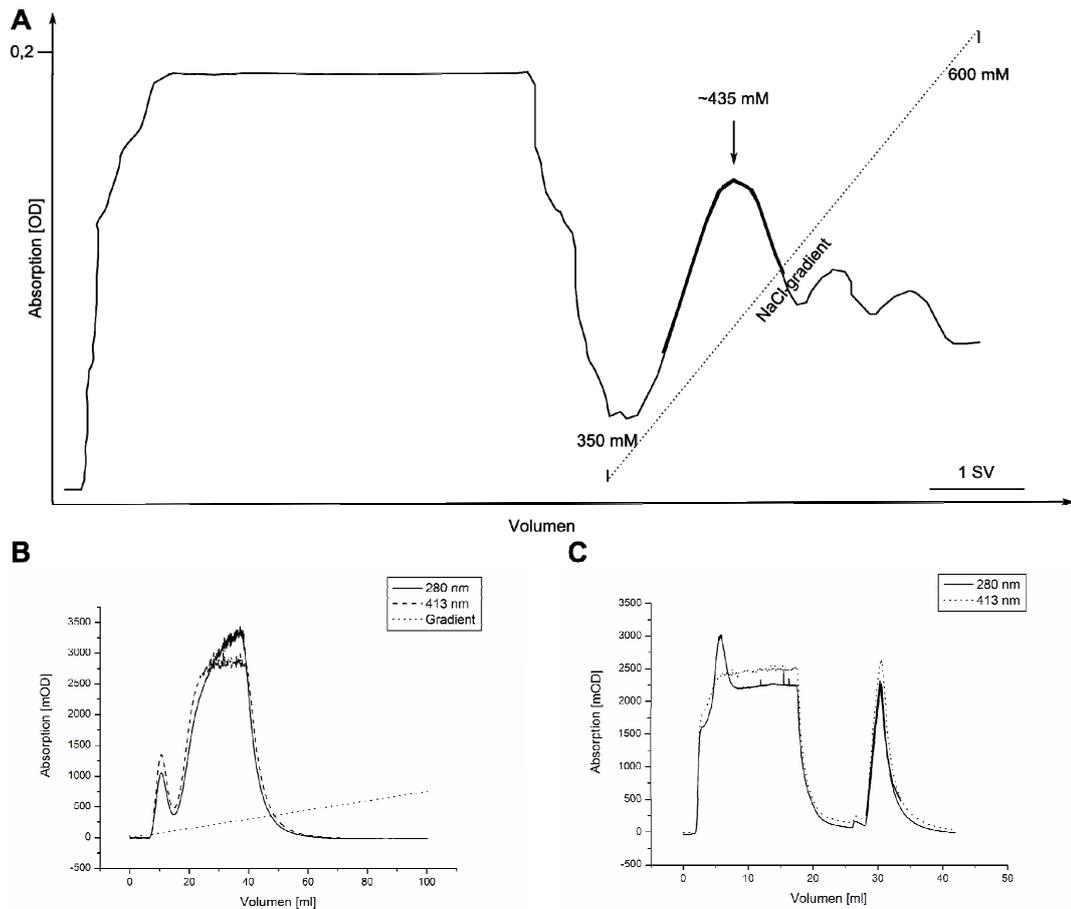


Abbildung 29: Elutionsprofil der sequenziellen Tandemaufreinigung,
A) Elutionsprofil der DEAE-Sepharose bei Anlegen eines NaCl-Gradienten (350-600 mM);
B) Elution von der Ni²⁺-NTA-Agarose mit einem Histidin-Gradienten (0-150 mM), Laden nicht gezeigt, und Waschen;
C) Elution von der Streptactin-Sepharose mit Desthiobiotin (2,5 mM). Die Bereiche der Elutionsprofile, die mit breiter Linie nachgezogen sind, werden als Pool weiterverwendet.
Im Elutionsprofil B) wurde der gesamte zweite Peak als Eluat angesehen.

Von den verschiedenen Aufreinigungsstufen wurden SDS-Gelelektrophoresen, Westernblots, Redoxspektren und Aktivitätstests angefertigt.

Ergebnisse

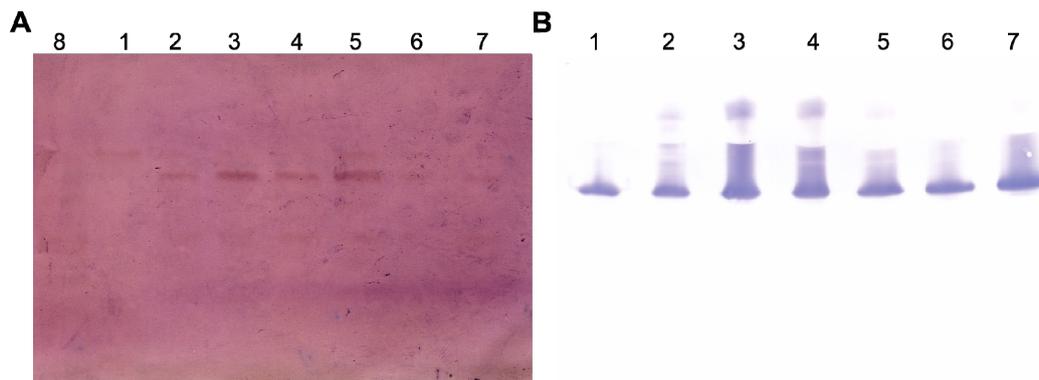


Abbildung 30: Tandemaufreinigung des gemischten Cytochrome bc_1 -Komplexes aus Membranen des Stammes TK54;
A) *anti penta*-His-Westernblot;
B) *anti Strep-tag II* Westernblot.

- 1 Säulendurchlauf der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 2 Waschschrift der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 3 Peak 1 von der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 4 Hauptpeak der Ni^{2+} NTA-Agarose
- 5 Säulendurchlauf der Streptactin-Sepharose
- 6 Waschschrift der Streptactin-Sepharose
- 7 Elution der Streptactin-Sepharose
- 8 Solubilisat

Die Westernblots (Abbildung 30 A und 30 B) zeigen in den meisten Fällen das erwünschte Ergebnis. Auf dem His-Westernblot fehlt allerdings in der Spur des Solubilisats (Abbildung 30 A) das Signal, möglicherweise da die Qualität des Blots nicht optimal ist. Desweiteren sollten im Durchlauf und im Waschschrift der Streptactin-Sepharosesäule keine Signale im *anti Strep-tag II* Westernblot auftauchen, möglicherweise ist hier die Bindungskapazität der Säule erreicht, obwohl innerhalb der vom Hersteller angegebenen Kapazitätsgrenzen gearbeitet wird. Es kann jedoch auch ein Hinweis darauf sein, dass diese Art der Tandemaufreinigung nicht ausreichend genug auftrennt oder die Komplexe in einem anderen Zustand vorliegen als angenommen (Abschnitt 3.4).

Ergebnisse

| Probe | molare Aktivität [s^{-1}] |
|---|---|
| Elution von DEAE-Sepharose | 250 |
| Ni ²⁺ NTA-Agarose: Säulendurchlauf | 281 |
| Ni ²⁺ NTA-Agarose: Waschschrift | 273 |
| Ni ²⁺ NTA-Agarose: Peak 1 | 440 |
| Ni ²⁺ NTA-Agarose: Peak 2 | 248 |
| Streptactin-Sepharose: Säulendurchlauf | 506 |
| Streptactin-Sepharose: Waschschrift | 350 |
| Streptactin-Sepharose: Elution | 122 |

Tabelle 4: Aktivitätsmessungen der Aufreinigungsstufen aus der Tandemaufreinigung von Membranen des Stammes TK54 (Mittelwerte aus Dreifach-Bestimmungen); ein vergleichbarer Wildtyp liegt bei $\sim 300 s^{-1}$

Die ermittelten Aktivitäten lassen sich schwer erklären. Zunächst ist auffällig, dass die Aktivitäten der Säulendurchläufe und Waschschriffe von der Streptactin-Sepharosesäule nicht, wie erwartet gleich sind, da lediglich mit dem Äquilibriumspuffer gewaschen wird, um ungebundenes Protein zu entfernen. Es sollten keine unterschiedlichen Subpopulationen wieder von den Säulen gewaschen werden können. Die Probe Waschschrift von der Streptactin-Sepharosesäule zeigt eine niedrige Restaktivität von nur noch einem Drittel verglichen mit der Probe Säulendurchlauf. Weiter ist auffällig, dass dieser Säulendurchlauf die höchste Aktivität hat, wobei hier nur Komplexe mit *His-tag*, also mit der inaktivierenden Mutante enthalten sein sollten. Die Aktivität dieser Subpopulation sollte in der Größenordnung des Werts des aus dem Stamm (Stamm TK54), der nur die inaktivierende Mutation trägt, isolierten Cytochrom *bc₁*-Komplexes liegen. Die Elution von der Streptactin-Sepharosesäule liegt im Bereich zwischen dem Wildtyp und der inaktivierenden Mutante und erlaubt keine definitive Aussage.

Der erste Peak von der Ni²⁺NTA-Agarosesäule zeigt eine sehr hohe Aktivität und ist mit einem Dimer-Modell nicht zu erklären, außer wenn man von einer unspezifischen Bindung des den *Strep-tag II* tragenden Komplexes ausgeht. Der Peak 2 der Ni²⁺NTA-Agarosesäule ist in jedem Fall eine Mischpopulation, weshalb dieser Wert schwer eingeschätzt werden kann. Allerdings erscheint er im Hinblick darauf, dass er einen höheren Anteil der Mutante enthalten sollte, wenn man von

Ergebnisse

gleicher Expression ausgeht, höher als erwartet. Der Expressionslevel der beiden Operons wird nicht untersucht.

In Untersuchungen zum Multimerenzustand des Cytochrome bc_1 -Komplexes unter 3.4 wird festgestellt, dass der Komplex als Tetramer im solubilisierten Zustand vorliegt, wobei davon ausgegangen wird, dass der Tetramer ein Dimer aus zwei Dimeren ist. Die dieser Überlegung zu Grunde liegende Annahme ist, dass es sich, wie aus den Strukturen hervorgeht, beim Cytochrom bc_1 -Komplex um ein Dimer handelt und dies die kleinste Funktionseinheit ist. Dies wird durch die beiden verschränkten Rieske-Proteine untermauert. Für den gemischten Cytochrome bc_1 -Komplex ergeben sich dadurch mehr Möglichkeiten zur Kombination der Affinitäts-*tags* und damit auch von Wildtyp-Monomer zu inaktivem Monomer als bei einem Dimer.

Es können pro Affinitäts-*tag* fünf Zustände vorliegen, von keinem bis zu vier Affinitäts-*tags*. Ein weiteres Problem ergibt sich daraus, wie die Monomeren im Verhältnis zueinander angeordnet sind, denn selbst ein Komplex der das 2:2-Verhältnis der Affinitäts-*tags* aufweist, kann aus einem Dimer bestehen, das vollständig Wildtyp ist, und aus einem zweiten, das zweimal die inaktive Mutante enthält, so dass eine Mischaktivität vorliegt.

Dies kann teilweise erklären, weshalb kein den Erwartungen entsprechendes Ergebnis durch die Aktivitätstest erhalten werden konnte. *Stopped-flow* Experimente (hier nicht dargestellt, durchgeführt von Raul Covian aus Bernhard Trumpowers Gruppe, Hanover, USA) liefern ebenfalls keine auswertbaren Daten.

Eine mögliche Alternative zur Tandemaufreinigung, die aus den zuvor genannten Gründe nicht zum gewünschten Ergebnis führt, ist die Ausnutzung der Avidität. Da der Komplex über mehrere His-*tags* verfügt und mit einem Gradient des um die Bindungsstelle konkurrierenden Imidazols eluiert werden kann, sollte mit steigender Anzahl der Affinitäts-*tags* auch der Elutionspunkt steigen. An dieser Stelle wird wieder auf Imidazol als Elutionsmittel zurückgegriffen, denn mit Histidin wird der Elutionspunkt hin zu niedrigeren Konzentrationen verschoben. Da hier aber eine möglichst scharfe Trennung durch einen flachen Gradienten (10 Säulenvolumen, 0-250 mM Imidazol) erzielt werden soll, werden zunächst die negativen Eigenschaften des Imidazol vernachlässigt. Die einzige erwünschte Population, die ein eindeutiges Ergebnis liefern kann, ist ein Tetramer, das drei His-*tags* und damit dreimal die

Ergebnisse

inaktivierende Mutation trägt und nur einmal den *Strep-tag* II mit dem Wildtypmonomer. In dieser Subpopulation liegt in einem Dimer die Kombination aus Wildtyp und Mutante vor, das andere Dimer ist durch die doppelte inaktivierende Mutante ausgeschaltet und beeinflusst die Reaktion nicht.

Mehrere Versuche der Aufreinigung, erst mit der klassischen Methode, dann eine Trennung auf Grund der Avidität über eine Ni^{2+} -NTA-Agarosesäule mit Imidazolgradient, scheitern daran, dass kein reproduzierbares Ergebnis erzielt werden kann. Es können mehrere Peaks des Cytochrom *bc*₁-Komplexes dargestellt werden, jedoch ist eine saubere Trennung und eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, da die Peaks teilweise ineinander übergehen. Das Expressionsmuster scheint ebenfalls von Anzuchtbedingungen abhängig zu sein, denn einzelne Peaks sind in unterschiedlichen Aufreinigungsversuchen mit unterschiedlichen Intensitäten zu beobachten. Die gewünschte Subpopulation mit drei *His-tags* scheint einen noch geringeren Anteil der Gesamtmenge auszumachen als bereits vermutet, denn sie ist nur als Schulter im Peak der zweifach *His-tag* markierten Komplexe bei der Verfolgung der Elution zu sehen. Eine Elution mit Histidin wurde versucht, jedoch verschlechtert sich die Auflösung hier so stark, dass alle Populationen in einem sehr breiten Peak eluieren.

3.3 Mutanten des Q_p -Zentrums

Die in diesem Teil der Arbeit erzeugten Mutanten werden an Hand von elektrochemisch-gekoppelten FTIR-Untersuchungen, die bereits am Wildtyp etabliert und in der Vergangenheit publiziert wurden, untersucht (115).

Dabei stehen der Protonierungszustand sowie die Wechselwirkung mit dem gebundenen Chinon oder dem Inhibitor Stigmatellin ausgewählter Seitengruppen in und um das Q_p -Zentrum im Mittelpunkt.

Die eindeutige Zuordnung der Schwingungen zu den korrespondierenden Aminosäureseitenketten spielt bei der Auswertung von FTIR-Spektren eine große Rolle und damit auch für die Auswahl der Mutanten. Es bieten sich hier die sauren Gruppen und die Seitengruppe des Tyrosins an, da sie sich gut identifizieren lassen. Durch Protonierungen und Deprotonierungen können Änderungen dieser Schwingungen während der elektrochemischen Untersuchungen im Infrarotbereich aufgenommen werden. Durch konservative Mutationen der erwähnten

Ergebnisse

Seitengruppen können diese Schwingungen beeinflusst werden. Aus diesen Gründen beschränkt sich die Auswahl auf Mutationen der genannten Aminosäuren. Ein weiteres Auswahlkriterium ist die Diskussion der ausgewählten Mutanten, im Hinblick auf ihre Bedeutung bei der Hydroxychinon-Oxidation im Q_p -Zentrum oder der Protonenleitung vom Q_p -Zentrum aus dem Komplex in der Literatur.

Durch ein Sequenzalignment mit verschiedenen Spezies (Abbildung 31) wird die Konservierung der ausgesuchten Reste im Cytochrom *b* untersucht.

Ergebnisse

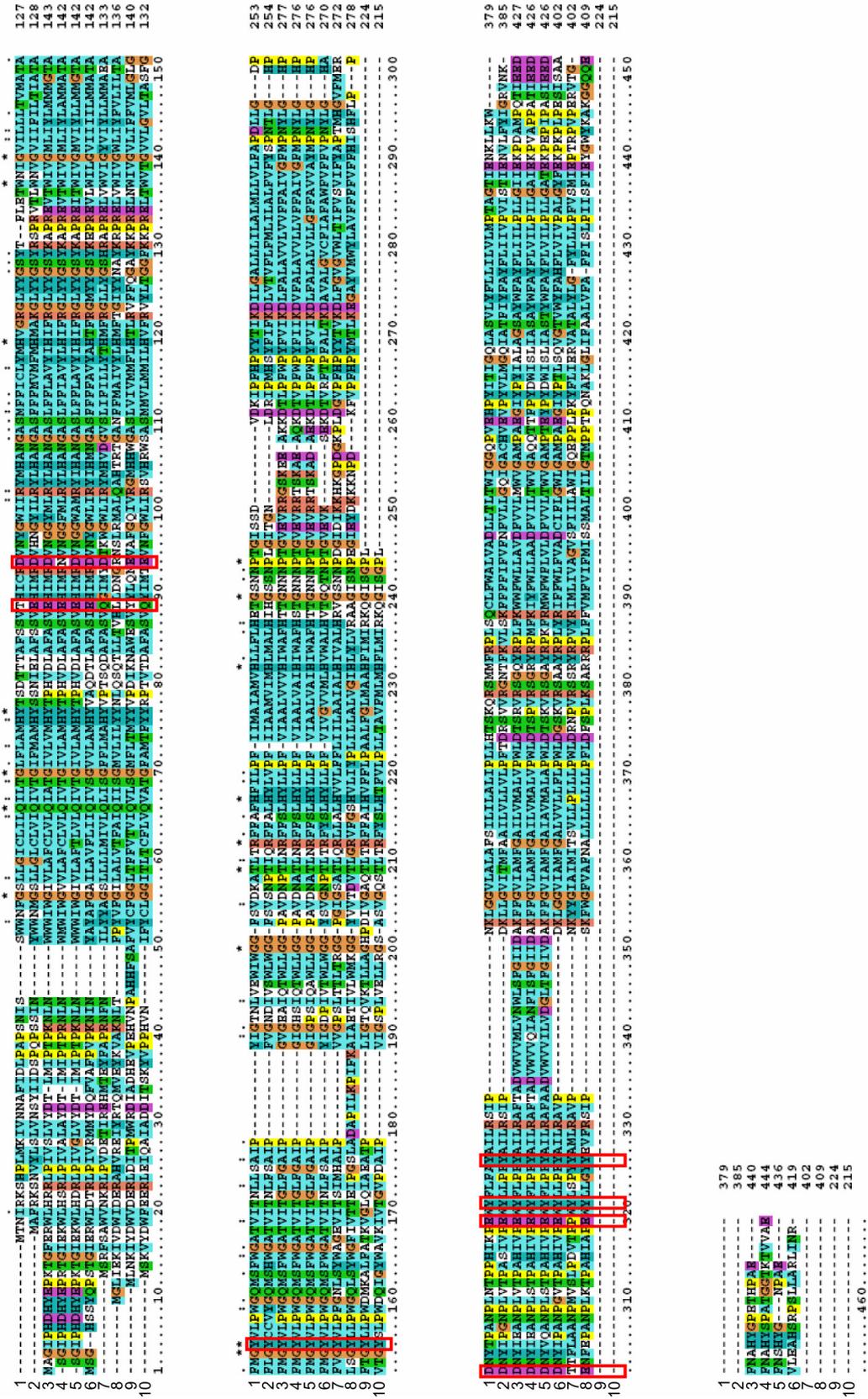


Abbildung 31: Cytochrom *b* Sequenzalignment folgender Spezies

Ergebnisse

Abbildung 31: Cytochrom *b* Sequenzalignment folgender Spezies

- 1 *B. taurus*
- 2 *S. cerevisiae*
- 3 *P. denitrificans*
- 4 *R. sphaeroides*
- 5 *R. capsulatus*
- 6 *Rhodopseudomonas viridis*
- 7 *Thiobacillus ferrooxidans*
- 8 *Aquifex aeolicus*
- 9 *Bacillus subtilis*
- 10 *Spinacia oleracea*

Positionen mit einem Stern sind über alle verglichenen Spezies konserviert. Mit Punkten gekennzeichnete Positionen enthalten nur Austausche gegen gleichartige Aminosäuren. Die sieben Positionen der Mutanten sind mit roten Kästen umrahmt. (erstellt mit ClustalX)

Die ausgewählten Reste sind über einen weiten Bereich der Spezies konserviert, was ein wichtiger Hinweis auf ihre Bedeutung ist. Anhand dieser Erkenntnisse wurden die Reste in der Struktur von *S. cerevisiae* (1ezv) herausgesucht und hervorgehoben (Abbildung 32).

Ergebnisse

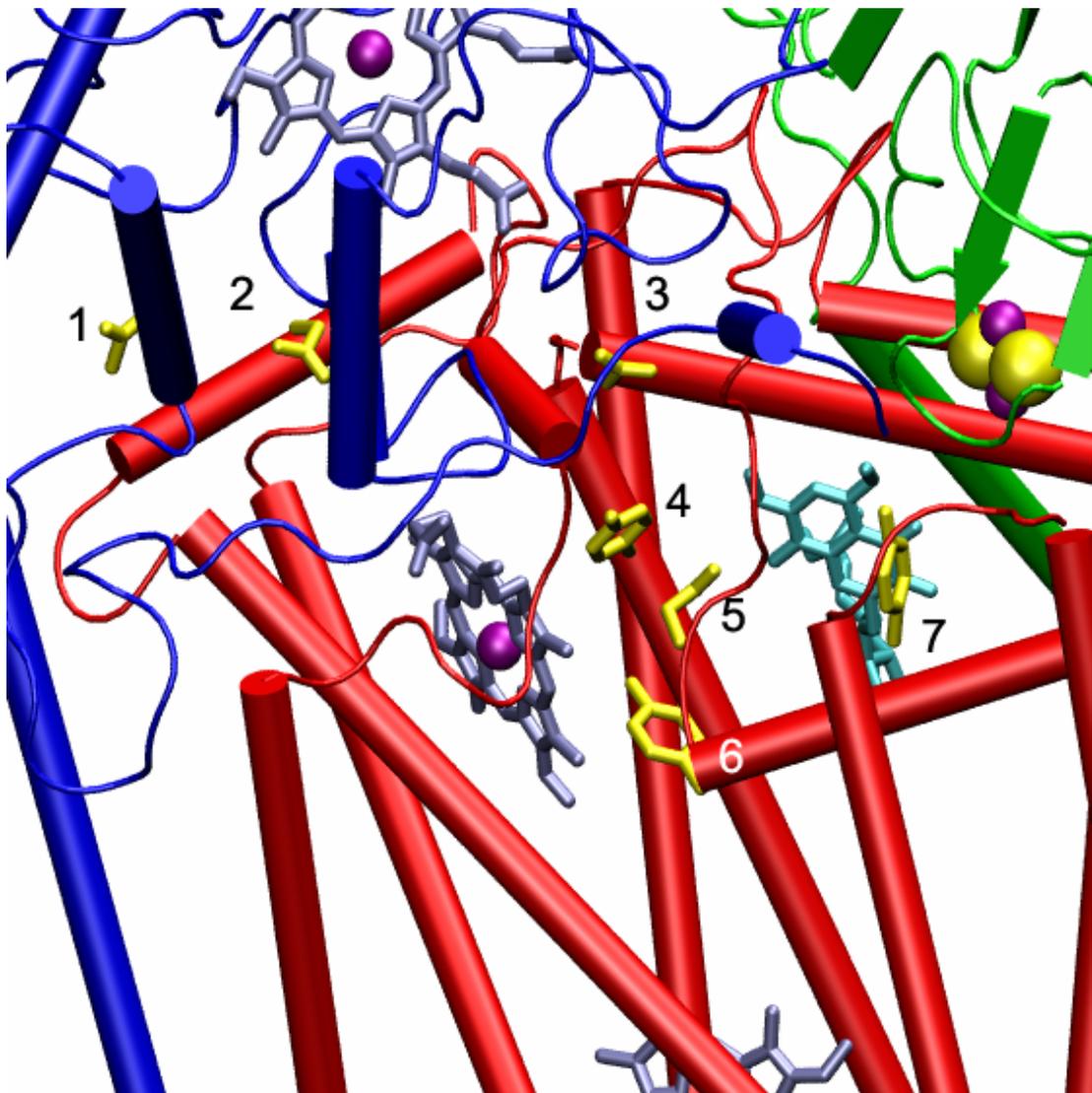


Abbildung 32: Ausgewählte, konservierte Reste in der *S. cerevisiae*-Struktur (1ezv). Cyt *b* ist in rot, Cyt *c*₁ in blau und das ISP in grün, die Häme in stahlblau, die Eisenatome in violett, Schwefelatome in gelb, das Stigmatellin in cyan und die Seitengruppen in gelb dargestellt.

Die erste Zahl entspricht der *S. cerevisiae*-, die zweite der *P. denitrificans*-Nummerierung:

- | | |
|---|----------|
| 1 | D71/86 |
| 2 | E66/81 |
| 3 | D255/278 |
| 4 | Y132/147 |
| 5 | E272/295 |
| 6 | Y274/297 |
| 7 | Y279/302 |

3.3.1 Klonierung und Mutagenese der Mutanten

Die oben aufgeführten Positionen sollen möglichst konservativ mutiert werden, dementsprechend wird Asparaginsäure (D) in Asparagin (N), Glutaminsäure (E) in Glutamin (Q) und Tyrosin (Y) in Phenylalanin (F) umgewandelt. Drei der Mutationen (D278N, E295Q, Y297F) wurden bereits früher erzeugt (197).

Der Vektor pAN36 dient als Template für die gerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.2.12) mit den mutagenen Oligonukleotiden bY147F und bD86N. Die dritte und vierte Mutagenese wurde auf dem Vektor pAN42 respektive pTK39 mit dem mutagenen Oligonukleotid bE81Q beziehungsweise bY302F durchgeführt. Die beiden aus dem pAN36 hervorgegangenen Vektoren (pTK42 und pTK43) werden zunächst über den Insertbereich sequenziert, dann mit einer NcoI/SmaI-Doppelrestriktion geöffnet, das Insert isoliert und jeweils in einen gleichartig geöffneten pAN42 umklontiert (pTK45 und pTK46). Die erhaltenen Expressionsvektoren werden über den Bereich des *fbcB* sequenziert. Alle vier Vektoren werden dann mit einem triparentalen Mating in *P. denitrificans* (MK6) überführt. Die Plasmide werden aus dem neuen Wirt isoliert und die Übertragung durch Restriktionsanalyse verifiziert.

3.3.2 Aufreinigung der Mutanten

Die Stämme mit den mutierten Cytochrom *bc*₁ Komplexen (TK39, TK40, TK45, TK46, die bereits vorhandenen sowie ein Wildtypstamm) werden nacheinander im 25 l Maßstab angezogen und Membranen präpariert. Im Anschluss werden alle Cytochrom *bc*₁ Komplexe mit der konventionellen Methode per DEAE-Sepharosesäule aufgereinigt, ankonzentriert (100 kDa cut-off) und im Anschluss mit einer Sephadex G-25, die mit Laufpuffer zur Gelfiltration für FTIR-Spektroskopie voräquiliibriert war, der Puffer ausgetauscht. Die Proben werden hiernach wieder auf mindestens 0,5 mM pro Monomer ankonzentriert (100 kDa cut-off).

3.3.3 Biochemische Charakterisierung der Mutanten

Von den aufgereinigten Cytochrom *bc*₁ Komplexen wurden Redoxspektren, SDS-Gelelektrophoresen, Westernblots und Aktivitätstests angefertigt.

Ergebnisse

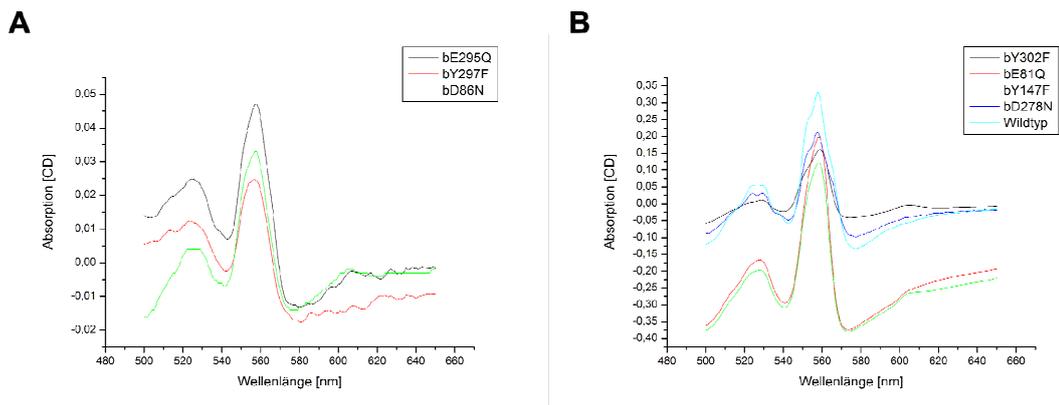


Abbildung 33: Redoxspektren der Cytochrom bc_1 Komplex-Mutanten, (A) die Mutanten bE295Q, bY297F und bD86N, (B) die Mutanten bY302F, bE81Q, bY147F, bD278N, Wildtyp.

Die Redoxspektren zeigen für alle Cytochrom bc_1 Komplex-Mutanten und den Wildtyp das charakteristische Spektrum. Hieraus kann geschlossen werden, dass zumindest die beiden Häm-tragenden Untereinheiten vorhanden sind und deren Proteinumgebung und Ligandierung nicht maßgeblich beeinflusst ist.



Ergebnisse

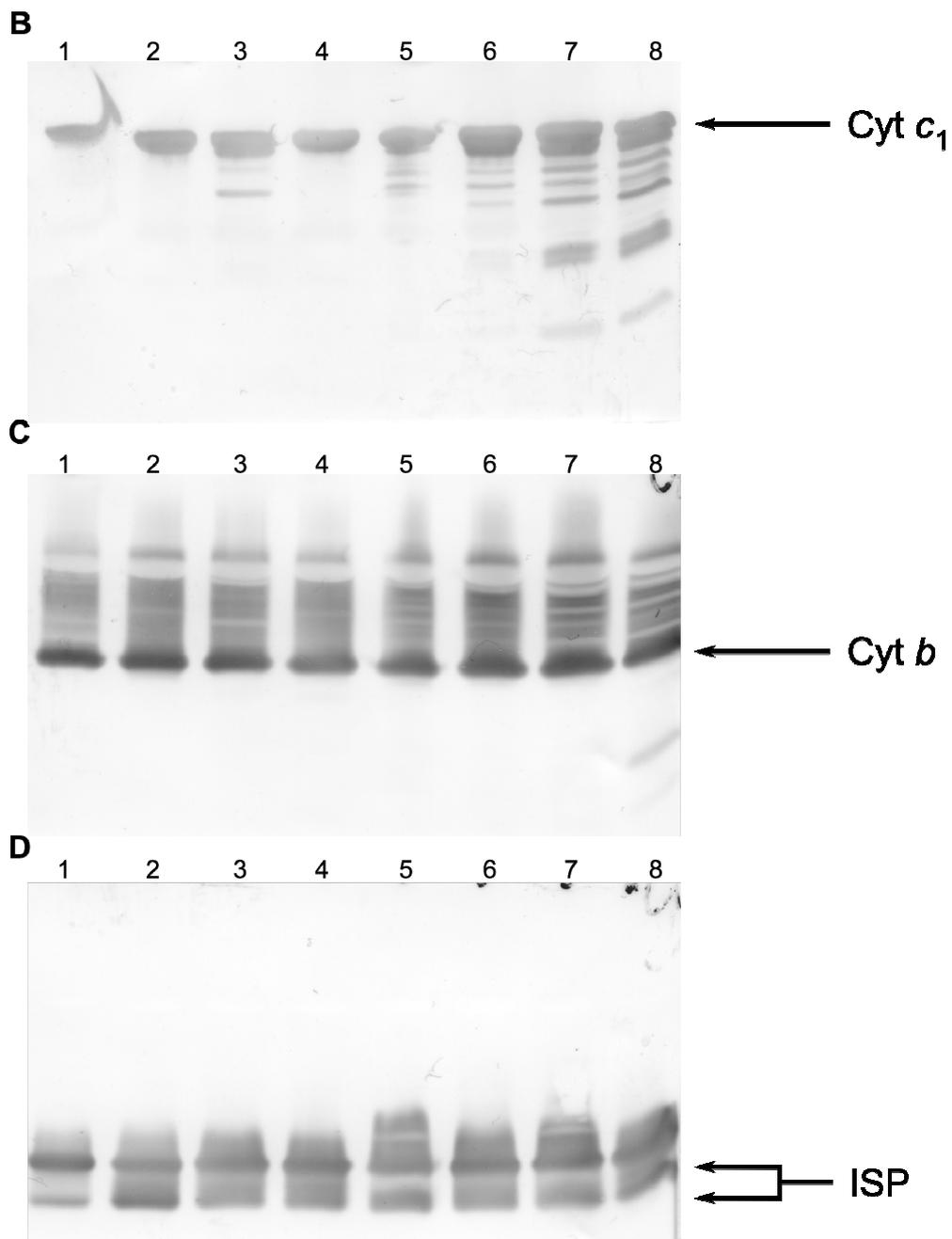


Abbildung 34: Nachweis der Untereinheiten der Mutanten
A) SDS-Gelelektrophorese (Tricin-Gel 10 %, Silberfärbung) des Wildtyps und der mutierten, gereinigten Cytochrom *bc*₁ Komplexe, Westernblots gegen:
B) Cytochrom *c*₁,
C) Cytochrom *b*,
D) ISP

| | | | |
|---|-------|---|---------|
| 1 | D86N | 5 | E295Q |
| 2 | E81Q | 6 | Y297F |
| 3 | D278N | 7 | Y302F |
| 4 | Y147F | 8 | Wildtyp |

Ergebnisse

Die SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 34 A) zeigt die Ein-Schritt-Aufreinigung der verschiedenen Komplexe. Die Proben enthalten nur wenige Verunreinigungen, die jedoch für die folgenden Experimente vernachlässigbar sind. In den anschließend durchgeführten Westernblots (Abbildung 35 B-D) können für alle Proben die drei Untereinheiten eindeutig gezeigt werden und es wird deutlich, dass die Mutationen nicht dazu führen, dass Cyt *b* hinsichtlich der Expression oder stabilen Assemblierung in den Komplex beeinträchtigt ist. Im Unterschied dazu wird in den folgenden Ergebnissen der Aktivitätsmessungen deutlich, dass sich hier klare Effekte ergeben.

| Probe | Aktivität [%] |
|--------------|----------------------|
| Wildtyp | 100* |
| E81Q | 120 |
| D86N | 66 |
| D278N | 105 |
| E295Q | 10 |
| Y147F | 55 |
| Y297F | 90 |
| Y302F | 95 |

Tabelle 5: Prozentuale Aktivitäten der Cytochrom *bc*₁ Komplex-Mutanten (Mittelwerte aus drei Dreifachbestimmungen) im Vergleich zum Wildtyp (molare Aktivität 327 s⁻¹).

Die Mutationen lassen sich nach ihren Aktivitäten in drei Gruppen aufteilen. Mutanten, deren Aktivität im Bereich des Wildtyps liegt, sind E81Q, D278N, Y297F und Y302F; deren Aktivitäten eine zu geringe Abweichung vom Wildtyp darstellen, um sie als signifikant einzustufen. Zur zweiten Gruppe gehören die Mutanten D86N und Y147F, die eine Verringerung der Aktivität um mindestens einem Drittel bis zur Hälfte des Wildtyp-Wertes aufweisen; was als deutliche Abweichung betrachtet wird. In eine dritte Kategorie fällt die Mutation E295Q, die eine drastische Verringerung der Aktivität aufweist.

Neben den Aktivitäten wurden ebenfalls die IC₅₀-Werte (Tabelle 7) für die Komplexe bestimmt. Hierbei handelt es sich um die Inhibitorkonzentration, in diesem Fall Stigmatellin, die die Aktivität um 50 % senkt und damit eine veränderte Bindungsaffinität widerspiegelt. Die Messungen am Wildtyp wurden zunächst im

Ergebnisse

Institut, die Messungen der Mutanten durch O. Anderka bei Sanofi-Aventis (Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt.

| Probe | IC ₅₀ Vielfaches des Wildtyps |
|---------|--|
| Wildtyp | 1,0 [#] |
| E81Q | 3,5 |
| D86N | 1,4 |
| D278N | 1,3 |
| E295Q | 4,6 |
| Y147F | 5,2 |
| Y297F | 2,0 |
| Y302F | 2,1 |

Tabelle 6: IC₅₀-Bestimmungen mit Stigmatellin der Mutanten (Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen).

[#]Der IC₅₀-Wert des Wildtyps liegt unter den gegebenen Messbedingungen bei 131 nM.

Anhand der IC₅₀-Messungen lassen sich die Mutationen ebenfalls in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe weist wiederum eine sehr geringe Abweichung vom Wildtyp auf (D86N und D278N). Die zweite Gruppe zeichnet sich im Vergleich zum Wildtyp mit den beiden Mutationen Y297F und Y302F durch einen etwa doppelt so hohen Wert aus. Die Mutationen E81Q, E295Q und Y147F zeigen eine starke Erhöhung des IC₅₀-Wertes um das Drei- bis Fünffache.

3.3.4 Elektrochemisch-gekoppelte FTIR-Untersuchungen

Elektrochemisch induzierte FTIR-Differenzspektren können strukturelle Änderungen aufzeigen, die an die Redoxreaktion des Cytochrom *bc*₁ Komplex gekoppelt sind. Diese Methode erlaubt es, die Signale im Differenzspektrum einzelnen Cofaktoren, Substraten, sowie den Aminosäureseitengruppen und dem Proteinrückgrat zuzuschreiben.

Die elektrochemisch-gekoppelten FTIR-Messungen werden von Prof. Petra Hellwig (Universität Straßburg, Frankreich) analog zu den Untersuchungen am Wildtyp Cytochrom *bc*₁ Komplex durchgeführt (115).

Ergebnisse

Diese Untersuchungen werden in einer spektroelektrochemischen Dünnschichtzelle aufgenommen (115). Als Elektrode wird ein mit Cysteamin und Mercaptopropionsäure modifiziertes Goldnetz verwendet. Zur Beschleunigung der Einstellung des Redoxgleichgewichts wird eine Mischung aus mehreren Redox-Mediatoren in substöchiometrischer Konzentration zugegeben. Die Experimente wurden bei 278 K durchgeführt. Die Proteinlösung wird mit dem anfänglichen Elektrodenpotential äquilibriert und parallel FTIR- und UV/Vis-Spektren (4000-1000 cm^{-1} , respektive 400-900 nm) aufgenommen. Im Anschluß wird das Endpotential angelegt und weitere Spektren aufgenommen. Der Potentialsprung wurde von -0,292 nach +0,708 V (gegenüber der Normalwasserstoffelektrode bei pH 7) gewählt und eine vollständige Äquilibrierung dauerte weniger als 7 min. Aus den Spektren werden Differenzspektren errechnet und mindestens 80 Differenzspektren werden gemittelt.

Die redox-induzierten FTIR-Differenzspektren der Mutation der sauren Aminosäuren (Abbildung 35 A) und der Tyrosinseitengruppen (Abbildung 35 B) jeweils im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

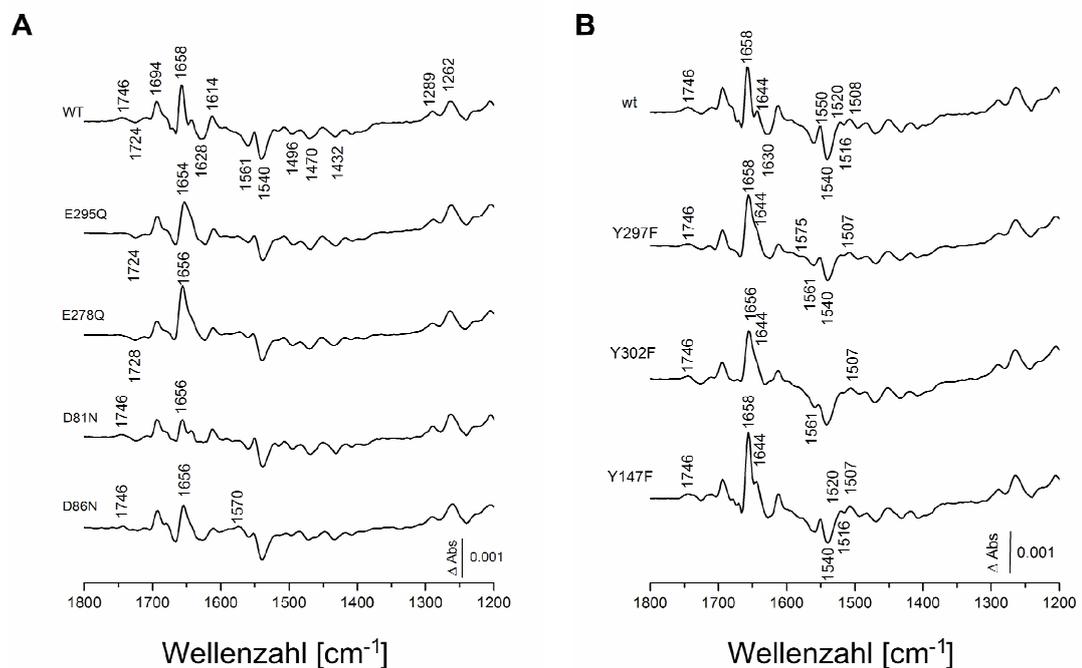


Abbildung 35: Redox-induzierte FTIR-Differenzspektren der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

A) Mutanten der sauren Aminosäureseitenketten,
B) Mutanten der Tyrosinseitenketten.

Ergebnisse

Die redox-induzierten FTIR-Differenzspektren enthalten Beiträge der Cofaktoren, der Aminosäuren, des Protein-Rückgrates. Die Differenzspektren aller Mutanten sowie des Wildtyps zeigen charakteristische und dominante Beiträge des Chinons. Es zeigt sich, dass alle Mutanten mit einem Chinolgehalt von 2,6-3,3 pro Monomer, wie bereits früher gezeigt, aufgereinigt werden können (115). Das Chinon kann über die C-O-Schwingung (1288 und 1264 cm^{-1}) der Methoxygruppe bestimmt werden.

Die FTIR-Differenzspektren der drei Mutanten E295Q, D278N und D86N zeigen Veränderungen in der Region des Spektrums, in der sich protonierte saure Seitengruppen befinden. Der Peak bei 1746 cm^{-1} ist bei den beiden Mutanten E295Q und D278N deutlich verkleinert, was für einen Beitrag dieser Seitengruppen spricht. Der negative Beitrag bei 1746 cm^{-1} ist in der Mutante D86N verringert. Die Mutante E81Q zeigt in diesem Spektralbereich keinen Beitrag.

Die Signale der protonierten sauren Reste zeigen sich verändert in den Mutanten E295Q, D86N und D278N im Bereich zwischen 1559 - 1563 m^{-1} .

In den FTIR-Differenzspektren (Abbildung 35 B) können nur geringfügige Änderungen für die beiden Mutanten Y302F und Y297F beobachtet werden. In der Mutante Y302F verschwindet das Signal bei 1666 cm^{-1} , welches entweder der C=O Schwingung des Proteinrückgrates oder dem protonierten Häm-Propionat zugeordnet wird. Weitere Veränderungen in dieser Mutante können bei 1626 und 1522 cm^{-1} beobachtet werden.

Die detaillierten Beobachtungen sind in Kleinschroth *et al.*, 2008 veröffentlicht (198).

3.4 Assoziationsgrad des Cytochrom bc_1 Komplexes

Der in der Literatur vorherrschende Kenntnisstand zum Assoziationsgrad des Cytochrom bc_1 Komplexes ist, dass es sich um ein Dimer handelt. Die in den letzten Jahren vorgelegten Strukturen zeigten immer Dimere und bestätigten damit diese Vorstellung, da sich der Komplex durch seine verschränkten Rieske-Proteine auszeichnet. Untersuchungen zur Funktion zeigten zudem, dass ein Dimer nicht nur strukturell von Bedeutung ist, sondern auch funktionell eine Rolle spielt. Es konnte ein Elektronenaustausch zwischen den Monomeren nachgewiesen werden, genauso wie eine Kommunikation zwischen den beiden Monomeren eines Dimers (Abschnitt 1.2.4.3). Weitere Untersuchungen zeigten in analytischen Ultrazentrifugationsläufen auch für den Komplex aus *P. denitrificans* unter gewissen

Ergebnisse

Annahmen ein Dimer (199), jedoch ergeben andere Ergebnisse durch analytische Gelfiltration und BN-PAGE (179) auch Zweifel an dieser Aussage.

Mit einer neuen massenspektrometrischen Technik soll hier, im Vergleich mit konventionellen Verfahren (Blau-Nativ-Gelelektrophorese und analytische Gelfiltration), der Assoziationsgrad geklärt werden.

Die Untersuchungen durch BN-PAGE als auch durch Gelfiltration werden im Vergleich mit anderen Membranproteinen gemacht. Solubilisierete, isolierte Membranproteine weisen immer einen Detergenzgürtel auf, dieser kann aber, je nach Membranprotein und Detergenz, stark in Größe und Menge des gebundenen Detergenz schwanken (Abschnitt 1.3). Ebenso kann die Form verschiedener Membranproteine deutlich voneinander abweichen, so dass sich der Formfaktor als auch der Stoke's Radius stark unterscheiden können. Diese Faktoren erschweren bei Membranproteinen eine direkte Korrelation zwischen Molekulargewicht und Laufstrecke, wie sie bei löslichen, globulären Proteinen möglich ist.

3.4.1 Aufreinigung des Cytochrom bc_1 Komplexes

Der Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex wird nach der konventionellen Methode aufgereinigt, ankonzentriert (cut-off 100 kDa) und gelfiltrierte (Abschnitt 2.3.6.1). Der Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex wird mit einer Ni^{2+} NTA-Agarosesäule aufgereinigt (Abschnitt 2.3.5.3, mit Imidazol) und ebenfalls gelfiltrierte (Abschnitt 2.3.6.1).

3.4.2 Blau-Nativ Polyacrylamidelektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE wird wie unter Abschnitt 2.3.8.2 beschrieben durchgeführt. Die aufgereinigten Proben werden auf eine Ionenstärke unter 50 mM und eine Gesamtproteinmenge von 400 ng eingestellt und mit Probenpuffer versetzt. Die Laufweite des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplexes aus *P. denitrificans* (Abbildung 36, 4C) liegt leicht über dem des aus *S. cerevisiae* (440 kDa, (74)) aufgereinigten (Abbildung 36, 2B).

Die Cytochrom aa_3 -Oxidase aus *P. denitrificans* (Abbildung 36, 5E) ist ein monomerer Komplex und besitzt mit 130 kDa ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht (9). Sie stellt in diesen Untersuchungen die untere Grenze dar. Die ATPase aus *Acetobacterium woodii* (Abbildung 36, 3A) dient mit einem Molekulargewicht von 600 kDa als obere Grenze (persönliche Mitteilung

Ergebnisse

Abeitsgruppe Prof. V. Müller, Goethe-Universität, Frankfurt am Main). Das Laufverhalten des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplexes aus *P. denitrificans* spricht für das Vorliegen eines Tetramers, da rein rechnerisch ein Molekulargewicht von über 440 kDa bei einer Größe des Monomers von 117 kDa nur so zu erreichen ist. Dies deckt sich mit den bisherigen BN-PAGE-Untersuchungen ((179), persönliche Mitteilung Prof. H. Schagger, Goethe-Universität, Frankfurt am Main). Der Δac Cytochrom bc_1 Komplex läuft deutlich niedriger als der Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier ein anderer Oligomerisierungszustand vorliegt, wahrscheinlich ein Dimer. Jedoch sind die Daten nicht eindeutig genug und eine überwiegend qualitative Betrachtung.

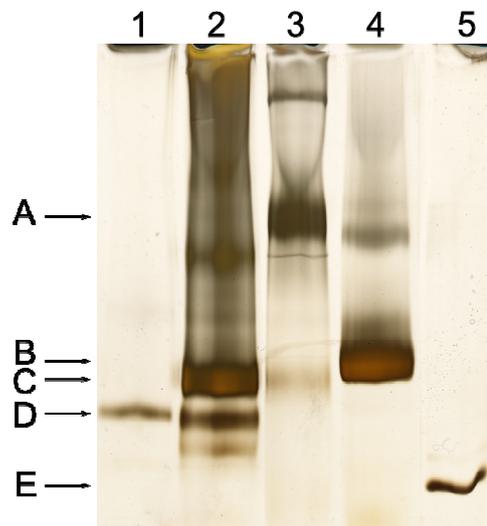


Abbildung 36: BN-PAGE verschiedener, gereinigter Membranproteine (Gradientengel 3,5-13 %, Silberfärbung).

In A-E sind die Laufstrecken der Hauptbanden markiert.

- 1 Δac Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans*
- 2 Cytochrom bc_1 Komplex aus *S. cerevisiae*
- 3 ATPase aus *Acetobacterium woodii*
- 4 Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans*, Wildtyp
- 5 Cytochrom aa_3 -Oxidase aus *P. denitrificans*

3.4.3 Gelfiltrationsuntersuchungen

Weitere Untersuchungen zur Komplexgröße werden auf einer Gelfiltrations-säule durchgeführt (Abschnitt 2.3.6.3). Hierzu wird zunächst eine Eichung mit löslichen Proteinen erstellt. Dies berücksichtigt allerdings nicht, dass die zu vermessenden Membranproteine einen Detergenzgürtel tragen. Im Vergleich werden deshalb

Ergebnisse

weitere Membranproteine neben den drei Cytochrom bc_1 Komplexen vermessen: die aa_3 -Oxidase aus *P. denitrificans*, das ISP aus Stamm TK47 mit gebundenem Fv Fragment und der Cytochrom bc_1 Komplex aus *S. cerevisiae*. Zur Ermittlung der Molekulargewichte wird der Verteilungskoeffizient (K_{av}) gegen das Molekulargewicht aufgetragen, dieser wird nach der folgenden Formel ermittelt:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

**Formel 2: Berechnung des Verteilungskoeffizienten (K_{av}),
 V_e Elutionsvolumen des Proteins,
 V_c geometrisches Säulenvolumen der Chromatographiesäule,
 V_0 Ausschlussvolumen der Chromatographiesäule**

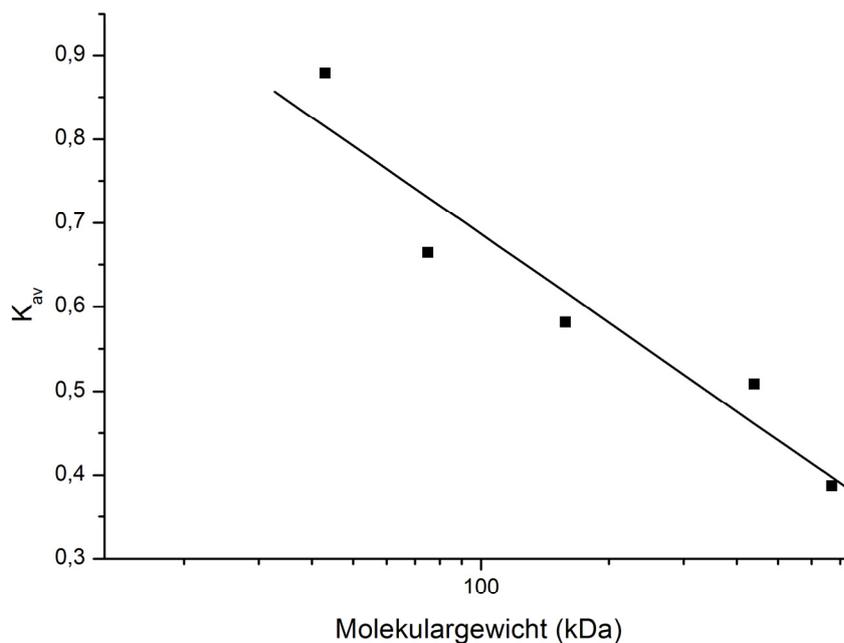


Abbildung 37: Gelfiltrations-Eichreihe mit löslichen Proteinen zur Kontrolle der Gelfiltrationssäule.
Die Proteine der Eichreihe (Rechtecke) von links nach rechts, Ovalbumin (43 kDa), Conalbumin (75 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa).
Die durchgezogene Linie entspricht der Eichgeraden
($R^2 = 0,9112$, $y = -0,1522 \ln(x) + 1,3874$)

Die aufgetragenen Proteine ergeben nach Eintrag in eine halblogarithmische Skala eine Eichreihe, deren R^2 -Wert in einem akzeptablen Bereich liegt. Die

Ergebnisse

Gelfiltrationssäule lässt sich demnach mit löslichen Proteinen bekannter Größe in diesem Bereich kalibrieren. Auf Grund des unbekanntens Faktors der Detergenzbindung können lösliche Proteine jedoch nicht als Standard für Membranproteine verwendet werden. Daher wird eine zweite Kalibrierung mit Membranproteinen vorgenommen, die alle im gleichen Detergenz vorliegen wie die zu untersuchenden Membranproteine. Die Anzahl ist jedoch auf drei Eichproteine limitiert.

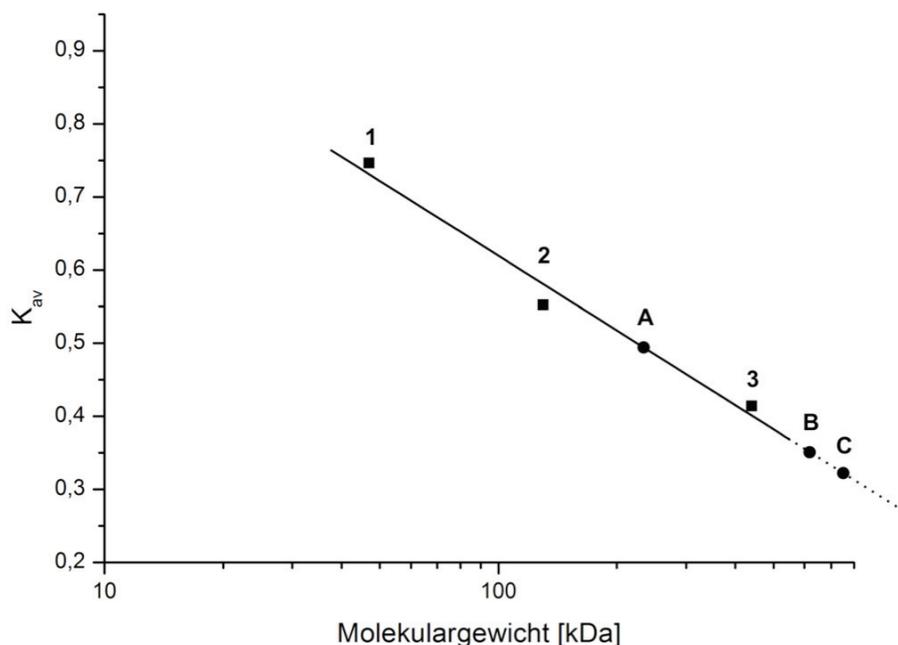


Abbildung 38: Gelfiltrationsuntersuchungen der Membranproteine.

Die Proteine der Eichreihe (Quadrate):

1) ISP aus Stamm TK47 mit gebundenem Fv-Fragment (47 kDa),

2) Cytochrom aa_3 -Oxidase (130 kDa) aus *P. denitrificans*,

3) Cytochrom bc_1 Komplex (440 kDa) aus *S. cerevisiae*.

Membranproteine, deren Größe nach der für Membranproteine ermittelte Eichreihe bestimmt wurden (Kreise):

A) Δac Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans*,

B) Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans*,

C) Cytochrom bc_1 Komplex aus Stamm TK47 mit gebundenem Fv-Fragment.

Die durchgezogene Linie entspricht der Eichgeraden

($R^2 = 0,9779$, $y = -0,1474 \ln(x) + 1,2985$)

Ergebnisse

| Komplex | ermitteltes Molekulargewicht (kDa) |
|--|------------------------------------|
| Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex <i>P. denitrificans</i> | 234 |
| Cytochrom bc_1 Komplex <i>P. denitrificans</i> | 619 |
| Cytochrom bc_1 Komplex TK47+ Fv 18E11 | 752 |

Tabelle 7: Ermittelte Molekulargewichte der untersuchten Membranproteine. Die ermittelten Molekulargewichte wurden anhand der Eichgeraden mit Membranproteinen errechnet.

Die Daten aus der Gelfiltration (Abbildung 38) liefern zu hohe Werte, wenn man auf das Molekulargewicht zurückrechnet (Tabelle 8). Die Ergebnisse können nur als Trend herangezogen werden. So zeigt sich eindeutig, dass der Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans* später eluiert als der aus *S. cerevisiae* und sich damit auch ein größeres Molekulargewicht ergibt. Der Δ ac Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans* weist ein weniger als halb so großes Molekulargewicht auf als sein Wildtyp-Äquivalent und liegt danach relativ nah am erwarteten Molekulargewicht eines Dimers von 200 kDa.

Das ermittelte Molekulargewicht für den Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans* von ~620 kDa kann bei einer Masse von 115 kDa für das Monomer nicht mehr mit einem Dimer erklärt werden. Ein Tetramer mit 460 kDa oder ein höherer Oligomerisierungszustand sind wahrscheinlich. Es muss jedoch beachtet werden, dass die experimentellen Werte ausserhalb der Eichgeraden liegen.

Die Betrachtung des Komplexes aus Stamm TK47 (chimärer Komplex, der das Fv-Fragment 18E11 bindet), an welchem sich das Fv-Fragment gebunden ist kann nur mit mindestens einem Tetramer erklärt werden. Das berechnete Molekulargewicht liegt bei 560 kDa, ausgehend von einem Tetramer mit vier gebundenen Fv Fragmenten (je 25 kDa). Das experimentell ermittelte Molekulargewicht liegt bei 750 kDa ermittelt. Auch dieser Wert liegt ausserhalb der Eichgeraden. Auf Grund der vier gebundenen Fv-Fragmente müsste eine Erhöhung des Molekulargewichts verglichen mit dem Wildtypprotein von ~100 kDa für die vier Fv-Fragmente angenommen werden, gefunden wurden ein Unterschied von ~130 kDa. Bezieht man die Gesamtgröße des Komplexes mit vier Fv-Fragmenten mit ein ist die Abweichung der zusätzlichen Proteinmasse relativ gering.

Ergebnisse

Diese Ergebnisse können nur als Indiz gelten und die bisherigen Vermutungen nur erhärten, aber nicht beweisen. Aus diesem Grund wird im Folgenden eine für Membranproteine neuartige Massenspektrometrie(MS)-Methode zur eindeutigen Ermittlung des Molekulargewichts herangezogen.

3.4.4 LILBID-Messungen

Die dritte Methode zur Untersuchung des Assoziationszustands des Cytochrom *bc₁* Komplexes ist die auf diesem Gebiet erst seit kurzem eingeführte LILBID-Massenspektrometrie (MS) (200-204). Sie ermöglicht die Untersuchung, sowohl der Gesamtgröße eines Komplexes als auch der einzelnen Untereinheiten durch eine *time-of-flight* (TOF)-Analyse in einer Probe.

Die Messungen werden von N. Morgner (Arbeitsgruppe Prof. B. Brutschy, Goethe-Universität, Frankfurt am Main) durchgeführt. Hierzu wird ein Strom aus Tropfen der schwach gepufferten Proteinlösung in ein differentielles Vakuum eingebracht und mit einem IR-Laser mit der Wellenlänge der Streckschwingung des Wassers (~3 µm) beschossen. Hierdurch erfolgt die schlagartige Verdunstung des Wassers, ohne dass bei Beschuss mit geringer Intensität nennenswerte Energiemengen auf den Protein-Komplex übertragen werden, wobei die Dielektrizitätskonstante stark abfällt (205). So kann der Komplex vom Lösungsmittel befreit und dabei ionisiert werden.

Es wird angenommen, dass die Ionisierung nach dem *lucky survivor* Prinzip geschieht (203), also statistisch Ladungen auf der Oberfläche während des Desorptionsprozesses nicht neutralisiert werden, da ihre Gegenionen zu weit entfernt sind (206). Bei höherer Laserintensität werden die nicht-kovalenten Bindungen zwischen den Untereinheiten eines Komplexes aufgebrochen, jedoch nicht das Proteinrückgrat, so dass die einzelnen Polypeptidketten des Komplexes ebenfalls untersucht werden können. Für diese Methode sind nur 2-10 µl einer mikromolaren Lösung notwendig. Eine systematische Untersuchung weiterer Membranproteine und eine nähere Beschreibung dieser Methode findet sich in (207).

Die Proben für die *laser-induced liquid bead ion desorption* (LILBID)-Untersuchungen werden in einer dreistufigen Dialyse (zweimal 1 h und einmal über Nacht, cut-off 4-6 kDa) gegen 1 l LILBID-Messpuffer äquilibriert. Dies ist notwendig, da der Puffer bei den LILBID-Messungen möglichst vollständig in die Gasphase

Ergebnisse

überführt werden soll, weshalb Salze und viele Puffersubstanzen stören würden. Danach werden die Lösungen auf 1-2 mg/ml Proteinkonzentration eingestellt.

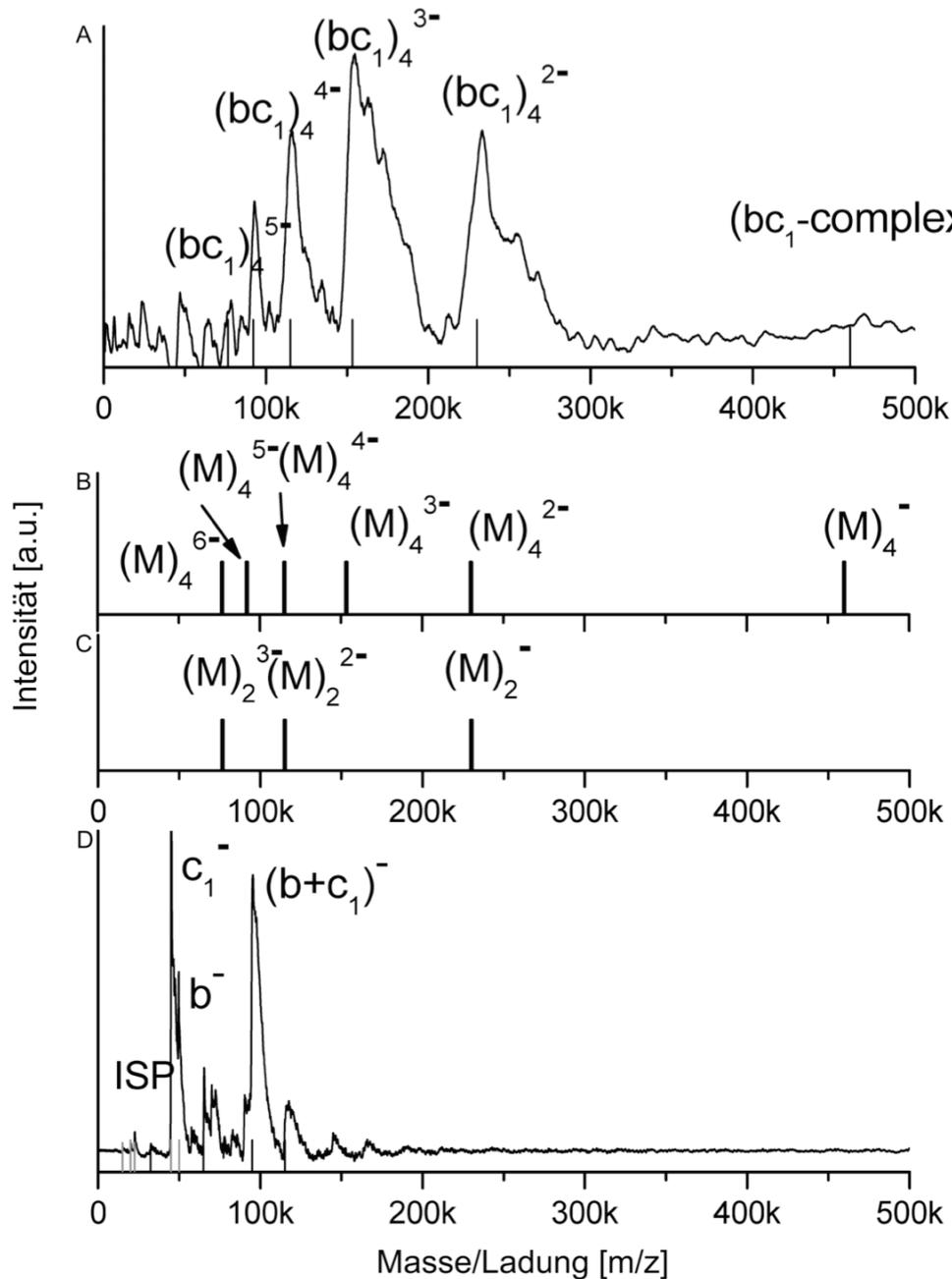


Abbildung 39: LILBID-Spektren des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplexes,
A) Spektrum des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplexes nach Laserbeschuss mit geringer Energie,
B) simuliertes Spektrum eines tetrameren Komplexes,
C) simuliertes Spektrum eines dimeren Komplexes,
D) Spektrum des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex nach Laserbeschuss mit höherer Energie.
Die Spektren wurden von N. Morgner (Physikalische Chemie, Prof. Brutschy, Goethe-Universität Frankfurt am Main) aufgenommen und dokumentiert.

Ergebnisse

Das Spektrum bei Laserbeschuss mit geringer Intensität (Abbildung 39 A) zeigt den Gesamtkomplex des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplexes bei einem Molekulargewicht von etwa 460 kDa bei einfacher, negativer Ladung. Da im Spektrum ein Masse:Ladungsverhältnis angegeben wird, erscheint die doppelt geladene Spezies bei der Hälfte des Molekulargewichts. Diese Reihe lässt sich bis zum 5fach geladenen Komplex mit einem Fünftel der Masse verfolgen. Ein Molekulargewicht von 460 kDa ergibt sich jedoch nur, wenn der Komplex als Tetramer vorliegt.

Der sehr kleine Peak des einfach geladenen Komplexes bei 460 kDa lässt zunächst mutmaßen, dass es sich hier nur um Rauschen handelt und kein Tetramer vorliegt, sondern nur ein Dimer, wenn man das Spektrum erst ab dem zweiten Peak von rechts betrachtet. Deshalb wird mit den theoretischen Massen eines Tetramers (Abbildung 39 B) und eines Dimers (39 C) jeweils ein Spektrum simuliert. Hierbei wird deutlich, dass mit dem Modell des Dimers der dreifach geladene Peak des Cytochrom bc_1 Komplexes nicht erklärt werden kann. Das Modell des Tetramers ergibt jedoch auch diesen Peak. Genauso verhält es sich mit dem Peak des fünffach geladenen Komplexes. Der Peak des sechsfach geladenen Komplexes geht im Spektrum (39 A) im Rauschen unter und ist nicht identifizierbar.

Bei hartem Laserbeschuss werden, wie in Spektrum in Abbildung 39 D dargestellt, die Massen der einzelnen Untereinheiten sichtbar. Auffällig ist hierbei, dass auch ein Subkomplex aus jeweils einem Cyt b und Cyt c_1 gefunden wird.

Ergebnisse

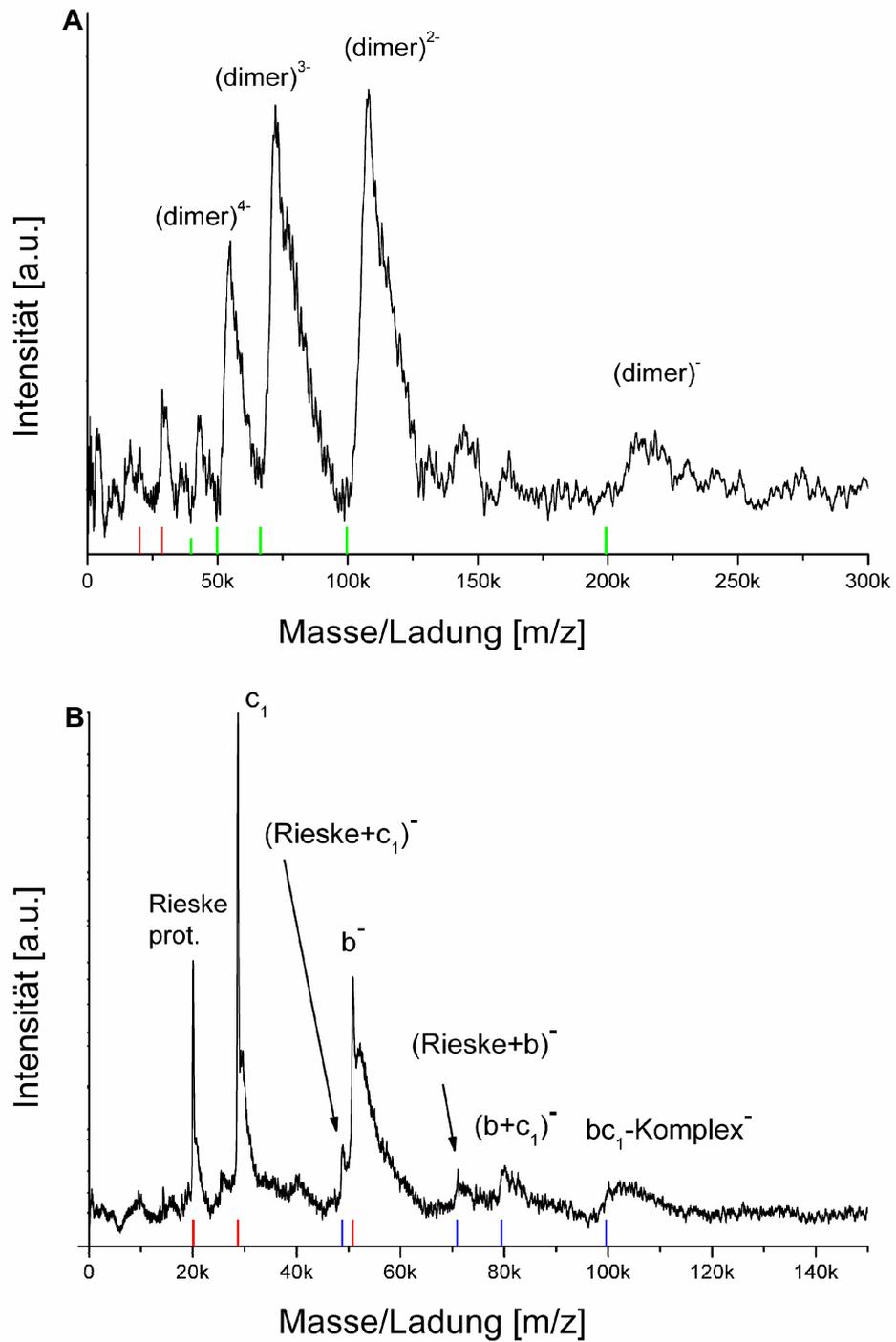


Abbildung 40: LILBID-Spektren des Δ ac Cytochrom bc_1 Komplexes aus *P. denitrificans*, nach Laserbeschuss mit:
A) geringer Energie
B) hoher Energie.
Mit den farbigen eingezeichneten Beginn der Peaks.

| Protein | Untereinheit | Anzahl TMH | Anzahl AS | Apparentes MW ^{*1} (kDa) | MW ^{*2} (kDa) | LILBID MW (kDa) |
|--|-------------------------------|---------------|--------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplex | ISP | 1 | 190 | 20 ^{*3} | 20,4 | 20,1 |
| Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplex | Cyt <i>c</i> ₁ | 1 | 426 | 60 ^{*3} | 45,3 | 45,0 |
| Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplex | Cyt <i>b</i> | 8 | 440 | 40 ^{*3} | 51,4 | 49,6 |
| Δac Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplex | ISP | 1 | 190 | 20 ^{*3} | 20,4 | 20,1 |
| Δac Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplex | Δac Cyt <i>c</i> ₁ | 1 | 263 | 30 ^{*4} | 29,1 | 28,7 |
| Δac Cytochrom <i>bc</i> ₁ Komplex | Cyt <i>b</i> | 8 | 450 | 40 ^{*4} | 53,0 | 50,8 ^{*5} |

Tabelle 8: Molekulargewichte der Untereinheiten des Wildtyp Cytochrom *bc*₁ Komplexes und des Δac Cytochrom *bc*₁ Komplexes;

^{*1} Molekulargewicht aus SDS-Gelelektrophoresen,

^{*2} berechnetes Molekulargewicht aus der Sequenz mit Cofaktoren,

^{*3} aus (60),

^{*4} aus dieser Arbeit,

^{*5} das Cytochrom *b* trägt einen deka His-tag, welches berechnet 1,55 kDa zur Masse beiträgt.

Ergebnisse

Das Spektrum des Δac Cytochrom bc_1 Komplexes zeigt nach weichem Laserbeschuss (40 A) den Peak des einfach geladenen Komplexes bei einer Masse von etwa 200 kDa an. Dies spricht für ein Dimer, denn die Masse des Monomers für diese Mutante beträgt etwa 100 kDa (Tabelle 8). Auch das gesamte Muster der mehrfach geladenen Peaks entspricht einem Dimer und nicht dem beim Wildtyp gefundenen Tetramer.

Das in Abbildung 40 B gezeigte LILBID-Spektrum zeigt den Δac Cytochrom bc_1 Komplex nach Laserbeschuss mit hoher Energie. Man erkennt die kleinere Masse des Δac Cyt c_1 von etwa 30 kDa im Vergleich zum Wildtyp Cyt c_1 mit etwa 48 kDa. Der Peak des Cyt b erfährt eine leichte Verschiebung zu höheren Massen auf Grund des *deka* His-*tags*. Der Massepeak des ISP bleibt im Gegensatz dazu, wie erwartet, unverändert.

Mit dieser Methode kann eindeutig gezeigt werden, dass der Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex als Tetramer und der Δac Cytochrom bc_1 Komplex als Dimer vorliegt. Diese Erkenntnis hat große Auswirkungen auf das Verhalten des Komplexes, das in der Diskussion (Abschnitt 4.) besprochen wird. Das Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen der BN-PAGE sowohl hier als auch in anderen Arbeiten (179) und bestätigt den Trend aus den analytischen Gelfiltrationen (Abschnitt 3.4.3).

Ergebnisse

4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand der Cytochrom bc_1 Komplex, sowohl die Untersuchung seiner Struktur als auch die seiner Funktion. Dieses zentrale Enzym der Atmungskette findet sich, schließt man die homologen b_6f Komplexe mit ein, in allen Reichen des Lebens.

Die Untersuchungen an diesem Komplex haben bereits eine lange Historie und einen beachtlichen Umfang angenommen. Erste Veröffentlichungen zu diesem Thema finden sich bereits vor vier Jahrzehnten. Der komplexe Reaktionsmechanismus dieses Enzymes, bei dem wichtige Ereignisse wie die Chinoloxidation sich immer noch in der Diskussion befinden, macht es zu einem weiterhin interessanten Forschungsfeld.

Das größte Interesse galt hierbei seit je her der mitochondrialen Atmungskette und erst von diesem Blickwinkel aus den Unterschieden zum Enzym aus anderen Spezies. Die Kenntnis der Unterschiede in Struktur und Funktion führt in Richtung des Verständnisses der Wirkungsweise von Inhibitoren, die in Form von Fungiziden (208), Herbiziden (209) und Malariamedikamenten (210-212), anwendungsrelevante Bezüge haben.

Die Gabelung der Elektronen, gegen den thermodynamisch zu favorisierenden Weg, die Rolle der Struktur und die komplexinterne Kommunikation zur Steuerung dieses Prozesses, sind derzeit Hauptaspekte der Funktionsuntersuchungen. Das Chinoloxidations-Zentrum ist als Ort der ROS-Produktion (1, 213-215), die für Zellschäden und Alterungsprozesse verantwortlich gemacht wird, in der Diskussion (216). Der Ablauf der Bildung dieses Zellgiftes, das aber auch Botenstoff ist, wird ebenfalls weiterhin diskutiert.

Die vorgenannten Untersuchungen stützen sich zu großen Teilen auch auf die, durch die röntgenkristallographische Strukturaufklärung erhaltenen, Raumstrukturen des Komplexes aus Mitochondrien verschiedener Spezies (73, 74). Die Kristallisation eines Komplexes mit gebundenem Elektronenakzeptorsubstrat trägt ebenfalls zum Verständnis bei (66). Die typischerweise aus dem Minimalkomplex mit den drei redoxaktiven Untereinheiten bestehenden prokaryontischen Modellsysteme sind auf Grund ihrer einfachen genetischen Zugänglichkeit und

Diskussion

Ordnung überzeugende Modellsysteme. Durch die Aufklärung einer Struktur aus einem Prokaryonten (82) werden sie noch überzeugender.

Das in dieser Arbeit untersuchte prokaryontische Modellsystem *P. denitrificans*, das als prokaryontischer Nachfahre eines evolutionären Vorläufers der Mitochondrien angesehen wird (217), ist aus diesen Gründen für die Untersuchung gerade der Struktur-Funktionsbeziehung prädestiniert. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit mit einem Beitrag zur Strukturaufklärung weiter bestärkt werden.

Ein im Moment viel beachtetes Thema ist das auffällig asymmetrische Verhalten des Komplexes (29, 112), die Interdimeren-Kommunikation (100) und der Interdimeren-Elektronentransfer (84). Durch diese Beobachtungen inspiriert, sollte im Modellsystem *P. denitrificans* ein Dimer erzeugt werden, das ein, zur Chinoloxidation befähigtes Zentrum trägt und eines, das durch Mutation ausgeschaltet wurde. Dieses Dimer sollte durch *steady-state* und *pre-steady-state* Untersuchungen im Hinblick auf die genannte Kriterien analysiert werden. Die Frage, ob das Dimer eine rein strukturelle Funktion hat oder es funktional ist, sollte so beantwortet werden.

Weitere Aufmerksamkeit wurde der bereits angesprochenen Chinoloxidation gewidmet. Es wurden Mutanten erzeugt und charakterisiert, die in einem Kooperationsprojekt durch elektrochemisch-gekoppelte FTIR-Untersuchungen weitergehend untersucht wurden.

In einem *proof of principle* Ansatz wurde eine für Membranproteine neue, massenspektroskopische Methode sowohl zur Bestimmung des Assoziationsgrades eines Komplexes als auch der Gesamtmasse eines Komplexes am Cytochrom *bc₁* Komplex getestet. In diesem Zuge wurde der Komplex aus *P. denitrificans* näher untersucht.

4.1 Assoziationszustand des Cytochrom *bc₁* Komplexes

Die Ergebnisse zum Assoziationszustand des Komplexes sollen hier zuerst diskutiert werden, da sie auf nahezu alle Teilprojekte dieser Arbeit Einfluss haben. Alle Kristallstrukturen (z. B. (73, 74, 82)) zeigen ein Dimer für den Komplex. Eine wesentliche Beobachtung aus diesen Strukturen zeigt, dass ein Rieske-Protein mit seiner Transmembranhelix im Monomer A verankert ist, seine Ektodomäne aber am Aufbau des Q_P-Zentrum des Monomers B teilnimmt. Wird diese Beobachtung im

Diskussion

Hinblick auf den Assoziierungszustand einbezogen, so ist für einen funktionalen Komplex ein Monomer auszuschließen. Werden die Untereinheiten des Komplexes mit ihren homologen Untereinheiten aus anderen Spezies verglichen, nicht nur den bakteriellen sondern auch den mitochondrialen, lässt sich auch für das Enzym aus *P. denitrificans* ein ähnlicher Aufbau erwarten. Vor diesem Hintergrund wurde ein dimeres Enzym erwartet.

Der Assoziationszustand des Enzymes aus *P. denitrificans* warf bereits in der Vergangenheit Fragen auf. Es konnte zwar durch analytische Ultrazentrifugationsexperimente gezeigt werden, dass der Komplex unter den angenommenen Bedingungen ein Dimer zu sein scheint (199), jedoch enthielten auch diese Proben geringe Mengen höher-molekularer Komplexe. Ergebnisse aus Gelfiltrationsuntersuchungen und BN-PAGE deuteten auf einen höheren Assoziationszustand hin (179). In den eigenen Gelfiltrationsversuchen, die dem Zweck der Kristallisation dienten (Abschnitt 3.1.1.5 Abbildung 11 und 12), fiel der frühe Elutionspunkt des Komplexes auf. Dies gab Anlass zu weiteren Untersuchungen des Komplexes im Vergleich mit anderen Proteinen sowohl durch Gelfiltration als auch durch BN-PAGE.

4.1.1 BN-PAGE Untersuchungen

Die Untersuchung des Molekulargewichts von solubilisierten Membranproteinen ist auf Grund des gebundenen Detergenzgürtels nicht einfach möglich, speziell mit hydrodynamischen Methoden. Einzelne Membranproteine können unterschiedliche Detergenzmengen binden, was sich auf deren scheinbares Molekulargewicht auswirkt (218). Die Größe der Detergenzmizelle wird ebenfalls durch das Detergenz bestimmt, so kann beispielsweise durch eine kürzere oder längere Alkylkette die Mizelle verkleinert oder vergrößert werden. Diese Effekte können teilweise durch die Verwendung der BN-PAGE ausgeschlossen werden, da die Proteine hier den Coomassie-Farbstoff binden und dann im elektrischen Feld auf Grund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden (189). Dabei hält das verwendete Gradientengel mit seinen in Laufrichtung immer enger werdenden Maschen größere Proteine stärker zurück als kleinere. Die Proteine bleiben bei entsprechender Laufdauer in den Maschen stecken und kommen so zum Stillstand.

In dieser Arbeit wurden zum Größenvergleich solubilierte Membranproteine verwendet, deren Größe und Assoziationszustand bekannt sind (Abbildung 37). Der

Diskussion

aufgereinigter Komplex aus *P. denitrificans* lief im Gel geringfügig höher als der mitochondriale aus *S. cerevisiae*, der mit 440 kDa für das Dimer angegeben wird. Dieser Komplex war im gleichen Detergenz (DDM) solubilisiert. Es konnte dementsprechend ausschließlich auf einen tetrameren Komplex zurückgerechnet werden, da das Monomer mit 115 kDa bestimmt worden ist (60). Dieser Trend wurde vor dem Hintergrund der gleichlautenden Gelfiltrationsergebnisse aus einer vorangegangenen Arbeit (179), für das Vorliegen eines höher-oligomeren Zustandes gewertet. Im Vergleich dazu war der Cytochrom *bc*₁ Komplex mit deletierter saurer Domäne (Monomer nach Sequenz ~100 kDa) deutlich kleiner und bewegte sich zwischen der Cytochrom *aa*₃-Oxidase und dem Cytochrom *bc*₁ Komplex aus *S. cerevisiae*. Diese Laufstrecke war nur mit einem dimeren Komplex (~200 kDa) zu vereinbaren. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass diese Mutante einen anderen Assoziationszustand im Vergleich mit dem Wildtyp oder der chimären Mutante aufweist.

Aus mit milden Detergenz solubilisierten Membranen von *P. denitrificans* konnte mit der BN-PAGE ein Superkomplex isoliert werden. Dieser Superkomplex enthielt jeweils vier Kopien des Cytochrom *bc*₁ Komplexes und der Cytochrom *aa*₃-Oxidase sowie eine Kopie des Komplex I (219). Da in diesem Superkomplex der Cytochrom *bc*₁ Komplex in vier Kopien vorliegt, könnte es sich um einen nativ vorkommenden, funktionalen Zustand des Tetramers handeln.

4.1.2 Gelfiltrationsuntersuchungen

Gelfiltrationsexperimente zur Bestimmung der molekularen Masse unterliegen ebenfalls den bereits beschriebenen Problemen wie dem unterschiedlichen Reibungskoeffizienten oder dem Formfaktor der verschiedenen Proteine, die einen schwer einschätzbaren Einfluss auf das Elutionsverhalten haben (220). Auch ist diese Methode vom technischen Aspekt her nicht unproblematisch, da in der Nähe der Auflösungsgrenze der Gelfiltrationssäule gearbeitet wurde. Der Einsatz von löslichen Proteinen zur Eichung von Membranproteinen erscheint ungeeignet, da sie die Detergenzbindung der Membranproteine nicht berücksichtigen. Unter diesen unklaren Voraussetzungen wurde ein dimerer Komplex aus *R. sulfidophilum* nachgewiesen (221). Durch die Einbeziehung weiterer Messdaten zur Bestimmung des gebundenen Detergenzes mittels UV-Absorption, Lichtstreuung und Brechungsindex (222), konnte die Methode verfeinert werden und ein weiterer

Diskussion

dimerer Cytochrom bc_1 Komplex gezeigt werden. Diese Methode konnte bereits wiederholt erfolgreich angewendet werden (223).

In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration zunächst mit löslichen Proteinen in detergenzhaltigem Puffer geeicht, in Kenntnis der oben genannten Probleme. Sie dienten nur als relativer Standard und um das Prinzip an der verwendeten Säule zu zeigen. Zum weiteren Vergleich wurden unter gleichen Bedingungen weitere Membranproteine herangezogen, darunter die Cytochrom aa_3 -Oxidase und eine modifizierte ISP-Untereinheit, sowie der mitochondriale Cytochrom bc_1 Komplex aus *S. cerevisiae*. Alle Membranproteine lagen in DDM solubilisiert vor. Die in Tabelle 8 berechneten Werte für die Komplexe unbekannter Größe wurden mit einer Eichgraden, die anhand der Membranproteine bekannter Größe ermittelt wurde, bestimmt.

Bemerkenswert ist, dass (i) der Cytochrom bc_1 Komplex mit deletierter, saurer Domäne ein deutlich geringeres Molekulargewicht (~230 kDa) aufweist und sich damit der Befund aus der BN-PAGE bestätigen lässt; (ii) der chimäre Komplex und der Wildtyp ein deutlich höheres Molekulargewicht nach dieser Berechnung aufweisen als der Komplex aus *S. cerevisiae*. Die Bindung von zusätzliche vier Fv-Fragmenten (à 25 kDa), ausgehend von einem Tetamer, führte zu einer Erhöhung der berechneten Masse um ~130 kDa, anstatt von nur 100 kDa, wie es sich rechnerisch erwarten ließe.

Jedoch gehen die Ergebnisse aus der Gelfiltration und der BN-PAGE Hand in Hand. Sie deuten beide auf einen tetrameren Zustand des Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplexes und einen dimeren Zustand des Cytochrom bc_1 Komplexes mit deletierter saurer Domäne hin.

4.1.3 LILBID-Untersuchungen

Eine für Membranproteine und Membranproteinkomplexe neue Methode der Bestimmung der molekularen Masse stellt die LILBID-MS dar. Diese Methode erlaubt es, auch große Membranproteinkomplexe durch einen Laser-induzierten Desorptionsprozess in die Gasphase zu überführen und sie mit einer TOF-Analyse auf ihre Masse hin zu untersuchen. Das erhaltene Spektrum ist ein Masse:Ladungsverhältnis, dessen Peakhöhen möglicherweise durch die Ionisierbarkeit beeinflusst werden. Je nach Intensität der eingestrahnten Energie

Diskussion

können sowohl intakte Komplexe als auch deren Untereinheiten aus derselben Probe analysiert werden. Die geringen Mengen an benötigter Probe beziehungsweise die geringe Konzentration sind im Hinblick auf Membranproteine ein überzeugendes Argument für diese Methode.

Allerdings liegt die Auflösungsgrenze im hohen Kilodalton-Messbereich bei ~100 Da, und oberhalb dieses Bereiches verschlechtert sie sich noch. Auch bei dieser Methode bleiben, gerade unter mildem Laserbeschuss noch Teile der Detergenzhülle und der Hydrathülle erhalten. Diese tragen zur experimentellen Masse bei und verschieben den beobachteten Peak oder führen zu einem längeren Auslaufen des Peaks in Richtung höherer Massen.

Der Wildtyp Cytochrom bc_1 Komplex konnte durch diese Methode, wie unter Abschnitt 3.4.5 dargestellt, als Tetramer identifiziert werden. Im Rahmen der oben beschriebenen Dimerenstruktur aller bisher bekannten Komplexe so wie der verschränkten Rieske-Proteine wird hier davon ausgegangen, dass es sich bei dem Tetramer um ein Dimer aus Dimeren handelt. Die Identifikation des einfach geladenen Massepeaks geschah anhand der Peakserie, die durch die Ladungsverteilung des Komplexes verursacht wird. Durch das zuordenbare Schema eines Dimers oder eines Tetramers konnte eindeutig zwischen den beiden Formen unterschieden werden. Da bei dieser Methode mit verdünnten Proteinlösungen gearbeitet wird, kann der These widersprochen werden, dass ein Tetramer:Dimer-Gleichgewicht unter diesen Bedingungen vorliegt (179). Im Spektrum ist keinerlei Dimer zu sehen, weshalb diese Ergebnisse konträr zu denen aus der analytischen Ultrazentrifugation stehen.

Das Spektrum des Gesamtkomplexes zeigt ebenfalls ein *trailing* der Peaks in Richtung höherer Molekulargewichte, dies ist noch anhaftendes Detergenz oder Wasser. Die drei Untereinheiten sind bei energiereichem Laserbeschuss bei ihren jeweiligen Molekulargewichten in scharfen Peaks darstellbar (Tabelle 9) und entsprechen nahezu den erwarteten Werten. Dies ist besonders wertvoll, wenn Proteine untersucht werden, die sehr hydrophob oder stark (negativ) geladen sind, wie das Cyt b oder das Cyt c_1 , die in SDS-PAGE-Methoden zu einem abweichenden, apparenten Molekulargewicht führen. Im LILBID-MS tritt dieser Effekt nicht auf, das Verfahren liefert authentische Massen.

Diskussion

Der Cytochrom *bc*₁ Komplex mit deletierter saurer Domäne stellt sich im LILBID-Spektrum nach Laserbeschuss mit geringer Intensität bei 200 kDa dar, dies entspricht der errechneten Masse eines Dimers (Tabelle 9). Somit kann zweifelsfrei von einem anderen Oligomerisierungszustand, dem des Dimers, für diese Mutante ausgegangen werden. Nach Laserbeschuss mit hoher Intensität lassen sich neben dem unveränderten Cyt *b* und der ISP auch die Δ ac Cyt *c*₁-Untereinheit bei der erwarteten Masse (~29 kDa) zeigen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die saure Domäne zur Dimerisierung zweier Dimere führt, die durch Deletion unterbunden werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die LILBID-MS eine schonende Methode ist, Membranproteinkomplexe in die Gasphase zu überführen und nach einer TOF-Analyse ihr Molekulargewicht zu bestimmen. Die Größe der Untereinheiten zusammen mit der Gesamtgröße eines Komplexes lässt Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Komplexes zu, wie in einer weiteren Anwendung mit Proteinen der oxidativen Phosphorylierung mit dieser Methode gezeigt werden konnte (224, 225). Damit steht für künftige Untersuchungen eine leistungsstarke Methode zur Verfügung den Oligomerenzustand, die Gesamtmasse von Membranproteinkomplexen und deren Untereinheiten zu untersuchen.

4.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungen

Die dargestellte Methode der BN-PAGE erschien nur für einen Vergleich der Proteine untereinander geeignet, jedoch nicht zur absoluten Größenbestimmung von aufgereinigten Membranproteinen.

Die analytische Gelfiltration erschien besser geeignet, jedoch waren teilweise sehr große abweichungen zu den erwarteten Massen zu beobachten.

Die LILBID-MS scheint auch im Vergleich mit der analytischen Ultrazentrifugation das vorteilhaftere System zu sein, denn hier muss nicht erst die Menge des gebundenen Detergenzes experimentell ermittelt und durch Anpassen der Pufferbedingungen ausgeglichen werden.

4.2 Ansätze zur Strukturaufklärung

Im Ansatz zur Strukturaufklärung wurden zwei Wege verfolgt: (i) die Antikörpervermittelte Kristallisation und (ii) die Kristallisation des Cytochrom *bc*₁ Komplexes

mit deletierter saurer Domäne. Auf beiden Wegen wurde die Dampfdiffusions-Methode im *sitting-* und *hanging-drop* Verfahren zur Kristallisation eingesetzt.

4.2.1 Chimärer Cytochrom bc_1 Komplex

Der chimäre Komplex erschien nach den Untersuchungen zur Stabilität und zur Bindung des Fv-Fragments zur Kristallisation geeignet, bis auf das Hemmnis der geringen Expression. Durch das Einbringen eines Codon-optimierten Gens konnte die Expression erfolgreich gesteigert werden. Das hieraus gewonnene Protein wies die gleichen Eigenschaften auf wie das Protein vor dem Einbringen des synthetisierten Gens.

Die Untersuchungen zur Stabilität zeigten nur einen geringen Zerfall sowohl des Co-Komplexes aus Cytochrom bc_1 Komplex und Fv-Fragment als auch des Cytochrom bc_1 Komplexes selbst. Um dieses Problem zu beheben, wurde nach einem geeigneteren Detergenz gesucht, das den Komplex in der dimeren oder tetrameren Form stabilisiert.

Eine Detergenztest mittels BN-PAGE ergab drei mögliche Kandidaten, die das Bandenmuster des Komplexes veränderten. Diese erwiesen sich jedoch in Detergenzaustauschversuchen als destabilisierend und führten zum Zerfall des Komplexes und zur Bildung unerwünschter Subpopulationen. Versuche, den Komplex in einem Dimerenzustand durch Variation der Solubilisierungsbedingungen zu isolieren, schlugen fehl. In diesen Versuchen wurden der Salzgehalt beziehungsweise die DDM-Konzentration verändert oder EDTA zur Eliminierung von zweiwertigen Ionen zugesetzt.

Die Kristallisationsversuche wurden Mangels eines geeigneteren Detergenzes in DDM durchgeführt. Zum Auspipettieren kamen Kristallisationsroboter zum Einsatz. Es wurden sowohl kommerziell verfügbare Standard-*screens* verwendet, als auch eigene Ansätze mit verschiedenen Fällungsmittel und Variation in pH-Wert, Protein-, Puffer- und Salzkonzentrationen. Die Ansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen (4-30 °C) gelagert. Das Protein erwies sich bei 4 °C am stabilsten. Alle Kristallisationsversuche wurden mit Stigmatellin inhibiertem Komplex durchgeführt. Der Einsatz der Fällungsmittel PEG-400 und PEG-4000 lieferten zwar die besten Ergebnisse, jedoch konnte trotz mehrerer 1000 Ansätzen keine Bedingung erhalten werden, die zur Kristallisation führte. Alle Ansätze führten zur

Diskussion

Präzipitation des Proteins, manche enthielten mikrokristallines Material. Die Versuche wurden nach diesen Ergebnissen zu Gunsten der zweiten Versuchsreihe eingestellt.

Ein Grund, weshalb eine Kristallisation nicht zu erreichen war, könnte in einer zu geringen Proteinstabilität liegen. Ein weiterer Grund kann möglicherweise die Beweglichkeit der Dimere untereinander oder der ISPs sein wodurch die Kristallisation gestört wird.

4.2.2 Cytochrom *bc*₁ Komplex mit deletierter saurer Domäne

Der Komplex mit deletierter saurer Domäne zeigt eine im Gegensatz zum chimären Komplex höhere Stabilität in den Gelfiltrationsuntersuchungen. Der Komplex wurde mittels einer Nickelchelatorsäule aufgereinigt, hierbei wurde ein Histidgradient zur Elution verwendet. Das Histidin verändert im Gegensatz zu Imidazol die Eigenschaften der *b*-Häme nicht. Der Komplex wird zwar durch das Imidazol nicht irreversibel in seiner Aktivität gestört, wie es im Falle des Komplexes aus *R. capsulatus* (226) berichtet wurde, jedoch werden die *b*-Häme bereits durch Ascorbat teilreduziert. Möglicherweise liegt dieser Effekt an einer Religandierung der *b*-Häme. Nach Gelfiltration und Inhibition durch Stigmatellin wurde der Komplex direkt in Kristallisationsansätzen verwendet.

Bereits etwa 1000 Ansätze führten zu ersten Kristallen des Komplexes. Durch Verfeinerung der Bedingungen konnten die Kristalle leicht vergrößert werden. Wahrscheinlich begünstigt die dimere Form dieser Mutante die Kristallisation, da im Proteinkomplex weniger Flexibilität möglich ist. Die Deletion der sauren Domäne könnte einen ähnlichen Effekt haben, da sie strukturell möglicherweise ungeordnet vorliegt.

Die erhaltenen Kristalle wurden geerntet, direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und auf Synchrotronanlagen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Kristalle ein geordnetes Beugungsmuster aufwiesen, jedoch Schaden durch den Einfrierprozess genommen hatten (persönliche Kommunikation C. Hunte, University Leeds, Great Britain), so dass bisher noch kein Datensatz aufgenommen werden konnte.

Die Kristallisationsexperimente können als Erfolg gewertet werden, allerdings muss das Einfrieren der Kristalle verbessert werden, so dass diese keinen Schaden mehr

Diskussion

durch den Einfrierprozess in flüssigem Stickstoff nehmen. Die verwendete Proteinlösung enthielt bereits 0,5 M Saccharose als *cryoprotectant*. Dies scheint nicht genug zu sein, deshalb sollten zukünftig die Kristalle auf einen Gehalt von 1 M Saccharose gebracht werden. Die Kristalle können mit der Kristallisationslösung mit sequentiell höherem Gehalt von Saccharose in zwei bis drei Schritten durchtränkt werden, bis sie die höhere Saccharosekonzentration erreicht haben.

4.2.3 Struktur-Modellierung

Die veröffentlichte Struktur von *R. sphaeroides* erlaubt mit Hilfe von Modellierungs-Programmen einen Ausblick auf eine mögliche Raumstruktur des Komplexes aus *P. denitrificans*. Die Primärsequenzen der drei Untereinheiten, sowie die Struktur wurden vorgegeben und daraus mit dem Programm ESyPred3D die Modelle erstellt. Erstaunlicherweise konnte das Programm nur die ISP- und die Cyt *b*-Untereinheit in annehmbarer Qualität simulieren. Die Cyt *c*₁-Untereinheit wurde nur mit offensichtlichen Fehlern modelliert, so dass ein zweites Programm 3DJIGSAW verwendet wurde. Damit konnte auch die dritte Untereinheit modelliert werden. Im Anschluss wurden die Modelle in VMD mit dem implementierten STAMP-Struktur-Alignment-Programm auf der bekannten Struktur angeordnet (Abbildung 41).

Auffällig ist, dass das Proteinrückgrat der Cyt *b*-Untereinheiten nahezu identisch ist (Abbildung 41 C). Es kann keine Abweichung des Proteinrückgrats erkannt werden, was auf Grund der hohen Sequenzidentität zwischen den beiden Komplexen bereits zu erwarten war.

Diskussion

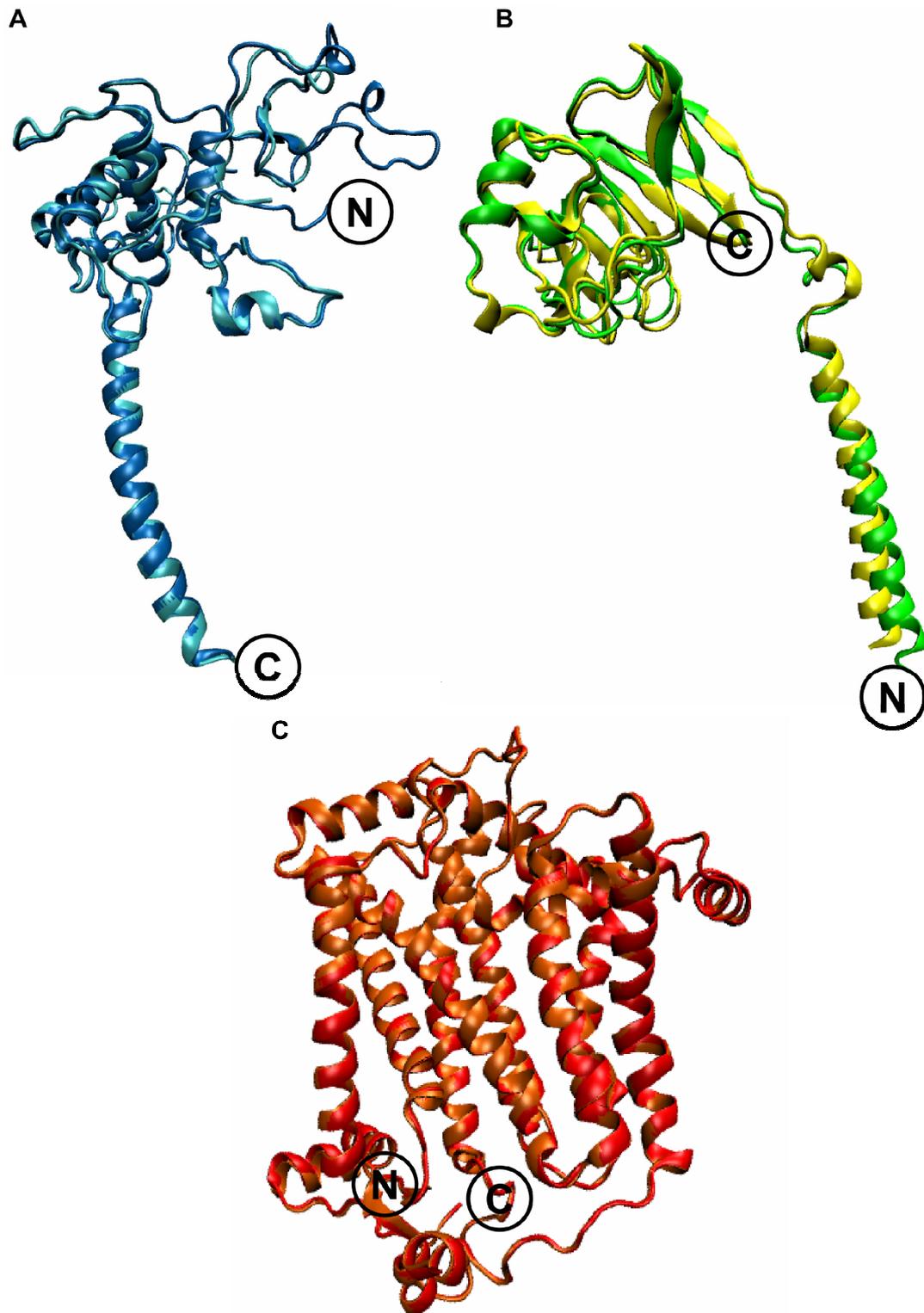


Abbildung 41: Modellierte Untereinheiten des Cytochrom bc_1 Komplexes aus *P. denitrificans* auf die Struktur aus *R. sphaeroides* (2JQP). Die erhaltenen Strukturen (hellblau, orange und gelb) sind mit den korrespondierenden Strukturen aus *R. sphaeroides* überlagert dargestellt (dunkelblau, rot und grün). Die drei Untereinheiten sind einzeln gezeigt: (A) Cyt c_1 , (B) ISP, (C) Cyt b .

Diskussion

Für das ISP gilt ähnliches, sowohl die Gesamtstruktur als auch der *cluster-binding-fold* der beiden Strukturen sind nahezu identisch. Die Form des Verlaufes des Proteinrückgrats ist gleich, lediglich die Anordnung im Raum ist stellenweise etwas abweichend (Abbildung 41 B). Die einzige offensichtliche Abweichung zeigt sich in der Gelenkregion zwischen der Ektodomäne und der Transmembranhelix. Hier ist zu erkennen, dass im modellierten Fall (Abbildung 41 B grün) eine Helix in diesem Bereich vorliegt, die im Original (Abbildung 41 B gelb) nicht zu sehen ist.

Die Cyt c_1 -Untereinheiten weisen die größten Abweichungen voneinander auf (Abbildung 41 A). In der hydrophilen Domäne (Abbildung 41 A rechts, dunkelblau) zeigt die Struktur aus *R. sphaeroides* eine Insertion, die es in *P. denitrificans* nicht gibt. Jedoch kehren beide Strukturen nach der Insertion am gleichen Punkt wieder in die Hauptstruktur der hydrophilen Domäne zurück. Die modellierte Struktur weist hier nur einen kurzen Loop auf. Das Programm ist nicht in der Lage den N-Terminus des Proteins aus *P. denitrificans* zu modellieren, da über diesen keinerlei Strukturinformationen vorliegen, da das Enzym aus *R. sphaeroides* diese Insertion nicht aufweist. Damit entspricht die modellierte Struktur der Situation in der Cytochrom bc_1 Komplex-Mutante mit deletierter saurer Domäne.

Mit den modellierten Strukturen kann das Bild eines Monomers der Cytochrom bc_1 Komplex-Mutante mit deletierter saurer Domäne zusammen-gesetzt werden, das einen ersten Blick auf die mögliche Struktur erlaubt (Abbildung 42).

Diskussion



Abbildung 42: Cytochrom bc_1 Komplex aus *P. denitrificans* modelliert auf die Struktur aus *R. sphaeroides* (2JQP), erstellt mit VMD.

Die erhaltenen Untereinheiten-Strukturen des Cyt c_1 sind in hellblau, Cyt b in orange und ISP in gelb dargestellt.

Diese wurden mit einem Strukturalignment auf Grundlage der Struktur der Struktur aus *R. sphaeroides* angeordnet. Die Struktur aus *R. sphaeroides* wurde danach ausgeblendet.

4.3 Gemischtes Dimer des Cytochrom *bc₁* Komplexes

In diesem Teil der Arbeit sollte ein Cytochrom *bc₁* Komplex erzeugt werden, der ein aktives und ein durch Mutation inhibiertes Monomer trägt, in der Annahme, dass es sich bei dem Komplex um ein Dimer handelt. Die beiden Monomere sollte durch das Einführen zweier *fbc*-Operons, mit den Informationen für (i) das Wildtyp-Enzym mit einem Strep-tag II (ii) das Enzym mit der inhibierenden Mutation und dem His-tag im Cyt *b*, exprimiert werden. Die Affinitäts-tags wurden am *fbcB* angebracht, um eine Unterscheidung der beiden Monomeren zu ermöglichen. In den Membranen des Organismus sollten dann neben zweifach homolog markierten Komplexen ebenfalls gemischte Komplexe entstehen. Diese sollten dann durch eine Tandem-aufreinigung mit den beiden korrespondierenden Säulenmaterialien aufgereinigt werden.

Die beiden getesteten Affinitäts-tags, *deka* His-tag und Strep-tag II, erwiesen sich insofern für das Experiment als geeignet, als sie in den exprimierten Komplexen per Westernblot nachweisbar waren, die Aktivität und Integrität des Komplexes nicht störten und es möglich war, sie mit dem korrespondierenden Säulenmaterial aufzureinigen. Die Position am C-Terminus des Cyt *b* zeigte die besten Ergebnisse. Die verwendete und charakterisierte Mutation im Cyt *b* (bY147S) zur Inhibierung des Komplexes eignete sich für dieses Experiment ebenfalls auf Grund ihrer niedrigen Aktivität. Sie weist Eigenschaften auf wie sie bereits in der Literatur beschrieben werden (133). Die Mutation korreliert mit dem His-tag und der Wildtyp mit dem Strep-tag II.

Darauffolgend konnte ein *P. denitrificans*-Stamm erzeugt werden, der stabil beide Operons und damit beide Komplexe mit Affinitäts-tags exprimierte und ihre Bindung an das korrespondierende Säulenmaterial nachgewiesen werden konnte. Eine funktionierende Tandem-Aufreinigung wurde für das gemischte Dimer ebenfalls etabliert. Die Tandem-Aufreinigung ist mittlerweile ein verbreitetes Mittel zur Aufreinigung von heterogenen, multimeren Proteinkomplexen (227, 228).

Das mit der Tandem-Aufreinigung gewonnene Material wurde durch *steady-state* und *pre-steady-state* Aktivitätsmessungen untersucht. Jedoch sind die Daten aus den *steady-state* Messungen nur schwer zu interpretieren. Es konnte keine Erklärung gefunden werden, die eine sinnvolle Aussage über die Monomer:Monomer-Interaktion erlauben würde. Die *pre-steady-state* Messungen

Diskussion

ergaben ähnliche Ergebnisse. Dies kann mit dem tetrameren Zustand des Enzymes erklärt werden, denn dieser erlaubt weit mehr Kombinationen der beiden Affinitäts-*tags* und damit der Monomere als ein einfaches Dimer-Modell. Mit der Tandem-Aufreinigung war es nicht möglich, eine homogene Präparation zu erhalten, da hiermit wahrscheinlich alle Komplexe aufgereinigt wurden, die wenigstens einen der beiden Affinitäts-*tags* trugen. In einer solchen Präparation können ein- bis dreifach markierte Komplexe, aus der Sicht beider Affinitäts-*tags*, vorkommen. Die einzigen Komplexe, die durch diese Methode vollständig eliminiert wurden, sind solche, die jeweils nur eine Art der Affinitäts-*tags* trugen, da sie an jeweils ein Säulenmaterial nicht binden konnten.

Die Lösung für das aufgetretene Problem wäre ein Komplex der nicht als Tetramer oder als Dimer von Dimeren vorliegt. Ein solcher Komplex konnte bereits identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die bereits hier beschriebene Mutante mit der deletierten sauren Domäne. Die Deletion im Cyt c_1 sollte für die Untersuchung der *half-of-the-sites*-Hypothese, die durch Beobachtung der Hydrochinon-Oxidation am Q_p -Zentrum sowie Beobachtung der *b*-Häme erfolgen soll, nicht behindert werden. Diese Mutante konnte bereits charakterisiert werden, so dass die nicht gemischte Version für diese Experimente als „Wildtyp“ dienen kann ((170), M. Castellani, nicht publiziert).

Bisher konnten die Experimente mit dieser vorgeschlagenen Mutante allerdings noch nicht durchgeführt werden, da der Strep-*tag* und die Mutation (bY147S) noch nicht auf die Deletionsmutante übertragen werden konnten. Sollte dies gelingen, ist die Prognose für die Experimente vielversprechend.

4.4 Q_p -Zentrum Mutanten

Die Mutationen bE81Q, bD86N, bY147F und bY302F konnten alle in das *fbcb*-Gen eingeführt und im Operon-Expressionsvektor anschließend in *P. denitrificans* überführt werden. Im Folgenden konnten diese Mutanten-Stämme und ein Wildtyp-Stamm, zusammen mit den bereits vorhandenen Mutanten-Stämmen, welche die Mutationen bD278N, bE295Q und Y297F (197) tragen, angezogen werden. Aus den erhaltenen Zellen wurden Membranen isoliert und daraus der Cytochrome *bc₁*-Komplex für die FTIR-Untersuchungen aufgereinigt. In allen Mutanten konnten die drei redox-aktiven Untereinheiten auf der SDS-PAGE dargestellt und in Westernblots nachgewiesen werden. Für alle Mutanten wurden Redoxspektren

Diskussion

aufgenommen, welche die Häm c_1 - und die beiden Häm b -Cofaktoren zeigen. Ebenso konnte die Aktivitäten und IC_{50} -Werte für alle Mutanten und den Wildtyp ermittelt werden.

Die Aktivität des Wildtyps lag mit 327 s^{-1} im Bereich von publizierten Wildtyp-Werten. Die für den Wildtyp bestimmte IC_{50} -Konzentration ist im Vergleich mit für *P. denitrificans* (197) publizierten Werten mit 131 nM zu hoch, auch im Vergleich zu *R. capsulatus* (210). Dies galt auch für die Werte aller Mutanten, so dass zwar keine absolute Aussage, aber eine relative Vergleichbarkeit der IC_{50} -Werte möglich war. Die Unterschiede resultieren möglicherweise aus unterschiedlichen Verfahren der Aktivitätsmessung, so wurde in dieser Versuchsreihe die Reaktion durch Zugabe von Cyt c gestartet und nicht durch die Zugabe des Hydrochinons (197).

Die Mutation E295Q zeigte eine deutliche Verringerung der Aktivität auf 10 % und wies eine 4,6fach höhere IC_{50} -Konzentration im Vergleich zum Wildtyp auf. Dies ist in guter Übereinstimmung mit für *R. spaeroides* und *S. cerevisiae* publizierten Werten von unter 4 % respektive 13 % (25, 136). Sie liegen jedoch unter den Werten, die für denselben *P. denitrificans*-Stamm an anderer Stelle ermittelt wurden (197), was nur schwerlich mit Veränderungen im Enzym zu erklären ist, sondern wahrscheinlich auf einer praktischen Komponente bei den Messungen zurückzuführen ist. Die Erhöhung der IC_{50} -Werte entspricht aber demselben Faktor. Die beiden Studien aus den anderen Organismen beschreiben nur den kompletten Verlust der Stigmatellin-Sensitivität. Dies lag bei der aus *P. denitrificans* isolierten Mutante nicht vor. Die Verschiebung in Richtung einer schlechteren Stigmatellinbindung war zu erwarten, denn in allen bisherigen Strukturen (z.B.: (74, 82)) konnte eine Bindung zwischen E295 und Stigmatellin gesehen werden.

Das Modell von Crofts *et al.* geht davon aus, dass die Säuregruppe dieser Aminosäure das zweite Proton während des Reaktionszyklus aufnimmt und danach in Richtung des Häm b_L rotiert. Dafür scheint zwar der pK_a -Wert dieser Gruppe zu niedrig zu sein, jedoch könnte eine lokale Verringerung des pH-Wertes durch einen vorangegangenen Protonenübergang auf ein Wassermolekül erreicht werden (211). Von einem ähnlichen Mechanismus, jedoch mit leicht verändertem zeitlichem Ablauf wird in einem anderen Modell ausgegangen (229). Hierbei soll das erste Proton auf E295 übertragen werden. Einem direkten Protonenübertrag auf diese Seitengruppe wird von anderer Seite widersprochen (135), jedoch wird nicht ausgeschlossen, dass E295 im Laufe der Reaktion protoniert wird und damit zur Protonenleitung

Diskussion

beiträgt. Vorangegangene Studien zeigen jedoch, dass E295 nicht essentiell für die Chinoloxidation ist und deshalb auch nicht zwingend protoniert werden muss (132).

Die Mutante Y297F liegt ebenfalls im PEWY-Loop, verändert die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp nicht, was mit anderen Untersuchungen übereinstimmt (197). Die Seitengruppe befindet sich in den meisten Strukturen am selben Ort. Die Mutation verringert die Stigmatellinbindung leicht. Die Daten (198) zeigen in redoxgekoppelten FTIR-Messungen eine Störung des Chinon- und des Proteinrückgrat-Signals. Das Tyrosin an dieser Stelle hat möglicherweise eine eher strukturelle Bedeutung, so dass ein konservativer Austausch, wie hier vorgenommen, die Chinoloxidation nicht behindert und möglicherweise nur zu einer leichten Veränderung der Lage des Substrates führt.

Die beiden Mutationen E81Q und D86N liegen, von der Chromon-Kopfgruppe des Stigmatellins in der Struktur (1ezv) aus *S. cerevisiae* gemessen, 29 Å beziehungsweise 20 Å entfernt, was einen direkten Einfluss auf das Hydrochinonoxidationszentrum schwer vorstellbar macht. Die beiden Reste sind allerdings in eine Kette von Wassermolekülen integriert, die auf Grundlage von *molecular dynamics*-Berechnungen als Protonenausgangs-kanal für das Q_p-Zentrum diskutiert wird (130). Diese Kette von Wassermolekülen konnte in der Struktur (1ezv) aus *S. cerevisiae* gezeigt werden. Sie verläuft über die beiden mutierten Reste und die Häm b_L-Kante in Richtung des PEWY-Loops. Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Q_p-Zentrum sind über das Wasserstoffbrücken-netzwerk denkbar.

Die Mutante D86N zeigt eine verringerte Aktivität, es ist jedoch ist kein Einfluss auf die Bindung von Stigmatellin feststellbar. Der umgekehrte Fall gilt für die Mutante E81Q, in der die Stigmatellinbindung beeinflusst ist, nicht jedoch die Aktivität. In redoxgekoppelten FTIR-Messungen zeigen die Mutanten einen Einfluss auf die Chinonbindung und das Proteinrückgrat (198), was auf einen Einfluss auf das Q_p-Zentrums hinweist. Mutmasslich sind die beobachteten Effekte sekundärer Natur und wirken sich wahrscheinlich über die beschriebene Wassermolekülkette aus.

Eine weitere Mutante, die nur einen geringen Effekt auf die Aktivität hat, ist D278N. Sie liegt in der Nähe der in Berry *et al.* beschriebenen Zinkbindestelle (93) und eines möglichen Protonenaustrittspunktes am Ende eines postulierten Protonenkanals. Der Einfluss auf die Stigmatellinbindung ist gering, da die Mutante nahezu wie der

Diskussion

Wildtyp reagiert. Die Seitengruppe nimmt wahrscheinlich am Wasserstoffbrücken-Netzwerk teil, hat aber keinen zwingenden Einfluss auf die Chinoloxidation und ist somit als regelndes Element für den Protonenaustritt unwahrscheinlich.

Die Mutation Y302F hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Komplexes und zeigt nur eine geringfügig verringerte Stigmatellinbindung, wie in einer vorangegangenen Studie ebenfalls gezeigt (197). Obwohl diese Seitengruppe in anderen Organismen erhalten ist, zeigt der konservative Austausch kaum Einfluss. Dies lässt sich möglicherweise mit einer gewissen Flexibilität des Protonennetzwerks um das Q_P-Zentrum erklären, so dass eine andere Seitengruppe die Funktion übernehmen kann. Es konnte bereits an anderer Stelle gezeigt werden, dass die Mutation dieses Rests konformationelle und kinetische Veränderungen sowie Veränderungen der Chinolbindung verursacht (119).

Die Tyrosinseitenkette der Aminosäure bY147 ist wahrscheinlich wichtig für die Substratbindung und damit für die Inhibitorbindung. Die Aktivität der Mutante liegt im Vergleich zum Wildtyp bei etwa 50 % und die Stigmatellinbindung ist stark verringert. Da die Seitengruppe in der Struktur (1ezv) aus *S. cerevisiae* bis zu 7 Å von der Chromon-Kopfgruppe des Stigmatellins entfernt ist, nimmt sie möglicherweise über ein koordiniertes Wassermolekül an der Substratbindung oder, wahrscheinlicher, an der Protonenleitung teil.

Die elektrochemisch-induzierten Redox-FTIR-Differenzspektren der beschriebenen Mutanten erlauben im Vergleich zum Wildtyp einen Einblick in den Protonierungszustand der Seitengruppen. Es wird deutlich, dass viele Seitengruppen die Chinonbindungsstelle direkt oder indirekt beeinflussen. Auch die Aktivitätsuntersuchung und die Inhibitorbindungsstudie zeigen die Beeinflussung der Chinonbindung durch die Mutanten. Seitengruppen, die eine Veränderung zeigen, sind wahrscheinlich am Wasserstoff-brückennetzwerk des Q_P-Zentrums oder am Protonenauslass beteiligt. Es konnten neben den bisher bereits in der Literatur diskutierten Seitengruppen E295 und Y302 nach diesen Untersuchungen auch die Seitengruppen der Aminosäuren D278 und E81 als wichtige Wechselwirkungspartner bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zwischen den Seitengruppen des Q_P-Zentrums starke Wechselwirkungen gibt und die Bindungstasche eine gewisse Toleranz gegenüber Veränderungen aufweist.

5 Zusammenfassung

Der Cytochrom bc_1 Komplex spielt in der mitochondrialen Atmungskette eine zentrale Rolle, er ist am Aufbau des Protonengradienten über die innere Mitochondrien-Membran beteiligt. Die Funktionsweise dieses integralen Membranproteinkomplexes ist trotz mehrerer gelöster Strukturen noch nicht vollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Komplex aus *P. denitrificans* untersucht und dabei mehrere Beiträge zu Struktur und Funktion dieses bakteriellen Modellsystems geleistet, wie z.B. seinem Oligomerenzustand in Detergenz-gelöster Form und zur Frage der Monomer:Monomer-Interaktion.

Zur Strukturaufklärung des Cytochrom bc_1 Komplexes aus *P. denitrificans* wurde ein chimärer Komplex zur Kristallisation eingesetzt, der in der Lage ist ein Antikörper-Fragment zu binden, das bereits mit Erfolg zur Strukturbestimmung des Hefe-Komplexes verwendet wurde. Diese Experimente führten vermutlich wegen mangelnder Proteinstabilität nicht zum gewünschten Ergebnis. Eine zweite Mutante, bei der eine stark saure Domäne des Cyt c_1 deletiert vorliegt (Δac Cytochrom bc_1 Komplex), konnte jedoch erfolgreich kristallisiert und Diffraktionsmuster bis etwa 3,5 Å erhalten werden. Die Kristalle weisen derzeit noch Inhomogenitäten, wahrscheinlich durch den Einfrierprozess, auf und werden gegenwärtig weiter optimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der lange diskutierte Oligomerenzustand des Cytochrom bc_1 Komplexes aus *P. denitrificans* in solubilisiertem Zustand als Tetramer, beziehungsweise unter Einbeziehung struktureller und mechanistischer Daten und Überlegungen als Dimer eines Dimers, geklärt werden. Dies erfolgte durch eine für Membranproteine neue Form der Massenspektrometrie, die als LILBID-MS bezeichnet wird. Diese Daten konnten die bisher vorläufigen Beobachtungen aus BN-Gelelektrophorese und Gelfiltrationsversuchen eindeutig und unabhängig bestätigen.

Darüber hinaus sollten noch Beiträge zur funktionellen Monomer:Monomer-Wechselwirkung geliefert werden. Hierfür wurde zunächst ein *P. denitrificans* Stamm erzeugt, der stabil zwei unterschiedliche *fbc*-Operons trägt und exprimiert: eine Wildtyp-Version mit *Strep-tag* und eine mit einem *His-tag* und einer inaktivierenden Mutation im Cyt *b*. Aus diesem Stamm sollte durch eine Tandem-Aufreinigung ein gemischter Cytochrom bc_1 Komplex isoliert werden. Dies gelang

Zusammenfassung

nicht, wie in Westernblots, *turnover* und *pre-steady-state* Aktivitätsuntersuchungen gezeigt wurde, da sich der Komplex als Tetramer erwies und damit eine eindeutige Aufreinigung nicht möglich war. Die Lösung für dieses Problem liegt im Δac Cytochrom bc_1 Komplex, der wie LILBID-MS Ergebnisse zeigten, lediglich als Dimer vorliegt; dazu müssen zukünftig die Affinitäts-*tags* und die inaktivierende Mutation auf diesen Komplex übertragen werden.

Der zweite Beitrag zur Funktionsuntersuchung wurde anhand von Mutanten konservierter saurer Aminosäuren und von Tyrosinen im und um das Q_p -Zentrum geliefert, mit anschließenden Aktivitätsuntersuchungen, Inhibitor-Bindungsstudien mit Stigmatellin und elektrochemisch-induzierten Redox-FTIR-Differenzspektren. Die Mutanten E295Q, E81Q und Y297Q zeigten eine verringerte Sensitivität für Stigmatellin. Die FTIR-Differenzspektren belegen, dass die Mutation der Positionen E295 und D278 die Signale für protonierte Seitengruppen verschieben. Die Mutation der Seitengruppen Y302, Y297, E81 und E295 beeinflussen direkt das oxidierte Chinon und das Proteinrückgrat.

Die Bedeutung der lange diskutierten Seitengruppe E295 ließ sich als direkter Interaktionspartner mit dem Hydrochinon bestätigen. Die wichtige Rolle der Seitengruppen in Positionen E295 und Y302 konnte bestätigt werden. Darüber hinaus wurden die Seitengruppen D278 und E81 als wesentliche Wechselwirkungspartner für die Hydrochinon-Oxidation identifiziert. Die Seitengruppen des Q_p -Zentrums unterliegen durch das Wasserstoffbrückennetzwerk starken Wechselwirkungen, wodurch die Bindungstasche eine gewisse Toleranz gegenüber Veränderungen zeigt.

6 Literaturverzeichnis

1. Stuart, J. A., and Brown, M. F. (2006) Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics, *Biochim Biophys Acta* 1757, 79-89.
2. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature* 191, 144-148.
3. Tocilescu, M. A., Fendel, U., Zwicker, K., Kerscher, S., and Brandt, U. (2007) Exploring the ubiquinone binding cavity of respiratory complex I, *J Biol Chem* 282, 29514-29520.
4. Zickermann, V., Zwicker, K., Tocilescu, M. A., Kerscher, S., and Brandt, U. (2007) Characterization of a subcomplex of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) lacking the flavoprotein part of the N-module, *Biochim Biophys Acta* 1767, 393-400.
5. Morgan, D. J., and Sazanov, L. A. (2008) Three-dimensional structure of respiratory complex I from *Escherichia coli* in ice in the presence of nucleotides, *Biochim Biophys Acta*.
6. Sazanov, L. A., and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*, *Science* 311, 1430-1436.
7. Mitchell, P. (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation, *FEBS Lett* 59, 137-139.
8. Gennis, R. B. (2004) Coupled proton and electron transfer reactions in cytochrome oxidase, *Front Biosci* 9, 581-591.
9. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature* 376, 660-669.
10. Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iwata, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation, *Science* 299, 700-704.
11. Beijerinck, M. (1910) Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien, *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II* 25, 30-63.
12. Katayama, Y., Hiraishi, A., and Kuraishi, H. (1995) *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus, *Microbiology* 141 (Pt 6), 1469-1477.
13. Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J.C., Glavina del Rio, T., Hammon, N., Israni, S., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Munk, A.C., Brettin, T., Bruce, D., Han, C., Tapia, R., Gilna, P., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Lykidis, A., Spiro, S., Richardson, D.J., Moir, J.W.B., Ferguson, S.J., van Spanning, R.J.M. and Richardson, P. (2006) Complete Sequence of the *Paracoccus denitrificans* Genome *National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA*.

Literaturverzeichnis

14. Margulis, L. (1970) Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts?, *J Theor Biol* 26, 337-342.
15. John, P., and Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion, *Nature* 254, 495-498.
16. Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O. M., and van Spanning, R. J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility, *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1046-1078.
17. de Gier, J. W., Lubben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H., and van der Oost, J. (1994) The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*, *Mol Microbiol* 13, 183-196.
18. Harms, N., and van Spanning, R. J. (1991) C1 metabolism in *Paracoccus denitrificans*: genetics of *Paracoccus denitrificans*, *J Bioenerg Biomembr* 23, 187-210.
19. van Verseveld, H. W., and Bosma, G. (1987) The respiratory chain and energy conservation in the mitochondrion-like bacterium *Paracoccus denitrificans*, *Microbiol Sci* 4, 329-333.
20. Yang, X. H., and Trumpower, B. L. (1986) Purification of a three-subunit ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex from *Paracoccus denitrificans*, *J Biol Chem* 261, 12282-12289.
21. Schagger, H., Link, T. A., Engel, W. D., and von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc1 complex from beef heart, *Methods Enzymol* 126, 224-237.
22. Schutz, M., Brugna, M., Lebrun, E., Baymann, F., Huber, R., Stetter, K. O., Hauska, G., Toci, R., Lemesle-Meunier, D., Tron, P., Schmidt, C., and Nitschke, W. (2000) Early evolution of cytochrome bc complexes, *J Mol Biol* 300, 663-675.
23. Trumpower, B. L. (1990) Cytochrome bc1 complexes of microorganisms, *Microbiol Rev* 54, 101-129.
24. Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N., and Lockau, W. (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome c/plastocyanin oxidoreductases, *Biochim Biophys Acta* 726, 97-133.
25. Crofts, A. R., and Berry, E. A. (1998) Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria, *Curr Opin Struct Biol* 8, 501-509.
26. Hauska, G., Gabellini, N., Hurt, E., Krinner, M., and Lockau, W. (1982) Cytochrome b/c complexes with polyprenyl quinol:cytochrome c oxidoreductase activity from *Anabaena variabilis* and *Rhodospseudomonas sphaeroides* GA: comparison of preparations from chloroplasts and mitochondria, *Biochem Soc Trans* 10, 340-341.
27. Lemaire, C., Girard-Bascou, J., Wollman, F.-A., and Bennoun, P. (1986) Studies on the cytochrome b6/f complex. I. Characterization of the complex subunits in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 851, 229-238.

Literaturverzeichnis

28. Rieske, J. S., MacLennan, D. H., and Coleman, R. (1964) Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15, 338-344.
29. Lange, C., and Hunte, C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2800-2805.
30. Turba, A., Jetzek, M., and Ludwig, B. (1995) Purification of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c552 and sequence analysis of the gene, *Eur J Biochem* 231, 259-265.
31. Li, Y., Leonard, K., and Weiss, H. (1981) Membrane-bound and water-soluble cytochrome c1 from *Neurospora* mitochondria, *Eur J Biochem* 116, 199-205.
32. Borst, P., and Grivell, L. A. (1981) Small is beautiful--portrait of a mitochondrial genome, *Nature* 290, 443-444.
33. Dutton, P. L. (1978) Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems, *Methods Enzymol* 54, 411-435.
34. Berry, E. A., Huang, L. S., Zhang, Z., and Kim, S. H. (1999) Structure of the avian mitochondrial cytochrome bc1 complex, *J Bioenerg Biomembr* 31, 177-190.
35. von Jagow, G., and Link, T. A. (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex, *Methods Enzymol* 126, 253-271.
36. Link, T. A., Haase, U., Brandt, U., and von Jagow, G. (1993) What information do inhibitors provide about the structure of the hydroquinone oxidation site of ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase?, *J Bioenerg Biomembr* 25, 221-232.
37. Crofts, A. R., Barquera, B., Gennis, R. B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors, *Biochemistry* 38, 15807-15826.
38. Esser, L., Quinn, B., Li, Y. F., Zhang, M., Elberry, M., Yu, L., Yu, C. A., and Xia, D. (2004) Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome bc(1) complex, *J Mol Biol* 341, 281-302.
39. Keilin, D., and Hartree, E. F. (1945) Purification and properties of cytochrome c, *Biochem J* 39, 289-292.
40. Berks, B. C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?, *Mol Microbiol* 22, 393-404.
41. Bachmann, J., Bauer, B., Zwicker, K., Ludwig, B., and Anderka, O. (2006) The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase, *FEBS J* 273, 4817-4830.
42. Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R. G., and Klosgen, R. B. (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in

Literaturverzeichnis

- chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts?, *J Biol Chem* 276, 42761-42766.
43. Iwata, S., Saynovits, M., Link, T. A., and Michel, H. (1996) Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution, *Structure* 4, 567-579.
 44. Carrell, C. J., Zhang, H., Cramer, W. A., and Smith, J. L. (1997) Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein, *Structure* 5, 1613-1625.
 45. 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. (2003) High-resolution structure of the soluble, respiratory-type Rieske protein from *Thermus thermophilus*: analysis and comparison, *Biochemistry* 42, 7303-7317.
 46. Link, T. A. (1999) The structure of Rieske and Rieske-type proteins,, *Advances in inorganic chemistry* 47, 83-157.
 47. von Jagow, G., and Ohnishi, T. (1985) The chromone inhibitor stigmatellin--binding to the ubiquinol oxidation center at the C-side of the mitochondrial membrane, *FEBS Lett* 185, 311-315.
 48. Denke, E., Merbitz-Zahradnik, T., Hatzfeld, O. M., Snyder, C. H., Link, T. A., and Trumpower, B. L. (1998) Alteration of the midpoint potential and catalytic activity of the rieske iron-sulfur protein by changes of amino acids forming hydrogen bonds to the iron-sulfur cluster, *J Biol Chem* 273, 9085-9093.
 49. Schroter, T., Hatzfeld, O. M., Gemeinhardt, S., Korn, M., Friedrich, T., Ludwig, B., and Link, T. A. (1998) Mutational analysis of residues forming hydrogen bonds in the Rieske [2Fe-2S] cluster of the cytochrome bc₁ complex in *Paracoccus denitrificans*, *Eur J Biochem* 255, 100-106.
 50. Snyder, C. H., Merbitz-Zahradnik, T., Link, T. A., and Trumpower, B. L. (1999) Role of the Rieske iron-sulfur protein midpoint potential in the protonmotive Q-cycle mechanism of the cytochrome bc₁ complex, *J Bioenerg Biomembr* 31, 235-242.
 51. Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Hadad, I., and Crofts, A. R. (2000) Specific mutagenesis of the rieske iron-sulfur protein in *Rhodobacter sphaeroides* shows that both the thermodynamic gradient and the pK of the oxidized form determine the rate of quinol oxidation by the bc₁ complex, *Biochemistry* 39, 7436-7444.
 52. Trumpower, B. L., and Edwards, C. A. (1979) Purification of a reconstitutively active iron-sulfur protein (oxidation factor) from succinate . cytochrome c reductase complex of bovine heart mitochondria, *J Biol Chem* 254, 8697-8706.
 53. Gencic, S., Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) Core I protein of bovine ubiquinol-cytochrome-c reductase; an additional member of the mitochondrial-protein-processing family. Cloning of bovine core I and core II cDNAs and primary structure of the proteins, *Eur J Biochem* 199, 123-131.

Literaturverzeichnis

54. Schulte, U., Arretz, M., Schneider, H., Tropschug, M., Wachter, E., Neupert, W., and Weiss, H. (1989) A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetICS and biogenesis, *Nature* 339, 147-149.
55. Kim, C. H., Balny, C., and King, T. E. (1987) Role of the hinge protein in the electron transfer between cardiac cytochrome c1 and c. Equilibrium constants and kinetic probes, *J Biol Chem* 262, 8103-8108.
56. Kim, C. H., and King, T. E. (1981) The indispensibility of a mitochondrial 15K protein for the formation of the cytochrome C1-cytochrome c complex, *Biochem Biophys Res Commun* 101, 607-614.
57. Kim, C. H., and King, T. E. (1983) A mitochondrial protein essential for the formation of the cytochrome c1-c complex. Isolation, purification, and properties, *J Biol Chem* 258, 13543-13551.
58. Kim, C. H., and King, T. E. (1987) Preparation and properties of cardiac cytochrome c1, *Biochemistry* 26, 1955-1961.
59. Yang, X. H., and Trumppower, B. L. (1986) Isolation of a three-subunit cytochrome bc1 complex from *Paracoccus denitrificans*, *Methods Enzymol* 126, 316-325.
60. Kurowski, B., and Ludwig, B. (1987) The genes of the *Paracoccus denitrificans* bc1 complex. Nucleotide sequence and homologies between bacterial and mitochondrial subunits, *J Biol Chem* 262, 13805-13811.
61. Grimm, M. (2001) Untersuchung $\sigma 70$ -ähnlicher Promotoren bei *P. denitrificans*, in *Molekulare Genetik*, p 101, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
62. Knaff, D. B. (1990) The cytochrome bc1 complex of photosynthetic bacteria, *Trends Biochem Sci* 15, 289-291.
63. Thony-Meyer, L. (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 337-376.
64. Ohta, S., Goto, K., Arai, H., and Kagawa, Y. (1987) An extremely acidic amino-terminal presequence of the precursor for the human mitochondrial hinge protein, *FEBS Lett* 226, 171-175.
65. Kim, C. H., and Zitomer, R. S. (1990) Disruption of the gene encoding subunit VI of yeast cytochrome bc1 complex causes respiratory deficiency of cells with reduced cytochrome c levels, *FEBS Lett* 266, 78-82.
66. Solmaz, S., and Hunte, C. (2008) Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer, *J Biol Chem*.
67. Schoppink, P. J., Hemrika, W., Reynen, J. M., Grivell, L. A., and Berden, J. A. (1988) Yeast ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase is still active after inactivation of the gene encoding the 17-kDa subunit VI, *Eur J Biochem* 173, 115-122.
68. Ozawa, T., Tanaka, M., and Shimomura, Y. (1983) Crystallization of cytochrome bc1 complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 921-925.
69. Beattie, D. S., Clejan, L., Chen, Y. S., Lin, C. I., and Sidhu, A. (1981) Orientation of complex III in the yeast mitochondrial membrane: labeling with

Literaturverzeichnis

- [125I] diazobenzenesulfonate and functional studies with the decyl analogue of coenzyme Q as substrate, *J Bioenerg Biomembr* 13, 357-373.
70. Gennis, R. B., Barquera, B., Hacker, B., Van Doren, S. R., Arnaud, S., Crofts, A. R., Davidson, E., Gray, K. A., and Daldal, F. (1993) The bc₁ complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*, *J Bioenerg Biomembr* 25, 195-209.
 71. Ohnishi, T., Schagger, H., Meinhardt, S. W., LoBrutto, R., Link, T. A., and von Jagow, G. (1989) Spatial organization of redox active centers in the bovine heart ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase, *J Biol Chem* 264, 735-744.
 72. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria, *Science* 277, 60-66.
 73. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex, *Science* 281, 64-71.
 74. Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T., and Michel, H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment, *Structure* 8, 669-684.
 75. Gao, X., Wen, X., Esser, L., Quinn, B., Yu, L., Yu, C. A., and Xia, D. (2003) Structural basis for the quinone reduction in the bc₁ complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc₁ with bound substrate and inhibitors at the Q_i site, *Biochemistry* 42, 9067-9080.
 76. Gao, X., Wen, X., Yu, C., Esser, L., Tsao, S., Quinn, B., Zhang, L., Yu, L., and Xia, D. (2002) The crystal structure of mitochondrial cytochrome bc₁ in complex with famoxadone: the role of aromatic-aromatic interaction in inhibition, *Biochemistry* 41, 11692-11702.
 77. Palsdottir, H., Lojero, C. G., Trumpower, B. L., and Hunte, C. (2003) Structure of the yeast cytochrome bc₁ complex with a hydroxyquinone anion Q_o site inhibitor bound, *J Biol Chem* 278, 31303-31311.
 78. Esser, L., Gong, X., Yang, S., Yu, L., Yu, C. A., and Xia, D. (2006) Surface-modulated motion switch: capture and release of iron-sulfur protein in the cytochrome bc₁ complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13045-13050.
 79. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003) Structure of the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science* 302, 1009-1014.
 80. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b₆f complex, *Nature* 426, 413-418.
 81. Berry, E. A., Huang, L. S., Saechao, L. K., Pon, N. G., Valkova-Valchanova, M., and Daldal, F. (2004) X-Ray Structure of *Rhodobacter Capsulatus* Cytochrome bc₁ (1): Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts, *Photosynth Res* 81, 251-275.
 82. Esser, L., Elberry, M., Zhou, F., Yu, C. A., Yu, L., and Xia, D. (2008) Inhibitor-complexed structures of the cytochrome bc₁ from the

Literaturverzeichnis

- photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*, *J Biol Chem* 283, 2846-2857.
83. Elberry, M., Xiao, K., Esser, L., Xia, D., Yu, L., and Yu, C. A. (2006) Generation, characterization and crystallization of a highly active and stable cytochrome bc1 complex mutant from *Rhodobacter sphaeroides*, *Biochim Biophys Acta* 1757, 835-840.
 84. Covian, R., and Trumpower, B. L. (2005) Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome bc1 complex dimer is reduced through center N, *J Biol Chem* 280, 22732-22740.
 85. Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S. H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1, *Nature* 392, 677-684.
 86. Kim, H., Xia, D., Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1998) Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8026-8033.
 87. Tian, H., Yu, L., Mather, M. W., and Yu, C. A. (1998) Flexibility of the neck region of the rieske iron-sulfur protein is functionally important in the cytochrome bc1 complex, *J Biol Chem* 273, 27953-27959.
 88. Tian, H., White, S., Yu, L., and Yu, C. A. (1999) Evidence for the head domain movement of the rieske iron-sulfur protein in electron transfer reaction of the cytochrome bc1 complex, *J Biol Chem* 274, 7146-7152.
 89. Xiao, K., Yu, L., and Yu, C. A. (2000) Confirmation of the involvement of protein domain movement during the catalytic cycle of the cytochrome bc1 complex by the formation of an intersubunit disulfide bond between cytochrome b and the iron-sulfur protein, *J Biol Chem* 275, 38597-38604.
 90. Cen, X., Yu, L., and Yu, C. A. (2008) Domain movement of iron sulfur protein in cytochrome bc1 complex is facilitated by the electron transfer from cytochrome b(L) to b(H), *FEBS Lett* 582, 523-526.
 91. Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., and Daldal, F. (2000) Probing the role of the Fe-S subunit hinge region during Q(o) site catalysis in *Rhodobacter capsulatus* bc(1) complex, *Biochemistry* 39, 15475-15483.
 92. Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., Moser, C. C., Dutton, P. L., and Daldal, F. (2000) Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc1 and its implications for energy conversion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4567-4572.
 93. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes, *Annu Rev Biochem* 69, 1005-1075.
 94. Obungu, V. H., Wang, Y., Amyot, S. M., Gocke, C. B., and Beattie, D. S. (2000) Mutations in the tether region of the iron-sulfur protein affect the activity and assembly of the cytochrome bc(1) complex of yeast mitochondria, *Biochim Biophys Acta* 1457, 36-44.

Literaturverzeichnis

95. Nett, J. H., Hunte, C., and Trumpower, B. L. (2000) Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome bc₁ complex, *Eur J Biochem* 267, 5777-5782.
96. Yan, J., and Cramer, W. A. (2003) Functional insensitivity of the cytochrome b₆f complex to structure changes in the hinge region of the Rieske iron-sulfur protein, *J Biol Chem* 278, 20925-20933.
97. Heimann, S., Ponamarev, M. V., and Cramer, W. A. (2000) Movement of the Rieske iron-sulfur protein in the p-side bulk aqueous phase: effect of luminal viscosity on redox reactions of the cytochrome b₆f complex, *Biochemistry* 39, 2692-2699.
98. Xiao, K., Liu, X., Yu, C. A., and Yu, L. (2004) The extra fragment of the iron-sulfur protein (residues 96-107) of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome bc₁ complex is required for protein stability, *Biochemistry* 43, 1488-1495.
99. Wikstrom, M. K., and Berden, J. A. (1972) Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin, *Biochim Biophys Acta* 283, 403-420.
100. Covian, R., Zwicker, K., Rotsaert, F. A., and Trumpower, B. L. (2007) Asymmetric and redox-specific binding of quinone and quinol at center N of the dimeric yeast cytochrome bc₁ complex. Consequences for semiquinone stabilization, *J Biol Chem* 282, 24198-24208.
101. Kolling, D. R., Samoilova, R. I., Holland, J. T., Berry, E. A., Dikanov, S. A., and Crofts, A. R. (2003) Exploration of ligands to the Q_i site semiquinone in the bc₁ complex using high-resolution EPR, *J Biol Chem* 278, 39747-39754.
102. Crofts, A. R. (2004) The cytochrome bc₁ complex: function in the context of structure, *Annu Rev Physiol* 66, 689-733.
103. Lange, C., Nett, J. H., Trumpower, B. L., and Hunte, C. (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure, *EMBO J* 20, 6591-6600.
104. Slater, E. C. (1973) The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin, *Biochim Biophys Acta* 301, 129-154.
105. Ding, H., Robertson, D. E., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1992) Cytochrome bc₁ complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Q_o site: a double-occupancy Q_o site model, *Biochemistry* 31, 3144-3158.
106. Samoilova, R. I., Kolling, D., Uzawa, T., Iwasaki, T., Crofts, A. R., and Dikanov, S. A. (2002) The interaction of the Rieske iron-sulfur protein with occupants of the Q_o-site of the bc₁ complex, probed by electron spin echo envelope modulation, *J Biol Chem* 277, 4605-4608.
107. Brandt, U., and Okun, J. G. (1997) Role of deprotonation events in ubihydroquinone:cytochrome c oxidoreductase from bovine heart and yeast mitochondria, *Biochemistry* 36, 11234-11240.
108. Ugulava, N. B., and Crofts, A. R. (1998) CD-monitored redox titration of the Rieske Fe-S protein of *Rhodobacter sphaeroides*: pH dependence of the midpoint potential in isolated bc₁ complex and in membranes, *FEBS Lett* 440, 409-413.

Literaturverzeichnis

109. Snyder, C., and Trumpower, B. L. (1998) Mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome bc₁ complex: pre-steady-state kinetics of cytochrome bc₁ complexes containing site-directed mutants of the Rieske iron-sulfur protein, *Biochim Biophys Acta* 1365, 125-134.
110. Crofts, A. R., Hong, S., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999) Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the bc(1) complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10021-10026.
111. Ding, H., Moser, C. C., Robertson, D. E., Tokito, M. K., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1995) Ubiquinone pair in the Q_o site central to the primary energy conversion reactions of cytochrome bc₁ complex, *Biochemistry* 34, 15979-15996.
112. Trumpower, B. L. (2002) A concerted, alternating sites mechanism of ubiquinol oxidation by the dimeric cytochrome bc(1) complex, *Biochim Biophys Acta* 1555, 166-173.
113. Snyder, C. H., Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2000) Evidence for a concerted mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome bc₁ complex, *J Biol Chem* 275, 13535-13541.
114. Bartoschek, S., Johansson, M., Geierstanger, B. H., Okun, J. G., Lancaster, C. R., Humpfer, E., Yu, L., Yu, C. A., Griesinger, C., and Brandt, U. (2001) Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome bc₁ complex, *J Biol Chem* 276, 35231-35234.
115. Ritter, M., Anderka, O., Ludwig, B., Mantele, W., and Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome bc₁ complex from *Paracoccus denitrificans*: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding, *Biochemistry* 42, 12391-12399.
116. Link, T. A. (1997) The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q(P)) site of the cytochrome bc₁ complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism, *FEBS Lett* 412, 257-264.
117. Junemann, S., Heathcote, P., and Rich, P. R. (1998) On the mechanism of quinol oxidation in the bc₁ complex, *J Biol Chem* 273, 21603-21607.
118. de Vries, S., Albracht, S. P., Berden, J. A., and Slater, E. C. (1981) A new species of bound ubisemiquinone anion in QH₂: cytochrome c oxidoreductase, *J Biol Chem* 256, 11996-11998.
119. Crofts, A. R., Lhee, S., Crofts, S. B., Cheng, J., and Rose, S. (2006) Proton pumping in the bc₁ complex: a new gating mechanism that prevents short circuits, *Biochim Biophys Acta* 1757, 1019-1034.
120. Zhang, H., Osyczka, A., Dutton, P. L., and Moser, C. C. (2007) Exposing the complex III Q_o semiquinone radical, *Biochim Biophys Acta* 1767, 883-887.
121. Xia, D., Esser, L., Yu, L., and Yu, C. A. (2007) Structural basis for the mechanism of electron bifurcation at the quinol oxidation site of the cytochrome bc₁ complex, *Photosynth Res* 92, 17-34.
122. Sadoski, R. C., Engstrom, G., Tian, H., Zhang, L., Yu, C. A., Yu, L., Durham, B., and Millett, F. (2000) Use of a photoactivated ruthenium dimer complex to measure electron transfer between the Rieske iron-sulfur protein and

Literaturverzeichnis

- cytochrome c(1) in the cytochrome bc(1) complex, *Biochemistry* 39, 4231-4236.
123. Crofts, A. R., Hong, S., Zhang, Z., and Berry, E. A. (1999) Physicochemical aspects of the movement of the Rieske iron sulfur protein during quinol oxidation by the bc(1) complex from mitochondria and photosynthetic bacteria, *Biochemistry* 38, 15827-15839.
 124. Berry, E. A., and Huang, L. S. (2003) Observations concerning the quinol oxidation site of the cytochrome bc1 complex, *FEBS Lett* 555, 13-20.
 125. Gurung, B., Yu, L., Xia, D., and Yu, C. A. (2005) The iron-sulfur cluster of the Rieske iron-sulfur protein functions as a proton-exiting gate in the cytochrome bc(1) complex, *J Biol Chem* 280, 24895-24902.
 126. Zhu, J., Egawa, T., Yeh, S. R., Yu, L., and Yu, C. A. (2007) Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome b(L) during ubiquinol oxidation in cytochrome bc(1) complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4864-4869.
 127. Ding, H., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1995) Ion pair formation between basic residues at 144 of the Cyt b polypeptide and the ubiquinones at the Qo site of the Cyt bc1 complex, *Biochemistry* 34, 15997-16003.
 128. Crofts, A. R., Guergova-Kuras, M., Huang, L., Kuras, R., Zhang, Z., and Berry, E. A. (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc(1) complex: role of the iron sulfur protein and its mobility, *Biochemistry* 38, 15791-15806.
 129. Sharp, R. E., Moser, C. C., Gibney, B. R., and Dutton, P. L. (1999) Primary steps in the energy conversion reaction of the cytochrome bc1 complex Qo site, *J Bioenerg Biomembr* 31, 225-233.
 130. Izrailev, S., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Schulten, K. (1999) Steered molecular dynamics simulation of the Rieske subunit motion in the cytochrome bc(1) complex, *Biophys J* 77, 1753-1768.
 131. Crofts, A. R. (2004) Proton-coupled electron transfer at the Qo-site of the bc1 complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation, *Biochim Biophys Acta* 1655, 77-92.
 132. Osyczka, A., Zhang, H., Mathe, C., Rich, P. R., Moser, C. C., and Dutton, P. L. (2006) Role of the PEWY glutamate in hydroquinone-quinone oxidation-reduction catalysis in the Qo Site of cytochrome bc1, *Biochemistry* 45, 10492-10503.
 133. Saribas, A. S., Ding, H., Dutton, P. L., and Daldal, F. (1995) Tyrosine 147 of cytochrome b is required for efficient electron transfer at the ubihydroquinone oxidase site (Qo) of the cytochrome bc1 complex, *Biochemistry* 34, 16004-16012.
 134. Brasseur, G., Saribas, A. S., and Daldal, F. (1996) A compilation of mutations located in the cytochrome b subunit of the bacterial and mitochondrial bc1 complex, *Biochim Biophys Acta* 1275, 61-69.
 135. Seddiki, N., Meunier, B., Lemesle-Meunier, D., and Brasseur, G. (2008) Is cytochrome b glutamic acid 272 a quinol binding residue in the bc1 complex of *Saccharomyces cerevisiae*?, *Biochemistry* 47, 2357-2368.

Literaturverzeichnis

136. Wenz, T., Covian, R., Hellwig, P., Macmillan, F., Meunier, B., Trumpower, B. L., and Hunte, C. (2007) Mutational analysis of cytochrome b at the ubiquinol oxidation site of yeast complex III, *J Biol Chem* 282, 3977-3988.
137. De Vries, S., Albracht, S. P., Berden, J. A., and Slater, E. C. (1982) The pathway of electrons through OH₂:cytochrome c oxidoreductase studied by pre-steady-state kinetics, *Biochim Biophys Acta* 681, 41-53.
138. Bechmann, G., Weiss, H., and Rich, P. R. (1992) Non-linear inhibition curves for tight-binding inhibitors of dimeric ubiquinol-cytochrome c oxidoreductases. Evidence for rapid inhibitor mobility, *Eur J Biochem* 208, 315-325.
139. Covian, R., Gutierrez-Cirlos, E. B., and Trumpower, B. L. (2004) Anti-cooperative oxidation of ubiquinol by the yeast cytochrome bc₁ complex, *J Biol Chem* 279, 15040-15049.
140. Covian, R., Kleinschroth, T., Ludwig, B., and Trumpower, B. L. (2007) Asymmetric binding of stigmatellin to the dimeric *Paracoccus denitrificans* bc₁ complex: evidence for anti-cooperative ubiquinol oxidation and communication between center P ubiquinol oxidation sites, *J Biol Chem* 282, 22289-22297.
141. Covian, R., and Trumpower, B. L. (2006) Regulatory interactions between ubiquinol oxidation and ubiquinone reduction sites in the dimeric cytochrome bc₁ complex, *J Biol Chem* 281, 30925-30932.
142. Takahashi, Y., and Nakamura, M. (1999) Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*, *J Biochem* 126, 917-926.
143. Miroux, B., and Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J Mol Biol* 260, 289-298.
144. Popot, J.-L. (1993) Integral membrane protein structure: transmembrane greek small letter alpha-helices as autonomous folding domains, *Current opinion in structural biology* 3, 532.
145. Sanders, C., Wethkamp, N., and Lill, H. (2001) Transport of cytochrome c derivatives by the bacterial Tat protein translocation system, *Mol Microbiol* 41, 241-246.
146. Dobbertsein, B. (1994) On the beaten pathway, *Nature* 367, 599-600.
147. Seddon, A. M., Curnow, P., and Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochim Biophys Acta* 1666, 105-117.
148. Von Jagow, G., and Schagger, H., (1994) *A practical guide to membrane protein purification*, in *Separation, Detection and Characterization of Biological Macromolecules*, A. R., Ed., Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.
149. Ludwig, B., and Schatz, G. (1980) A two-subunit cytochrome c oxidase (cytochrome aa₃) from *Paracoccus denitrificans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 196-200.
150. Hunte, C. (2005) Specific protein-lipid interactions in membrane proteins, *Biochem Soc Trans* 33, 938-942.

Literaturverzeichnis

151. Palsdottir, H., and Hunte, C. (2004) Lipids in membrane protein structures, *Biochim Biophys Acta* 1666, 2-18.
152. Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., and Schagger, H. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes, *J Biol Chem* 278, 52873-52880.
153. Hunte, C., and Richers, S. (2008) Lipids and membrane protein structures, *Curr Opin Struct Biol*.
154. Caffrey, M. (2003) Membrane protein crystallization, *J Struct Biol* 142, 108-132.
155. Landau, E. M., and Rosenbusch, J. P. (1996) Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14532-14535.
156. Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P., and Landau, E. M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases, *Science* 277, 1676-1681.
157. Katona, G., Andreasson, U., Landau, E. M., Andreasson, L. E., and Neutze, R. (2003) Lipidic cubic phase crystal structure of the photosynthetic reaction centre from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.35Å resolution, *J Mol Biol* 331, 681-692.
158. Wiener, M. C. (2004) A pedestrian guide to membrane protein crystallization, *Methods* 34, 364-372.
159. Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry, *J Biol Chem* 276, 32403-32406.
160. Lustig, A., Engel, A., and Zulauf, M. (1991) Density determination by analytical ultracentrifugation in a rapid dynamical gradient: application to lipid and detergent aggregates containing proteins, *Biochim Biophys Acta* 1115, 89-95.
161. Deisenhofer, J., and Michel, H. (1989) The Photosynthetic Reaction Center from the Purple Bacterium *Rhodospseudomonas viridis*, *Science* 245, 1463-1473.
162. Yeates, T. O., Komiya, H., Rees, D. C., Allen, J. P., and Feher, G. (1987) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: membrane-protein interactions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6438-6442.
163. Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K., and Michel, H. (1996) The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*, *Structure* 4, 581-597.
164. Faller, M., Niederweis, M., and Schulz, G. E. (2004) The structure of a mycobacterial outer-membrane channel, *Science* 303, 1189-1192.
165. Huber, T., Steiner, D., Rothlisberger, D., and Pluckthun, A. (2007) In vitro selection and characterization of DARPins and Fab fragments for the co-crystallization of membrane proteins: The Na(+)-citrate symporter CitS as an example, *J Struct Biol* 159, 206-221.

Literaturverzeichnis

166. Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase, *Nat Struct Biol* 2, 842-846.
167. Ostermeier, C., Essen, L. O., and Michel, H. (1995) Crystals of an antibody Fv fragment against an integral membrane protein diffracting to 1.28 Å resolution, *Proteins* 21, 74-77.
168. Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., and Michel, H. (1997) Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10547-10553.
169. Kleinschroth, T. (2003) Modellierung einer Antikörperbindungstelle am Cytochrom-*bc*₁-Komplex von *Paracoccus denitrificans*, in *Molekulare Genetik*, p 120, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main.
170. Castellani, M. (2006) Functional studies on the interaction between *Paracoccus denitrificans* complex III and its substrates, in *Facolta' di Scienze MM.FF.NN*, p 83, Università degli studi di L'Aquila, L'Aquila.
171. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.
172. Turchin, A., and Lawler, J. F., Jr. (1999) The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis, *Biotechniques* 26, 672-676.
173. Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., and Depiereux, E. (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures, *Bioinformatics* 18, 1250-1256.
174. Contreras-Moreira, B., and Bates, P. A. (2002) Domain fishing: a first step in protein comparative modelling, *Bioinformatics* 18, 1141-1142.
175. Bates, P. A., and Sternberg, M. J. (1999) Model building by comparison at CASP3: using expert knowledge and computer automation, *Proteins Suppl* 3, 47-54.
176. Bates, P. A., Kelley, L. A., MacCallum, R. M., and Sternberg, M. J. (2001) Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM, *Proteins Suppl* 5, 39-46.
177. Pfitzner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O. M. (1998) Cytochrome c oxidase (heme aa₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I, *J Bioenerg Biomembr* 30, 89-97.
178. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103-119.
179. Anderka, O. (2005) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am Cytochrom *bc*₁-Komplex aus *Paracoccus denitrificans*, in *Molekulare Genetik*, p 229, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main.

Literaturverzeichnis

180. Gerhus, E. (1992) Molekularbiologische und funktionelle Untersuchungen zum Cytochrome *bc*₁ Komplex aus *Paracoccus denitrificans*, Medical University Lübeck, Germany, Lübeck.
181. Antoine, R., and Loch, C. (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms, *Mol Microbiol* 6, 1785-1799.
182. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166, 557-580.
183. Hanahan, D., and Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density, *Methods Enzymol* 100, 333-342.
184. Devries, G. E., Harms, N., Hoogendijk, J., and Stouthamer, A. H. (1989) Isolation and Characterization of *Paracoccus-Denitrificans* Mutants with Increased Conjugation Frequencies and Pleiotropic Loss of a (Ngatcn) DNA-Modifying Property, *Archives of Microbiology* 152, 52-57.
185. Hanahan, D. (1985) *DNA Cloning*, Vol. 1, IRL Press.
186. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-491.
187. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Biotechnology* 24, 104-108.
188. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193, 265-275.
189. Schagger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal Biochem* 199, 223-231.
190. Crane, F. L., Barr, R., Donald, B. M., and Lemuel, D. W. (1971) [220] Determination of ubiquinones, in *Methods in Enzymology*, pp 137-165, Academic Press.
191. Kroger, A., Sidney, F., and Lester, P. (1978) [56] Determination of contents and redox states of ubiquinone and menaquinone, in *Methods in Enzymology*, pp 579-591, Academic Press.
192. Zaugg, W. S., and Rieske, J. S. (1962) The quantitative estimation of cytochrome b in sub-mitochondrial particles from beef heart, *Biochem Biophys Res Commun* 9, 213-217.
193. Chance, B. (1957) Techniques for the assay of the respiratory enzymes, *Methods Enzymol* 4, 273-329.
194. Berden, J. A., and Slater, E. C. (1970) The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain, *Biochim Biophys Acta* 216, 237-249.
195. Kleymann, G. (1994) in *MPI für Biophysik Frankfurt am Main*, Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt am Main.

Literaturverzeichnis

196. Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., and Michel, H. (1995) Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes, *Biotechnology (N Y)* 13, 155-160.
197. Stocker, A. (2007) Mutationsstudien im Bereich der Chinoloxidationsbindungsstelle des Cytochrome bc₁ Komplexes aus *Paracoccus denitrificans*, in *Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie*, p 179, Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
198. Kleinschroth, T., Anderka, O., Ritter, M., Stocker, A., Link, T. A., Ludwig, B., and Hellwig, P. (2008) Characterization of mutations in crucial residues around the Q(o) binding site of the cytochrome bc₁ complex from *Paracoccus denitrificans*, *FEBS J.*
199. Mayer, G., Anderka, O., Ludwig, B., and Schubert, D. (2002) The state of association of the cytochrome bc₁ complex from *Paracoccus denitrificans* in solutions of dodecyl maltoside, *Progr Colloid Polym Sci* 119, 77-83.
200. Kleinekofort, W., Pfenninger, A., Plomer, T., Griesinger, C., and Brutschy, B. (1996) Observation of Noncovalent Complexes Using Laser-induced Liquid Beam Ionization/Desorption., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 156, 195–202.
201. Morgner, N., Barth, H. D., and Brutschy, B. (2006) A New Way to Detect Noncovalently Bonded Complexes of Biomolecules from Liquid Micro-Droplets by Laser Mass Spectrometry, *Aust. J. Chem.* 59, 109-114.
202. Sobott, F., Schunk, S. A., Schüth, F., and Brutschy, B. (2006) Examination of Condensation Products of Group 4 Alkoxides with Laser-Induced liquid Beam Ionization/Desorption Mass Spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom* 18, 1429–1438.
203. Kleinekofort, W., Avdiev, J., and Brutschy, B. (1996) A New Method of Laser Desorption Mass Spectrometry for the Study of Biological Macromolecules., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 152, 135–142.
204. Kleinekofort, W., Schweitzer, M., Engels, J., and Brutschy, B. (1997) Analysis of Double-stranded Oligonucleotides by Laser-induced Liquid Beam Mass Spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 163, L1–L4.
205. Franck, E. U. D., R. . (1978) Dielectric Behaviour of Methanol and Related Polar Fluids at High Pressures and Temperatures., *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 66, 191–198.
206. Dessiaterik, Y., Nguyen, T., Baer, T., and Miller, R. E. (2003) IR Vaporization Mass Spectrometry of Aerosol Particles with Ionic Solutions: The Problem of Ion–Ion Recombination., *J. Phys. Chem. A* 107, 11245–11252.
207. Morgner, N., Kleinschroth, T., Barth, H. D., Ludwig, B., and Brutschy, B. (2007) A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex, *J Am Soc Mass Spectrom* 18, 1429-1438.
208. Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides, *Pest Manag Sci* 58, 859-867.

Literaturverzeichnis

209. di Rago, J. P., and Colson, A. M. (1988) Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 263, 12564-12570.
210. Mather, M. W., Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., Cooley, J. W., McIntosh, M. T., Daldal, F., and Vaidya, A. B. (2005) Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system, *J Biol Chem* 280, 27458-27465.
211. Kessler, J. J., Lange, B. B., Merbitz-Zahradnik, T., Zwicker, K., Hill, P., Meunier, B., Palsdottir, H., Hunte, C., Meshnick, S., and Trumppower, B. L. (2003) Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex, *J Biol Chem* 278, 31312-31318.
212. Vaidya, A. B., and Mather, M. W. (2005) A post-genomic view of the mitochondrion in malaria parasites, *Curr Top Microbiol Immunol* 295, 233-250.
213. Boveris, A. (1976) Mitochondrial production of hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*, *Acta Physiol Lat Am* 26, 303-309.
214. Boveris, A., Cadenas, E., and Stoppani, A. O. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem J* 156, 435-444.
215. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria, *Arch Biochem Biophys* 180, 248-257.
216. Drose, S., and Brandt, U. (2008) The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex, *J Biol Chem*.
217. John, P., and Whatley, F. R. (1975) *Paracoccus denitrificans*: a present-day bacterium resembling the hypothetical free-living ancestor of the mitochondrion, *Symp Soc Exp Biol*, 39-40.
218. Moller, J. V., and le Maire, M. (1993) Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins, *J Biol Chem* 268, 18659-18672.
219. Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., and Schagger, H. (2004) Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*, *J Biol Chem* 279, 5000-5007.
220. Tanford, C., and Reynolds, J. A. (1976) Characterization of membrane proteins in detergent solutions, *Biochim Biophys Acta* 457, 133-170.
221. Montoya, G., te Kaat, K., Rodgers, S., Nitschke, W., and Sinning, I. (1999) The cytochrome bc1 complex from *Rhodovulum sulfidophilum* is a dimer with six quinones per monomer and an additional 6-kDa component, *Eur J Biochem* 259, 709-718.
222. Sone, N., Kutoh, E., and Sato, K. (1990) A cytochrome o-type oxidase of the thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited conditions, *J Biochem* 107, 597-602.

Literaturverzeichnis

223. Hayashi, Y., Takagi, T., Maezawa, S., and Matsui, H. (1983) Molecular weights of alpha beta-protomeric and oligomeric units of soluble (Na⁺, K⁺)-ATPase determined by low-angle laser light scattering after high-performance gel chromatography, *Biochim Biophys Acta* 748, 153-167.
224. Fritz, M., Klyszejko, A. L., Morgner, N., Vonck, J., Brutschy, B., Muller, D. J., Meier, T., and Muller, V. (2008) An intermediate step in the evolution of ATPases: a hybrid F(0)-V(0) rotor in a bacterial Na(+) F(1)F(0) ATP synthase, *FEBS J* 275, 1999-2007.
225. Meier, T., Morgner, N., Matthies, D., Pogoryelov, D., Keis, S., Cook, G. M., Dimroth, P., and Brutschy, B. (2007) A tridecameric c ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase from the thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TA2.A1 facilitates ATP synthesis at low electrochemical proton potential, *Mol Microbiol* 65, 1181-1192.
226. Guergova-Kuras, M., Salcedo-Hernandez, R., Bechmann, G., Kuras, R., Gennis, R. B., and Crofts, A. R. (1999) Expression and one-step purification of a fully active polyhistidine-tagged cytochrome bc1 complex from *Rhodobacter sphaeroides*, *Protein Expr Purif* 15, 370-380.
227. Rocco, C. J., Dennison, K. L., Klenchin, V. A., Rayment, I., and Escalante-Semerena, J. C. (2008) Construction and use of new cloning vectors for the rapid isolation of recombinant proteins from *Escherichia coli*, *Plasmid* 59, 231-237.
228. Gloeckner, C. J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R., and Ueffing, M. (2007) A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes, *Proteomics* 7, 4228-4234.
229. Mulkidjanian, A. Y. (2005) Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting, *Biochim Biophys Acta* 1709, 5-34.

Literaturverzeichnis

7 Publikationen

Kleinschroth, T., Anderka, O., Ritter, M., Stocker, A., Link, T. A., Ludwig, B., and Hellwig, P. (2008) Characterization of mutations in crucial residues around the Q(o) binding site of the cytochrome *bc*(1) complex from *Paracoccus denitrificans*, FEBS J.

Morgner, N., Kleinschroth, T., Barth, H. D., Ludwig, B., and Brutschy, B. (2007) A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex, *J Am Soc Mass Spectrom* 18, 1429-1438.

Covian, R., Kleinschroth, T., Ludwig, B., and Trumpower, B. L. (2007) Asymmetric binding of stigmatellin to the dimeric *Paracoccus denitrificans* *bc*₁ complex: evidence for anti-cooperative ubiquinol oxidation and communication between center P ubiquinol oxidation sites, *J Biol Chem* 282, 22289-22297.

Publikationen

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| A | Adenin |
| abs. | absolut |
| AK | Antikörper |
| Amp | Ampicilin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Häm b_H | Hochpotential Häm b |
| Häm b_L | Tiefpotential Häm b |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| BCIP | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat |
| C | Cytosin |
| CIAP | <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> |
| Cyt b | Cytochrom b |
| Cyt c | Cytochrom c |
| Cyt c_1 | Cytochrom c_1 |
| dATP | desoxy-ATP |
| DDM | β -D-Dodecylmaltosid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dsDNA | Doppelstrang-DNA |
| EB | <i>Elution Buffer</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESR | Elektronenspinresonanz |
| FAD | reduziertes Flavinadenindinukleotid |
| FTIR | Fourier-tranformierte Infrarot (Spektroskopie) |
| G | Guanin |
| His | Histidin |
| IgG | Immunglobulin G |
| IR | Infrarot |
| ISP | <i>Iron-sulphur-Protein</i> |
| kbp, kb | Kilobasenpaar |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| kD | Kilodalton |
| Km | Kanamycin |
| KP _i | Kaliumphosphat |
| LB | Luria-Bertani |
| LILBID | <i>laser-induced liquid bead ion desorption</i> |
| μS | Mikrosiemens |
| mA | Milliampere |
| MES | 2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure |
| MMP | <i>mitochondrial matrix processing peptidase</i> |
| MPD | (+/-)-2-Methyl-2,4-pentandiol |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | Molekulargewicht |
| mV | Millivolt |
| NAD | Nicotinadenindinukleotid |
| NaP _i | Natriumphosphat |
| NBT | Nitroblautetrazolium |
| NCS | <i>New Born Calf Serum</i> |
| NEB | New England Biolabs |
| NMR | Kernspinresonanz |
| OD | optische Dichte |
| ORF | offener Leserahmen |
| <i>p.a</i> | <i>pro analysi</i> |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PDB | <i>Protein Data Base</i> |
| PNK | Polynucleotid Kinase |
| Q | Ubichinon |
| Rif | Rifampicin |
| RBS | Ribosomenbindestelle |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehung pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sm | Streptomycinsulfat |
| SOEing PCR | <i>Splicing by overlap extension PCR</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| ssDNA | Einzelstrang-DNA |
| SV | Säulenvolumen |
| T | Thymin |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TBS | Tris- <i>buffered saline</i> |
| TE | Tris-EDTA |
| TEG | Tris-EDTA-Glucose |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin |
| TMBZ | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TMH | Transmembranhelix |
| TMQH ₂ | Trimethylhydrochinon |
| TNM | Tris-Natriumchlorid-Magnesiumchlorid |
| TOF | <i>time of flight</i> |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UE | Untereinheiten |
| ÜNK | Über Nacht Kultur |
| UP | <i>Universal Primer</i> |
| UQ, QH ₂ | Ubi(hydro)chinon |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| w.t. | Wildtyp |

Abkürzungsverzeichnis

Eidstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thomas Kleinschroth, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Mörfelden-Walldorf

Thomas Kleinschroth

Eidstattliche Erklärung

Lebenslauf

Lebenslauf

Berufserfahrung

- 09/2003 – heute
Wissenschaftlicher Assistent / Promotion in Biochemie
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
Molekulare Genetik, Biochemie, Prof. Bernd Ludwig
Thema: Struktur-Funktionsanalyse eines bakteriellen Cytochrom *bc*₁ Komplex (Komplex III der Atmungskette)
Betreuung von Studenten und Diplomanden, Netzwerkadministration
- 03/1999 - heute
Nacht- und Wochenenddienst im Vertrieb des DRK Blutspendedienstes

Ausbildung

- 05/2003
Diplomarbeit in Biochemie; sehr gut
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
Molekulare Genetik, Biochemie, Prof. Bernd Ludwig
Thema: Modellierung einer Antikörperbindungstelle auf den Cytochrom *bc*₁ Komplex von *P. denitrificans* zur Kristallisation
- 10/1998 – 05/2003
Biochemiestudium
Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt am Main;
weitere Prüfungsfächer: Biophysikalische Chemie, Zellbiologie
- 1997-1998
Zivildienst DRK Blutspendedienst Frankfurt am Main
- 1988-1997
Gymnasium Schillerschule Frankfurt am Main, Abitur

Lebenslauf

Danksagung

Danksagung

Die Anfertigung dieser Arbeit war nur dank der Unterstützung vieler Seiten möglich.

Hierfür bedanke ich mich auf diesem Wege herzlich bei:

Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Überlassung des Themas, die stete Möglichkeit zur persönlichen Diskussion und Unterstützung, sowie die exzellente Betreuung.

Prof. Dr. Carola Hunte für die Möglichkeit, am Max-Planck Institut für Biophysik Frankfurt am Main die Kristallisationsexperimente durchzuführen, die Synchrotrontrips, die Diskussionsbereitschaft und die vielen Hilfestellungen und Tipps zur Kristallisation, sowie das zur Verfügung stellen des Fv-Fragments.

Prof. Dr. Petra Hellwig und Ruth Hielscher für die fruchtbare Zusammenarbeit und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Bernhard Brutschy und Nina Morgner für die produktive Zusammenarbeit.

Dr. Oliver Anderka für die Unterstützung, die Diskussionsbereitschaft und das Interesse, auch als er schon nicht mehr am Institut gearbeitet hat.

Hildur Palsdottir für die gelungene und sehr nette Zusammenarbeit während der Anfangsphase dieser Arbeit.

Freya Alena Bundschuh für die langen Jahre der sehr schönen Laborpartnerschaft.

Dr. Oliver Richter für die vielen anregenden Diskussionen und stete Hilfsbereitschaft basierend auf Unmengen an Wissen.

Andrea Herrmann für die Jahre der technischen Unterstützung, die Geduld mit mir und der Frage kannst du heute noch was für mich machen, sowie ihre aufmischende und erfrischende Art.

Hans-Werner Müller für die vielen guten Ratschläge auf dem Gebiet der Proteinbiochemie und die vielen „gifts“.

Sofia Hollschwandner für ihre technische Unterstützung und die Tipps für einen „Fremden“ im MPI für Biophysik.

Marc Böhm und Sebastian Richers für die nette Unterstützung am MPI für Biophysik und die Hilfestellung bei der Kristallisation

Danksagung

Maria Bracinha, Peter Greiner, Klaus Hoffmeier, Jule Janzon, Oliver Maneg, Daniela Maneg, Carolin Werner, Achim Hannappel für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die Möglichkeiten, die sie mir geboten haben, einschließlich der großartigen Unterstützung und Hilfe, nicht nur während meiner gesamten Ausbildung. Ohne Euch stände ich heute nicht an diesem Punkt.

Allen meinen Freunden und Bekannten danke ich für die Unterstützung, Geduld und notwendige Zerstreuung.

Ganz besonderer Dank gilt Michela Castellani nicht nur für die gute Zusammenarbeit und die Geduld mit mir, sondern vor allem für Ihre Liebe und das sie immer an mich geglaubt hat und für mich da war und so vieles mehr... .