



Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung

***Infrarotspektroskopische
Untersuchungen zum Mechanismus
der Cytochrom-c-Oxidase***

Dirk Heitbrink

***Infrarotspektroskopische
Untersuchungen zum Mechanismus
der Cytochrom-c-Oxidase***

Dirk Heitbrink

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3969
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung Jül-3969
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Infrarotspektroskopische Untersuchungen zum Mechanismus der Cytochrom-*c*-Oxidase

Die Cytochrom-*c*-Oxidase ist eine komplexe biologische Maschine, die einen elektrochemischen Gradienten über einer Membran aufbaut. Getrieben wird dieser Prozess durch die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Neben den vier Protonen, die durch die Membran gepumpt werden, müssen noch vier weitere Protonen für die Sauerstoffchemie aufgenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen der Struktur und den während des Funktionszyklus ablaufenden Prozessen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strategien verfolgt:

Mit der *vollreduzierten*, CO gebundenen Rinderherzoxidase konnte erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einer Zeitauflösung von 5 μ s Differenzspektren über den Bereich von 2200 bis 950 cm^{-1} aufzunehmen. Die Analyse der Daten ergibt, dass die transiente Bindung des fotolysierten CO an Cu_B sowie die Strukturänderung einer etwa 12 Å entfernten Aminosäure (E286) kinetisch gekoppelt sind. Diese Aminosäure ist Teil eines vorgeschlagenen Protonenkanals und spielt eine entscheidende Rolle beim Transport von Protonen ins Reaktionszentrum bzw. durch die Membran. Die Ergebnisse lassen auf einen Mechanismus schließen, der den Eintritt des Sauerstoffs unter Beteiligung der Aminosäure E286 kontrolliert.

Die Ergebnisse mit der *halbreduzierten*, CO gebundenen Cytochrom-*c*-Oxidase von *Rhodobacter sphaeroides* zeigen erstmals, dass der Elektronentransfer vom Häm a_3 zum Häm a an die Deprotonierung der oben schon beschriebenen Aminosäure E286 gekoppelt ist. Folglich ist nicht nur der K-Kanal am reduktiven Teil des Funktionszyklus beteiligt, sondern auch der D-Kanal, was gängigen Modellen der Literatur widerspricht.

Es konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Rekonstitution der bakteriellen Cytochrom-*c*-Oxidase in Proteoliposomen keinen Einfluss auf das Protein hat; somit konnte die *ATR-Technik* für weitere Experimente genutzt werden.

Die Auswertung von *Redox-Differenzspektren* des Wildtyps und der Mutanten, aufgenommen mit der ATR-Technik, ergeben die präzise Zuordnung eines Bandenmusters im Differenzspektrum. Dieses Signal kann eindeutig der Umgebungsänderung der Aminosäure E286 zugewiesen werden.

Zum ersten Mal konnte im IR ein *Intermediatspektrum* des oxidativen Teils des Funktionszyklus aufgenommen werden. Die Interpretation der Differenzspektren demonstriert, dass ein Tyrosin beim Übergang in den Zustand F involviert ist und deprotoniert vorliegt.

IR studies of cytochrome *c* oxidase

Cytochrome *c* oxidase is a complex biological machinery, which couples the reduction of oxygen to a vectorial transport of protons across the membrane. To achieve this, the protein takes up eight protons, four electrons, and an oxygen molecule. The electrons and four of the eight protons are used for the reduction of oxygen to produce water. The remaining four protons are pumped across the membrane.

In this work, Fourier-transform infrared spectroscopy was applied to provide insight into the structural and functional relationships of the complex catalytic cycle. To accomplish this, different strategies were applied:

The results obtained with the *fully reduced*, CO-bound cytochrome *c* oxidase from bovine heart showed for the first time the possibility of performing difference spectroscopy on this enzyme with a time-resolution of 5 μs in the range of 2200 to 950 cm^{-1} . The evaluation of the data revealed a dynamic link between the transient binding of CO to Cu_B and the movement of an amino acid side chain (E286) approximately 12 \AA away. This amino acid is part of the D-channel and thought to play an important role in guiding the protons either into the binuclear center or through the membrane. The results presented in this work suggest a mechanism in which oxygen binding is controlled via E286.

The outcome of the measurements with the *two electron-reduced*, CO-bound cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* indicate the deprotonation of E286 during electron transfer from heme a_3 to heme *a*. This result contradicts the current model of the catalytic-cycle because this deprotonation suggests an uptake of just one proton rather than two through the K-channel.

Redox difference spectra of wild type and mutant cytochrome *c* oxidase obtained with the attenuated total reflection technique pointed out the precise assignment of a band feature. This signal was clearly attributed to a conformational change of the side chain of amino acid E286.

For the first time it was possible to record a difference spectrum in the IR of the oxidative part of the catalytic cycle. The *F minus O* spectrum showed an involvement of a tyrosine which undergoes deprotonation.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Leben, Energie und Stoffwechsel	1
1.2	Atmungskette	1
1.3	Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	2
1.3.1	Struktur und Funktion	6
1.3.2	Transportwege	6
1.3.3	Modell des katalytischen Mechanismus	11
1.3.4	Aufgabenstellung	16
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Aufzucht der <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Bakterien	21
2.2	Reinigung der Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	21
2.3	Rekonstitution der Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase in Lipidvesikeln	23
2.4	Spektroskopische Methoden und Datenauswertung	30
2.4.1	Grundlagen der Schwingungsspektroskopie	30
2.4.2	Versuchsaufbau	30
2.4.3	Zeitaufgelöste Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie	33
2.4.4	Probenpräparation und -charakterisierung	37
2.4.5	Datenauswertung	40
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Blitzlichtfotolyse der vollreduzierten, CO gebundenen Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	52
3.1.1	Kinetik der vollreduzierten, CO gebundenen Rinderherzoxidase	53
3.1.2	Kinetik der vollreduzierten, CO gebundenen CcO von <i>R. sphaeroides</i> und Vergleich mit der Rinderherzoxidase	59
3.2	Blitzlichtfotolyse der halbreduzierten Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase von <i>R. sphaeroides</i> in Transmission	52
3.2.1	Wildtyp	62
3.2.2	Vergleich der vollreduzierten und der halbreduzierten Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	64
3.2.3	Vergleich der halbreduzierten CcO des WT mit Mutanten	67
3.2.4	pH-Abhängigkeit	70

3.3	Charakterisierung und Funktionalitätstest der rekonstituierten Cytochrom-c-Oxidase	62
3.3.1	UV/Vis-Spektroskopie	72
3.3.2	IR-Messungen	74
3.4	ATR Differenzspektroskopie	72
3.4.1	Zuordnung der Carbonylschwingung	78
3.4.2	pH-induzierte Differenzspektroskopie	80
3.4.3	pH-Abhängigkeit der redox-induzierten Differenzspektren	82
3.4.4	Intermediatspektren	83
4	DISKUSSION	92
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	ANHANG	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	104

1 Einleitung

1.1 Leben, Energie und Stoffwechsel

Lebende Organismen wandeln kontinuierlich Energie u. a. für Prozesse wie Bewegung, Biosynthese, aktiven Transport und Temperaturkontrolle um. Im Laufe der Evolution hat sich nicht nur eine riesige Anzahl unterschiedlicher Organismen entwickelt, sondern auch die Nutzung unterschiedlicher Energiequellen weit verbreitet. Wärme scheidet als Energiequelle aus, da man zur Leistung von Arbeit einen Temperaturgradienten benötigt. Die direkte Nutzung von Lichtenergie ist ebenfalls nicht möglich, da die Lebenszeit z. B. eines angeregten Chlorophylls mit 10^{-10} s erheblich kürzer ist als die Reaktionen biologischer Prozesse. Pflanzen, Algen und Cyanobakterien sind aber in der Lage, durch Photosynthese die Energie der absorbierten Photonen in chemische Energie umzuwandeln. Während dieser Reaktion werden Elektronen von einem Wassermolekül durch die Absorption von Licht über Photosystem (PS) II und PS I auf Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) übertragen. Das Ergebnis ist ein Molekül mit einem stark negativen Reduktionspotential. Die Energie dieser Reduktionsäquivalente kann über weitere Reaktionsschritte zum Aufbau von reduzierten, organischen Verbindungen, wie z. B. Fett oder Kohlenhydrat, genutzt werden. Diese Produkte haben den Vorteil, dass durch Oxidation die gespeicherte Energie jederzeit wieder nutzbar gemacht werden kann und dass im Vergleich zu einem angeregten Chlorophyll die Lebenszeit mit bis zu 10^8 s 18 Größenordnungen länger ist (Harris, 1995).

Durch die Oxidation von einem Mol Glukose werden ungefähr 2800 kJ freigesetzt. Da biologische Reaktionen, wie z. B. die Bildung einer Peptidbindung (25 kJ/mol), erheblich kleinere Energieportionen benötigen, wäre die direkte Kopplung einer solchen Reaktion an die Oxidation von Glukose unwirtschaftlich. Aus diesem Grund gibt es Moleküle mit geringerer freier Energie wie NADH (200 kJ/mol), FADH_2 (140 kJ/mol) und Adenosintriphosphat (ATP) (55 kJ/mol), die bei der Oxidation von Glukose gebildet werden. Bei der Glykolyse werden zwei ATP und beim Durchlaufen des Citratzyklus weitere zwei GTP gebildet. ATP gilt als sogenannte *universelle Energiewährung* in der Zelle. Durch die oxidative Phosphorylierung kann man bis zu 32 weitere ATP gewinnen. Hierbei werden die Elektronen der Reduktionsäquivalente in die Atmungskette (siehe nächstes Kapitel) eingeschleust und durch eine Reihe von Elektronen-Überträgern auf Sauerstoff übertragen. Die dadurch frei werdende Energie

wird zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über eine Membran genutzt und kann durch die ATP-Synthase zur Produktion von ATP verwendet werden.

Die primäre Energiequelle allen Lebens ist somit die Sonne. Diese Energiequelle direkt nutzen können allerdings nur *autotrophe* („sich selbst ernährende“) Organismen. Sie sind in der Lage, die Sonnenenergie durch Photosynthese in chemische Energie umzuwandeln und diese durch „Atmung“ zu verwerten. Im Gegensatz dazu sind *heterotrophe* („sich fremd ernährende“) Organismen auf die Zufuhr von fett- oder kohlenhydratreicher Nahrung angewiesen, die sie dann ebenfalls durch „Atmung“ verbrauchen.

Vergleicht man die Photosynthese und die Atmungskette, so erkennt man auf molekularer Ebene viele Gemeinsamkeiten. Beispielsweise dient in beiden Reaktionen membranständiges Quinon als Elektronen-Überträger. Bei der Photosynthese leitet Plastoquinon die Elektronen vom Photosystem II auf Photosystem I weiter. Im Gegensatz dazu ist in der Atmungskette Ubiquinon für den Weitertransport der Elektronen vom Komplex I und II auf Komplex III verantwortlich. Ein Beispiel für die Ähnlichkeit beider Reaktionsketten liegt in der jeweiligen Schlüsselreaktion. Vergleicht man zum einen die Bildung von Wasser im binuklearen Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase und zum anderen die Bildung von Sauerstoff im Mangancluster des Photosystems II, so sieht man bis hin zur Beteiligung einzelner Aminosäuren (z. B. eines Tyrosins) im Funktionszyklus große Übereinstimmungen (Hoganson et al., 1998).

1.2 Atmungskette

Die Atmungskette besteht aus einer Reihe von *Elektronen-Überträgern*, die bei eukaryotischen Zellen in der inneren Membran der Mitochondrien und bei prokaryotischen Zellen in der Zellmembran lokalisiert sind. Die Aufgabe der einzelnen Komplexe ist es, Elektronen schrittweise auf Sauerstoff zu übertragen und die dabei frei werdende Energie in einen elektrochemischen Protonengradienten umzuwandeln.

Der erste Schritt in dieser Transportkette ist der Elektronentransfer von NADH auf einen hydrophoben und damit membranständigen Ubiquinonpool (Q). Diese Reaktion wird katalysiert durch die NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I oder NADH-Dehydrogenase). Hierbei handelt es sich um einen L-förmigen Proteinkomplex (Friedrich et al., 1998) mit einem Molekulargewicht von 530 kDa für den bakteriellen Komplex und bis zu 1 MDa für den mitochondrialen Komplex. Das Protein unterteilt

sich in zwei Bereiche: Einen hydrophoben, in der Membran liegenden und einen hydrophilen, aus der Membran ragenden Arm. Der Elektronentransport von NADH auf Ubiquinon verläuft wahrscheinlich über bis zu neun Eisen-Schwefel-Zentren und einem Flavinmononukleotid (FMN), welche alle im hydrophilen Teil des Komplexes lokalisiert sind. Der hydrophobe Arm des Proteins ist sehr wahrscheinlich an der Übertragung der Elektronen auf Ubiquinon und dem damit gekoppelten Protonentransfer beteiligt was durch die Entdeckung einer in diesem Bereich lokalisierten Eisen-Schwefel-Gruppe bestärkt wird (Friedrich et al., 2000). Neben dieser Dehydrogenase speziell für NADH existieren noch weitere Dehydrogenasen für z. B. Succinat (Komplex II oder Succinat:Ubiquinon Oxidoreduktase) oder Glycerol-3-Phosphat.

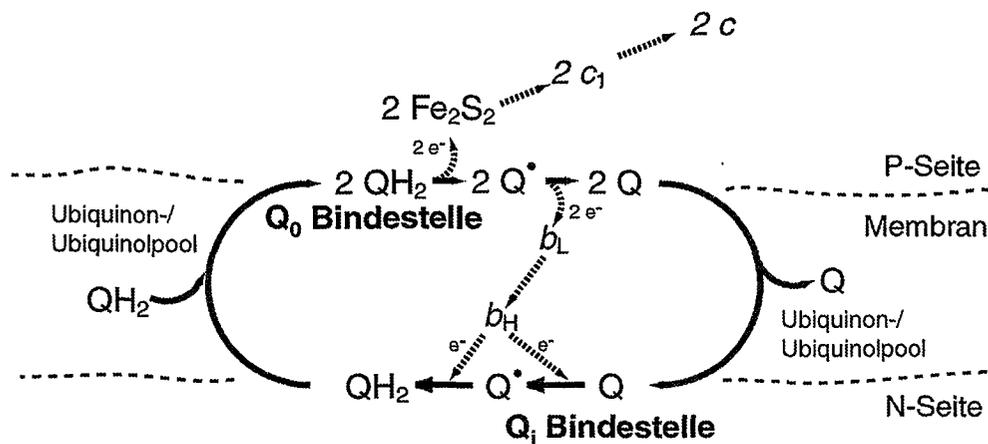


Abbildung 1.2-1 Schematische Darstellung des Q-Zyklus vom bc_1 -Komplex. Gestrichelte Pfeile verdeutlichen den Elektronentransport. Q: Ubiquinon; Q[•]: Ubisemiquinon; QH₂: Ubiquinol; b_H: Häm b_H; b_L: Häm b_L. Die hydrophoben Ubiquinon/Ubiquinol Moleküle bilden in der Membran einen Pool, der frei diffundieren kann. *P-Seite*: Die durch den Protonentransport über die Membran positiv geladene (Protonenabgabe) Seite. *N-Seite*: Die durch den Protonentransport über die Membran negativ geladene Seite (Protonenaufnahme).

Vom reduzierten Ubiquinol (QH₂) werden die Elektronen über die Cytochrom-Reduktase (Komplex III, Ubiquinol-Cytochrom-*c*-Reduktase oder bc_1 -Komplex) auf das wasserlösliche Cytochrom-*c* übertragen. Die Oxidation des QH₂ findet an der sogenannten Q₀ Bindungsstelle statt. Der Weg der beiden übertragenen Elektronen verzweigt sich hier: Eines der beiden Elektronen wird über ein Eisen-Schwefel-Zentrum (Fe₂-S₂) auf Cytochrom-*c* übertragen. Das zweite Elektron wird über Cytochrom-b_L und Cytochrom-b_H zu einer Ubiquinon Bindungsstelle (Q_i) transportiert, um dort Ubiquinon zu Semiquinon zu reduzieren. Durch die Oxidation eines zweiten

Ubiquinols an der Bindungsstelle Q_0 wird ein weiteres Cytochrom-*c* reduziert und die Reduktion des Semiquinon zu Ubiquinon vervollständigt. Gekoppelt an diese als Q-Zyklus bekannte Reaktion ist der Transport von Protonen, der zur Bildung des elektrochemischen Protonengradienten beiträgt (siehe (Hunte, 2001) und die darin enthaltenen Zitate). Vom reduzierten Cytochrom-*c* werden die Elektronen schrittweise über das letzte Enzym der Atmungskette, die Cytochrom-*c*-Oxidase (CcO), auf molekularen Sauerstoff übertragen – den letzten Akzeptor. Der Funktionsmechanismus dieses Enzymkomplexes ist Gegenstand dieser Arbeit und wird deshalb detailliert im nachfolgenden Kapitel vorgestellt.

Die Spannweite der ablaufenden Redoxreaktionen umfasst etwa 1,14 V ($\Delta E_0'$), was -220 kJ/mol ($\Delta G_0'$) entspricht. Zum Aufbau des elektrochemischen Gradienten werden die Protonen aus der Matrix der Mitochondrien bzw. dem Cytosol der Bakterien über die Membran in den Intermembranraum bzw. das Periplasma gepumpt. Dieser Ionengradient kann z. B. mittels der ATP-Synthase zur Bildung von ATP (siehe Abbildung 1.2-2), zu aktiven Transportprozessen oder zur Geißelrotation bei Bakterien genutzt werden.

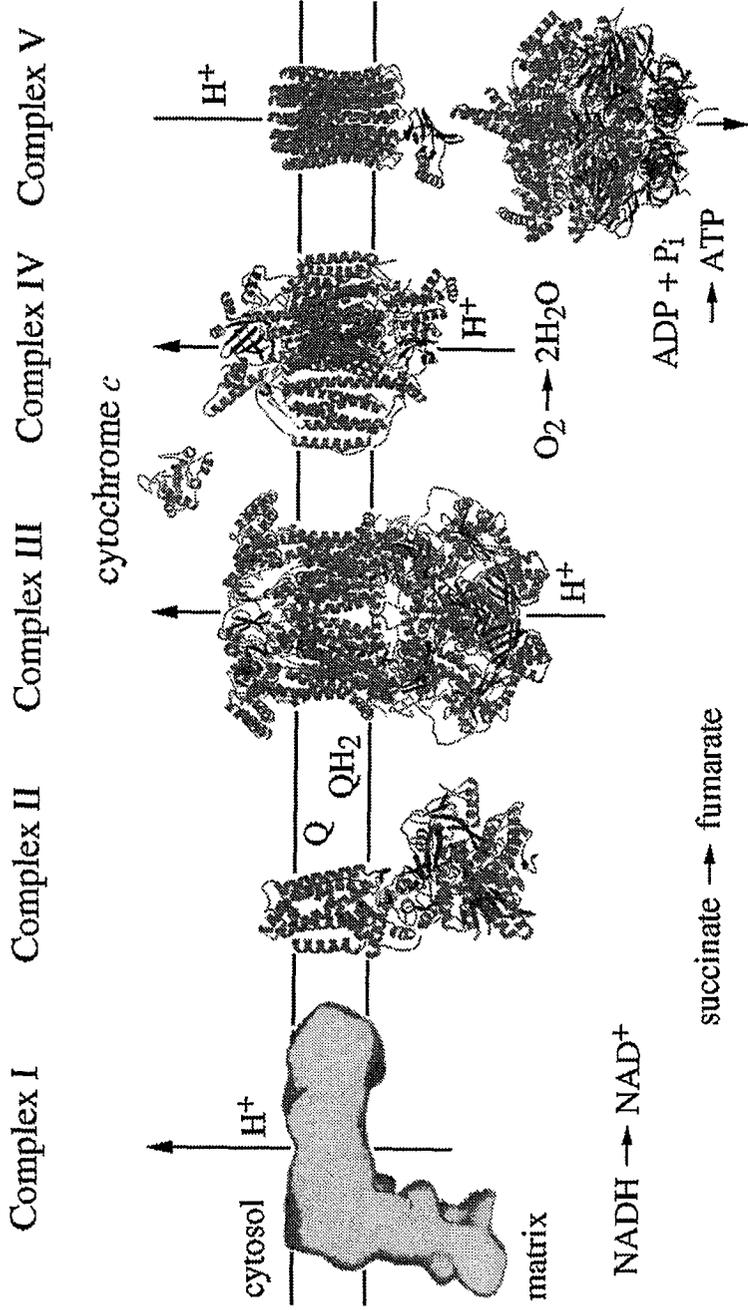


Abbildung 1.2-2 Schematischer Aufbau der Atmungskette anhand von Kristallstrukturen der beteiligten Enzyme (ausgenommen Komplex I). Neben Komplexen I bis IV und Cytochrom-c, die die Atmungskette bilden, ist noch die Struktur der ATP-Synthase (Komplex V) dargestellt. Diese Abbildung wurde entnommen aus: (Schultz and Chan, 2001).

1.3 Cytochrom-*c*-Oxidase

1.3.1 Struktur und Funktion

In den vergangenen Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, die Kristallstruktur verschiedener Cytochrom-*c*-Oxidase zu bestimmen. 1995 wurden die ersten Kristallstrukturen vom Typ aa_3 ¹ gelöst. Veröffentlicht wurden die Strukturen der Rinderherzoxidase (Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al., 1996) sowie der bakteriellen CcO von *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995) mit einer Auflösung von 2,8 Å. Im Anschluss daran publizierte Yoshikawa die Strukturen der oxidierten, der reduzierten, der CO gebundenen sowie der N₃ gebundenen Form der Rinderherzoxidase (Yoshikawa et al., 1998). Die kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen der ba_3 Oxidase (Soulimane et al., 2000) von *Thermus thermophilus* und aa_3 Oxidase von *R. sphaeroides* (Svensson-Ek et al., eingereicht) vervollständigen das bisher bekannte Bild.

¹ Beide Hämgruppen sind vom Type Häm a (siehe Abbildung 1.3-2).

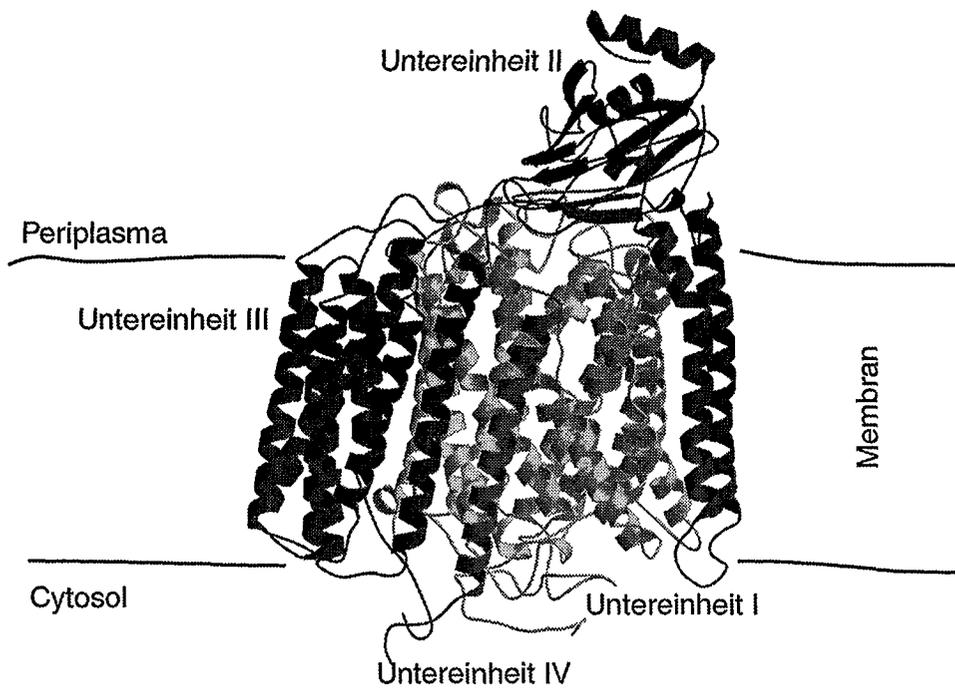


Abbildung 1.3-1 Kristallstruktur der CcO von *R. sphaeroides* (Svensson-Ek *et al.*). Dargestellt sind schematisch das Proteinrückgrat ohne die Seitengruppen. Unterschieden wird zwischen den Sekundärstrukturelementen: α -Helix, β -Faltblatt und Zufallsknäuel. Es sind alle vier UE der CcO zu erkennen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der beiden aa_3 Oxidasen des Bakteriums *R. sphaeroides* und des Rinderherzens. Namensgebend für diese Gruppe ist die Struktur der Hämgruppen. In der folgenden Abbildung ist die Struktur eines Häm a dargestellt.

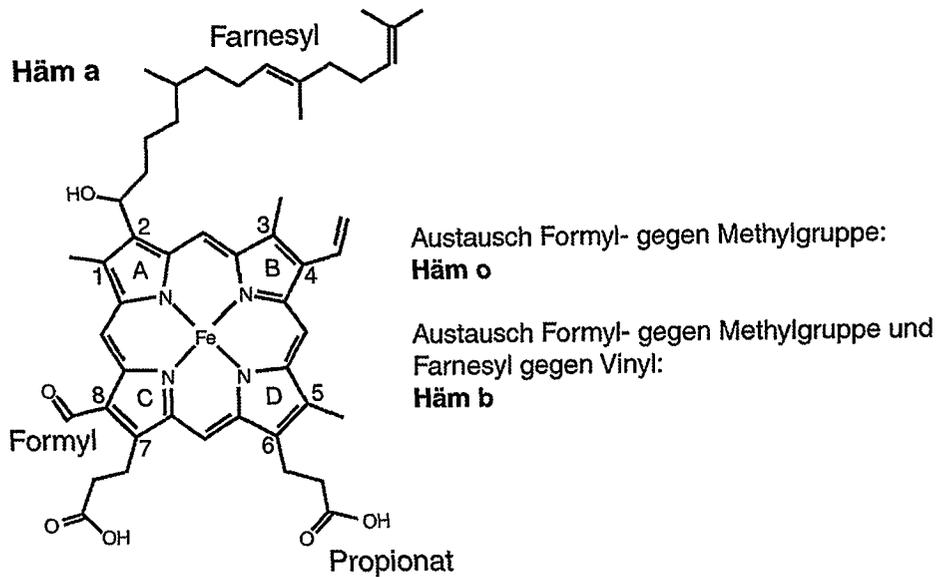


Abbildung 1.3-2 Chemische Struktur des Häm a.

Strukturüberblick

Die bakterielle CcO besteht aus 4 UE und hat ein Molekulargewicht von 127 kDa. Die Rinderherzoxidase hat im Gegensatz dazu 13 UE, von denen 3 mitochondrial und 10 im Kern kodiert sind, und ein Molekulargewicht von 220 kDa. Die UE I bis III der bakteriellen CcO und der Rinderherzoxidase zeigen eine sehr hohe Sequenzhomologie von etwa 50 % (Hosler et al., 1992). Darüber hinaus ist ein Großteil derjenigen Aminosäuren (AS) in beiden CcO identisch, die eine Rolle beim Protonenpumpen, Elektronentransfer oder bei der Ligandenbindung spielen bzw. als wichtig für die Funktion vorgeschlagen sind. Vier aktive Redoxzentren sind im Protein lokalisiert worden: Häm a, Häm a₃, Cu_B and Cu_A. Alle Kofaktoren können unter physiologischen Bedingungen in zwei unterschiedlichen Oxidationsstufen vorliegen, d. h. sie können jeweils ein Elektron aufnehmen oder abgeben².

Untereinheit I besteht aus 12 transmembranen α -Helizes, die etwa senkrecht zur Membran liegen. Von oben betrachtet erkennt man, dass sie in drei Gruppen zu je 4

² In der Literatur wird u. a. diskutiert, dass Häm a₃ während des Funktionszyklus bis zu drei Elektronen auf Sauerstoff überträgt und damit seine Oxidationsstufe von +II nach +V ändert (Ogura et al., 1996). Darüber hinaus wird beschrieben, dass möglicherweise Cu_B zwei Elektronen bei der Sauerstoffspaltung überträgt (Fabian and Palmer, 1995).

Helizes angeordnet sind. Jede der vier Gruppen bildet einen Halbkreis; dadurch wird der Eindruck einer Spirale erweckt (siehe Abb. 1.3-3). Die Redoxzentren Häm a, Häm a₃ und Cu_B sind alle in UE I lokalisiert und liegen tief eingebettet in der Membran etwa 13 Å entfernt vom Periplasma. Häm a wird durch zwei axiale Histidin-Liganden (*low-spin* Häm) und im Gegensatz dazu Häm a₃ nur von einem axialen Histidin-Liganden gebunden (*high-spin* Häm). Die Ebene beider Häm-Gruppen stehen in etwa senkrecht aufeinander, wie in Abbildung 1.3-3 gut zu erkennen ist. Der Abstand der beiden komplexierten Eisenatome ist 13,5 Å, zwischen den Enden der beiden Häm Gruppen liegen etwa 5 Å. Zusammen mit dem etwa 4,5 Å entfernten Cu_B, welches durch drei Histidin-Liganden gebunden ist, bildet Häm a₃ das binukleare Zentrum (bZ).

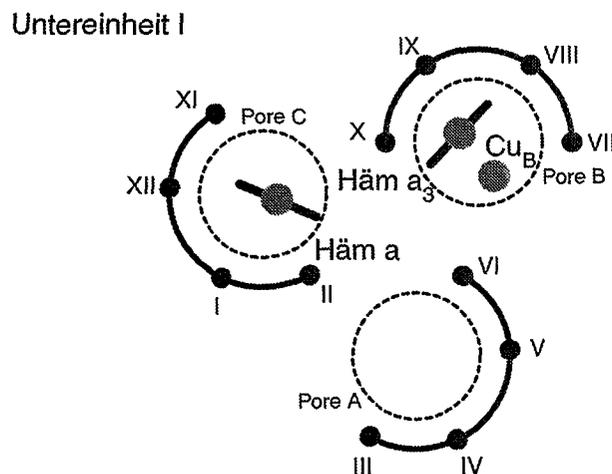


Abbildung 1.3-3 Schematische Darstellung der UE I sowie der Redoxzentren Häm a, Häm a₃ und Cu_B. Angelehnt an: (Iwata, 1998).

Untereinheit II besteht aus zwei transmembranen α -Helizes, die als Membranankern dienen, und einer wasserlöslichen Domäne, die aus 10 β -Faltblättern besteht. Diese Domäne liegt oberhalb der UE I und beinhaltet das Redoxzentrum Cu_A. Untersuchungen haben ergeben, dass es sich hierbei um ein zweikerniges Cu-Cu Zentrum handelt, das sich im oxidierten Zustand ein ungepaartes Elektron teilt, was rein formal zu der ungewöhnlichen Oxidationsstufe von + 1,5 führt (Antholine et al., 1992; Karpefors et al., 1996).

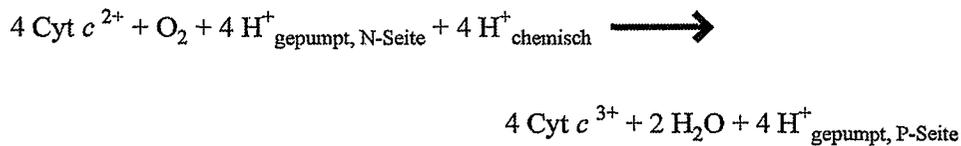
Untereinheit III besteht aus sieben transmembranen α -Helizes, die in zwei Gruppen zu zwei bzw. fünf Helizes aufgebaut sind. Zwischen den beiden Gruppen erkennt man eine V-förmige Lücke, die bei der bakteriellen CcO mit zwei und bei der Rinderherzoxidase mit drei Phospholipiden gefüllt ist. Versuche haben gezeigt, dass die bakterielle CcO auch ohne die UE III und IV ihre volle Funktionsfähigkeit erlangt (Bratton et al., 1999). Die Stabilität des Proteins scheint allerdings verändert, da die modifizierte CcO schneller ihre Funktionsfähigkeit verliert als die unveränderte CcO. Die Schlussfolgerung aus diesem Versuch ist, dass die UE III u. a. die Stabilität des bZ erhöht.

Untereinheit IV besteht aus nur einer transmembranen α -Helix. Diese beinhaltet eine ATP-Bindestelle (Bisson et al., 1987), die möglicherweise regulatorische Funktionen übernimmt. Eine vergleichbare UE wurde auch bei der bakteriellen CcO von *Paracoccus denitrificans* gefunden.

Untereinheiten IV bis XIII in der Rinderherzoxidase haben ebenfalls regulatorische Funktionen (siehe (Kadenbach et al., 2000) und die darin enthaltenen Zitate) und dienen darüber hinaus vermutlich der Stabilisierung.

Funktion

Die Cytochrom-*c*-Oxidase katalysiert den Transfer von Elektronen des reduzierten Cytochrom-*c* zum Sauerstoff. Hierbei handelt es sich um den letzten Schritt der Atmungskette, wobei der Elektronendonator Cytochrom-*c* oxidiert und der Elektronenakzeptor Sauerstoff reduziert wird. Zu diesem Zweck werden vier Protonen aus der Matrix bzw. dem Cytosol aufgenommen. Da diese Protonen bei der Sauerstoffchemie verwendet werden, bezeichnet man sie als chemische Protonen (oder auch Substrat-Protonen). Zusätzlich werden noch vier weitere Protonen aus der Matrix bzw. dem Cytosol aufgenommen und durch das Protein auf die andere Seite der Membran gepumpt. Diese Protonen nennt man gepumpte oder vektorielle Protonen. Die Gesamtreaktion lautet:



Die Reaktion führt zur Bildung eines elektrochemischen Gradienten über der Membran. Durch den vektoriellen Transport der Protonen entsteht eine positive und saure Außenseite (Periplasma bzw. Intermembranraum), die im weiteren Verlauf P-Seite genannt wird, und eine negative und basische Innenseite (Cytosol bzw. Matrix), die N-Seite.

Die CcO gehört zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Calhoun et al., 1994). Kennzeichnend für diese Familie sind zwei Merkmale: hohe Sequenzhomologie der UE I und das sogenannte binukleare Zentrum (bZ) als Ort der Sauerstoffchemie. Eine weitere Unterteilung erfolgt anhand der Substratspezifität. Mitochondriale und einige bakterielle Oxidasen nutzen wasserlösliches Cytochrom-*c* als Elektronendonator und gehören somit zur Gruppe der Cytochrom-*c*-Oxidasen. Im Gegensatz dazu verwenden einige Bakterien membranständiges Quinol als Elektronenquelle und werden somit als Quinol-Oxidasen bezeichnet.

1.3.2 Transportwege

Der Ort der Sauerstoffchemie – das bZ – liegt tief eingebettet in der Membran, etwa auf halbem Weg zwischen Cytosol und Periplasma bei der bakteriellen CcO bzw. zwischen Matrix und Intermembranraum bei der Rinderherzoxidase. Alle Edukte der im bZ ablaufenden Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser müssen zu diesem Ort gelangen. Neben dem Sauerstoff selber werden noch Elektronen und Protonen durch das Protein zu diesem Ort gebracht. Darüber hinaus müssen Protonen von der N-Seite auf die P-Seite transportiert werden. All diese Transportprozesse müssen auf festgelegten Bahnen ablaufen, da andernfalls eine Kontrolle der Reaktionen nicht möglich wäre.

Elektronentransport

Die vier Elektronen, die man zur Reduktion des Sauerstoffs benötigt, werden schrittweise von vier reduzierten Cytochrom-*c* Molekülen auf die CcO übertragen. Der erste Elektronenakzeptor ist das zweikernige Cu_A-Cu_A Zentrum. Von hier aus werden die

Elektronen zum Häm a übertragen (Hill, 1991), welches ~ 20 Å (unteres Cu zum Fe des Häm a) entfernt ist (Iwata et al., 1995). Es stellt sich die Frage, warum der Elektronentransfer zum Häm a im Vergleich zum Häm a₃ erheblich schneller ist, obwohl der Abstand zwischen Häm a₃ und Cu_A-Cu_A Zentrum nur um etwa 3 Å größer ist als der zum Häm a. Untersuchungen wurden durchgeführt, um den effektivsten Weg zwischen Cu_A und Häm a zu finden und damit die Unterschiede zwischen den Elektronentransferkinetiken zu erklären (Brunori et al., 1997). Auf der anderen Seite führten Untersuchungen an Proteinen, die einen Elektronentransferprozess beinhalten und deren Struktur bekannt ist, zu folgendem Ergebnis: Für den Fall, dass der kürzeste Abstand zwischen den Redoxzentren kleiner als 14 Å ist, so ist die Geschwindigkeit des Elektronentransfers unabhängig vom Weg und erheblich schneller als typische Katalysegeschwindigkeiten (Page et al., 1999). Der kürzeste Abstand zwischen Cu_A und Häm a liegt bei ~ 13 Å und somit unterhalb der beschriebenen Grenze. Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Elektronentransferraten bietet die Beobachtung, dass bei der Reduktion von Häm a₃ ein Proton aus der Lösung aufgenommen wird (Verkhovskiy et al., 1995), wohingegen die Reduktion von Häm a zwar auch, aber nicht im gleichen Maße an eine Protonenaufnahme gekoppelt ist (Mitchell and Rich, 1994). Die Kopplung von Protonentransfer und Elektronentransfer könnte somit eine mögliche Erklärung dafür sein, dass unterschiedliche Wege bevorzugt werden. Der letzte Schritt des Elektronentransfers ist die Übertragung des Elektrons vom Häm a zum bZ.

Sauerstofftransport

Die Löslichkeit von Sauerstoff in organischen Lösungsmitteln ist um ein Vielfaches größer als in Wasser (z.B. um ein Faktor 4 in Alkohol (Merck Index, 1989)). Drei Kanäle mit hydrophobem Charakter, welche in der Membran beginnen, wurden anhand der Strukturdaten vorgeschlagen (Tsukihara et al., 1996). Einer dieser Kanäle beginnt in der oben beschriebenen Lücke der UE III, wo in der Struktur endogene Lipide beobachtet wurden, und führt direkt zum bZ. Dieser Kanal ist zwar länger als die beiden anderen beschriebenen, hat aber den Vorteil eines eingebauten Sauerstoffreservoirs. Mutationsstudien, die zielgerichtet diesen Kanal blockieren, unterstützen die Hypothese, dass es sich hierbei um den Eintrittskanal des Sauerstoffs handelt (Riistama et al., 2000; Riistama et al., 1996).

Die Tatsache, dass es eine Vielzahl von vorgeschlagenen Sauerstoffkanälen gibt, lässt den Schluss zu, dass möglicherweise auch mehrere Kanäle vorhanden sind. Weil der Sauerstoff in der Membran im Überschuss vorliegt und somit nicht ratenlimitierend

für die katalysierte Reaktion ist, stand die Ausbildung eines hochspezialisierten Sauerstoffkanals unter Umständen nicht unter einem hohen Selektionsdruck.

Protonentransport

Während der Reduktion des Sauerstoffs werden vier Protonen benötigt. Da der Ort der Sauerstoffchemie etwa 30 Å entfernt von der N-Seite liegt, muss im Protein mindestens ein Kanal vorhanden sein, durch den Protonen gelangen können. Charakteristisch für solche Kanäle sind polare AS, Wassermoleküle und Wasserstoffbrückenbindungen, entlang derer sich ein Proton zum Ort der Sauerstoffreduktion bewegen kann. Darüber hinaus müssen noch vier weitere Protonen von der N-Seite aufgenommen und durch das Protein transportiert werden. Anhand von Mutationsexperimenten postulierte man zwei Kanäle (Fetter et al., 1996; Fetter et al., 1995; Hosler et al., 1993; Thomas et al., 1993), welche später durch die Kristallstrukturen ergänzt und bestätigt wurden: den D-Kanal und den K-Kanal. Experimente haben gezeigt, dass beide Kanäle während des Funktionszyklus zur Protonenaufnahme genutzt werden. Mögliche Protonenaustrittskanäle werden in der Literatur diskutiert, sind aber bis heute nicht identifiziert (Hofacker and Schulten, 1998; Morgan et al., 1994; Tsukihara et al., 1996).

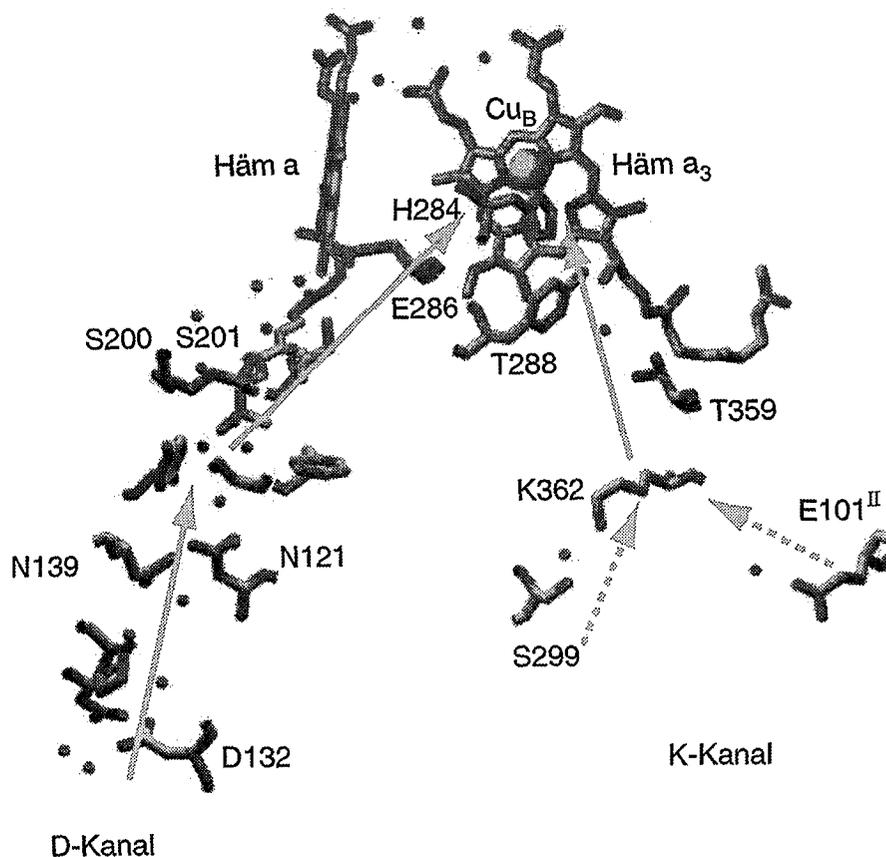


Abbildung 1.3-4 Darstellung der zwei identifizierten Protonenkanäle der CcO von *R. sphaeroides* (Svensson-Ek et al., eingereicht). Zu erkennen sind neben den wichtigen AS der jeweiligen Kanäle die in der Kristallstruktur gefundenen Wassermoleküle (kleine Kreise).

D-Kanal

Dieser Kanal beginnt mit einem Aspartat (D132)³, lokalisiert in UE I, das als möglicher Eintrittspunkt der Protonen gilt und dem Kanal seinen Namen gibt. Über zwei Asparagine (N139 und N121) und zwei Serine (S201 und S200) führt der Kanal zu einer Glutaminsäure (E286). Zwischen den AS liegt eine Kette von hochgeordneten Wassermolekülen. Der Abstand vom E286 zum bZ beträgt etwa 10 Å, und es ist nicht offensichtlich, wie Protonen diese Barriere überwinden können. Da es sich bei dieser

³ D132 bedeutet, dass es sich hierbei um eine Aspartat mit der Nummer 132 handelt und dass diese AS auf der UE I liegt. Die Nummerierung erfolgt in allen Fällen nach der *R. sphaeroides* Nummerierung. Für den seltenen Fall, dass eine im Text genannte AS nicht in der UE I lokalisiert ist, wird die Nummer der UE durch eine hochgestellte, römische Ziffer veranschaulicht.

Barriere um eine hydrophobe Tasche handelt, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass mehrere ungeordnete und somit für die Röntgen-Kristallografie unsichtbare Wassermoleküle vorhanden sind (Riistama et al., 1997). Da dieser Kanal sowohl für gepumpte als auch für chemische Protonen genutzt wird (Konstantinov et al., 1997), muss es einen Schalter geben, der unterscheidet, ob ein Proton zur P-Seite gepumpt werden soll oder bei der Reduktion von Sauerstoff eingesetzt wird. Dieses Element ist möglicherweise E286.

K-Kanal

Mögliche Eingänge zu diesem Kanal sind entweder ein Serin (S299) oder eine Glutaminsäure (E101^H), die auf der UE II lokalisiert ist. Der Kanal führt weiter über ein Lysin (K362), das diesem Kanal den Namen gibt. Zwischen S299 und K362 erkennt man ein verbindendes Wassermolekül in der Struktur. Die Entfernung zur nächsten AS, einem Threonin (T359), ist etwa 9 Å. Man erkennt in der Struktur keine Wassermoleküle zwischen diesen beiden AS. Molekulardynamik-Rechnungen haben gezeigt, dass das K362 allerdings so flexibel ist, dass es diese Lücke überbrücken kann (Hofacker and Schulten, 1998). Der nächste Schritt erfolgt wieder über ein Wassermolekül zum Hydroxylrest der Farnesylseitenkette des Häm a₃. Das letzte Glied in dieser Kette ist ein Tyrosin (Y288), welches in der Nähe eines der Cu_B-Liganden liegt (H284). In der Struktur der Rinderherzoxidase (Yoshikawa et al., 1998) und der bakteriellen Oxidase von *Paracoccus denitrificans* (Ostermeier et al., 1997) gehen dieses Histidin und Tyrosin eine ungewöhnliche kovalente Bindung ein, welche allerdings in der CcO von *R. sphaeroides* nicht zu beobachten ist (Svensson-Ek, eingereicht).

Protonen-/Wasseraustritt

Das während der Reduktion gebildete Wasser und die gepumpten Protonen benötigen einen Ausgang. Die Propionsäurereste der Hämgruppen, die am Pumpvorgang beteiligt sein sollen (Puustinen and Wikström, 1999), bilden mit Hilfe einiger Arginine, dem Mg²⁺ und einiger Wassermoleküle ein Wasserstoffbrückennetzwerk, das bis zur P-Seite reicht. Dieses könnte eine Möglichkeit sein, das gebildete Wasser und die zu pumpenden Protonen abzugeben. Bis heute ist allerdings noch kein Kanal identifiziert worden.

1.3.3 Modell des katalytischen Mechanismus

Die Reaktionsgeschwindigkeit der von CcO katalysierten Reduktion von Sauerstoff zu Wasser wird durch den Elektronen- und Protonentransfer kontrolliert. Diese Kontrolle führt dazu, dass einige charakteristische Reaktionsschritte zeitlich getrennt voneinander beobachtet werden können. Diese Zwischenzustände bezeichnet man auch als Intermediate, die in der Summe den Reaktionszyklus beschreiben.

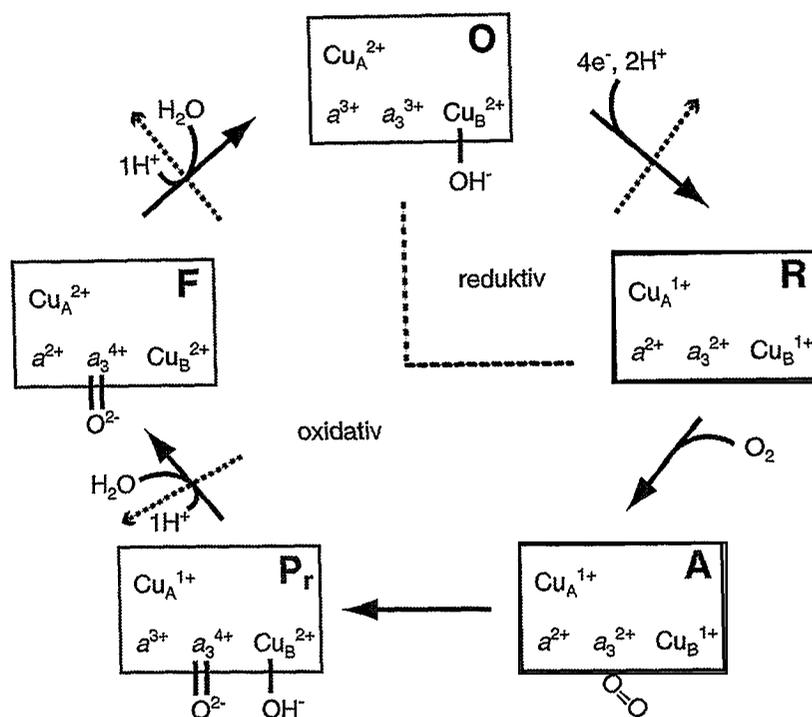


Abbildung 1.3-5 Schematische Darstellung des Funktionszyklus der CcO ausgehend vom vollreduzierten Zustand **R** (4 Elektronen). Die gestrichelten Pfeile geben mögliche Pumpschritte an (Sigurdson, 2001).

Der Reaktionszyklus lässt sich grob in zwei Abschnitte unterteilen: den reduktiven und den oxidativen Teil. Der reduktive Teil beinhaltet den Übergang vom Zustand **O**, bei dem alle Redoxzentren oxidiert sind, zum Zustand **R**. Dieser ist dadurch charakterisiert, dass durch die Aufnahme von zwei Elektronen das bZ reduziert vorliegt. Darüber hinaus werden bei diesem Übergang zwei Protonen aufgenommen (Mitchell and Rich, 1994). Dieses wird dadurch belegt, dass die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion mit steigendem pH sinkt (Verkhovsky et al., 1995). Die Aufnahme der Protonen ist notwendig, um die überschüssigen negativen Ladungen, welche durch

den Elektronentransfer in das bZ eingeführt werden, zu kompensieren. In der Literatur wurde anfangs diskutiert, dass der K-Kanal für den oxidativen und der D-Kanal für den reduktiven Abschnitt des Reaktionszyklus zuständig sei (Konstantinov et al., 1997; Vygodina et al., 1998; Zaslavsky and Gennis, 1998). Somit würden zwei Protonen beim Übergang von **O** → **R** durch den K-Kanal aufgenommen. Neuere Ergebnisse zeigen allerdings, dass der D-Kanal ebenfalls in den reduktiven Teil des Reaktionszyklus involviert ist ((Wikström et al., 2000) und diese Arbeit).

Der oxidative Teil beginnt mit der Anlagerung von Sauerstoff an das reduzierte Häm a_3 (**R** → **A**). Der nächste Schritt ist nun abhängig davon, ob man die Reaktion mit der vollreduzierten (Cu_A^{1+} , a^{2+} , a_3^{2+} , Cu_B^{1+} ; **A** → **P_R**) oder halbreduzierten Oxidase (Cu_A^{2+} , a^{3+} , a_3^{2+} , Cu_B^{1+} ; **A** → **P_M**) durchführt. Ist die CcO im vollreduzierten Zustand, so werden vier Elektronen auf Sauerstoff übertragen, wobei je ein Elektron vom Häm a und Cu_B kommt und zwei Elektronen vom Häm a_3 stammen. Im halb-reduzierten Zustand werden ebenfalls vier Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Es stellt sich allerdings die Frage, woher das vierte Elektron kommt, da Häm a oxidiert ist. Eine mögliche Quelle, nicht nur für ein Elektron, sondern auch für ein Proton, ist ein Tyrosin (Y288), welches durch Radikalbildung beides freisetzen könnte. Bei der Rinderherzoxidase bildet dieses Tyrosin eine kovalente Bindung mit einem Cu_B -Liganden (H284), was nicht bei der CcO Struktur von *R. sphaeroides* beobachtet wurde. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass sich beim Übergang in den Zustand **P** ein Radikal bildet (MacMillan et al., 1999; Proshlyakov et al., 2000). Die Radikalbildung findet nicht nur im halb-reduzierten Zustand statt, sondern auch im vollreduzierten. Hier wird die Radikalbildung allerdings direkt durch das bei Häm a vorhandene Elektron rückgängig gemacht. Sowohl im halb-reduzierten als auch im vollreduzierten Zustand wird die Sauerstoffbindung beim Übergang von **A** nach **P_M** bzw. **P_R** gebrochen, wodurch ein Oxoferryl-Zustand gebildet wird. Ältere Untersuchungen hatten vorgeschlagen, dass die Bindung bei diesem Übergang intakt bleibt und der Sauerstoff in Form eines Peroxids am Häm a_3 gebunden vorliegt, was diesem Zustand auch seinen Namen (**P**) gab. Der Übergang von **A** nach **P** ist in beiden Fällen pH-unabhängig, und weist damit darauf hin, dass während dieser Reaktion keine Protonen aufgenommen werden (Oliveberg et al., 1989). Interessanterweise haben beide **P** Intermediate identische UV/Vis-Spektren. Die Struktur bzw. die Umgebung der Chromophore beider Intermediate ist folglich vergleichbar (Morgan et al., 1996).

Im Falle der halb-reduzierten Oxidase stoppt die Reaktion hier. Bei der vollreduzierten Oxidase zerfällt das Intermediat allerdings unter der Aufnahme eines Protons von E286 (Adelroth et al., 2000) aus dem D-Kanal zum Intermediat **F**. Neben der Proto-

enaufnahme ist die (Re-) Reduktion des Häm *a* durch Cu_A noch charakteristisch für diesen Übergang. Der Unterschied zwischen **P** und **F** wird deutlich bei der Betrachtung der UV/Vis-Spektren. Das **F minus O** Spektrum zeigt eine breite Absorption bei 580 nm, während das **P minus O** Spektrum eine scharfe Bande bei 607 nm hat.

Der letzte Schritt im Funktionszyklus ist der **F** → **O** Übergang. Hierbei wird wiederum ein Proton durch den D-Kanal aufgenommen und das letzte Elektron zum bZ transportiert. Sowohl Elektron als auch Proton werden zur Reduktion bzw. Protonierung des Oxoferryl-Komplexes eingesetzt ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-} + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-OH}$; wobei die Hydroxylgruppe auch an Cu_B gebunden sein könnte).

Eine Möglichkeit, diese Intermediate zu beobachten, bietet die *flow-flash*-Technik. Hierbei werden zwei getrennte Kammern zum einen gefüllt mit vollreduzierter, CO gebundener CcO und zum anderen mit sauerstoffgesättigter Lösung. Beide Lösungen werden anschließend in eine Mischkammer gepumpt. Um zu vermeiden, dass das an der CcO gebundene CO durch den nun in der Lösung vorhandenen Sauerstoff unkontrolliert ausgetauscht wird, muss die Vermischung sehr schnell erfolgen (< 1 s). Ist dieses gewährleistet, kann die Reaktion durch einen Laserpuls gestartet werden: Das CO wird fotolytisiert, der Sauerstoff bindet an das Protein und der Funktionszyklus wird durchlaufen (Proshlyakov et al., 1996b; Proshlyakov et al., 1996; Proshlyakov et al., 1994). Da in diesem Fall der gesamte Funktionszyklus abläuft, können die Intermediate allerdings nur zeitaufgelöst beobachtet werden.

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welche Schritte im Funktionszyklus mit Protonenabgabe und infolgedessen mit dem eigentlichen Pumpvorgang assoziiert sind. In der Abbildung 1.3-4 sind die bisher diskutierten, möglichen Pumpschritte durch einen gestrichelten Pfeil dargestellt. Eine Vielzahl von detaillierten Modellen wird in der Literatur beschrieben. Neben dem Histidin-Zyklus von Wikström et al. (Morgan et al., 1994) gibt es noch Modelle von Michel et. al. (Michel, 1998) sowie weitere modifizierte Varianten (Michel, 1999; Michel, 1999b). Eine der wesentlichsten Diskrepanzen zwischen Wikströms und Michels Model ist die Frage, ob die einzelnen Pumpschritte über den gesamten Funktionszyklus verteilt sind (Michel) oder, ob nur im oxidativen Teil Protonen gepumpt werden (Wikström). Die ursprüngliche Meinung war, dass nur im oxidativen Teil des Funktionszyklus je zwei Protonen beim Übergang von **P** → **F** und **F** → **O** gepumpt werden. Mittlerweile geht man allerdings davon aus, dass auch beim Übergang von **O** → **R** ebenfalls Protonen gepumpt werden. Trotz der großen Anzahl der bis heute veröffentlichten Arbeiten ist es nicht möglich, eindeutig zu sagen, welche Pumpschritte an welche Übergänge gekoppelt sind.

1.3.4 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollen Untersuchungen an dem Membranprotein Cytochrom-*c*-Oxidase durchgeführt werden. Sowohl die Rinderherzoxidase als Vertreter der Eukaryoten als auch die CcO von *Rhodobacter sphaeroides* als Vertreter der Prokaryoten sind Gegenstand der Experimente. Das Ziel der Experimente ist es, einen Einblick in den Mechanismus des Funktionszyklus zu erlangen und damit den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion aufzuklären.

Eine Möglichkeit den Protonentransfer und die dabei beteiligten AS zu beobachten ermöglicht die Fourier Transform Infrarot-Spektroskopie. Diese Technik war schon bei der Aufklärung des Fotozyklus von Bacteriorhodopsin sehr erfolgreich (Heberle and Zscherp, 1996; Zscherp and Heberle, 1997). Die Messungen werden mit zwei verschiedenen Modifikationen durchgeführt: Zum einen wird die CcO zeitaufgelöst in *Transmission* gemessen und zum anderen kommt die *ATR-Technik* bei Messungen im Gleichgewicht zum Einsatz.

Für die Transmissionsmessungen werden im Wesentlichen zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Die Präparation der *vollreduzierten, CO gebundenen CcO* soll optimiert werden und bei Fotolyseexperimenten zum Einsatz kommen. Hierbei verfolgt man die Kinetik der FeCO-Schwingung und die durch die Rückbindung von CO induzierten Änderungen im *Protein*. Die CO-Kinetik ist vielfach in der Literatur beschrieben und sehr gut untersucht worden, weshalb der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der Änderungen im Protein liegt. Eine weitere Möglichkeit, Fotolyseexperimente durchzuführen, bietet die *halbreduzierte, CO gebundene CcO*. Auch hier soll die Probenpräparation für die Messungen im IR optimiert werden. Neben den oben beschriebenen Beobachtungen bei Experimenten mit der vollreduzierten CcO kann man in diesem Zustand zusätzlich noch durch Elektronentransfer induzierte Änderungen im Protein untersuchen.

Die ATR-Technik erfordert eine besondere Präparation. Die in gereinigter Form vorliegende, solubilisierte CcO muss für diesen Zweck in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Um auszuschließen, dass diese Prozedur einen Effekt auf die Funktionalität der CcO hat, werden verschiedene Experimente durchgeführt. Im Anschluss daran sollte es möglich sein, mit der rekonstituierten CcO Redox-Differenzspektren aufzunehmen, und darüber hinaus Intermediate des Funktionszyklus darzustellen.

Bei allen Untersuchungen im IR liegt das besondere Interesse auf einem Bereich ($1750 - 1700 \text{ cm}^{-1}$), in dem man Carboxylsäuren (Aspartat und Glutamat) beobachten kann. Diese AS sind Schlüsselemente bei allen Protonenpumpen. Es ist daher von besonderem Nutzen, Informationen über den Protonierungszustand und/oder Strukturänderungen dieser AS zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Aufzucht der *Rhodobacter sphaeroides* Bakterien

Alle Bakterienstämme von *R. sphaeroides* wurden von Bob Gennis (Department of Biochemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Die Aufzucht der Zellen und die Reinigung der CcO konnte ich während eines zweimonatigen Aufenthalts in den Laboratorien von Bob Gennis erlernen und anschließend in unserem Labor etablieren. Zur Herstellung des Wildtyps und von Mutanten der CcO wird der Stamm JS100 verwendet. Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mangelmutante, die eine Störung der Carotenoid-Biosynthese zeigt. Das hat den Vorteil, dass die membranlöslichen Carotenoide bei der Reinigung keinen störenden Einfluss haben. Dieser Stamm weist außerdem einen Verlust des *ctaD* Gens auf, welches für die Untereinheit I der CcO kodiert und ersetzt wurde durch eine Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz. Die Expression dieser Untereinheit erfolgt durch ein modifiziertes *ctaD* Gen, das für eine um sechs Histidine verlängerte (6XHis) Untereinheit I kodiert und auf einem Plasmid liegt (Shapleigh and Gennis, 1992).

Die Aufzucht von *R. sphaeroides* erfolgt aerob im Minimalmedium (Sistrom, 1960). Das Medium wird in zehnfacher Konzentration (10 X) hergestellt und enthält die folgenden Bestandteile:

di-Kaliumhydrogenphosphat	200 mM
Ammoniumsulfat	37,8 mM
Bernsteinsäure	340 mM
L-Glutamat	6,7 mM
L-Aspartat	2,5 mM
Natriumchlorid	85 mM
Nitriloessigsäure	10,47 mM
Magnesiumsulfat * 7 H ₂ O	12 mM
Calciumchlorid * 2 H ₂ O	2,27 mM
Eisensulfat * 7 H ₂ O	0,07 mM
Spurenelemente	1 ml/L
Ammoniummolybdatlsg * 4 H ₂ O (1,25 %)	1,6 µM

Die für das Minimalmedium notwendigen Spurenelemente werden in einer Stammlösung zusammengefasst (100 ml):

EDTA	1,765 g
Zinksulfat * 7 H ₂ O	10,95 g
Eisen(II)-sulfat * 7 H ₂ O	5,0 g
Mangansulfat * H ₂ O	1,54 g
Kupfersulfat * 5 H ₂ O	0,392 g
Kobaltchlorid * 6 H ₂ O	0,238 g
Schwefelsäure	„einige Tropfen“, bis die Lösung klar wird

Das 10 X Medium wird entweder autoklaviert und bei 4 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Für die Aufzucht der Zellen wird das Medium 10fach verdünnt und mit Kaliumhydroxid auf pH 7 eingestellt. 2L-Schüttelkolben (mit Schikane) werden mit jeweils 800 ml Medium gefüllt und autoklaviert. Danach gibt man die notwendigen Antibiotika und Vitamine zu: Pro Liter Kulturmedium 500 µl der Streptomycin/Spectinomycin-Stammlösung, 200 µl der Tetracyclin-Stammlösung und 100 µl der Vitamin-Stammlösung. Die Stammlösungen haben folgende Zusammensetzung:

Vitamin-Stammlösung (100 ml, steril-filtriert)

Vitamin H	0,01 g
Niacin	1,0 g
Vitamin B ₁	0,5 g

Tetracyclin-Stammlösung:

Tetracyclin Hydrochlorid 10 mg/ml (50 % Ethanol/50 % Wasser)

Streptomycin/Spectinomycin-Stammlösung:

Streptomycin Sulfat	100 mg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml

Um die Kolben mit einer genügend großen Anzahl Zellen anzuimpfen, werden Vorkulturen gezogen. Die Anzucht der Vorkulturen geschieht in autoklavierten 500 ml Schüttelkolben, gefüllt mit 200 ml Medium. Angeimpft werden diese Vorkulturen mit jeweils 2 ml tiefgefrorenen Kulturen (25 % Glycerin). Das Animpfen der Lösung erfolgt, nachdem die erste Vorkultur grün geworden ist. Dieses ist ein Zeichen dafür, dass die Bakterien unter Sauerstoffmangel leiden und mit der Umstellung von oxida-

tiver auf photosynthetische Energiegewinnung beginnen. Dies bedeutet aber auch, dass die Ausbeute an CcO geringer wird. Die 2 Liter Kolben werden mit jeweils 10 bis 20 ml Vorkultur angeimpft. Das Wachstum der Zellen erfolgt in einem Schüttelinkubator (*Infors*) bei 30 °C und 130 RPM.

Je nach Zelldichte der Vorkultur und Art der Mutante werden die Zellen nach 18 bis 30 h geerntet. Der Zeitpunkt der Ernte wird wieder über die Farbe der Zellsuspension bestimmt. Sobald der erste Kolben grün ist, werden alle Zellen geerntet. Die Zellen pelletiert man bei 8300 x g für 15 min in einem KA-9 Rotor (*Kontron*; Zentrifuge: RC5C, *Sorvall*). Die Ausbeute an Zellen liegt zwischen 2 und 5 g (Feuchtgewicht) pro Liter eingesetztem Medium.

2.2 Reinigung der Cytochrom-c-Oxidase

Zentrifugationsschritte und French[®] Press

Für die Isolation der CcO werden zwischen 25 und 100 g Zellen (Feuchtgewicht) eingesetzt. Im folgenden Schritt (Aufschluss der Zellwände) resuspendiert man die Zellen in 50 mM Phosphatpuffer (pH 8). Zur Unterdrückung der Proteaseaktivität gibt man Leupeptin und Benzamidin mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/l bzw. 1 mM zur Lösung und leitet diese viermal durch eine French[®] Press. Der Druck innerhalb der Zelle sollte während der gesamten Zeit nicht unter 1.000 psi liegen. Anschließend wird das Lysat 10 Minuten in einem SS34 Rotor bei 17.000 x g zentrifugiert. Das Pellet (nicht aufgeschlossene Zellen) verwirft man und wiederholt den ersten Zentrifugationsschritt mit dem Überstand. Im nächsten Schritt wird der Überstand für 4 h bei 110.000 x g in einem Ti 50.2 Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand enthält danach die löslichen Proteine und wird verworfen. Das Pellet besteht u.a. aus den Membranfragmenten und beinhaltet auch die CcO.

Solubilisierung

Das Pellet wird mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 8) aufgenommen und homogenisiert. Um die Proteine aus der Membran zu lösen, wird über einen Zeitraum von 15 min 20 prozentige n-Dodecyl- β -D-Maltosid-Stammlösung (DM) (*Anatrace*) zum Homogenisat gegeben (Endkonzentration 1 % w/v) und über Nacht (> 8 h) bei 4 °C gerührt. Der Überschuss an Detergenz im Verhältnis zum Lipid führt dazu, dass die Proteine aus

ihren Membranfragmenten in einzelne Detergenzmizellen überführt werden. Da die einzelne Detergenzmizelle inkl. Protein leichter ist als die nicht-solubilisierten Membranfragmente, kann man diese durch Zentrifugation trennen. Aus diesem Grund zentrifugiert man den Solubilisierungsansatz für 2 h bei 110.000 x g. Das Pellet wird verworfen und der Überstand zur weiteren Bearbeitung gesammelt.

Affinitätschromatografie

Die Reinigung erfolgt durch Affinitätschromatografie. Bei dieser Technik gibt es eine stationäre Phase (Sepharose), einen Komplexbildner (Nitriloessigsäure), der an die stationäre Phase gebunden ist, und ein komplexiertes Metallion (Ni). Die sehr hohe Affinität des Metallions zum 6XHis Ende der Untereinheit I erlaubt eine selektive Bindung des Proteins. Durch Variation des Waschpuffers (pH und Salzkonzentration) lassen sich unspezifisch gebundene Proteine entfernen. Ein Überschuss an Imidazol verdrängt das Protein aus der Bindung, da es mit Imidazol um die Bindung am Ni konkurriert. Folglich kann das Protein gezielt eluiert werden. Die Wasch- und Elutionspuffer müssen für jedes Protein getestet und optimiert werden. Für die CcO ergibt sich folgendes Schema (siehe (Mitchell and Gennis, 1995)):

- a Die Affinitätssäule füllt man mit Säulenmaterial (Ni-NTA Agarose, *Qiagen*) und äquilibriert (ca. 6faches Säulenvolumen) mit Waschpuffer A (50 mM Phosphat, 10 mM Imidazol, 0,1 % DM). Die Bindekapazität des Säulenmaterials beträgt 5 – 10 mg/ml für ein 20 kD großes Protein (*Qiagen Katalog*). Da die CcO mit 120 kD erheblich größer ist, werden 1 ml Säulenmaterial pro mg Protein eingesetzt.
- b Sobald die Säule äquilibriert ist, mischt man den Überstand aus dem letzten Zentrifugationsschritt mit dem Säulenmaterial. Die Bindung des Proteins mit dem Säulenmaterial wird durch 20 minütiges Rühren gewährleistet. Nachdem sich das Säulenmaterial wieder abgesetzt hat (ca. 1 h), sollte die Bindung vollständig sein.
- c Zur Überprüfung der Bindung wird die Konzentration der Oxidase im ersten Durchlauf getestet (siehe Abbildung 2.2-1). Für den Fall, dass noch Oxidase im Durchlauf detektiert wird, muss Schritt b (möglicherweise mit mehr/neuem Säulenmaterial) wiederholt werden.
- d Die Säule wird mit folgenden Waschpuffern jeweils solange gewaschen, bis der Durchlauf klar ist: Waschpuffer A, Waschpuffer B (250 mM Phosphat, 10 mM Imidazol, 0,1 % DM), Waschpuffer C (250 mM Phosphat, 25 mM Imidazol, 0,1 % DM) und wieder Waschpuffer A.

e Man eluiert das Protein mit dem Elutionspuffer (50 mM Phosphat, 100 mM Imidazol, 0,1 % DM). Je langsamer das Protein eluiert, desto schärfer ist das Elutionsprofil des Proteins.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der CcO erfolgt im sichtbaren Spektralbereich mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrometers (*UV-2101PC, Shimadzu*). Dafür füllt man 1 ml OxidaseLösung in eine Küvette mit einer optischen Weglänge von 1 cm. Das erste Spektrum wird im oxidierten Zustand (Cu_A^{2+} - Cu_A^{2+} , Fe_a^{3+} , Fe_{a3}^{3+} , Cu_B^{2+}) aufgenommen. Durch Zugabe von 100 μl einer 1 M Natriumdithionit-Lösung geht die Oxidase in den vollreduzierten Zustand über. Dieser Zustand ist dadurch gekennzeichnet, dass alle vier Redoxzentren ein Elektron mehr haben als im oxidierten Zustand ($\text{Cu}_A^{1,5+}$ - $\text{Cu}_A^{1,5+}$, Fe_a^{2+} , Fe_{a3}^{2+} , Cu_B^{1+}). Nachdem das zweite (reduzierte) Spektrum um den Verdünnungsfaktor korrigiert ist, zieht man das erste (oxidierte) Spektrum davon ab. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nicht nur bei der gereinigten Oxidase (Eluat). Besonders zwischen den einzelnen Reinigungsschritten ist es wichtig zu wissen, wo und wieviel CcO vorhanden ist. Aus diesem Grund sind beispielhaft einige Differenzspektren zur Bestimmung der Konzentration aus verschiedenen Reinigungsschritten dargestellt.

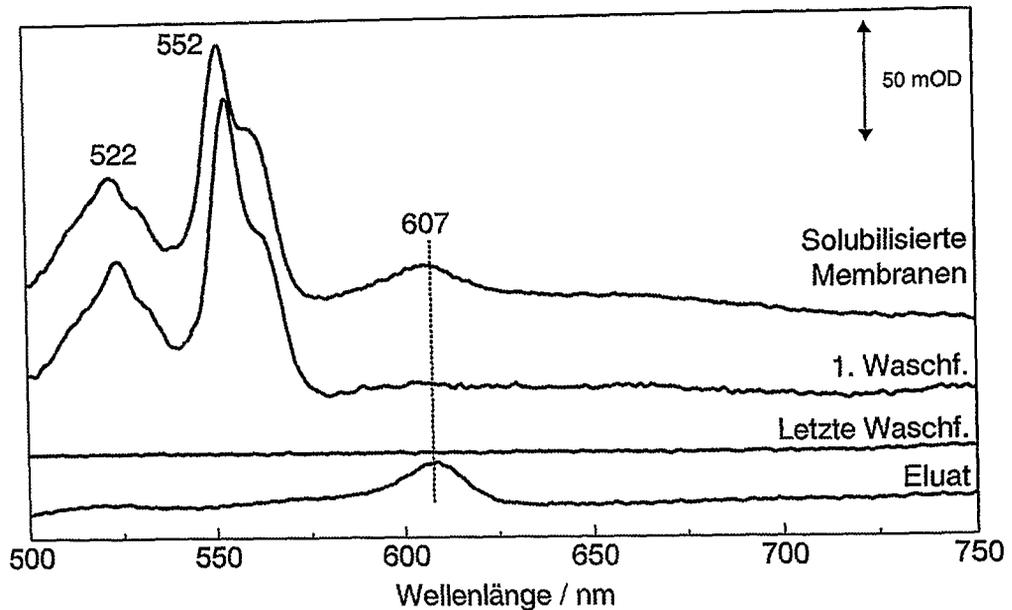


Abbildung 2.2-1 Zeigt Redox-Differenzspektren in der α -Region. Dargestellt sind folgende Differenzspektren: Das erste Spektrum (Solubilisierte Membranen) dient der Bestimmung der Proteinmenge vor dem Auftragen auf die Säule (b). Die 1. (c) und die letzte Waschfraktion (d) dient der Überprüfung der Bindung von CcO an die Säule. Das letzte Spektrum (Eluat) zeigt die gereinigte CcO.

Das oberste Spektrum zeigt ein Homogenisat der solubilisierten Membranen vor dem Auftragen auf die Affinitätssäule. Man erkennt deutlich, dass neben der Absorption bei 607 nm, die größtenteils dem reduzierten Häm a_3 der CcO entspricht (siehe Kapitel 2.4.1.1), weitere Banden bei 522 und 552 nm zu erkennen sind (z. B. Cytochrom-*b*). Um zu testen, ob die CcO an die Säule bindet, wird die erste Waschfraktion untersucht. Spektrum b zeigt, dass kaum noch CcO in der Waschfraktion vorhanden ist, aber alle anderen Banden deutlich zu sehen sind. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die CcO an die Säule gebunden hat und die Verunreinigungen, soweit möglich, herausgewaschen werden. Dieses verdeutlicht auch das Spektrum c; nach mehreren Waschschrritten sind alle Verunreinigungen verschwunden. Die Elution mit Imidazol liefert dann reine CcO, wie das unterste Spektrum zeigt. Die Konzentration lässt sich wie folgt berechnen: Der Absorptionskoeffizient der CcO im Redox-Differenzspektrum beträgt $\epsilon_{605} - \epsilon_{630} = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (van Gelder, 1966). Die Konzentration der CcO bei einer optischen Weglänge von 1 cm berechnet sich nach Lambert-Beer:

$$c_{\text{Oxidase}} = (\text{OD}_{(605)} - \text{OD}_{(630)}) / (24 \text{ mM}^{-1})$$

Pufferaustausch und Konzentrierung

Imidazol hat nicht nur einen Einfluss auf das sichtbare Spektrum der CcO, sondern destabilisiert die CcO auch. Deshalb muss Imidazol entfernt werden. Zu diesem Zweck und zur Erhöhung der Konzentration wird das Protein in einem *Amicon-100* Konzentrator mehrfach konzentriert und wieder mit dem gewünschten Puffer verdünnt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis ein Verdünnungsfaktor größer 100 erreicht ist und die Konzentration der CcO je nach Experiment bei ca. 100 – 400 μM liegt. Zur Aufbewahrung wird das Protein tropfenweise in flüssigen Stickstoff pipettiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3 Rekonstitution der Cytochrom-*c*-Oxidase in Lipidvesikeln

Voraussetzung für alle Schritte während der Rekonstitution ist, dass die benutzten Glasgefäße „sauber“ sind. Da schon eine geringe Verunreinigung der Gefäße mit Detergenzien oder Lipiden zu einer unvollständigen Rekonstitution führen können, werden alle Gefäße vor Gebrauch für mind. 10 h (über Nacht) in 6 M KOH gereinigt. Dieser Schritt führt dazu, dass die obersten Schichten der Glasgefäße entfernt und damit Verunreinigungen beseitigt werden. Das anschließende Auswaschen mit deionisiertem Wasser und die Fortsetzung der Reinigung für eine Dauer von 1,5 h im Ultraschallbad (H_2O) bewirken, dass die Glasoberfläche wieder hydrophil wird.

Lipid-Stammlösung

In einem 10 ml Eichkolben wiegt man 10 mg DMPC (1,2-Ditetramiristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin, *Sigma*) ein und löst in 9 ml Chloroform. Durch Zugabe von 1 ml Methanol wird die Löslichkeit der Lipide erhöht. Die Stammlösung wird bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Herstellung der Lipidvesikel

Zur Herstellung der Vesikel werden 0,5 bis 1 ml der Lipid-Stammlösung in ein Becherglas (2 ml) gegeben. Unter einem leichten Stickstoffstrom wird das Lösungsmittelgemisch vollständig verdampft (mind. für 2 h). Das Volumen des verdampften

Lösungsmittels wird durch 10 mM Phosphatpuffer (pH 8) mit 2 % (w/v) Cholat (*Sigma*) ersetzt. Die polaren Kopfgruppen der Lipide werden 30 min im Ultraschallbad hydratisiert. Es muss darauf geachtet werden, dass dieser und der folgende Schritt oberhalb des T_m (23 °C für DMPC; Übergangstemperatur gelartig → flüssig-kristallin) der eingesetzten Lipide durchgeführt wird. Mit Hilfe eines Stab-Ultraschallgeräts (*Labsonic L, B. Braun*) werden die Vesikel durch 5 bis 10 min Beschallung geformt. Die Vesikellösung wird dann für 10 min in einer Tischzentrifuge (*Centrifuge 5414 S, Eppendorf*) mit 14.000 RPM zentrifugiert, um Metallabrieb des Stabultraschallgeräts zu entfernen.

Entfernung des Detergenz und Rekonstitution der Cytochrom-c-Oxidase in Proteoliposomen

Dieser Schritt kann auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden. Neben der Dialyse, der Gelchromatografie und der Verdünnung gibt es noch die Adsorption an Polystyrol Kugeln (*Bio-Beads SM-2, Bio-Rad*), die in dieser Arbeit angewendet wird. Eine detaillierte Beschreibung und Diskussion findet man in der Arbeit von Rigaud et al. (Rigaud et al., 1998) und den darin zitierten Arbeiten. Basierend auf dieser Arbeit wurde eine Prozedur für die CcO entwickelt und optimiert, die eine Verringerung der Konzentration an exogenen Lipiden um einen Faktor 10.000 beinhaltet.

Zur Reinigung der Bio-Beads werden sie vor Gebrauch für 10 min in Methanol gegeben (nicht länger, da sie sich sonst auflösen) und anschließend mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 8) gewaschen. Die Vesikellösung und die solubilisierte Oxidase werden etwa im Verhältnis 1:1 (Lipid- zu Proteinkonzentration) für die Rinderherzoxidase und 5:1 für die bakterielle CcO gemischt. Das Endvolumen wird durch Zugabe von 10 mM Phosphatpuffer (pH 8) auf 500 μ l eingestellt. Der Protein-Lipid-Mix wird bei 4 °C für 30 min gerührt. Insgesamt wird 1 g der gereinigten Bio-Beads pro 500 μ l Protein-Lipid-Mix (und somit pro 1 bis 2 mg eingesetztem Protein) abgewogen und in 16 Fraktionen aufgeteilt. Die Anteile gibt man bei 4 °C nach folgendem Schema zum Protein-Lipid-Mix:

Zeit [h]	0	1	2	3	4	5	6	7
Anteil [1/16]	1	1	1	1	2	2	4	4

Tabelle 2-1

Nach Zugabe der letzten Bio-Beads wird die gesamte Lösung über Nacht bei 4 °C gerührt. Am nächsten Tag werden die Bio-Beads entfernt und die Konzentration der Lösung bestimmt. Gewöhnlich liegt die Konzentration bei etwa 20 µM. Die Lösungen werden bei 4 °C gelagert und innerhalb von einer Woche verbraucht.

2.4 Spektroskopische Methoden und Datenauswertung

2.4.1 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie

Die Infrarot (IR)-Spektroskopie ist ein hervorragendes Hilfsmittel, um Informationen über einzelne Schwingungen in einem Molekül zu erlangen. Im Gegensatz zur sichtbaren Spektroskopie, bei der elektronische Übergänge betrachtet werden, reicht die Energie der elektromagnetischen Strahlung im IR nur aus, um Schwingungsübergänge zu induzieren. Dieses macht die IR-Spektroskopie aber erheblich selektiver als die sichtbare Spektroskopie. Darüber hinaus können auch solche Proteine untersucht werden, die keinen Chromophor besitzen, also nicht „farbig“ und daher ungeeignet für sichtbare Spektroskopie sind.

Die Auswahlregel für das Erscheinen einer Bande im IR-Spektrum ist, dass die Normalschwingung mit einer Änderung des Dipolmoments gekoppelt sein muss. Die Anzahl der Schwingungen in einem Molekül richtet sich nach der Anzahl der Atome N . Ein Molekül mit N Atomen besitzt $3N-6$ Schwingungsfreiheitsgrade. Da die Anzahl der Atome in biologischen Molekülen (Proteinen) sehr groß ist, steigt auch die Anzahl der Schwingungen, die zu einem Infrarotspektrum beitragen, stark an. Dieses führt zu einer Überlagerung der einzelnen Banden, so dass bei großen Proteinen, wie z. B. der bakteriellen CcO, es kaum möglich ist, Absolutspektren im Hinblick auf die Funktion zu interpretieren. In der Abbildung 2.4-1 B ist ein Absolutspektrum der CcO in Phosphatpuffer dargestellt. Man erkennt, dass allein aufgrund der starken Absorption des Wassers und des Proteins eine Interpretation des Spektrums schwierig wird. Das Spektrum A zeigt eine breite Emission über einen Bereich von 7000 bis 800 Wellenzahlen. Bei unseren Messungen ist besonders der Bereich zwischen 1800 und 950 cm^{-1} sowie zwischen 2300 und 1900 cm^{-1} von besonderem Interesse. In diesen Bereichen zeigt das Emissionsspektrum des Globars eine hohe Photonenintensität, was gut für das Signal/Rausch-Verhältnis ist.

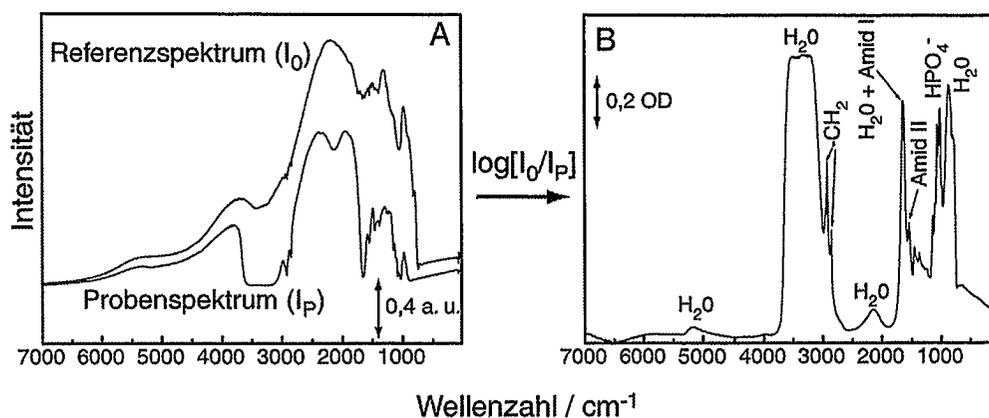


Abbildung 2.4-1 Zeigt Einkanalspektren (A) ohne Probe (Referenzspektrum) und mit CcO ($\sim 300 \mu\text{M}$) und 100 mM Phosphat Puffer (Probenspektrum), aufgenommen mit einer Transmissions-Küvette mit $10 \mu\text{m}$ Schichtdicke. Das Absolutspektrum (B) erhält man durch Subtrahieren der logarithmierten Einkanalspektren. Zu erkennen sind verschiedene Absorptionsbanden: Wasser, Phosphat, Protein und Detergenz.

Eine Möglichkeit, die Problematik der starken Wasser- und Proteinabsorption zu umgehen, stellt die Differenzspektroskopie dar. Hierbei wird das Protein im „Zustand X“ als Referenzspektrum gemessen und anschließend durch geeignete Methoden in den „Zustand Y“ überführt und erneut gemessen (Probenspektrum). Als Ergebnis erhält man ein Differenzspektrum „Y minus X“, bei dem nur diejenigen Schwingungen dargestellt werden, die sich beim Übergang vom ersten in den zweiten Zustand geändert haben. Beispiele hierfür sind die lichtinduzierten („Licht minus Dunkel“) oder durch chemische Modifikation induzierten („Reduziert minus Oxidiert“) Veränderungen und ihre Differenzspektren in den folgenden Kapiteln.

Eine Schwierigkeit ist hierbei allerdings, dass die gemessenen Änderungen im Differenzspektrum um ein vielfaches kleiner sind als die Gesamtabsorption. In Abbildung 2.4-1 B erkennt man, dass bei einer Schichtdicke von $\sim 10 \mu\text{m}$ und einer Proteinkonzentration von $\sim 300 \mu\text{M}$ die Absorption der Amid I Bande bei ~ 1 liegt. Die zu erwartenden Differenzbanden sind um einen Faktor 1000 kleiner – liegen also bei $\sim 1 \text{ mOD}$. Dieses hat zur Folge, dass selbst kleine Variationen von Parameter wie z. B. Temperatur und pH, die während des Differenzexperiments eigentlich konstant sein sollten, einen großen Einfluss auf das Differenzspektrum haben können. In einem $\text{R}_4 - \text{O}$ Differenzspektrum beispielsweise will man nur solche Signale messen, die durch die Reduktion der Kofaktoren induziert werden. Hat allerdings der oxidierende Puffer einen pH der unterschiedlich von dem des reduzierenden Puffers ist, so werden Änderungen im Protein (pH-)induziert, deren Signale größer sind und damit die redox-induzierten Signale überlagern (siehe Abbildung 3.4-2). Diese kommt bei Diffe-

renzexperimenten erschwerend hinzu und muss bei der Durchführung berücksichtigt werden.

Fourier Transform Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie)

Im Vergleich zu herkömmlichen IR-Gitterspektrometern besitzt die FTIR-Spektroskopie wesentliche Vorteile: In einem Gitterspektrometer wird das Messlicht Wellenlänge für Wellenlänge zeitlich getrennt am Detektor aufgezeichnet. Bei einem FTIR-Spektrometer dagegen wird der gesamte Bereich des Messlichtes (Fellget-Vorteil). Durch die Einkopplung eines HeNe-Lasers in das Interferometer ist ein interner Frequenzstandard vorhanden, der eine aufwendige Kalibrierung hinfällig macht (Connes-Vorteil). Darüber hinaus ermöglichen die bei diesem Verfahren runden Aperturen einen besseren Strahlendurchsatz (Jacquinot-Vorteil).

Bevor das vom Global ausgesandte Messlicht die Probe erreicht, passiert es das Herzstück des Spektrometers, das Michelson-Interferometer (siehe Abbildung 2.4-2). Hier wird der Strahl an einem Strahlteiler in zwei identische Strahlen aufgeteilt. Einer der Strahlen trifft auf einen festen Spiegel und wird reflektiert, der andere trifft auf einen beweglichen Spiegel mit einer Weglängendifferenz Δx und wird ebenfalls reflektiert. Vereinigen sich die beiden Strahlen wieder, so haben sie je nach Spiegelstellung des beweglichen Spiegels eine Phasendifferenz und interferieren dementsprechend. Abhängig von der eingestrahlten Wellenlänge und der Weglängendifferenz oszilliert die Intensität am Detektor. Für das Signal am Detektor bei eingestrahelter Wellenzahl ν gilt:

$$I(x) = I(\nu)(1 + \cos 2\pi\nu x) \quad \text{Gleichung 2-1}$$

Da die IR-Lichtquelle über einen Bereich kontinuierlich strahlt, entspricht das Signal am Detektor der Summe aller oszillierenden Intensitäten. Man spricht von einem Interferogramm. Es gilt:

$$I(x) = \int_0^{\infty} [I(\nu)(1 + \cos 2\pi\nu x)] d\nu \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Das Interesse liegt bei der Intensitätsverteilung in Abhängigkeit von der Wellenzahl. Das sogenannte Einkanalspektrum erhält man durch eine mathematische Umformung, der Fourier-Transformation. Es gilt:

$$I(\nu) = 4 \int_0^{\infty} [I(x) - \frac{1}{2} I(0)] \cos(2\pi\nu x) dx \quad \text{Gleichung 2-3}$$

Durch Logarithmieren der Einkanalspektren ($I_{\text{Ref.}}$ und I_{Probe}) und anschließende Subtraktion erhält man das Absolutspektrum.

Da man aufgrund des endlichen Verfahrenweges des beweglichen Spiegels nicht in der Lage ist, wie in Gl. 2.2 beschrieben, ein unendliches Interferogramm aufzunehmen, müssen noch einige Korrekturen, wie z. B. eine Apodisation, vorgenommen werden. Eine detaillierte Beschreibung und Diskussion der Theorie der FTIR-Spektroskopie findet man bei W. Herres et al (Gronholz and Herres, 1985).

2.4.2 Versuchsaufbau

Bei allen Versuchen im IR kommt ein *IFS 66v* Spektrometer von *Bruker* zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein Gerät, das teilweise evakuiert werden kann. Mit Ausnahme der Probenkammer haben die restlichen Teile des Gehäuses einen Druck von etwa 10 mbar. Dieses führt dazu, dass störende Absorptionen von Wasserdampf und Kohlendioxid fast vollständig beseitigt und Fehler durch Konvektion der Luft verringert werden. Die Lichtquelle ist ein Global (IR) oder wahlweise eine Halogenlampe (VIS). Im Vis werden die Signale von einer Silizium-Diode, im IR von einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor (Mercury-Cadmium-Tellurit) gemessen. Anschließend digitalisiert ein Analog/Digital-Wandler die Signale und transferiert sie auf den Messrechner (PC).

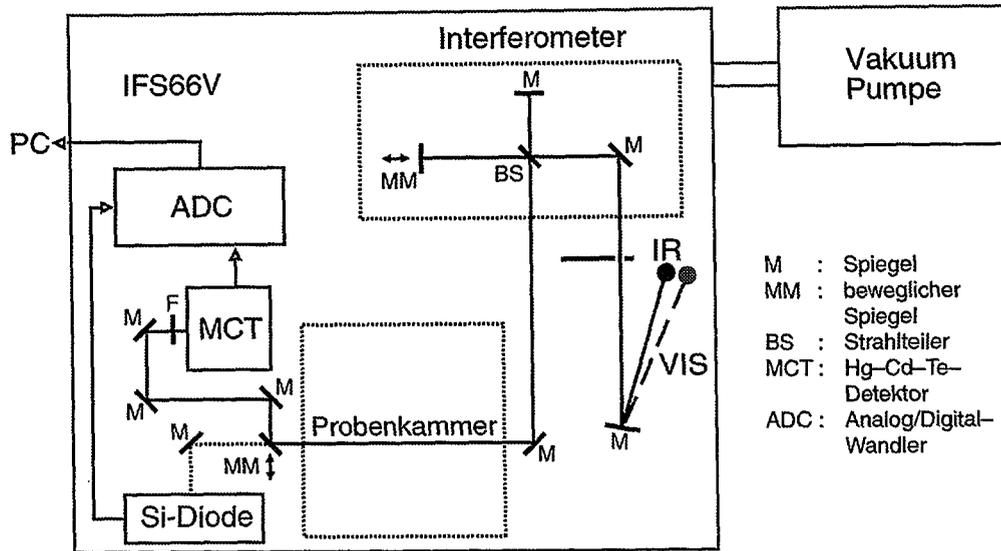


Abbildung 2.4-2 Schematischer Aufbau des IFS 66v Spektrometers.

Spülen der Probenkammer mit trockener Luft während der Messungen verringert die Absorption von Wasserdampf und Kohlendioxid. Die Experimente werden mit zwei unterschiedlichen Versuchsaufbauten durchgeführt, die jeweils in der Probenkammer installiert werden.

Bei der **Transmissions-Zelle** befindet sich die Probe in einer infrarotdurchlässigen Küvette (BaF_2 oder CaF_2), die senkrecht zum einfallenden Messlicht liegt. Die Küvetten haben eine optische Weglänge von 5 – 10 μm (siehe Abb. 2.4-3). Die Einstellung der gewünschten Temperatur erfolgte über einen Thermostaten (*Julabo, FP30*; mit Ethanol als Kühlflüssigkeit), der mit einem temperierbaren Probenhalter verbunden ist.

Die Transmissions-Küvetten bilden ein abgeschlossenes Kompartiment, d. h. die Probe muss vor dem Verschließen der Küvette so manipuliert werden, dass sie bei den anschließenden Messungen im gewünschten Zustand vorliegt. Alle Transmissions-Experimente werden in Lösung durchgeführt. Ein Problem hierbei ist, dass sich Proteinabsorption und Wasserabsorption in einigen Bereichen überlagern. Um zu vermeiden, dass der lineare Bereich des Detektors verlassen wird, variiert man die Proteinkonzentration und die Schichtdicke der IR-Küvetten so, dass im beobachteten Bereich zwischen 2200 und 1000 cm^{-1} die optische Dichte den Wert 1 nicht übersteigt. Je höher die Proteinkonzentration ist desto besser, da mehr Wasser aus dem Strahlengang verdrängt wird.

In dieser Arbeit werden verschiedene Transmissions-Experimente durchgeführt, die sich hinsichtlich der Probenpräparation unterscheiden (siehe Kapitel 2.4.1.1) und in drei Gruppen einteilen lassen: CO-Fotolyse der vollreduzierten (4 Elektronen) und der halbreduzierten (2 Elektronen) CeO sowie fotoinduzierte Redox-Differenzexperimente.

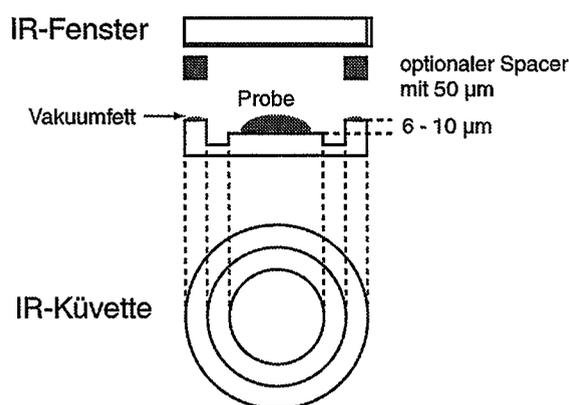


Abbildung 2.4-3 Schematische Darstellung einer IR-Küvette

Die *attenuated total reflection* (ATR)-Technik beruht auf dem Effekt, dass beim Übergang eines Lichtstrahls zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex an der Grenzfläche oberhalb eines kritischen Winkels Totalreflexion auftritt. Wie in Abb. 2.4-4 zu erkennen, koppelt man den IR-Strahl in einen infrarotdurchlässigen Kristall. Oberhalb des kritischen Winkels tritt an der Grenzfläche jeweils Totalreflexion auf, so dass der Lichtstrahl durch den Kristall geleitet wird. Am Ende verlässt der IR-Strahl den Kristall und wird in den Transmissions-Strahlengang zurückgeführt. Bei der abgeschwächten Totalreflexion kommt es zur Ausbildung einer evaneszierenden Welle in das angrenzende Medium. Die Eindringtiefe dieser Welle und damit auch die Stärke der Absorption ist abhängig von der Wellenlänge, den Brechungsindizes der Medien und dem Einfallswinkel. Mit Hilfe der letzten beiden Parameter lässt sich die Eindringtiefe der evaneszierenden Welle variieren. Für die Eindringtiefe d_p gilt:

$$d_p = \frac{\lambda}{\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \Theta - n_{21}^2}} \quad \text{mit } n_{21} = n_2/n_1$$

Bei einem Silizium/Wasser-Übergang ($n_{\text{Silizium}} = 3,42$ und $n_{\text{Wasser}} = 1,33$) und einem Einfallswinkel Θ von 50° ergibt sich eine Eindringtiefe von $\sim 0,4$ mal der Wellenlänge.

Bei unseren Versuchen wurde eine Micro-ATR-Zelle der Firma *Resultec* verwendet. Das interne Reflexionselement besteht aus Diamant und liefert 9 effektive Reflexionen. Wie man der Abb. 2.4-4 entnehmen kann, besteht die Möglichkeit, über einen Kühlkreislauf die Temperatur der Probe zu regulieren. Dabei wird wie beim Transmissions-Aufbau ein Thermostat genutzt.

Eine weitere Modifikation des ATR-Aufbaus wurde im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt. Zu diesem Zweck wird eine **Durchfluss-Zelle** auf den Kristall aufgesetzt. Durch diesen ergänzenden Aufsatz wird das Puffervolumen, welches die Probe überschichtet, auf ein Minimum herabgesetzt ($\sim 1\mu\text{l}$). Darüber hinaus kann man mit Hilfe eines Dreiwegeventils und einer Schlauchpumpe nicht nur die Pufferlösung kontinuierlich austauschen, sondern auch zwischen zwei verschiedenen Puffern wechseln. Zur Aufnahme eines Redox-Differenzspektrums muss folglich nicht mehr der Plexiglasschutzdeckel beim Austausch der Lösungen entfernt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Spektren unter einem kontinuierlichem Pufferstrom gemessen werden können (siehe Kapitel 3.3.2).

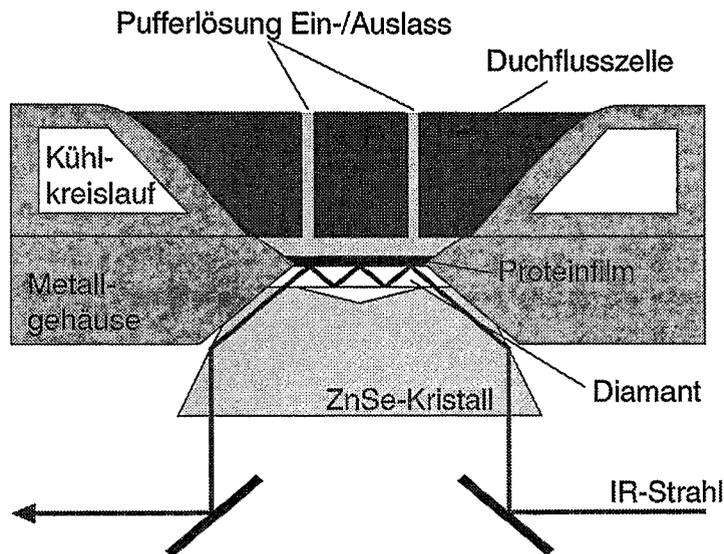


Abbildung 2.4-4 Schematischer Aufbau der Diamant-ATR-Zelle mit Durchflussaufsatz.

Für die zeitaufgelösten Fotolyse-Experimente und Fotoreduktions-Messungen wird ein Nd:YAG-Laser (*GCR 12s, Spectra Physics*) mit einer Grundwellenlänge von 1064 nm eingesetzt. Mit Hilfe eines KDP-Kristalls (SHG, *Spectra Physics*) werden die für unsere Experimente notwendigen Wellenlängen von 532 nm und 355 nm (Pulslänge etwa 10 ns) erzeugt. Den austretenden Laserstrahl koppelt man in einen flexiblen Quarz-Lichtleiter und kann über diesen je nach Versuchsaufbau die ATR-Zelle bzw. die Transmissions-Küvette erreichen.

2.4.3 Zeitaufgelöste Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie

Für die zeitaufauflösenden Messungen stehen zwei Verfahren zur Verfügung. Bei der **Rapid-Scan-Technik** werden die einzelnen Interferogramme nacheinander in bestimmten Zeitintervallen aufgenommen. Die Zeitauflösung wird hierbei begrenzt durch die Zeitspanne, die der bewegliche Spiegel benötigt, um ein komplettes Interferogramm aufzunehmen. Dieses Zeitintervall wird neben der Spiegelgeschwindigkeit durch die spektrale Auflösung bestimmt: Der Verfahrensweg des Spiegels steigt mit hö-

herer spektraler Auflösung und hat daher direkt eine Verringerung der zeitlichen Auflösung zur Folge. Mit den Standardeinstellungen von 200 kHz für die Spiegelgeschwindigkeit und einer spektralen Auflösung von $4,5 \text{ cm}^{-1}$ ergibt sich eine maximale Zeitauflösung von 30 bis 40 ms. Hierbei handelt es sich um ein Intervall, da der Spiegel etwa 10 ms benötigt, um ein komplettes Interferogramm aufzunehmen. Dieses hat allerdings zur Folge, dass die zeitliche Information innerhalb des Spektrums unscharf wird.

Ein großer Vorteil dieser Technik liegt darin, dass man mit einem Experiment mehrere Differenzspektren *eines* Funktionszyklus aufnehmen kann. Eine weitere Stärke dieses Verfahrens ist es, in einem vergleichbaren Zeitraum mehr Spektren mitteln zu können als mit der Step-Scan-Technik (siehe nächster Absatz). Dieses führt zu einem erheblich besseren Signal/Rausch-Verhältnis. Um es weiter zu verbessern, wurden in einer Messung bis zu 10.000 Experimente gemittelt. Weitere Verbesserungen ergeben sich durch Mittelung von mehreren Messungen. Die maximale Anzahl von gemittelten Spektren lag bei 100.000. Nachteilig bei der Rapid-Scan-Technik ist allerdings die geringe Zeitauflösung im Vergleich zur Step-Scan-Technik

Die **Step-Scan-Technik** ist gekennzeichnet durch eine schrittweise Aufnahme der Interferogrammpunkte (siehe Abbildung 2.4-5) (Barowy and Sakai, 1984; Sakai and Murphy, 1978). Dazu fährt der bewegliche Spiegel zu der Position, die dem ersten Interferogrammpunkt entspricht. Die Reaktion wird z. B. durch einen Laserblitz gestartet und die zeitliche Änderung des Signals am Detektor aufgezeichnet. Anschließend wird die nächste Spiegelposition angefahren, die Reaktion erneut gestartet und wieder gemessen. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die für ein vollständiges Interferogramm benötigten Punkte aufgenommen sind. Das Signal/Rausch-Verhältnis kann verbessert werden, indem man bei jeder Spiegelposition einige Zeitspuren mittelt. Nachdem die Messung beendet ist, wird der Datensatz, der aus einzelnen Zeitspuren bei der Spiegelposition x besteht, in Interferogramme zum Zeitpunkt t zusammengesetzt. Da während einer Step-Scan-Messung kein Datenaustausch zwischen dem Messrechner und dem Spektrometer stattfindet, ist die Anzahl der Datenpunkte durch den Speicher des internen 16 bit Analog/Digital-Wandlers (2 Mbyte) limitiert. Bei einer Interferogrammgröße von 1.000 Messpunkten ist es somit möglich, 1.000 Zeitspuren mit je 1.000 Zeitpunkten aufzunehmen. Die Zeitauflösung ist demzufolge nur durch den Detektor bzw. der nachgeschalteten Elektronik limitiert.

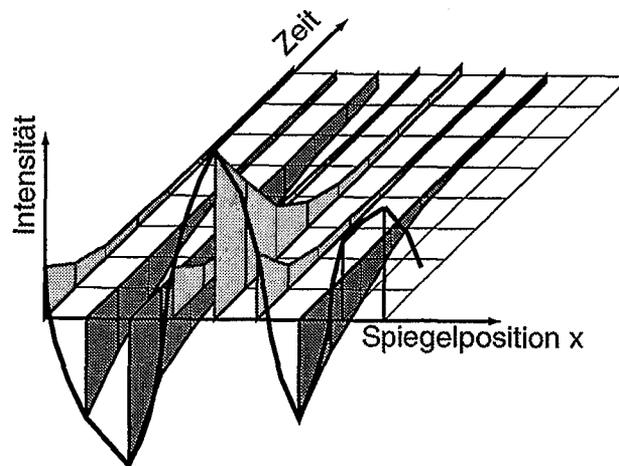


Abbildung 2.4-5 Prinzip der zeitaufgelösten Step-Scan-Technik. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Spiegelpositionen des beweglichen Spiegels dargestellt. Die z-Achse repräsentiert die Intensität und die y-Achse die zeitliche Entwicklung der Interferogramme. Dargestellt ist nur ein Ausschnitt der gesamten aufgenommenen Matrix.

Bei allen Step-Scan-Messungen wird der spektrale Bereich durch Breitbandfilter der Firma *OCLI* (*Optical Coating Laboratory, Inc.*; bezogen über *Lot-Oriel, Langenberg*) eingeschränkt. Es wird entweder zwischen 950 und 1950 cm^{-1} (im weiteren „Amid-Bereich“ genannt) oder 1600 und 2300 cm^{-1} (im weiteren „CO-Bereich“ genannt) gemessen. Zusammen mit der Standardauflösung von $4,5\text{ cm}^{-1}$ ergibt dies eine Interferogrammgröße von < 1.000 Punkten. Ein weiterer Vorteil der Breitbandfilter ist, dass die Intensität des Messlichts im interessanten Spektralbereich erhöht werden kann. Durch die Einschränkung des Messbereichs sinkt die Intensität des *centerbursts*⁴ im Interferogram. Mit Hilfe einer Apertur kann die Intensität wieder soweit erhöht werden, dass der dynamischen Bereich des Detektors voll ausgeschöpft wird. Dieses führt zu einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis.

Die Anzahl und die Abstände der Zeitpunkte können nun intern mit der *Opus* Software auf einer linearen Zeitachse (Standard: 1.000 Zeitpunkte) oder extern durch einen programmierbaren Frequenzgenerator (*Wavetek model 39*) auf einer quasi-logarithmischen Zeitachse (Bolwien, 2001) gewählt werden. Mit einer Zeitauflösung des MCT-Detektors von $5\text{ }\mu\text{s}$ und 1000 äquidistanten Zeitpunkten überdeckt man ein Zeitintervall von 5 bis $5000\text{ }\mu\text{s}$. Durch Änderung der max. zeitlichen Auflösung z. B.

⁴ Hierbei handelt es sich um das Intensitätsmaximum des Interferograms.

auf 100 μs lässt sich das betrachtete Zeitintervall auf 0,1 bis 100 ms verschieben. Der Nachteil besteht allerdings darin, dass man zwei Messungen durchführen muss, um ein Zeitintervall von 5 μs bis 100 ms abzudecken. Mit der quasi-logarithmischen Zeitachse kann man dagegen den Bereich von 7 μs bis 100 ms mit einer Messung abdecken.

Die Synchronisation der Experimente erfolgt dadurch, dass ein TTL-Puls vom Spektrometer zum Laser und zum AD-Wandler gesendet wird, was den Zeitnullpunkt der Messung definiert. Von diesem Zeitpunkt an werden alle Signale aufgenommen und als Einkanalspektren abgespeichert. Der Laser braucht einige Zeit, bis der Laserpuls ausgesandt wird (etwa 100 μs). Bei einer Zeitauflösung von 5 μs auf einer linearen Zeitachse hat dies zur Folge, dass etwa die ersten 20 Einkanalspektren vor dem Laserpuls aufgenommen werden und somit als Referenz dienen können. Misst man allerdings mit einer Zeitauflösung von 100 μs , so hat man praktisch nur ein Referenzspektrum zur Verfügung. Dies wird umgangen, indem man den ausgesandten TTL-Puls zum Laser um 2 ms verzögert, was dazu führt, dass man wiederum etwa 20 Referenzspektren erhält. Da die Triggerung des Lasers über die Blitzlampen erfolgt, die Energie aber über den *Q-Switch-Delay* eingestellt wird, kann es zu einer Veränderung des Zeitnullpunkts kommen. Aus diesem Grund muss man den Zeitnullpunkt bei der Auswertung der Daten genau bestimmen (siehe Kapitel 2.4.5).

2.4.4 Probenpräparation und -charakterisierung

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, werden zwei verschiedene Messaufbauten genutzt. Die Probenpräparation für die Transmissions-Messungen unterscheidet sich erheblich von derjenigen der ATR-Messungen. Die bei der Probenpräparation verwendete CcO von *R. sphaeroides* wurde, wie im Kapitel 2.2 beschrieben, isoliert und gereinigt. Die Rinderherzoxidase wurde von H. Sigurdson und P. Brzezinski vom Institut für Biophysik an der Universität Göteborg, Schweden, zur Verfügung gestellt.

2.4.4.1 Transmission

Vollreduzierte, CO gebundene CcO

Beim letzten Schritt der Proteinreinigung wird die CcO mit dem Puffer gewaschen, der auch für die anschließenden Experimente benötigt wird. Alle Puffer enthalten 50

mM Phosphat, 100 mM KCl und 0,05 % n-Dodecyl- β -D-Maltosid, wobei der pH je nach Versuch variiert. Die pH-Kontrolle erfolgt jeweils direkt vor der Probenpräparation, so dass etwaige pH-Abweichungen durch den letzten Waschschrift überprüft werden können.

Zur Reduktion der Oxidase vermischt man 8 μ l der hochkonzentrierten Oxidaselösung (100 – 400 μ M) mit 2 μ l einer 250 mM Ascorbat- oder Dithionit-Lösung, so dass sich eine Endkonzentration von 50 mM Ascorbat bzw. Dithionit ergibt. Man muss darauf achten, dass durch Zugabe der Reduktionslösungen keine pH-Verschiebung stattfindet. Anschließend gibt man 4 – 8 μ l der reduzierten Oxidase-Lösung auf eine IR-Küvette (*L-Optik*), die dann in eine gasdicht verschließbare Probenkammer (siehe Abbildung 2.4-6) überführt wird. Bevor man die Kammer verschließt, können je nach Versuchsbedingungen wässrige Salzlösungen auf den Boden des Probenraums gefüllt werden, um zu verhindern, dass die Probe während der Präparation austrocknet. Nachdem die Probenkammer verschlossen ist, wird abwechselnd Vakuum gezogen und mit CO gespült (ca. 10 mal). Hierdurch wird erreicht, dass der Sauerstoff vollständig aus der Atmosphäre und den Lösungen entfernt wird, andernfalls würde die CcO unter Verwendung der Elektronen den Sauerstoff zu Wasser umwandeln. Die Probe verbleibt in dieser Atmosphäre (ca. 0,5 – 1 bar Überdruck CO) für 1 h. Nach dieser Inkubationszeit wird die Küvette durch ein entsprechendes IR-Fenster, was zu Beginn der Präparation ebenfalls in die Kammer eingebaut wird, innerhalb der CO-Atmosphäre verschlossen.

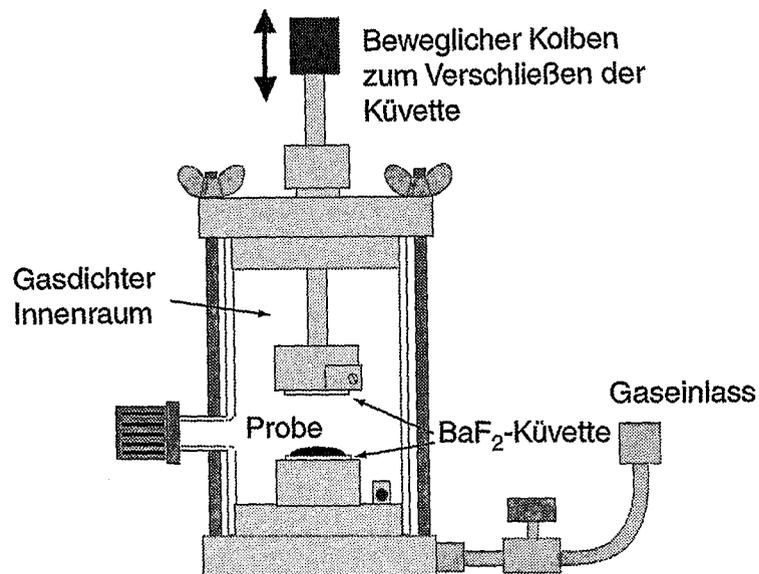


Abbildung 2.4-6 Schematische Darstellung der Anaerobenkammer (Sigurdson, 2001).

Vor jeder IR-Messung wird ein UV/Vis Spektrum aufgenommen (*Shimadzu, UV-2120PC*), um zu überprüfen, ob die CcO auch im vollreduzierten, CO gebundenen Zustand vorliegt. In der folgenden Abbildung (2.4-7 A) ist ein solches Spektrum dargestellt sowie die Spektren der oxidierten und der reduzierten Form. Die Absolutspektren entsprechen in Bezug auf ihre Maxima den in der Literatur beschriebenen Spektren (Vanneste, 1966). Im unteren Teil der Abbildung (2.4-7 B) erkennt man die entsprechenden Differenzspektren.

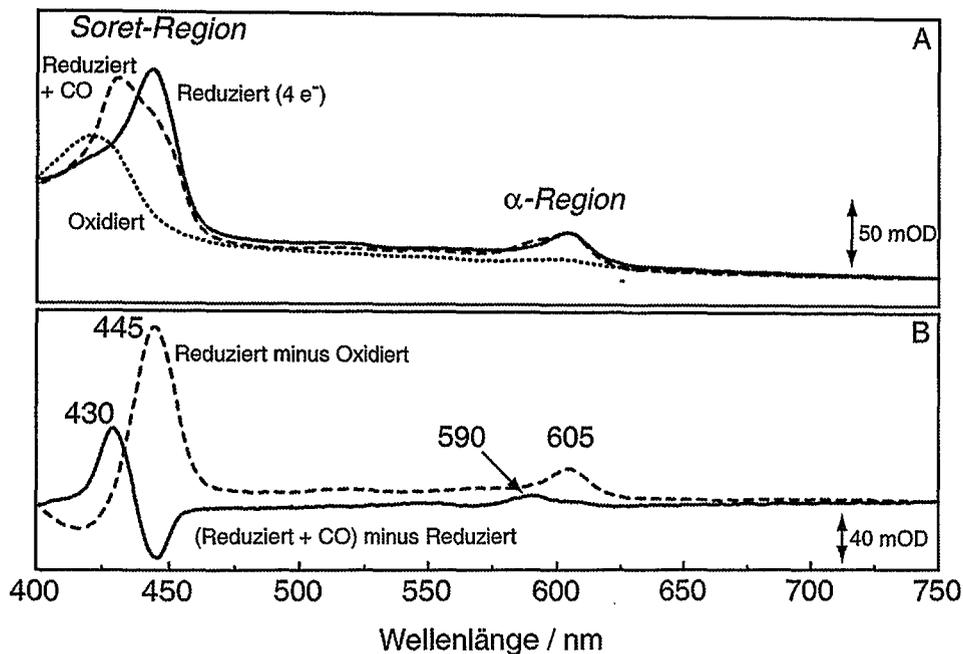


Abbildung 2.4-7 Dargestellt sind verschiedene Absolutspektren (A) und Differenzspektren (B) der CcO im UV/Vis-Bereich. Alle Absolutspektren wurden mit einer IR-Küvette mit 10 μm Weglänge aufgenommen.

Beim Übergang vom oxidierten in den reduzierten Zustand (Reduziert *minus* Oxidiert) erkennt man eine Rotverschiebung in der Soret-Region (γ -Region) von 420 nm (negative Bande) zu 445 nm (positive Bande) sowie die Entstehung einer Bande bei 605 nm in der α -Region. Grob lässt sich sagen, dass in der Soret-Region die Absorption zu je 50 % vom Häm a und Häm a_3 getragen wird. In der α -Region tragen Häm a 70 % und Häm a_3 30 % zur Absorption bei (Liao and Palmer, 1996). Durch die Bindung von CO an das Häm a_3 der vollreduzierten Oxidase ((Reduziert + CO) *minus* Reduziert) verschiebt sich ein Teil der 445 nm Bande zu 430 nm. In der α -Region ist die Verschiebung zu 590 nm (positive Bande) nur schwer zu beobachten, da Häm a_3 nur zu 30 % der Gesamtabsorption in diesem Bereich beiträgt.

Grundsätzlich können alle Spektren nur qualitativ beurteilt werden. Durch die Tatsache, dass es sich, wie oben schon erwähnt, bei der Transmissions-Küvette um ein abgeschlossenes System handelt, ist es schwierig, quantitative Aussagen über die einzelnen Zustände zu machen. Erhält man z. B. ein UV/Vis Spektrum, welches zeigt, dass die CcO nicht vollständig reduziert ist, so kann man keine weiteren Reduktionsäquivalente hinzufügen. Dieses wäre allerdings notwendig, um den exakten Prozent-

satz an unvollständig reduzierter CcO zu bestimmen. Da dieses aber nicht möglich ist, dienen die Absolutspektren somit als Negativkontrolle. Es werden nur die Proben für weitere Experimente genutzt, bei denen das Absolutspektrum dem korrekten Zustand entspricht.

Halbreduzierte, CO gebundene CcO

Die Präparation der halbreduzierten CcO (Cu_B und Häm a_3 sind reduziert; Häm a und Cu_A sind oxidiert) erfolgt ähnlich wie bei der vollreduzierten CcO und wurde erstmals von Greenwood et al. (Greenwood et al., 1974) beschrieben. Nach dem letzten Reinigungsschritt wird die CcO auf einer IR-Küvette in die Probenkammer gegeben, ohne vorher ein Reduktionsmittel hinzuzufügen. Nachdem abwechselnd Vakuum gezogen und mit CO gespült wurde, verbleibt die Probe für 5 min in der CO-Atmosphäre, bevor sie verschlossen wird. Dadurch dass CO und 2 OH⁻ zu CO₂ und H₂O reagieren, werden zwei Elektronen frei, die das binukleare Zentrum reduzieren (Sakai and Takahashi, 1996). Diese Reaktion ist stark pH-abhängig (Brzezinski and Malmstrom, 1985), was ebenfalls bei unseren Versuchen beobachtet werden konnte. Unsere Versuche werden bei zwei pH-Werten durchgeführt. Bei pH 6,5 dauert die Bildung des halbreduzierten Zustandes etwa 12 h, und der Zustand ist darüber hinaus über einen großen Zeitraum (> 48 h) stabil. Im Gegensatz dazu ist die Bildungsgeschwindigkeit bei pH 8,3 ($\pm 0,2$) erheblich beschleunigt (etwa 30 min), und nach etwa 4 h bei Raumtemperatur sind Teile der Proteinlösung mit drei oder vier Elektronen reduziert. Für die Messungen im IR benötigt man Proben, die über einige Stunden stabil sind. Um die Autoreduktion der Oxidase bei pH 8,3 zu verlangsamen, werden alle Messungen bei 5 °C durchgeführt. Dieses führt dazu, dass über 6 h keine Änderungen im UV/Vis-Spektrum erkennbar sind.

Vor und nach jedem IR-Experiment werden die Proben mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie überprüft, ob der halbreduzierte Zustand noch vorliegt. In Abbildung 2.4-8 sind zwei Differenzspektren dargestellt. Sie beschreiben die Absorptionsänderungen, die durch die Reduktion der Oxidase mit vier Elektronen (durchgezogene Linie) bzw. zwei Elektronen (gestrichelte Linie) und CO-Bindung hervorgerufen werden.

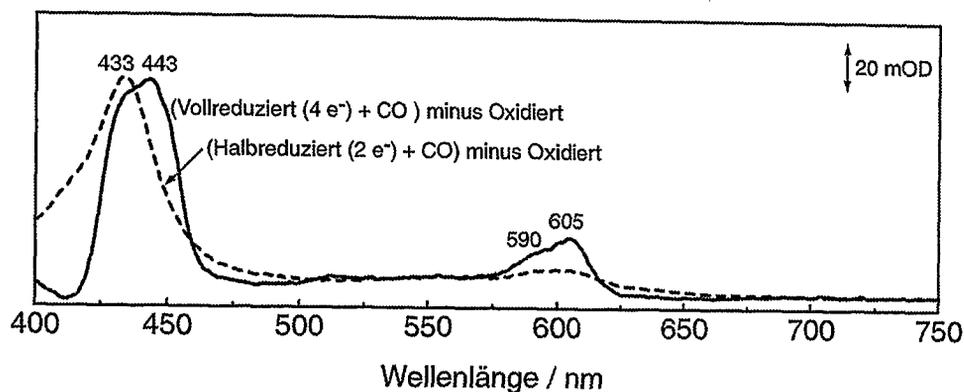


Abbildung 2.4-8 Dargestellt sind Differenzspektren der halbreduzierten, CO gebundenen CcO minus der oxidierten CcO (gestrichelt) sowie der vollreduzierten, CO gebundenen CcO minus der oxidierten CcO, im UV/Vis.

Man erkennt deutlich die Unterschiede zwischen den Differenzspektren. Da in der α -Region die Absorption zu 70 % vom Häm a getragen wird, ist hier die Änderung beim Übergang vom halbreduzierten (Häm a ist oxidiert) in den vollreduzierten Zustand (Häm a ist reduziert) besonders deutlich in Form einer starken Absorptionzunahme zu erkennen. Bei beiden Spektren sieht man in dieser Region eine Bande (Schulter) bei 590 nm, die man der Bindung von CO an das reduzierte Häm a_3 zuordnet. In der Soret-Region gibt es im halbreduzierten Zustand nur eine Bande bei 433 nm, die dem reduzierten, CO gebundenen Häm a_3 zuzuordnen ist. Beim Übergang in den vollreduzierten Zustand stellt man eine zweite Bande bei 443 nm fest, die durch die Reduktion von Häm a entsteht. Weiterhin kann man im halbreduzierten Zustand bei 420 nm eine Schulter nachweisen, der im vollreduzierten Zustand eine negative Bande entgegensteht. Das bedeutet, dass bei der Präparation der halbreduzierten CcO zum Zeitpunkt der Aufnahme des Spektrums noch Teile der Oxidase-Moleküle oxidiert waren. Dieser Zustand wurde nicht nur billigend in Kauf genommen, da CO nur an das reduzierte Häm a_3 bindet und somit das oxidierte Molekül nicht in einem CO-Fotolyse-Experiment sichtbar wird, sondern war beabsichtigt, da aufgrund der Redoxpotentiale zunächst alle Häm a_3 Zentren reduziert werden und danach erst Häm a. Somit wäre eine kleine Population oxidierten CcO ein Indikator dafür, dass es noch kein reduziertes Häm a gibt. Es wurde somit bei der Kontrolle des halbreduzierten Zustandes auf drei Punkte geachtet:

- Die Absorption bei 605 nm soll nicht die Absorption bei 590 nm übersteigen.
- Keine Schulter bei 443 nm.

- Absorption bei 420 nm.

Jeder dieser Punkte für sich ist nur ein schwacher Hinweis auf den halbreduzierten Zustand. Alle Punkte zusammen ergeben allerdings die Möglichkeit zu unterscheiden, ob die Probe im halbreduzierten oder in einem mit drei (bzw. vier) Elektronen reduzierten Zustand vorliegt!

Eine weitere Möglichkeit, den Oxidationszustand der Redoxzentren zu unterscheiden, liegt in der Analyse der FeCO-Streckschwingung im IR. Elektrochemische Titratio-
nen, die im UV/Vis und im IR gleichzeitig beobachtet wurden, haben gezeigt, dass die FeCO-Streckschwingung redox-sensitiv ist (Dodson et al., 1996). Für die Rinderherzoxidase wurde eine Verschiebung von $1965,5 \text{ cm}^{-1}$ zu $1963,3 \text{ cm}^{-1}$ beim Übergang vom halbreduzierten in den vollreduzierten Zustand beschrieben.

In Abbildung 2.4-9 erkennt man, dass bei unseren Experimenten mit der bakteriellen CcO ebenfalls eine Verschiebung von etwa zwei Wellenzahlen beim Übergang vom halbreduzierten (1967 cm^{-1}) in den vollreduzierten Zustand (1965 cm^{-1}) zu beobachten ist. Zur ergänzenden Kontrolle werden neben den sichtbaren Messungen zusätzlich Rapid-Scan-Experimente durchgeführt, um die Frequenz der FeCO-Schwingung und damit den Oxidationszustand der Redoxzentren bei gebundenem CO zu bestimmen.

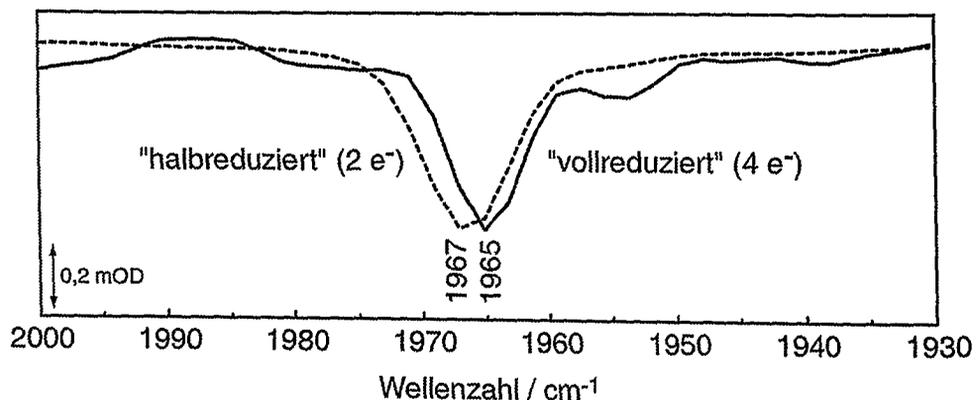


Abbildung 2.4-9 Dargestellt sind die CO-Banden eines Licht *minus* Dunkel Differenzspektrums der halb-
reduzierten (gestrichelt) und der vollreduzierten Oxidase. Die Spektren wurden 30 ms nach der CO-
Fotolyse mit Hilfe eines Rapid-Scan-Experiments aufgenommen. Versuchsbedingungen waren: 100 mM
KCl, 50 mM Phosphat, 0,05 % n-Dodecyl- β -D-Maltosid, pH 8,3 bei 5°C , sowie 50 mM Ascorbat im
Falle der vollreduzierten Oxidase.

Die Kombination aus sichtbarer und IR-Kontrolle ermöglicht es, den Zustand der Oxidase exakt zu bestimmen und eine genaue Unterscheidung zwischen vollreduziertem, CO gebundenem und halbreduziertem, CO gebundenem Zustand durchzuführen.

Fotoreduktion

Die Probenpräparation für die fotochemischen Experimente ist angelehnt an Lübben et al. (Lübben and Gerwert, 1996). Im Gegensatz zu den vorhergehenden Präparationen handelt es sich in diesem Fall um eine Präparation für nur *ein* Differenzexperiment.

Nach dem letzten Reinigungsschritt wird die Oxidaselösung mit einer Lösung, die 100 mM EDTA, 500 μ M Riboflavin und 50 mM Phosphat enthält, im Verhältnis 10:1 vermischt. Anschließend werden 4 – 6 μ l dieses Gemischs auf eine IR-Küvette gegeben und mit einem IR-Fenster verschlossen. Die Probe wird im UV/Vis vor und nach jedem Experiment überprüft.

Bei diesem Experiment handelt es sich um ein Redox-Differenzexperiment. Hierbei wird die CcO im oxidierten Zustand als Referenzspektrum gemessen und anschließend durch 100 Pulse des frequenzverdreifachten (355 nm) Nd:YAG Lasers fotoreduziert und erneut vermessen. Hierbei wird Riboflavin durch den Laserpuls in den ersten angeregten Zustand überführt und geht dann durch einen verbotenen Spinübergang (*Intersystem crossing*) in einen Triplett-Zustand über. In diesem Zustand kann Riboflavin ein Wasserstoff von einem organischen Molekül (EDTA) abstrahieren. Dieses starke Reduktionsmittel ist dann in der Lage, ein Elektron auf die CcO zu übertragen (Lübben and Gerwert, 1996; Tollin, 1995). Da in unserem Fall EDTA in einem 200fachen Überschuss vorliegt, kann durch wiederholte Anregung des Riboflavins (100 Pulse) sichergestellt werden, dass die CcO in den vollreduzierten Zustand übergeht.

2.4.4.2 ATR

Für die ATR-Messungen wird die CcO – wie in Kapitel 2.3 beschrieben – in Proteoliposomen rekonstituiert. Danach gibt man 10 bis 30 μ l dieser Lösung auf das Reflexionselement der ATR-Zelle und verdampft unter einem leichten Stickstoffstrom das Lösungsmittel. Der getrocknete Film wird anschließend je nach Experiment mit einer geeigneten Pufferlösung rehydratisiert. Dadurch kommt es zum Eindringen von Was-

sermolekülen zwischen die Lipidschichten (Anschwellen). Die sinkende Absorption der Amid I Bande wird teilweise durch eine Wasserbande kompensiert. Dies gilt nicht für die Amid II Bande. Hier erkennt man deutlich die geringere Proteinabsorption, nachdem der Film rehydratisiert ist (siehe Abb. 2.4-10). Die Wechselwirkung der hydrophilen Diamantoberfläche mit den polaren Kopfgruppen der Lipide und der Lipide untereinander ist aber so stark, dass die CcO an der Oberfläche haften bleibt. Nach zwei bis vier Stunden ist dieser Vorgang beendet, so dass mit den Messungen begonnen werden kann.

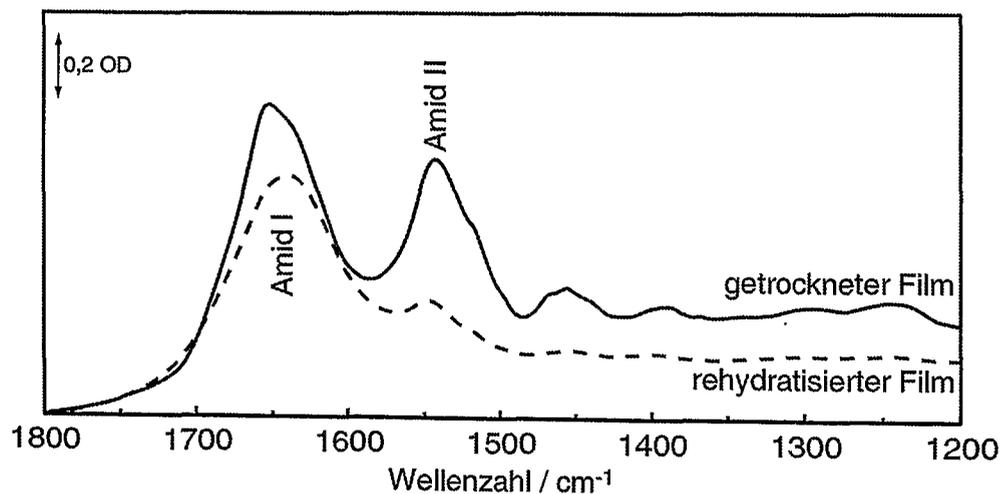


Abbildung 2.4-10 Absolutspektrum eines getrockneten (durchgezogene Linie) und eines rehydratisierten (gestrichelte Linie) Films der rekonstituierten CcO. Der getrocknete Film wurde mit einer wässrigen Lösung von 100 mM KCl, 50 mM Phosphat und pH 8 überschichtet.

2.4.5 Datenauswertung

Zur Datenanalyse der Step-Scan-Messungen wurde die Software *Matlab (Math-Works)* eingesetzt. Da die Step-Scan-Daten als Einkanalspektren vorliegen, müssen erst die Differenzspektren berechnet werden. Für ein Differenzspektrum zum Zeitpunkt t gilt:

$$\Delta A(t) = \log[I_R/I(t)]$$

$I(t)$ bezeichnet die Intensität des Einkanalspektrums zum Zeitpunkt t . Die Bestimmung des Zeitnullpunkts und damit auch die Anzahl der für die Mittelung der Referenz (I_R) verwendeten Einkanalspektren erfolgt durch Einsetzen verschiedener Werte.

Wie schon in Kapitel 2.4.3 erwähnt, wurden aus messtechnischen Gründen Messungen mit unterschiedlicher Zeitauflösung und in unterschiedlichen Wellenzahlenbereichen durchgeführt. Mit Hilfe von Matlab war es nun möglich, mehrere Experimente, die zur Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses durchgeführt wurden, zu mitteln und zusammenzufassen. Das Ergebnis ist eine Gesamtmatrix $\Delta A(v_m, t_n)$, wobei die Zeilen der zeitlichen Entwicklung bei einer Wellenzahl v_m und die Spalten einem Differenzspektrum zum Zeitpunkt t_n entsprechen. Diese Matrix beinhaltet anschließend die komplette spektrale und zeitliche Information.

2.4.5.1 Singulärwertzerlegung

Anschließend wird mit der so erhaltenen Gesamtmatrix eine Singulärwertzerlegung (SVD von: *singular value decomposition*) durchgeführt (siehe (Georgiadis et al., 1994; Thorgeirsson et al., 1991; Thorgeirsson et al., 1992)). Hierbei gilt, dass man diese Matrix als ein Produkt dreier Matrizen darstellen kann:

$$\Delta A(v, t) = U * S * V^T$$

Die Matrix U beinhaltet die orthonormierten Basisspektren und die Diagonalmatrix S die Singulärwerte (Gewichtungsfaktoren). Die Matrix V^T ist die transponierte Form der Matrix V und enthält die Zeitinformation. Für die Elemente der Matrix S gilt:

$$s_{1,1} > s_{2,2} > s_{3,3} > \dots > s_{n,n} \geq 0$$

Die Anzahl der Singulärwerte entspricht der Anzahl der linear unabhängigen Basisvektoren, die benötigt werden, um die Matrix ΔA darzustellen. Bei einer Messung ohne Rauschen entspräche der Rang der Matrix gerade der Anzahl der linear unabhängigen Basisvektoren. Da dieser Zustand bei realen Messungen allerdings nicht vorkommt, beschreiben die Basisvektoren mit hohen Indizes nur noch das Rauschen. Um die wesentlichen Bestandteile der Matrix ΔA darzustellen, benötigt man somit nicht alle Basisvektoren. Indem man die Matrix S_r bildet, für die gilt, dass alle Elemente mit dem Index $i > r$ gleich Null sind, erhält man eine Matrix, die um die Basisvektoren gekürzt ist, die nur das Rauschen beschreiben. Es gilt:

$$\Delta A_r = U * S_r * V^{-1}$$

Zur Beurteilung, welche Singulärwerte berücksichtigt werden und welche nicht, gibt es verschiedene Verfahren. Ein rein mathematisches Verfahren besteht in der Festlegung eines Abbruchkriteriums. Dies ist allerdings schwierig, da das Signal/Rausch-Verhältnis im beobachteten spektralen Bereich variiert. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Bestimmung der Anzahl signifikanter Basisvektoren besteht in einem Vergleich jeweils der Komponenten der U Matrix (spektrale Information) und der Komponenten der V Matrix (Zeitverläufe). Beim Vergleich der Spektren der U Matrix erkennt man solche Spektren, die nur noch Rauschen enthalten, daran, dass gerade in dem Bereich starke Signale zu erkennen sind, wo das Rauschen erwartungsgemäß am größten ist. Ein Beispiel hierfür ist die Amid I Region um 1660 cm^{-1} . Da in diesem Bereich durch die Absorption von Wasser und Protein die Anzahl der Photonen, die den Detektor erreichen, sehr gering ist, ist das Rauschen groß. Ein weiterer Bereich mit starkem Rauschen liegt um 1000 cm^{-1} , wo Wasser ($\sim 850\text{ cm}^{-1}$) und Phosphat ($\sim 1080\text{ cm}^{-1}$) absorbieren und darüber hinaus die Emission des Globar langsam nachlässt. Beim Vergleich der Zeitverläufe (V Matrix) muss man wissen, dass bei zyklischen Prozessen dieser wieder auf Null zurückgehen sollte. Man stellt allerdings fest, dass die Signale derjenigen Zeitverläufe, welche das Rauschen darstellen, mit zunehmendem zeitlichen Abstand nicht auf Null zurückkehren. Darüber hinaus erkennt man Schwingungen mit einer Frequenz von 50 Hz, die auf eine elektrische Störung hinweisen.

Die beschriebenen Hilfsmittel geben die Möglichkeit, ausreichend genau zu entscheiden, wieviele Basisvektoren notwendig sind. Im Zweifelsfall wurde eher eine Komponente mehr benutzt.

2.4.5.2 Exponentialanpassung

Die Anpassung der Daten erfolgt in erster Linie zur qualitativen Beschreibung der Ergebnisse und nicht zur detaillierten, kinetischen Analyse. Ein Ziel der exponentiellen Anpassung war es, den Einfluss von Parametern wie z. B. Änderungen des pH-Werts, der Temperatur oder der Salzkonzentration auf die Kinetik zu bestimmen. Eine weitere Aufgabe bestand darin, durch den Vergleich der Zeitkonstanten zweier Experimente zu entscheiden, ob die Probe in beiden Experimenten im selben Zustand war (siehe Kapitel 3.2.2).

Die Anpassung erfolgte mit *Matlab* parallel an die Zeitverläufe der V Matrix (A_j) nach folgender Gleichung (siehe (Bolwien, 2001)):

$$A_j = \sum_i a_{ji} \cdot e^{\frac{t}{\tau_i}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Blitzlichtfotolyse der vollreduzierten, CO gebundenen Cytochrom-c-Oxidase

Die Blitzlichtfotolyse der vollreduzierten, CO gebundenen CcO ermöglicht, Änderungen im binuklearen Zentrum (bZ) und seiner Umgebung mit hoher Zeitauflösung zu verfolgen. Im vollreduzierten Zustand bindet CO an das Häm a_3 . Durch einen Laserpuls lässt sich diese Bindung brechen. CO bindet nach der Fotolyse innerhalb von Pikosekunden an Cu_B , äquilibriert in Mikrosekunden mit CO in Lösung und kehrt anschließend in Millisekunden wieder an das Häm a_3 zurück (Raumtemperatur). Eine Vielzahl von Blitzlichtfotolyse-Experimenten wurde im UV/Vis und im IR unter verschiedensten Bedingungen durchgeführt (siehe (Einarsdottir, 1995) und die darin enthaltenen Zitate). Anhand der Experimente ergab sich folgendes kinetisches Modell:

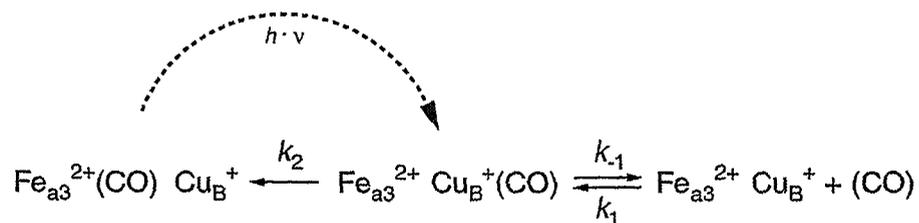


Abbildung 3.1-1 Schematische Darstellung eines Fotolyseexperiments mit vollreduzierter, CO gebundener Rinderherzoxidase. Bei Raumtemperatur und in CO gesättigter Lösung ist $k_2 = 1030 \text{ s}^{-1}$, $k_1 = 6,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_1 = 4,7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Einarsdottir et al., 1993; Woodruff et al., 1991).

Zeitaufgelöste Fotolyse-Experimente wurden im IR in der Vergangenheit aufgrund der schwierigen Probenpräparation nur im CO-Bereich durchgeführt, da hier das Protein selbst nicht absorbiert und somit Proben mit einer bis zu fünffach größeren optischen Dichte eingesetzt werden konnten als im Amid-Bereich (Dyer et al., 1994; Einarsdottir et al., 1993; Fiamingo et al., 1982; Sharrock and Yonetani, 1977; Woodruff et al., 1991). Neuere Versuche von Rost et al. haben erstmals gezeigt, dass es auch möglich ist, die Kinetik der CcO im Amid-Bereich zeitaufgelöst zu verfolgen (Rost et al., 1999). Die Versuche wurden allerdings mit der Rapid-Scan-Technik durchgeführt. Hierbei hat man zwar den großen Vorteil, schnell ein gutes Si-

gnal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, erkauft sich diesen aber durch eine geringe Zeitauflösung von 30 bis 40 ms (siehe auch Kapitel 2.4.3). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass man die Rückbindung des CO und die damit verbundenen Änderungen im Protein parallel verfolgen kann. Mit Hilfe der Step-Scan-Technik wurde die Zeitauflösung der Experimente im Vergleich zu bereits veröffentlichten Resultaten um etwa vier Größenordnungen auf 5 μ s verbessert. Sowohl die Rinderherzoxidase als auch die bakterielle CcO von *R. sphaeroides* wurden in Fotolyse-Experimenten untersucht. Die mit der Probenpräparation verbundenen Schwierigkeiten aufgrund des hohen Molekulargewichts der CcO im Vergleich zu bisher untersuchten Proteinen und der dadurch resultierenden stärkeren Absorption im Amid-Bereich wurden bereits beschrieben und veröffentlicht (Heitbrink et al., 2002).

3.1.1 Kinetik der vollreduzierten, CO gebundenen Rinderherzoxidase

Die Präparation der CcO erfolgt wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben mit einer Proteinkonzentration von $\sim 300 \mu\text{M}$. Die Datenaufnahme erfolgt in zwei verschiedenen spektralen Bereichen mit der Step-Scan-Technik bei einer Zeitauflösung von 5 bzw. 100 μ s auf einer linearen Zeitachse (siehe Kapitel 2.4.3).

Die folgende Abbildung 3.1-2 zeigt das Ergebnis der Fotolyse-Experimente. Dargestellt sind die Licht *minus* Dunkel Differenzspektren der Zeitpunkte: 10 μ s, 100 μ s, 1 ms, 10 ms und 100 ms nach der CO-Fotolyse. Die Datenaufnahme erfolgte in zwei Bereichen: dem CO-Bereich (A) und dem Amid-Bereich (B). Gut aufgelöst in der Abbildung A sind Banden bei 2062 und 1962 cm^{-1} . Die Bande bei 1962 cm^{-1} entspricht der Streckschwingung des am Häm a_3 gebunden CO ($\nu_{\text{CO-a}_3}$). Diese Bande ist negativ, da es sich um eine Grundzustandsbande handelt. Durch die Fotolyse wird die Bindung gebrochen. Mit fortschreitender Zeit kehrt das fotolysierte CO zum Häm a_3 zurück und die Differenz-Absorption sinkt. Mit Hilfe dieser Bande lässt sich also selektiv die Rückbindungskinetik des CO beobachten. Die zweite Bande bei 2062 cm^{-1} beschreibt die transiente Bindung von CO an Cu_B ($\nu_{\text{CO-Cu}_B}$) (Dyer et al., 1989). In der Abbildung B sind die durch die CO-Fotolyse induzierten Änderungen im Amid-Bereich dargestellt. Man erkennt eine Vielzahl von positiven und negativen Banden, die sowohl Häm- als auch Proteinschwingungen zuzuordnen sind. Die Analyse dieser Banden ist von besonderem Interesse bei der Aufklärung des Funktionszyklus, da mit Hilfe der IR-Spektroskopie in diesem Bereich Aussagen über einzelne AS getroffen

werden können. Aufgrund der Komplexität der CcO sind bis heute nur wenige Banden eindeutig zugeordnet. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen befasst sich u. a. mit dem Versuch, durch Isotopenmarkierung (Behr et al., 2000; Behr et al., 1998) oder durch Punktmutationen (Hellwig et al., 1998; Lübben et al., 1999; Yamazaki et al., 1999) Banden zuzuordnen. Für den größten Teil der Differenzbanden besteht allerdings eine als vorläufig zu bezeichnende Zuordnung (siehe Anhang A).

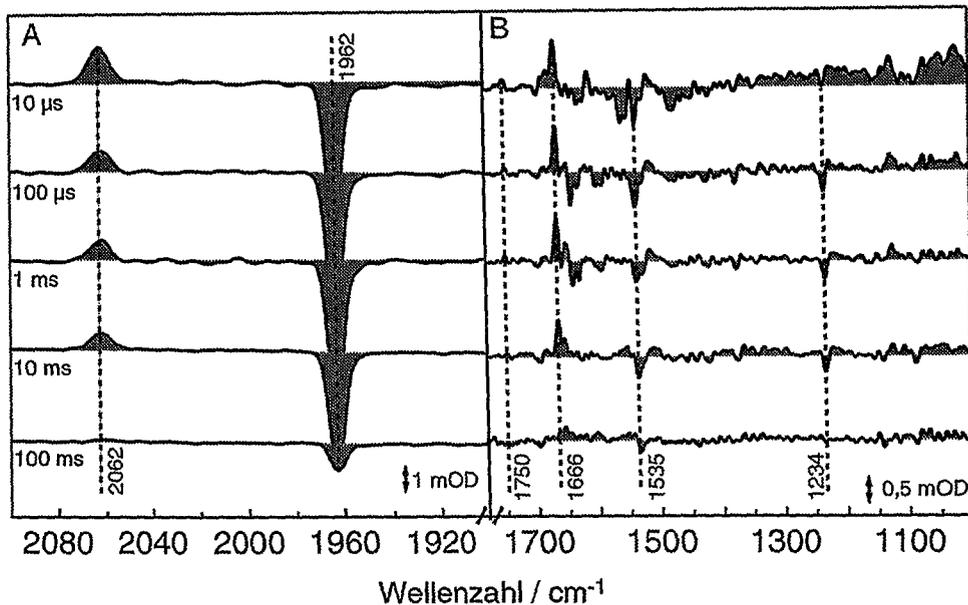


Abbildung 3.1-2 Zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektren der vollreduzierten, CO gebundenen Rinderherzoxidase, aufgenommen mit der Step-Scan-Technik nach den angegebenen Zeiten. Dargestellt sind der CO-Bereich (A) und der Amid-Bereich (B). Versuchsbedingungen: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8,6, 100 mM Phosphat, 0,05 % DDM und 40 mM Ascorbat. Zur besseren Übersicht sind die Spektren mit einem konstanten Offset versehen. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses werden bei jeder Spiegelposition 10 Experimente koadiert. Darüber hinaus wird bis zu 20 mal ein solches Experiment wiederholt.

Das erste Spektrum $10\text{ }\mu\text{s}$ nach der Fotolyse in Abbildung B zeigt, dass die Differenzbanden von einer breiten Untergrundabsorption überlagert werden. Diese Störung zeigt eine zeitliche Entwicklung und ist noch schwach im zweiten Spektrum ($100\text{ }\mu\text{s}$) bzw. nicht mehr im dritten Spektrum (1 ms) nachweisbar. Über die Ursache dieses Prozesses lässt sich nur spekulieren: Ein Temperatur-induziertes Differenzspektrum einer Pufferlösung (Daten nicht dargestellt) zeigt einen Verlauf, der vergleichbar mit dem Verlauf dieser Untergrundabsorption ist. Durch die Absorption des Laserpuls während eines Fotolyse-Experiments nimmt das Protein Energie auf, was zum Bruch der FeCO-Bindung führt. Überschüssige Energie wird durch Schwingungsrelaxation auf das umgebende Medium (Puffer) übertragen. Folglich wäre eine Deutung für die

breite Untergrundabsorption die transiente Erwärmung des Puffers. Ein weiterer Grund für dieses Phänomen könnte eine Kontinuumsbande sein. Delokalisierte Protonen in einem Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen zeigen breite Absorptionsbanden mit unterschiedlicher Intensität im Bereich von 2800 bis 800 cm^{-1} (Zundel and Merz, 1984). Die Struktur der Rinderherzoxidase (Tsukihara et al., 1995) und der CcO von *P. denitrificans* (Iwata et al., 1995) hat gezeigt, dass innerhalb des D-Kanals hochgeordnete Wassermoleküle vorhanden sind, die ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen bilden. Darüber hinaus sind in der hydrophoben Tasche zwischen E286 und dem bZ sehr wahrscheinlich auch Wassermoleküle lokalisiert (Hofacker and Schulten, 1998; Riistama et al., 1997). Diese bilden die Verbindung zwischen dem D-Kanal und dem bZ. Durch die Fotolyse kann es zu Veränderungen in den beschriebenen Netzwerken von Wasserstoffbrückenbindungen kommen, was eine weitere Möglichkeit darstellt, die breite Untergrundabsorption zu erklären.

Zur Trennung von Rausch- und Signalanteilen wird eine SVD-Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.5.1). Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung 3.1-3 gezeigt. Dargestellt sind in Teil A die ersten vier Komponenten der Matrix U, welche den ungewichteten Basisspektren entsprechen. Man erkennt, dass mit steigendem Index die spektrale Information abnimmt. Der zweite Teil der Abbildung (B) zeigt die ersten vier Komponenten der Matrix V (Zeitverläufe), gewichtet mit den entsprechenden Singulärwerten.

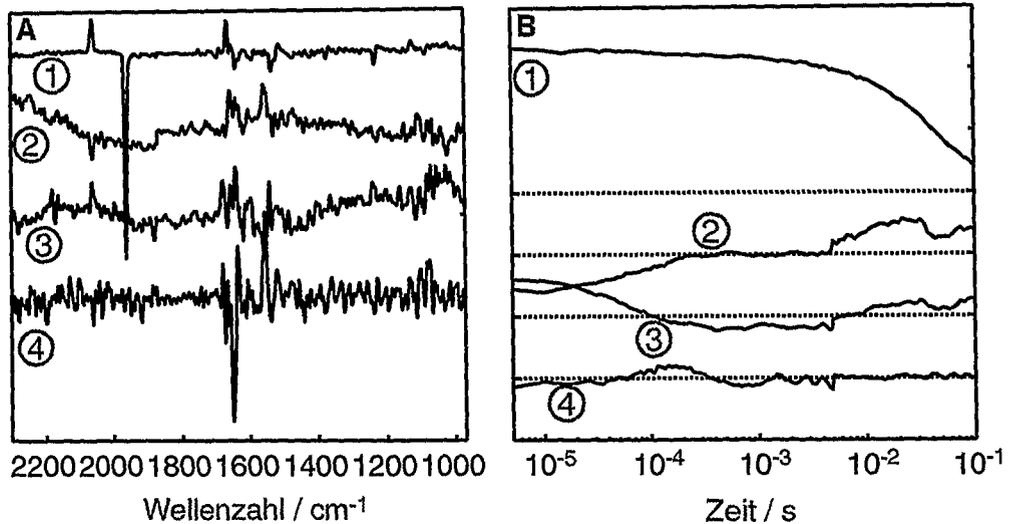


Abbildung 3.1-3 Ergebnisse der Singulärwertzerlegung der in Abb. 3.1-2 beschriebenen Daten. Dargestellt sind die Basisspektren (A) und die Zeitverläufe (B). Die Zeitverläufe sind mit den entsprechenden Singulärwerten gewichtet (S_1 : 0,1022; S_2 : 0,0153; S_3 : 0,0105; S_4 : 0,0043), deren Signifikanz mit steigendem Index abnimmt.

Anhand der Abbildung erkennt man, dass die 4. Komponente weder spektrale noch zeitliche Informationen enthält und somit nur noch das Rauschen repräsentiert. Besonders gut erkennt man dies daran, dass hier starkes Rauschen in dem Bereich zu sehen ist, wo die Absorption der Probe am größten ist. Die 1. Komponente beinhaltet sowohl in den Basisspektren als auch in den Zeitverläufen die meiste Information. Die Entscheidung, ob die 2. und 3. Komponente noch Informationen enthält oder hauptsächlich das Rauschen darstellt, ist schwieriger (siehe Kapitel 2.4.5.1). Man erkennt bei den Zeitverläufen der 2. und 3. Komponente, dass gerade im Mikrosekundenbereich noch Informationen vorhanden sind. Bei den entsprechenden Basisspektren sieht man ebenfalls noch spektrale Informationen, die zwar stark vom Rauschen überlagert werden, aber dennoch wichtig für die Auswertung sein könnten. Besonders die Untergrundabsorption im Basisspektrum der 2. Komponente ähnelt sehr der als transiente Erwärmung des Puffers oder einer Kontinuumsbande zugeordneten Störung. Da die SVD-Analyse diesen Prozess aber nicht vollständig von anderen spektralen Informationen trennen kann, muss diese Komponente bei der weiteren Auswertung ebenfalls berücksichtigt werden. Aus diesem Grund werden die ersten drei Komponenten zur weiteren Analyse genutzt.

Neben der Unterdrückung des Rauschens hat die SVD-Analyse den weiteren Vorteil, dass zur kinetischen Analyse nur die ausgewählten (in diesem Fall die ersten drei) Komponenten der Matrix V exponentiell gefittet werden müssen. Ohne die SVD-Analyse müssten alle Zeitverläufe der Rohdaten parallel angepasst werden. In der nächsten Abbildung 3.1-4 ist das Ergebnis der exponentiellen Anpassung (gestrichelte Linie) der ersten drei Komponenten der Matrix $S \times V$ (durchgezogene Linie) veranschaulicht.

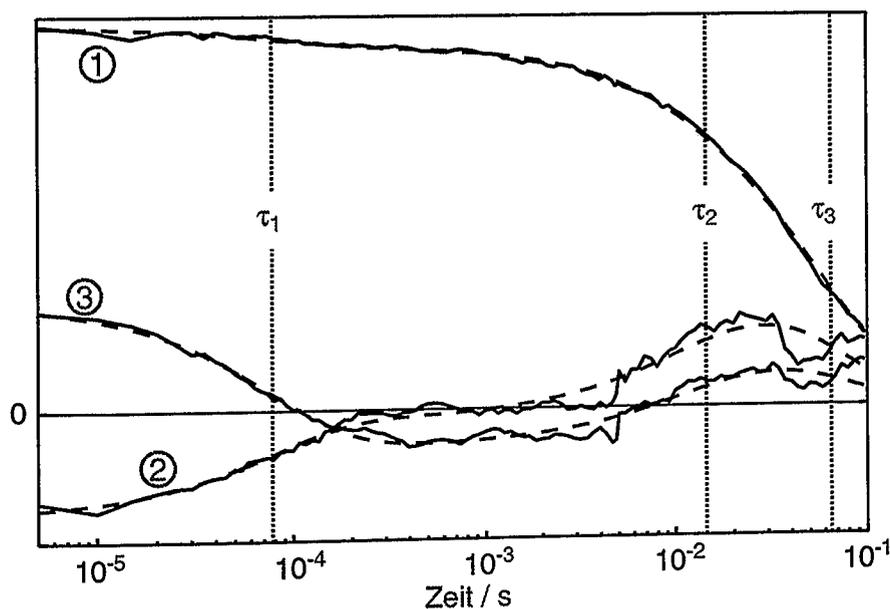


Abbildung 3.1-4 Globale Anpassung der ersten drei gewichteten Komponenten der Matrix V (durchgezogene Linie) aus der SVD-Analyse durch die Summe dreier Exponentialfunktionen (gestrichelte Linie). Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen siehe Text.

Die exponentielle Anpassung ergibt, dass drei Exponentialfunktionen nötig sind, um die Daten zu beschreiben. Die resultierenden Zeitkonstanten sind: $\tau_1 = 77,7 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 14,4 \text{ ms}$ und $\tau_3 = 64,8 \text{ ms}$.

Die hohe Selektivität der IR-Spektroskopie erlaubt es nun, solche Zeitverläufe zu betrachten und zu interpretieren, bei denen die Wellenzahl gezielt Änderungen einzelnen AS bzw. Kofaktoren zugeordnet werden kann. In der nächsten Abbildung sind die Zeitverläufe der Maxima einiger ausgesuchter Wellenzahlen gezeigt. Darüber hinaus ist die Summe der benötigten Exponentialfunktionen sowie die Beiträge der einzelnen Komponenten dargestellt. Ausgewählt wurden aus dem CO-Bereich die oben schon beschriebenen, sehr gut charakterisierten Banden $\nu_{\text{CO-CuB}}$ und $\nu_{\text{CO-a3}}$ bei

2062 bzw. 1962 cm^{-1} . Weiterhin sieht man zwei Banden aus dem Amid-Bereich bei 1750 und 1666 cm^{-1} , die zum einen der Streckenschwingung einer protonierten Glutaminsäure (E286) (Hellwig et al., 1998; Lübben et al., 1999; Yamazaki et al., 1999) zum anderen einer Formylschwingung (1666 cm^{-1}) einer der beiden Hämgruppen (Behr et al., 1998) zugeordnet worden sind. Bei den ausgewählten Banden handelt es sich um Signale, die sehr gut charakterisiert sind und zudem möglicherweise eine wichtige Rolle im Funktionszyklus spielen (siehe weitere Diskussion). Im Differenzspektrum der Abbildung 3.1-2 erkennt man eine große Anzahl weiterer Signale. Diese Banden zeigen ebenfalls eine zeitliche Entwicklung, deren Analyse aufgrund der nicht eindeutigen Zuordnung z. Z. von untergeordnetem Interesse ist. Nichtsdestoweniger kann in Zukunft bei fortschreitender Bandenzuordnung die Information dieser Differenzsignale von großer Wichtigkeit sein.

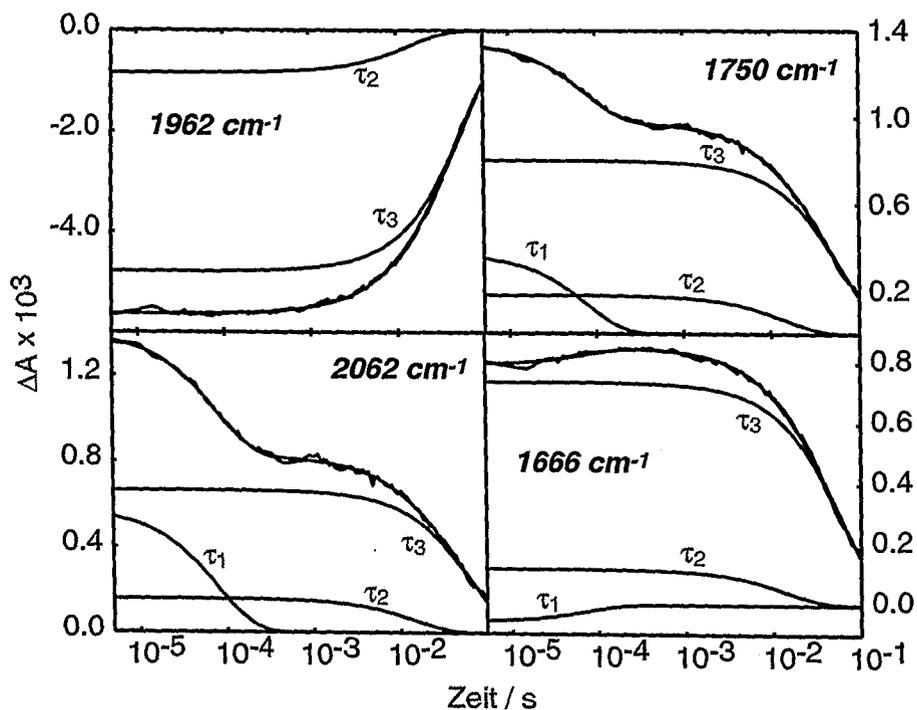


Abbildung 3.1-5 Zeitverläufe ausgesuchter Wellenzahlen (durchgezogene Linie). Darüber hinaus sind die Ergebnisse der globalen Anpassung gezeigt: Summe der benötigten Exponentialfunktionen sowie die Beiträge der einzelnen Komponenten.

Anhand der Amplituden der Exponentialfunktionen sieht man, dass die Rückbindung des CO an das Häm a_3 (1962 cm^{-1}) zum größten Teil durch die langsamste Geschwin-

digkeitskonstante (τ_3) beschrieben wird. Unter der Annahme, dass bei der Probenpräparation ein CO Überdruck von 1 bar herrscht, stimmt diese Zeitkonstante mit Literaturwerten gut überein (Sharrock and Yonetani, 1977). Ein geringer Beitrag der Exponentialfunktion mit der Zeitkonstante τ_2 ist bei allen betrachteten Zeitverläufen mit fast identischer Amplitude vorhanden. Der Ursprung dieser Zeitkonstante ist vermutlich zu einem großen Teil auf die oben schon diskutierte zeitliche Änderung der Untergrundabsorption zurückzuführen. Man erkennt anhand der Abbildung 3.1-2, dass dieser Prozess eigentlich schneller zerfällt als durch die Zeitkonstante τ_2 beschrieben. Da die SVD-Analyse diesen Vorgang allerdings nicht eindeutig trennen kann, beschreibt die Zeitkonstante τ_2 vermutlich mehrere Prozesse. Die beobachteten Änderungen der Formylschwingung (1666 cm^{-1}) lassen sich ebenfalls im Wesentlichen durch τ_3 beschreiben mit kleineren Beiträgen der Geschwindigkeitskonstanten τ_2 und τ_1 . Die kinetische Beschreibung der transienten Bindung von CO an Cu_B (2062 cm^{-1}) sowie der Zeitverlauf bei 1750 cm^{-1} , welcher auf eine strukturelle Änderung in der Umgebung von E286 hinweist, lassen sich durch die Geschwindigkeitskonstanten τ_1 und τ_3 beschreiben mit nur geringem Beitrag von τ_2 . Dieses führt zu dem Schluss, dass zwischen der Ligandenbindung an Cu_B und den Änderungen bei einer Aminosäure am Ende des D-Kanals (E286) eine dynamische Verbindung besteht (Heitbrink et al., 2002).

3.1.2 Kinetik der vollreduzierten, CO gebundenen CcO von *R. sphaeroides* und Vergleich mit der Rinderherzoxidase

Um einen Vergleich der Rinderherzoxidase mit der bakteriellen CcO durchzuführen, wurden Blitzlichtfotolyse-Experimente mit der vollreduzierten, CO gebundene CcO von *R. sphaeroides* durchgeführt. Die Experimente erfolgten im Gegensatz zu den Experimenten an der Rinderherzoxidase bei $5\text{ }^\circ\text{C}$ mit einer geringeren Zeitauflösung von $100\text{ }\mu\text{s}$. Die experimentellen Bedingungen sind ansonsten identisch. Jeweils vor und nach den Versuchen wird anhand eines UV/Vis Spektrums kontrolliert, ob die Probe noch im vollreduzierten, CO gebundenen Zustand vorliegt.

Die folgende Abbildung 3.1-6 zeigt das Ergebnis dieser Experimente. Dargestellt sind die Licht *minus* Dunkel Differenzspektren $100\text{ }\mu\text{s}$, 1 ms , 10 ms und 100 ms nach der CO-Fotolyse. Die Daten sind zusammengesetzt aus Messungen im CO- und Amid-Bereich.

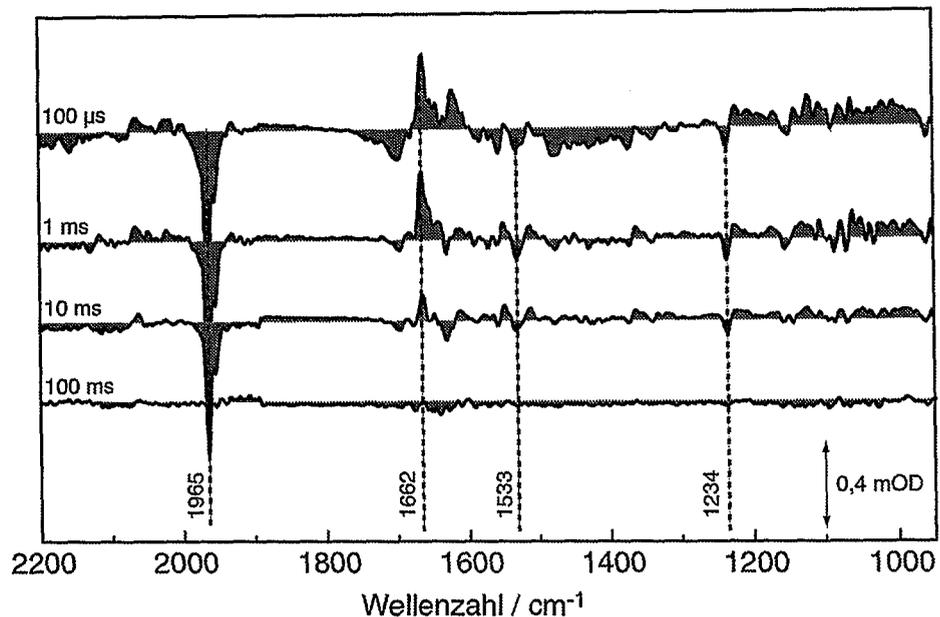


Abbildung 3.1-6 Zeitaufgelöste FTIR-Differenzspektren der vollreduzierten, CO gebundenen CcO von *R. sphaeroides* (~300 μM), aufgenommen mit der Step-Scan-Technik nach den angegebenen Zeiten. Versuchsbedingungen: 5 $^{\circ}\text{C}$, pH 8,6, 100 mM Phosphat, 0,05 % DDM und 40 mM Ascorbat. Zur besseren Übersicht sind die Spektren mit einem konstanten Offset versehen.

Aufgrund der geringeren Zeitauflösung, der höheren Temperatur und des schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis erkennt man im CO-Bereich nicht die transiente Bindung des CO an das Cu_B bei ca 2062 cm^{-1} . Gut aufgelöst ist dagegen die Bande der CO-Streckschwingung bei 1965 cm^{-1} . Darüber hinaus erkennt man oberhalb des Rauschens Banden, welche eine zeitliche Änderung zeigen (1234 cm^{-1} , 1535 cm^{-1} und 1662 cm^{-1}). In der folgenden Abbildung 3.1-7 ist wiederum, wie schon in Abbildung 3.1-3, das Ergebnis der SVD-Analyse dargestellt. In A erkennt man die ersten fünf Basisspektren und in B die mit den entsprechenden Singulärwerten gewichteten Zeitverläufe. Anhand der folgenden Abbildung erkennt man, dass nur die 1. Komponente die zeitliche und spektrale Information enthält.

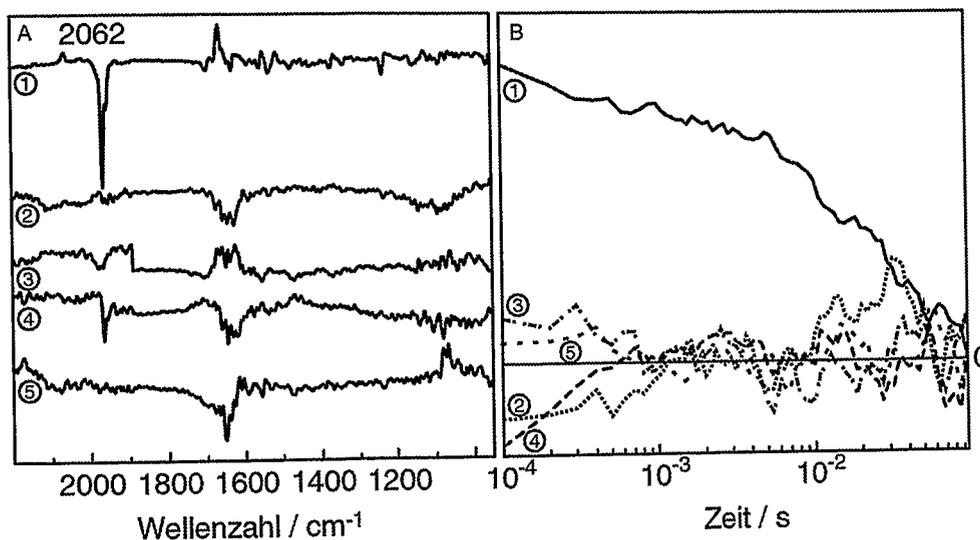


Abbildung 3.1-7 Ergebnisse der SVD-Analyse der in Abb. 3.1-6 beschriebenen Daten. Dargestellt sind die Basisspektren (A) und die Zeitverläufe (B). Die Zeitverläufe sind mit den entsprechenden Singulärwerten gewichtet (S_1 : 0,0125; S_2 : 0,0026; S_3 : 0,0016; S_4 : 0,0015; S_5 : 0,0012), deren Signifikanz mit steigendem Index abnimmt.

Das obere Spektrum der Abbildung 3.1-7 A verdeutlicht eine der Stärken der SVD-Analyse. Die transiente Bindung des CO bei der Rückbindung an Häm a_3 zeigt eine charakteristische Bande bei 2062 cm^{-1} . Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnis war dieses Signal nicht in den Rohdaten nachzuweisen (siehe Abbildung 3.1-6). Die Analyse der ersten Komponente der gewichteten Matrix V ergibt, dass zwei Exponentialfunktionen nötig sind, um die Daten anzupassen. Die erste, dominierende Exponentialfunktion hat eine Zeitkonstante von $\tau_1 = 38 \text{ ms}$, die zweite von $\tau_2 = 7,7 \text{ ms}$. Aufgrund der höheren Temperatur sind beide Zeitkonstanten im Vergleich zur Rinderherzoxidase verringert, liegen aber ebenfalls im Bereich von Literaturdaten anderer bakterieller CcO (Nicoletti et al., 1998). Sowohl bei der Rinderherzoxidase als auch bei der bakteriellen CcO konnten zwei Zeitkonstanten nachgewiesen werden, wobei die langsamere jeweils dominierend ist. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Umgebung beider bZ vergleichbar ist.

Ein Vergleich der Spektren zum Zeitpunkt $100 \mu\text{s}$ nach der Fotolyse der Rinderherzoxidase und der CcO von *R. sphaeroides* zeigt (Daten nicht dargestellt), dass beide Spektren vergleichbare Differenzbanden aufweisen. Einen wichtigen Unterschied findet man allerdings in der Region oberhalb von 1700 cm^{-1} . Hier sieht man bei der Rinderherzoxidase ein Bandenmuster, welches einer durch die Fotolyse induzierten Änderung von E286 zugeordnet wurde (siehe oben). Dieses Muster kann man nicht

bei der CcO von *R. sphaeroides* beobachten. Über die Ursachen hierfür lässt sich nur spekulieren. Es ist allerdings eindeutig und muss bei künftigen Analysen berücksichtigt werden, dass trotz der großen Homologie zwischen der Rinderherzoxidase und der CcO von *R. sphaeroides* es offensichtlich Unterschiede zwischen den Proteinen gibt.

3.2 Blitzlichtfotolyse der halbreduzierten Cytochrom-*c*-Oxidase von *R. sphaeroides* in Transmission

3.2.1 Wildtyp

Eine Möglichkeit, den Mechanismus der Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer aufzuklären, ist, die Kinetik der CcO in verschiedenen Redox- und Protonierungszuständen zu untersuchen. Ein Mittel dafür ist die Durchführung von Blitzlichtfotolyse-Experimenten mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO (siehe Abbildung 3.2-1). Bei der Fotolyse des CO kommt es in diesem Zustand zu einer transienten Absenkung des Reduktionspotentials von Häm a_3 . Mit Hilfe der sichtbaren Spektroskopie wurden drei Zeitkonstanten beobachtet (Adelroth et al., 1995; Hallen et al., 1994; Oliveberg and Malmstrom, 1991). Die erste Zeitkonstante von 3 μs (τ_1) beschreibt den Elektronentransfer vom Häm a_3 zum Häm a . Anschließend erfolgt ein weiterer Elektronentransfer zwischen Häm a und Cu_A mit einer Zeitkonstante von 35 μs (τ_2). Der Anteil an reduziertem Häm a liegt bei 40 – 60 % in der ersten Phase und der des Cu_A bei unter 10 % in der zweiten Phase. In der dritten sogenannten „ms-Phase“ mit einer Zeitkonstante von etwa 1 ms (τ_3) findet ein weiterer Elektronentransfer von Häm a_3 zum Häm a statt.

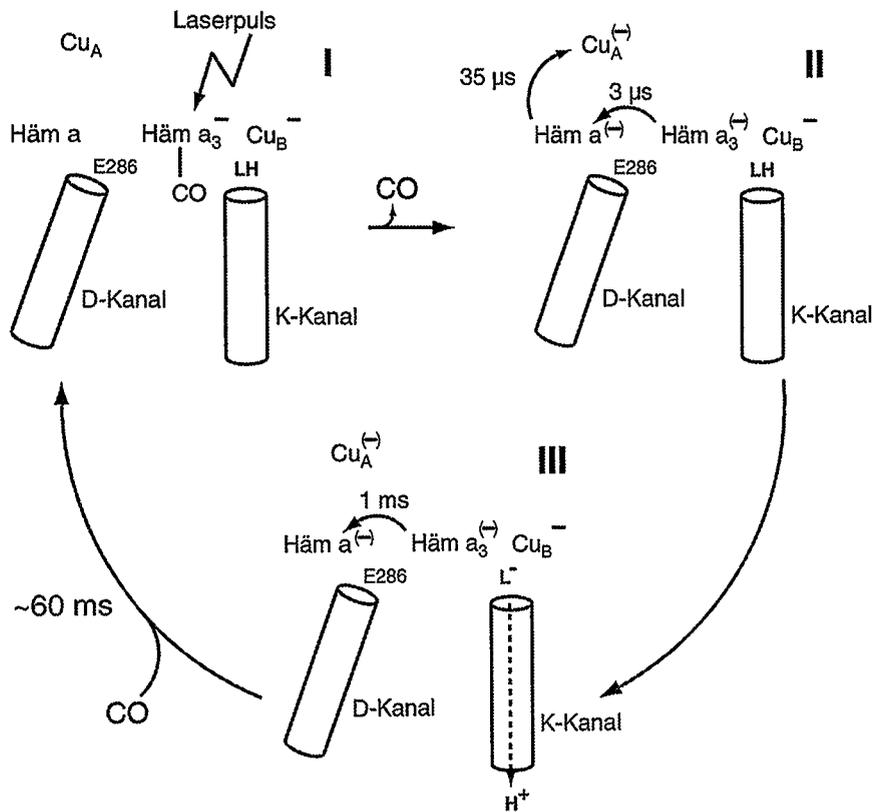


Abbildung 3.2-1 Schematische Darstellung eines Fotolyseexperiments mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO. Die in Klammern gesetzten Minuszeichen (-) im Zustand II und III verdeutlichen: (a) Es handelt sich hierbei nur um *ein* Elektron, welches zu Beginn der Reaktion am Häm a_3 lokalisiert ist. (b) Dieses Elektron ist zu unterschiedlichen Prozentsätzen auf die drei Redoxzentren (Cu_A , Häm a und Häm a_3) verteilt.

In der folgenden Abbildung ist ein Fotolyse-Experiment mit der halbreduzierten CcO von *R. sphaeroides* dargestellt.

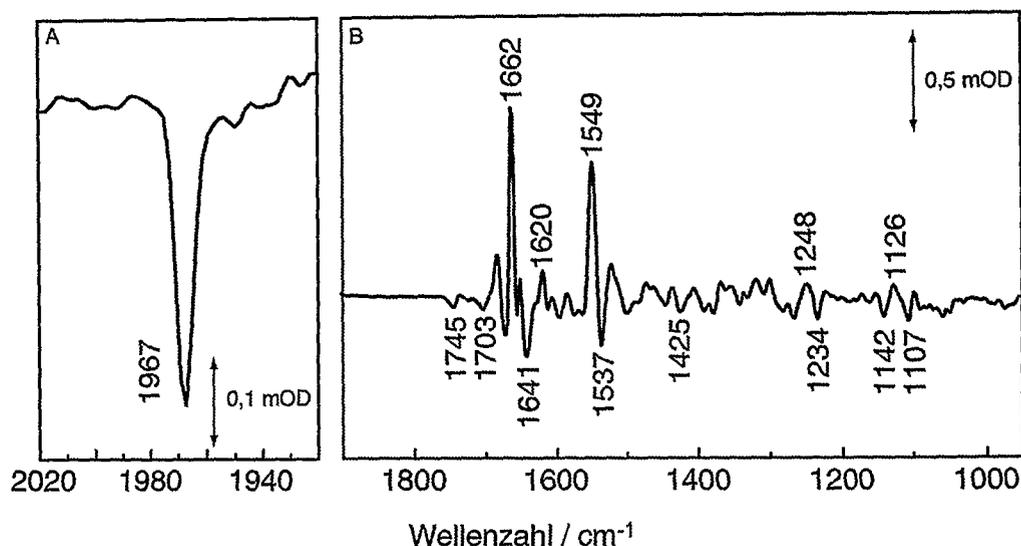


Abbildung 3.2-2 Darstellung eines Rapid-Scan-Differenzspektrums 30 – 40 ms nach der Fotolyse mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO im CO-Bereich (A) und Amid-Bereich (B). Alle Experimente wurden bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 8,5 durchgeführt. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnis wurden 30.000 Spektren gemittelt.

Das Differenzspektrum mit einer Zeitauflösung von $\sim 30 \text{ ms}$ zeigt die für den halbreduzierten Zustand typische Absorption der FeCO-Schwingung bei 1967 cm^{-1} (A). Im Amid-Bereich (B) erkennt man eine große Anzahl weiterer Banden. Die Frequenzverschiebung der FeCO-Schwingung um zwei Wellenzahlen stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Verschiebungen der Rinderherzoxidase (Dodson et al., 1996) und der CcO von *P. denitrificans* (Rost et al., 1999) für den halbreduzierten Zustand überein. Die Differenzbanden im Amid-Bereich sind aufgrund der wenig fortgeschrittenen Bandenzuordnung nur schlecht charakterisiert. Vergleiche mit der vollreduzierten CcO (siehe nächstes Kapitel und Anhang A) und Experimenten mit Mutanten (siehe Kapitel 3.2.3) ergeben allerdings die Möglichkeit, einige Signale zuzuordnen.

3.2.2 Vergleich der vollreduzierten und der halbreduzierten Cytochrom-c-Oxidase

Die Zeitauflösung eines Rapid-Scan-Experiments ist mit 30 – 40 ms erheblich geringer als die eines Step-Scan-Experiments. Sie reicht aber aus, um die Rereduktion des Häm a_3 und die damit verbundenen Änderungen im Protein zu verfolgen. Zur Verdeutlichung, dass die Rückbindung des CO an das Häm a_3 im halbreduzierten Zustand

erheblich länger dauert als im vollreduzierten Zustand, wurde ein Step-Scan-Experiment im CO-Bereich durchgeführt.

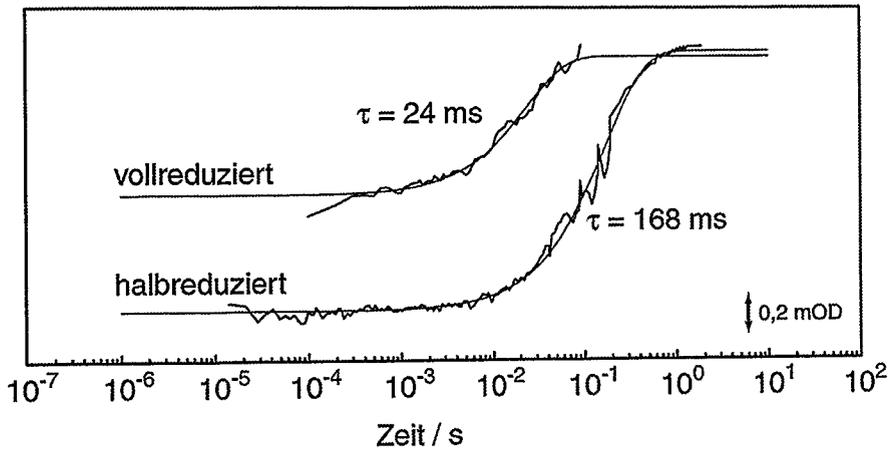


Abbildung 3.2-3 Dargestellt sind die Zeitverläufe der vollreduzierten und halbreduzierten, CO gebundenen CcO von *R. sphaeroides* bei 1965 bzw. 1967 cm^{-1} . Der Zeitverlauf der vollreduzierten CcO ist das Ergebnis eines Step-Scan-Experiments mit einer Zeitauflösung von 100 μs . Die halbreduzierte CcO wurde zusammengesetzt aus einem Step-Scan-Experiment mit logarithmischer Zeitachse und einem Rapid-Scan-Experiment. Versuchsbedingungen: 50 mM Phosphat, 100 mM KCl, pH 8,5 und 5 $^{\circ}\text{C}$.

Da CO nur an das reduzierte bZ bindet, ist die Rückkehr des CO an das Häm a_3 limitiert durch dessen Rereduktion. Die beiden Zeitverläufe wurden mit einer Exponentialfunktion angepasst mit dem Ergebnis, dass die Rückbindung des CO an die halb-reduzierte CcO ($\tau = 168 \text{ ms}$) etwa sieben mal langsamer ist als bei der vollreduzierten Oxidase ($\tau = 24 \text{ ms}$). Es muss darauf hingewiesen werden, dass es sich in diesem Fall nicht um eine detaillierte Analyse der Kinetik handelt und nur eine Exponentialfunktion verwendet wird. Dieses ist ausreichend für eine grobe Beschreibung der Zeitverläufe.

Für die weitere Auswertung wäre es somit von Vorteil, durch einen Vergleich von vollreduzierter, CO gebundener und halb-reduzierter, CO gebundener CcO Banden zu identifizieren, die bei einem Fotolyseexperiment bei einem Differenzspektrum erscheinen und in dem anderen nicht. Aus diesem Grund ist in der folgenden Abbildung jeweils ein Differenzspektrum der vollreduzierten, CO gebundenen bzw. halb-reduzierten, CO gebundenen CcO 30 – 40 ms nach der Fotolyse dargestellt.

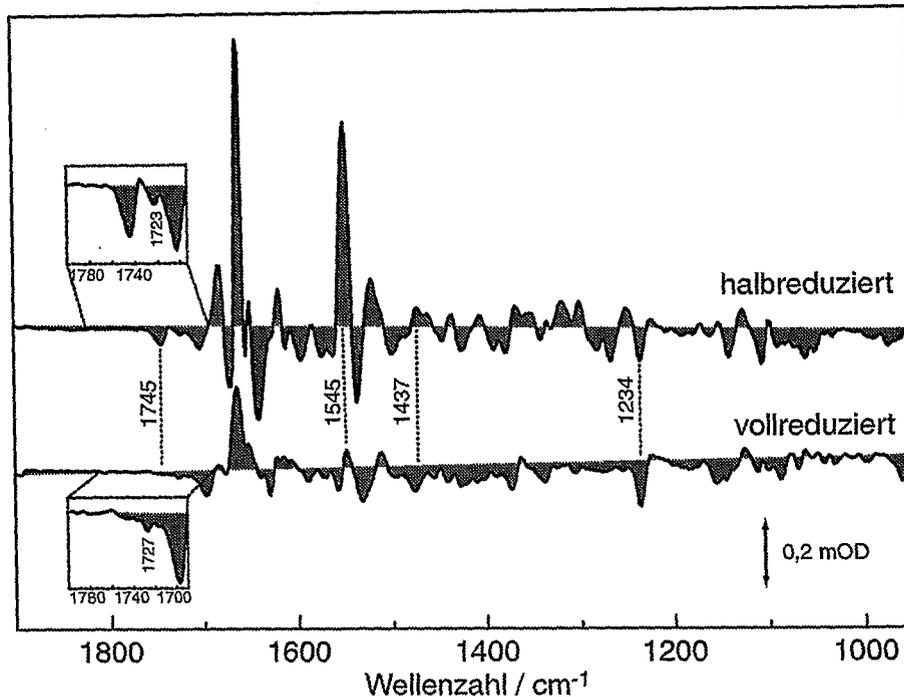


Abbildung 3.2-4 Vergleich der Experimente mit vollreduzierter, CO gebundener und halbreduzierter, CO gebundener CcO von *R. sphaeroides*. Die Differenzspektren sind 30 – 40 ms nach der Fotolyse gemessen. Beide Experimente wurden bei 5°C und pH 8,5 durchgeführt.

Man erkennt, dass einige Banden in beiden Spektren mit nahezu identischen Amplituden vorhanden sind (z. B. 1234 cm^{-1}). Aber auch Banden mit verschiedenen Vorzeichen (1437 cm^{-1}) und unterschiedlichen Amplituden (1545 cm^{-1}) sind zu beobachten. Im Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} sieht man einen signifikanten Unterschied in Form einer Differenzbande bei 1745 cm^{-1} , der nur bei der halbreduzierten CcO auftaucht. Diese Bande wurde vorher schon für die CcO von *P. denitrificans* beschrieben und dem Elektronentransfer vom Häm a zum Häm a₃ zugeordnet (Rost et al., 1999). Darüber hinaus haben Untersuchungen mit Mutanten gezeigt, dass diese Bande einer Schwingungsänderung⁵ von E286 zugeordnet werden kann (Hellwig et al., 1998; Lübben et al., 1999; Nyquist et al., 2001; Yamazaki et al., 1999).

⁵ Es handelt sich hierbei um die C=O Streckschwingung einer protonierten Carboxylgruppe.

3.2.3 Vergleich der halbreduzierten CcO des WT mit Mutanten

Abbildung 3.2-5 fasst die Ergebnisse der Rapid-Scan-Experimente mit den Mutanten E101D, E101C und E286D sowie dem WT zusammen. Bei Fotolyse-Experimenten mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO wird ein Elektronentransfer und damit gekoppelt eine Protonenaufnahme induziert. Demzufolge sind besonders solche Mutationen von Interesse, die in den Kanälen liegen. Kennzeichnend für die ausgewählten Mutanten ist der Austausch einer AS im D-Kanal (E286D) bzw. im K-Kanal (E101D und E101C) (siehe auch Anhang B). Dargestellt sind Licht *minus* Dunkel Differenzspektren mit einer Zeitauflösung von 30 – 40 ms. Alle Messungen wurden auf das negative CO-Signal (1967 cm^{-1}) der E286D Mutante skaliert. Der Skalierungsfaktor beträgt für den WT 2,8, für E101D 2,8 und für E101C 2,1.

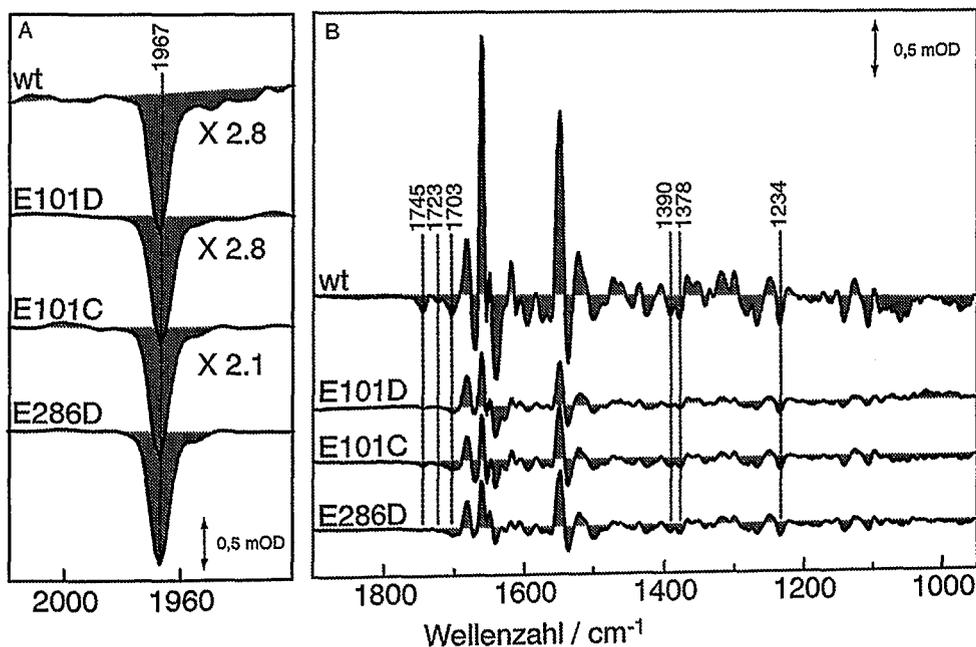


Abbildung 3.2-5 Darstellung von Rapid-Scan-Differenzspektren 30 – 40 ms nach der Fotolyse mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO von WT, E101D, E101C und E286D im CO-Bereich (A) und Amid-Bereich (B). Die Daten wurden im gesamten Bereich mit den angegebenen Skalierungsfaktoren auf das CO-Signal von E286D skaliert. Alle Experimente wurden bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ und pH 8,5 durchgeführt.

Man erkennt, dass die Differenzsignale der Mutanten im Amid-Bereich (B) erheblich kleiner sind als die Differenzsignale des WT. Eine mögliche Erklärung ist, dass nur ein geringerer Teil der Häm a_3 Moleküle an der Reaktion beteiligt ist. Normalerweise werden 40 – 60 % der Häm a_3 Gruppen während eines Blitzlichtfotolyse-Experiments

oxidiert. Es könnte also sein, dass bei den Mutanten weniger als 40 % der Häm a_3 Gruppen an der Reaktion teilnehmen. Dieses würde bedeuten, dass bei der Betrachtung des Differenzspektrums 30 – 40 ms nach der Fotolyse bei den Mutanten im Vergleich zum WT bereits mehr CO an Häm a_3 zurückgebunden ist. Dieses liegt darin begründet, dass die Zeitkonstante für die Rückbindung des CO im vollreduzierten Zustand erheblich schneller ist⁶. Es muss somit berücksichtigt werden, dass die durch die CO-Fotolyse bzw. Rückbindung induzierten Änderungen unabhängig vom Elektronentransfer und den damit gekoppelten Differenzsignalen sein können. Somit kann man durch die Skalierung auf das CO-Signal zwar die Änderungen, welche durch CO induziert werden, korrekt im Amid-Bereich skalieren, berücksichtigt aber möglicherweise nicht die Änderungen, die durch den Elektronentransfer hervorgerufen werden. Eine genaue Skalierung könnte man nur dann durchführen, wenn die im Differenzspektrum auftretenden Banden den unterschiedlichen Reaktionen (Elektronentransfer und CO-Rückbindung) zugeordnet werden. Bei der Auswertung der Daten muss folglich berücksichtigt werden, dass die Skalierung möglicherweise Fehler beinhaltet und es somit schwieriger ist, Aussagen über die Intensitäten einzelner Banden zu treffen.

Da die meisten Banden im Differenzspektrum noch nicht zugeordnet sind, liegt der Fokus der weiteren Analyse auf dem Bereich oberhalb 1700 cm^{-1} . Bei den in der folgenden Abbildung 3.2-6 dargelegten Daten handelt sich um ein und denselben Datensatz, einmal skaliert auf den CO-Peak (A) und zum anderen skaliert auf die Bande, welche dem Elektronentransfer zugeordnet wurde (1745 cm^{-1}).

⁶ Wichtig für die Bindung von CO an Häm a_3 ist, dass das bZ reduziert ist. Derjenige Anteil der Proteine, der bei einem Fotolyse-Experiment mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO keinen Elektronentransfer zeigt, verhält sich also in Bezug auf ihre CO Rückbindungskinetik wie die vollreduzierte CcO.

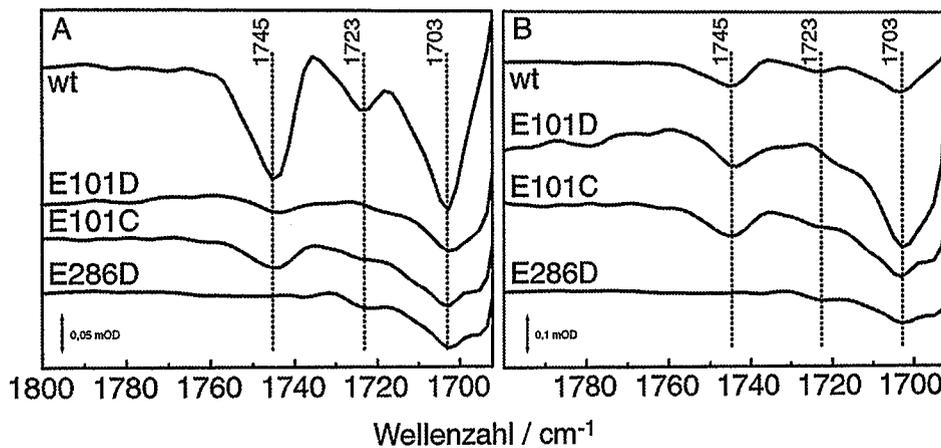


Abbildung 3.2-6 Dargestellt sind die Daten aus Abbildung 3.2-5 im Bereich $1800 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, einmal skaliert auf das CO-Signal der E286D Mutante (A) und einmal teilweise skaliert auf das negative Signal 1745 cm^{-1} des WT (B). Die Skalierungsfaktoren in A sind 2,8 für den WT, 2,8 für E101D und 2,1 für E101C. Die Skalierungsfaktoren in B sind 10 für E101D und 4 für E101C. Da bei der Mutante E286D dieses Signal nicht vorhanden ist, wurde keine Skalierung durchgeführt.

Die Abbildung verdeutlicht die Problematik bei der Interpretation der Daten. Das dominierende negative Signal des WT in Abbildung A bei 1745 cm^{-1} ist durch die Skalierung in Abbildung B weniger stark ausgeprägt. Es lässt sich allerdings feststellen, dass dieses negative Signal, welches im WT vorhanden und bei der E286D Mutante verschwunden ist, einer durch den Elektronentransfer induzierten Änderung bei E286 zuzuordnen ist. Ob es sich bei dieser Änderung um eine Deprotonierung von E286 handelt oder nur um eine Umgebungsänderung, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Redox-Differenzexperimente haben gezeigt, dass es sich in diesem Fall um eine Verschiebungsbande handelt und somit nur eine Umgebungsänderung beobachtet wird (Nyquist et al., 2001) und Kapitel 3.4.1). Allerdings bestand in diesem Fall das Bandenmuster auch aus einer negativen (1745 cm^{-1}) und positiven (1735 cm^{-1}) Bande. Darüber hinaus konnte man dieses Muster mit der E286D Mutante, wie erwartet zu niedrigeren Wellenzahlen ($-1738 \text{ cm}^{-1}/+1729 \text{ cm}^{-1}$) verschoben⁷, beobachten. Die Tatsache, dass man bei den Versuchen mit der halbreduzierten CcO weder bei den Mutanten E101D und E101C noch beim WT eine positive Bande bei 1735

⁷ Beim konservativen Austausch einer Glutaminsäure (E) gegen eine Asparaginsäure (D), kann die Funktion möglicherweise trotz Verkürzung der Seitenkette von der neuen AS übernommen werden. Durch die Verkürzung kommt es allerdings zu Umgebungsänderungen z. B. in Form von veränderten Wasserstoffbrückenbindungen, was einhergeht mit einer Verschiebung der Absorption der beobachteten C=O Schwingung.

cm^{-1} erkennt, deutet darauf hin, dass es sich in diesem Fall um eine Deprotonierung handelt. Ein weiterer Hinweis, dass es sich hierbei nicht um eine Verschiebungsbänder handelt, ist, dass bei der E286D Mutante kein verschobenes Bandenmuster mehr nachzuweisen ist. Es wäre somit möglich, dass trotz des konservativen Austauschs die Funktion (Deprotonierung) nicht durch eine um ein C-Atom verkürzte AS übernommen werden kann. Anhand der Daten kann man also mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass es sich hierbei um die Deprotonierung der AS E286 beim Übergang vom oxidierten in den reduzierten Zustand handelt. Diese Interpretation steht im Gegensatz zu den Ausführungen von Rost et al. (Rost et al., 1999).

Die Bande bei 1723 cm^{-1} ist weder bei E101C noch bei E101D zu erkennen. Dieses lässt darauf schließen, dass diese Bande möglicherweise durch die AS E101 hervorgerufen wird. Da man bei der E286D Mutante aber auch kaum eine Bande nachweisen kann, ist diese Aussage sehr spekulativ.

3.2.4 pH-Abhängigkeit

Der langsame Elektronentransfer zwischen Häm a_3 und Häm a mit einer Zeitkonstante von 1 ms ist im Gegensatz zu den beiden schnelleren Elektronentransfers ($\tau = 35 \mu\text{s}$ und $\tau = 3 \mu\text{s}$) stark pH-abhängig. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass dieser Schritt mit der Deprotonierung einer Gruppe L gekoppelt sein muss (Adelroth et al., 1995; Brzezinski and Malmstrom, 1987; Hallen et al., 1994) (siehe auch Abbildung 3.2-7). Aus diesem Grund wurden Rapid-Scan-Experimente mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO des WT und von Mutanten bei pH 8,5 bzw. 6,5 in Transmission durchgeführt.

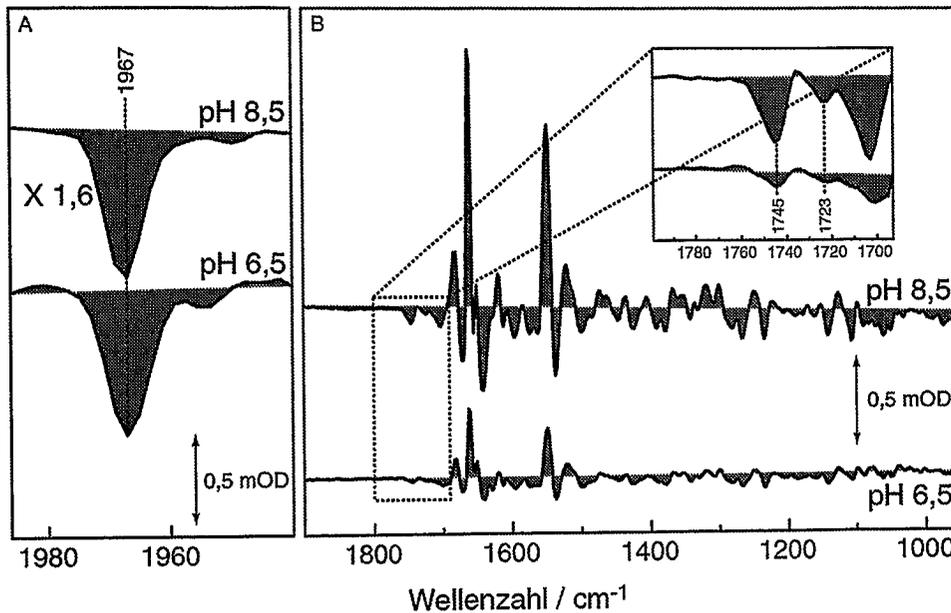


Abbildung 3.2-7 Rapid-Scan-Differenzspektren der halbreduzierten, CO gebundenen CcO von *R. sphaeroides* aufgenommen im CO-Bereich (A) und im Amid-Bereich (B). Versuchsbedingungen waren 100 mM KCl, 50 mM Phosphat bei pH 8,5 (obere Spektren) und bei pH 6,5 (untere Spektren) sowie 5 °C. Die Spektren in B sind mit dem in A angegebenen Faktor skaliert.

Bei gleichem Umsatz, d. h. bei Skalierung auf die CO-Bande, kann man wiederum beobachten, dass die Differenzsignale bei pH 6,5 im Amid-Bereich kleiner sind als bei pH 8,5. Die Zeitkonstante für die pH-abhängige ms-Phase hat ein Minimum bei pH 7 ($\tau_{3,pH7} = 0,5$ ms) und ein Maximum bei pH 10 ($\tau_{3,pH10} = 5$ ms) (Adelroth et al., 1995; Hallen et al., 1994). Für die Messungen mit einer Zeitauflösung von 30 – 40 ms bedeutet dies, dass bei pH 6,5 bereits mehr Elektronen zum Häm a_3 zurückgekehrt sind als bei pH 8,5, weshalb die Differenzsignale, welche dem Elektronentransfer zugeordnet werden können, bei pH 6,5 kleiner als bei pH 8,5 sind. Wie man in der Vergrößerung in Abbildung 3.2-7 B erkennt, ist die Amplitude der Bande bei 1745 cm^{-1} bei pH 8,5 erheblich größer als bei pH 6,5. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zeigt es sich auch hier, dass diese Bande eindeutig an den Elektronentransfer vom Häm a zum Häm a_3 gekoppelt ist.

Die Frage, ob es sich hierbei um eine Deprotonierungs- oder um eine Verschiebungsbande handelt, lässt sich nicht mit eindeutiger Sicherheit beantworten. Die Experimente deuten allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Deprotonierung hin.

3.3 Charakterisierung und Funktionalitätstest der rekonstituierten Cytochrom-*c*-Oxidase

Die ATR-Technik hat im Gegensatz zu Transmissions-Experimenten einen wesentlichen Vorteil: Das Protein ist zugänglich und es ist somit möglich, durch Veränderung der Pufferlösung Änderungen im Protein zu induzieren und Differenzspektren aufzunehmen. Diese Änderungen erfolgen darüber hinaus an ein und derselben Population von Oxidase-Molekülen, was den Verbrauch an Protein erheblich reduziert. Durch Variation z. B. des pH-Werts, der Salzkonzentration oder des Reduktionsmittels lassen sich verschiedenste Fragestellungen bearbeiten.

Bevor man zu weiteren Anwendungen kommt, muss allerdings erst gezeigt werden, dass durch die Rekonstitution (siehe Kapitel 2.3) und die Probenpräparation (siehe Kapitel 2.4.4) das Protein nicht denaturiert, sondern noch funktionsfähig bleibt. Darüber hinaus müssen für die Versuche Bedingungen gefunden werden, unter denen der Proteinfilm gut haftet. Andernfalls sind die Differenzsignale, die durch das „Schwellen“ des Proteinfilms entstehen (entspricht einer Konzentrationsänderung), größer als die Signale, die durch die chemische Modifikation innerhalb des Proteins auftreten. Eine Abschätzung soll hier die Problematik verdeutlichen: Die effektive Eindringtiefe der evaneszierenden Welle beträgt $\sim 10 \mu\text{m}$. In den Differenzexperimenten werden Banden in der Größenordnung von 0,1 mOD detektiert, d. h. die Änderungen im Schwellverhalten dürfen 1 nm nicht überschreiten.

3.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Da das Absorptionsmaximum nicht nur von den Häm-Gruppen selber, sondern auch von deren Umgebung beeinflusst wird, lassen sich mit Hilfe der sichtbaren Spektroskopie sowohl Aussagen über die Funktionalität der Häm-Gruppen als auch über die Integrität des Proteins machen (Yonetani, 1960; van Gelder, 1966; Vanneste, 1966). Zunächst musste überprüft werden, ob die Rekonstitution einen negativen Einfluss auf die CcO hat. Zu diesem Zweck werden 50 μl der rekonstituierten Oxidaselösung (*R. sphaeroides*) auf die innere Wand einer Quarz-Küvette aufgetragen und mit einem leichten Stickstoffstrom eingetrocknet. Anschließend wird der Film mit 100 mM KCl, 50 mM Phosphat und pH 8 rehydratisiert. Nach der Aufnahme eines sichtbaren Spek-

trums (*Shimadzu UV-2101PC*) des oxidierten Zustands wird der Puffer gegen eine reduzierende Lösung (90 mM KCl, 50 mM Phosphat, 10 mM Dithionit und pH 8) ausgetauscht und erneut gemessen. Dieser Vorgang kann einige Male wiederholt werden, ohne dass sich das Protein von der Küvette löst. Man ist also imstande, den Oxidase-Film zyklisch durch verschiedene Redox-Zustände zu führen.

In der folgenden Abbildung ist diese Reaktion anhand des Funktionszyklus (Abbildung 1.3-5) schematisch abgebildet.

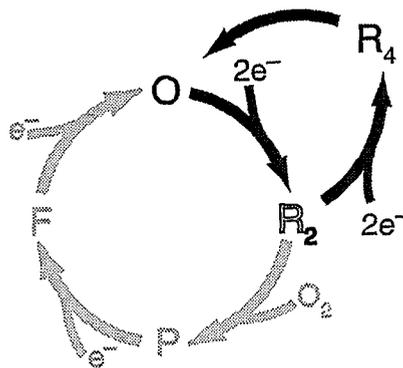


Abbildung 3.3-1 Schematische Darstellung der Intermediate, die während der Aufnahme eines Reduziert *minus* Oxidiert Differenzspektrums ($R_4 - O$) durchlaufen werden.

In der folgenden Abbildung (3.3-2) sind neben dem $R_4 - O$ Differenzspektrum der rekonstituierten CcO als Film auch das Differenzspektrum der solubilisierten CcO in Lösung dargestellt. Die Zuordnung der einzelnen Banden wurde ausführlich in Kapitel 2.4.4 diskutiert. Man erkennt keinen Unterschied zwischen den beiden Differenzspektren, was ein Beleg ist, dass die Rekonstitution keinen negativen Einfluss auf die CcO hat.

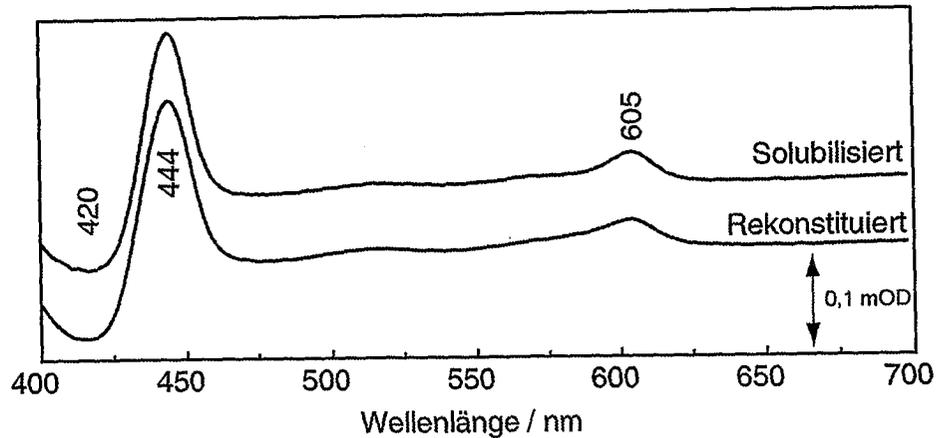


Abbildung 3.3-2 „Reduziert minus Oxidiert“-Differenzspektren der solubilisierten Oxidase (Solubilisiert) und eines rehydratisierten Films von *R. sphaeroides*. Die Spektren wurden auf das Soret-Maximum skaliert.

3.3.2 IR-Messungen

Der nächste Schritt der Charakterisierung besteht darin, ein in der Literatur beschriebenes Experiment mit den Oxidase-Filmen zu wiederholen. Mit Hilfe der ATR-Technik sollte es möglich sein, durch den Austausch eines oxidierenden gegen einen reduzierenden Puffer Redox-Differenzspektren ($R_4 - O$) aufzunehmen. Ein wichtiger Punkt bei diesen ATR-Messungen ist, dass durch den Austausch des Puffers im Oxidase-Film möglichst nur die Änderungen im Protein induziert werden, die auch beobachtet werden sollen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen der polaren Kopfgruppen der Lipide und polarer Gruppen der CcO kommt es allerdings bei Änderung der Ionenkonzentration im Puffer zu unerwünschten Ereignissen: Diese beruhen auf der Abschirmung der Ladungen der Lipide/CcO durch Gegenionen. Wird nun die Konzentration an Ionen verringert, verringert sich auch die Konzentration an Gegenionen, und es kommt zu einer Abstoßung, was als Schwellung des Films bezeichnet wird (siehe auch Anhang C). Bei Erhöhung der Ionenkonzentration werden die Ladungen besser abgeschirmt, so dass sich die Distanz verkleinert und es zu einer Schrumpfung des Films kommt. Beide Ereignisse resultieren in einer Änderung der Proteinkonzentration, da bei konstanter Eindringtiefe der evaneszierenden Welle mehr bzw. weniger Moleküle im Strahlengang vorhanden sind. Die Folge ist, dass durch den Pufferaustausch die erwünschten Änderungen größtenteils von den vergleichsweise großen Amid-Änderungen überlagert werden.

Die mechanischen Störungen durch den Pufferwechsel lassen sich auf folgende Weise minimieren: Da diese Beeinträchtigung durch den Austausch des Puffers abhängig von der Zeit ist, muss darauf geachtet werden, dass zwischen der Störung bzw. dem Austausch des Puffers und der Aufnahme des Referenz- und des Probenspektrums in etwa gleich viel Zeit vergeht. Praktisch heißt dies, dass man z. B. einen mit oxidierendem Puffer äquilibrierten Film vor der Messung nochmals mit demselben Puffer spült, kurz wartet, die Referenzmessung startet, anschließend die Lösung gegen den reduzierenden Puffer austauscht und dann die gleiche Zeitspanne vor der Aufnahme des Probenspektrums wartet, die man zuvor bei der Aufnahme der Referenzmessung gewartet hat. Eine weitere Chance, diese Störungen zu verkleinern, besteht in der Nutzung einer Durchflusszelle. Hierbei wird der Oxidase-Film kontinuierlich mit Puffer umspült. Dadurch wird der Film zwar permanent mechanisch gestört, der Störungslevel ist aber sowohl beim Referenzspektrum als auch beim Probenspektrum vergleichbar und spielt im Differenzspektrum kaum eine Rolle.

Zu Beginn der Messungen müssen Bedingungen gefunden werden, bei denen der Film möglichst gut haftet. Aus diesem Grund werden folgende Experiment durchgeführt: Es wird ein Film hergestellt und für zwei bis vier Stunden mit oxidierendem Puffer äquilibriert. Vor dem Beginn der Messung wird der Puffer nochmals ausgetauscht, um mechanische Störungen zu minimieren. Anschließend wird ein Referenzspektrum aufgenommen, der Puffer ausgetauscht und wieder ein Probenspektrum gemessen. Da es sich bei dem Puffer für die Referenz- und die Probenmessung um ein und denselben Puffer handelt, sollte man im Spektrum nur solche Änderungen beobachten, die es zu vermeiden gilt. Somit müssen die Pufferbedingungen solange variiert werden, bis keine Änderungen im Differenzspektrum mehr zu erkennen sind (siehe Abb. 3.3-2: Grundlinie-ATR). Folgende Kombination erwies sich als am besten geeignet:

- (a) *Ox*: 50 mM Phosphat, 100 mM KCl, pH 8 / *Red*: 50 mM Phosphat, 90 mM KCl, 10 mM Dithionit, pH 8

In der Abbildung 3.3-2 sind die Redox-Differenzspektren ($R_4 - O$) der Rinderherzoxidase (B) und der bakteriellen CcO von *R. sphaeroides* (A) dargestellt, die mit dem oben beschriebenen Puffer in der ATR-Konfiguration aufgenommen wurden. Zum Vergleich sind Redox-Differenzspektren dargestellt, bei der CO fotolytisch reduziert wurde (siehe Kapitel 2.4.4.2). Außerdem erkennt man in Abbildung (B) noch eine Grundlinie aufgenommen mit der ATR-Technik (siehe oben) und eine Grundlinie aufgenommen mit der Transmission. Letzteres erhält man, indem man ein Fotore-

duktions-Experiment – ohne Protein – nur mit Puffer durchführt. Wie oben schon beschrieben, erhält man das Spektrum „Grundlinie-ATR“, indem man einen Oxidasefilm präpariert und mit oxidierendem Puffer äquilibriert. In diesem Zustand wird ein Referenzspektrum aufgenommen. Der Puffer wird dann durch den bei der Referenzmessung genutzten Puffer, ausgetauscht und ein Probenspektrum gemessen. Das Differenzspektrum zeigt dann folglich nur solche Signale, die auf die mechanische Beanspruchung des Films zurückzuführen sind.

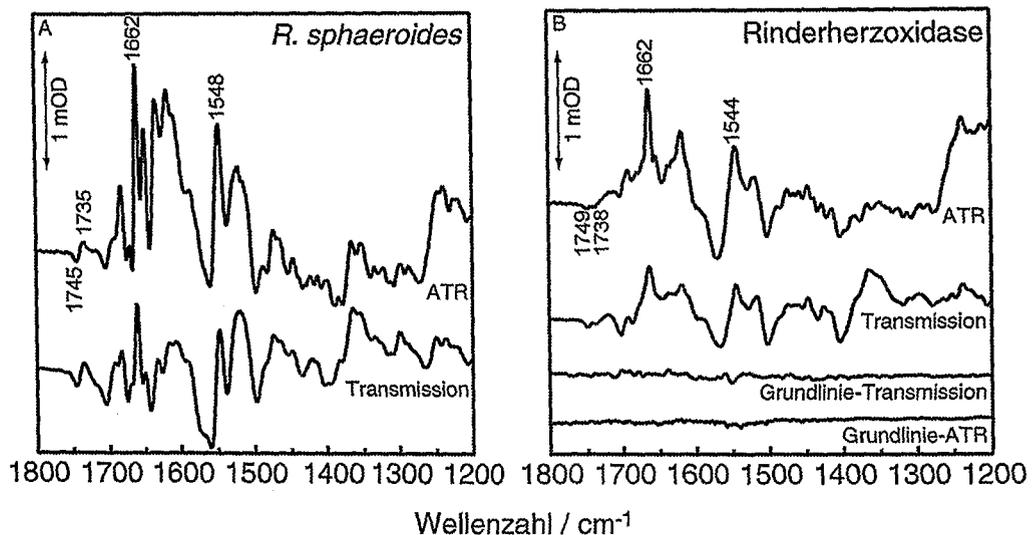


Abbildung 3.3-2 „Reduziert minus Oxidiert“-Differenzspektren der CcO von *R. sphaeroides* (A) und der Rinderherzoxidase (B). In beiden Abb. ist das oberste Differenzspektrum durch Dithionit-Reduktion induziert und mit der ATR-Technik aufgenommen worden. Das folgende Spektrum wird durch Fotoreduktion induziert und in Transmission aufgenommen, wobei hierfür die solubilisierter Oxidase verwendet wurde. In der der Abb. B sind darüber hinaus noch zwei Spektren von Kontroll-Experimenten dargestellt (siehe Text).

Ein Vergleich der Redox-Differenzspektren mit den beiden Kontroll-Experimenten (Grundlinie-ATR, Grundlinie-Transmission) zeigt, dass die gemessenen Differenzbanden weit über dem Rauschen liegen. Einige dieser Banden sind bereits in der Literatur beschrieben und zugeordnet. Die Bande in Abbildung 3.3-2 A (ATR) bei 1662 cm^{-1} ist beispielweise der Schwingungsänderung einer Formyl-Seitengruppe des Häm a_3 (C=O) (Behr et al., 1998) zugeordnet. Weiterhin erkennt man ein positiv/negativ-Bandenmuster bei $1735/1745\text{ cm}^{-1}$, welches der Aminosäure E286 zugeordnet wurde. Ein Vergleich der ATR-Redox-Differenzexperimente mit denen der Fotoreduktion ergibt eine gute Übereinstimmung. Zudem zeigt ein Vergleich mit Spektren aus der Literatur für *Paracoccus denitrificans* (Hellwig et al., 1996), *R. sphaeroides* (Behr et

al., 1998) und der Rinderherzoxidase (Hellwig et al., 1999), dass die mit der ATR-Technik gemessenen Daten eine gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten aufweisen. Dieses ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Rekonstitution keinen störenden Einfluss auf die CcO hat.

Eine weitere Möglichkeit, die Funktionalität besonders des binuklearen Zentrums (bZ) zu testen, ist die CO-Blitzlichtfotolyse. Im reduzierten Zustand bindet CO an Häm a_3 , was durch eine Schwingungsbande bei 1963 cm^{-1} für die Rinderherzoxidase bzw. 1965 cm^{-1} für die bakterielle CcO nachweisbar ist. Durch Vergleich der CO-Rückbindungskinetik von solubilisierter CcO und rekonstituierter CcO lassen sich Aussagen über die Integrität des bZ machen. Die Rückkehr von CO zum Häm a_3 findet im Bereich von Millisekunden statt und lässt sich bei den oben beschriebenen Wellenzahlen verfolgen.

In der Abbildung 3.3-3 sind die Rückbindungskinetiken von solubilisierter (Kreise) und rekonstituierter (Quadrate) CcO dargestellt. Die Experimente wurden mit einer Zeitauflösung von $100\text{ }\mu\text{s}$ durchgeführt. Die exponentielle Anpassung der beiden Kinetiken mit einer Exponentialfunktion ergibt Zeitkonstanten von $\tau = 20\text{ ms}$ für die solubilierte und $\tau = 22\text{ ms}$ für die rekonstituierte CcO.

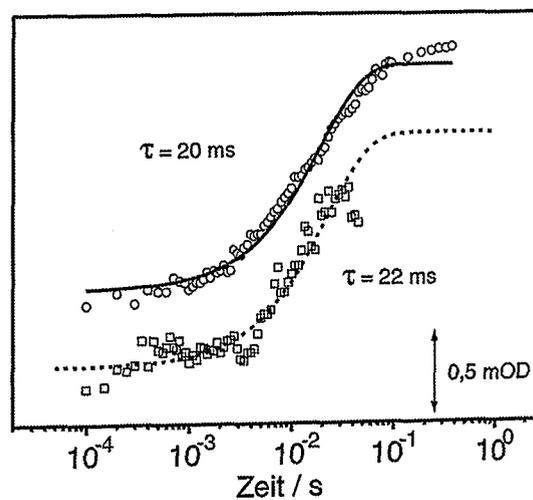


Abbildung 3.3-3 Absorptionsänderungen bei 1963 cm^{-1} von solubilisierter (Kreise) und rekonstituierter (Quadrate) Rinderherzoxidase. Zur besseren Übersicht sind die Messwerte der solubilierten Oxidase um $0,5\text{ OD}$ nach oben verschoben. Versuchsbedingungen waren $20\text{ }^\circ\text{C}$ und $\text{pH } 8$.

Weder die Frequenz, bei der die FeCO-Schwingung absorbiert, noch die Zeitkonstanten für die Rückkehr des CO an das Häm a_3 zeigen große Unterschiede zwi-

schen solubilisierter und rekonstituierter CcO. Dieses ist erneut ein Beleg dafür, dass die Rekonstitution keine negative Wirkung auf die Funktionalität der CcO hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle gezeigten Experimente eindeutig darauf hinweisen, dass die Rekonstitution der CcO in Proteoliposomen keinen negativen Einfluss auf die Integrität des binuklearen Zentrums und der Hämgruppen sowie deren Funktion hat.

3.4 ATR Differenzspektroskopie

3.4.1 Zuordnung der Carbonylschwingung

Zur Analyse der in Abbildung 3.3-2 beschriebenen Differenzbanden, welche bei der rekonstituierten CcO von *R. sphaeroides* im $R_4 - O$ Differenzspektrum zu erkennen sind, wurden weitere Experimente mit der ATR-Technik im IR durchgeführt. Besondere Aufmerksamkeit lag bei den ergänzenden Versuchen auf dem Bandenmuster oberhalb von 1700 cm^{-1} mit einer positiven Bande bei 1735 cm^{-1} und einer negativen Bande bei 1745 cm^{-1} . Diese Banden wurden bei der CcO von *P. denitrificans* (Hellwig et al., 1996) und bei der Quinol-Oxidase von *E. coli* (Lübben and Gerwert, 1996) ebenfalls beobachtet. Experimente mit Mutanten (Hellwig et al., 1998; Lübben et al., 1999; Yamazaki et al., 1999) konnten nicht eindeutig beantworten, ob es sich bei diesem Bandenmuster um eine Verschiebungsbände oder um eine Deprotonierungs-/Protonierungsreaktion von E286 und einer weiteren AS handelt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden $R_4 - O$ Differenzspektren mit der ATR-Technik gemessen. Die nächste Abbildung fasst die Ergebnisse dieser Messungen zusammen. Zur besseren Übersicht ist nur der Bereich zwischen 1780 und 1710 cm^{-1} dargestellt (siehe auch Anhang B, Abbildung B-2).

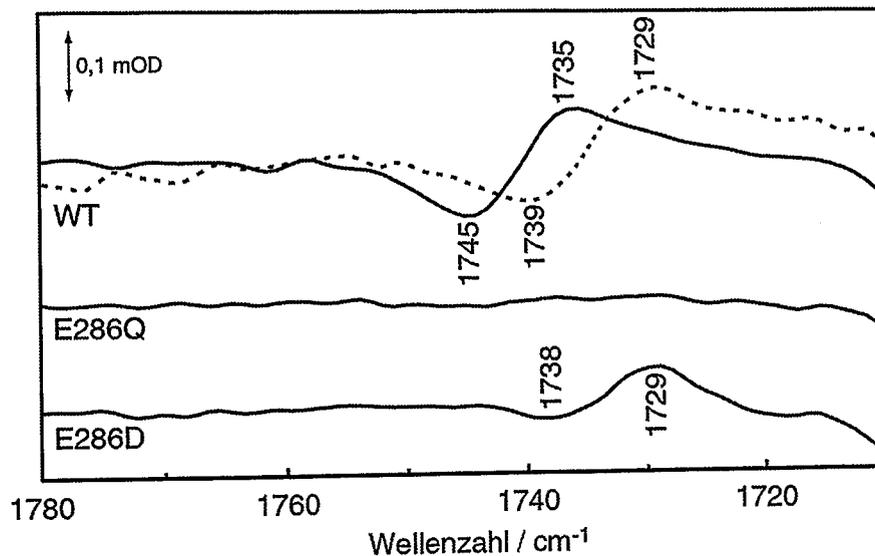


Abbildung 3.4-1 $R_4 - O$ Differenzspektren im Bereich 1780 bis 1710 cm^{-1} . Die beiden oberen Spektren beschreiben die redox-induzierten Änderungen des WT von *R. sphaeroides* in H_2O (durchgezogene Linie) und in D_2O (gestrichelte Linie). Das mittlere Spektrum entspricht dem Differenzspektrum der E286Q Mutante und das untere Spektrum der E286D Mutante. Versuchsbedingungen waren 50 mM Phosphat, 100 mM KCl und pH 8 (pD 7,6) für die Aufnahme des oxidierten Spektrums bzw. 50 mM Phosphat, 90 mM KCl, 10 mM Dithionit und pH 8 (pD 7,6) für die Aufnahme des reduzierten Spektrums.

Man erkennt in den oberen Spektren der Abbildung 3.4-1, dass die negative und positive Bande bei 1745 cm^{-1} bzw. 1735 cm^{-1} durch den Austausch des Puffers von H_2O zu D_2O um etwa 6 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben wird. Diese Verschiebung liegt im erwarteten Rahmen und ist in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten (Chirgadze et al., 1975). Die Frequenz, bei der die C=O Schwingung einer Carbonsäure absorbiert, ist von den umgebenden Wasserstoffbrücken abhängig.

Um das Bandenmuster zuzuordnen, werden $R_4 - O$ Differenzspektren der konservativen Mutanten E286Q und E286D von *R. sphaeroides* gemessen. Hierbei macht man sich folgendes zu Nutze: Durch den Austausch einer Glutaminsäure gegen eine Asparaginsäure verkürzt man die Seitenkette der AS selektiv um eine CH_2 -Gruppe. Dies hat eine Änderung der Umgebung und damit auch der Wasserstoffbrücken dieser AS zur Folge.

Bei der E286Q Mutante sind beide Signale in der betrachteten Region vollständig verschwunden. Der Austausch der Glutaminsäure gegen eine Asparaginsäure verschiebt das positive Signal um 7 cm^{-1} zu 1738 cm^{-1} und das negative Signal um 6 cm^{-1} zu 1729 cm^{-1} . Da in beiden Fällen keine Bande mehr bei der ursprünglichen Wellen-

zahl von 1745 cm^{-1} bzw. 1735 cm^{-1} zu beobachten ist, kann man davon ausgehen, dass dieses Bandenmuster ausschließlich von der AS E286 hervorgerufen wird.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Spektren der CcO aus *P. denitrificans* (Hellwig et al., 1998), so stellt man Unterschiede fest. Bei vergleichbaren Mutationen verbleibt jeweils eine negative Bande bei 1732 cm^{-1} im **O** – **R₄** Differenzspektrum. Hellwig et al. folgerten daraus, dass das positive Signal (1746 cm^{-1}) im WT beim Übergang in den oxidierten Zustand einer Protonierung der AS E278 zuzuordnen ist. Das verbleibende negative Signal im WT (1734 cm^{-1}) entspricht nach Auffassung der Autoren der Deprotonierung einer noch unbekanntem AS bei diesem Übergang.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen für die CcO von *R. sphaeroides* geht jedoch eindeutig hervor, dass sowohl die positive als auch die negative Bande durch eine Änderung der die protonierte AS E286 umgebenden Wasserstoffbrücken hervorgerufen wird und nicht durch eine Deprotonierung der AS selbst. Die Verschiebung der Bande beim Übergang vom oxidierten in den reduzierten Zustand um 10 cm^{-1} deutet darauf hin, dass E286 im reduzierten Zustand stärker durch Wasserstoffbrücken gebunden wird. Die Carboxylgruppe der Asparaginsäure in der E286D Mutante zeigt ein vergleichbares Verhalten. Die Verschiebung beim Übergang in den reduzierten Zustand beträgt 9 cm^{-1} . Das gesamte Bandenmuster ist allerdings zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, da die Länge der Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zu E286 variiert und es möglicherweise kleinere strukturelle Änderungen durch die Mutation gibt.

3.4.2 pH-induzierte Differenzspektroskopie

Die **R** – **O** Differenzspektren haben gezeigt, dass E286 im physiologischen pH-Bereich protoniert vorliegt. Der apparente pK-Wert dieser AS kann mit Hilfe der pH-induzierten Differenzspektroskopie bestimmt werden (Szárás et al., 1994).

Die folgende Abbildung zeigt ein solches Experiment. Als Referenz dient eine Messung bei pH 10. Anschließend wird der pH-Wert schrittweise in 0,2 pH-Schritten bis pH 6,8 durch Austausch des Puffers abgesenkt.

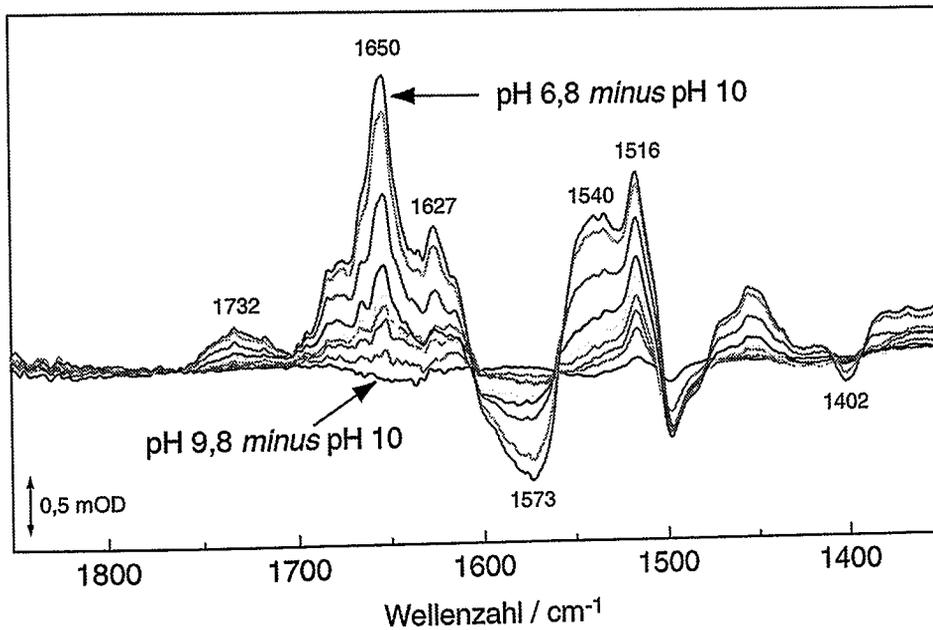


Abbildung 3.4-2 Darstellung der pH-induzierten Differenzspektren. Als Referenz diente ein Oxidase-Film äquilibriert bei pH 10 (50 mM Phosphat und 100 mM KCl). Durch Austausch des Puffers mit gleichen Salzkonzentrationen, aber unterschiedlichen pH-Werten und anschließender Messung eines Probenspektrums, ergaben sich die dargestellten Differenzspektren.

Die positive Bande bei 1732 cm^{-1} sowie die damit gekoppelten Banden bei 1573 und 1402 cm^{-1} beschreiben die Titration von Carbonsäuren. Vermutlich handelt es sich hierbei um Carbonsäuren, die innerhalb der Kanäle liegen und damit einen pK-Wert haben der oberhalb von denen der Oberflächencarboxylate liegt (pK ~ 4). Mit sinkendem pH steigt die Anzahl protonierter Asparagin- und Glutaminsäuren (1732 cm^{-1}), und dementsprechend sinkt die Anzahl deprotonierter Carbonsäuren (1573 und 1402 cm^{-1}). Die Breite der Banden ist ein klares Zeichen für eine große Anzahl gleichzeitig titrierter AS. Die unterschiedliche Umgebung jeder einzelnen AS führt zu einem etwas verschobenen Absorptionsmaximum und in der Summe zu einer Verbreiterung der beobachteten Absorptionsbande. Die Banden bei 1650 und 1540 cm^{-1} entsprechen möglicherweise Sekundärstruktur-Änderungen im Protein. Man sieht aber auch hier, dass diese Banden auf einer breiten Absorptionsänderung der Amid I und Amid II Bande liegen, die unter Umständen durch das in Kapitel 3.3 beschriebene Schwellen/Schrumpfen hervorgerufen werden (siehe auch Anhang C). Die Zuordnung der Banden bei 1627 und 1516 cm^{-1} ist sehr spekulativ. Während die Absorption bei 1627 cm^{-1} sowohl durch eine Häm- wie auch durch ein Asparaginschwingung hervorgerufen

werden könnte, entspricht die Bande bei 1516 cm^{-1} eventuell einer Tyrosin- oder ebenfalls einer Hämschwingung.

Die Analyse der pH-induzierten Differenzspektren verdeutlicht die Problematik bei diesem Experiment. Durch die Änderung des pH-Werts werden Änderungen in einer Vielzahl von AS induziert. Für den Fall, dass der pK-Wert von E286 in dem beobachteten pH-Bereich liegt, sind die Signale überlagert durch die große Anzahl titrierter Carbonsäuren. Gleiches gilt für die Änderungen im Amid I und Amid II Bereich. Hier werden mögliche pH-induzierte Umlagerungen einzelner AS überlagert von Strukturänderungen ganzer Sekundärstrukturelemente und/oder Schwellen/Schrumpfen des Films. Es lässt sich somit festhalten, dass der pH-Wert ein zu grobes Mittel ist, um Änderungen einzelner AS zu beobachten. Das Ergebnis zeigt aber auch wie wichtig es ist, bei Differenzexperimenten, wie z. B. einem Redox-Experiment, den pH-Wert der verschiedenen Pufferlösungen exakt einzustellen, da sonst möglicherweise neben den redox-induzierten Änderungen auch pH-induzierte Differenzbanden im Spektrum erscheinen.

3.4.3 pH-Abhängigkeit der redox-induzierten Differenzspektren

$R_4 - O$ Differenzspektren bieten im Vergleich zu pH-induzierten Differenzspektren eine Möglichkeit, mit höherer Selektivität Änderungen im Protein zu induzieren und sind darüber hinaus physiologisch im Bezug auf den Funktionszyklus. Wie oben beschrieben, konnte durch die Analyse der $R_4 - O$ Differenzspektren ein Bandenmuster bei $(-)/1745/(+)/1735\text{ cm}^{-1}$ einer Umgebungsänderung der AS E286 zugeordnet werden. Da es aus den oben diskutierten Gründen nicht möglich war, mit Hilfe der pH-induzierten Differenzspektren den pK-Wert der AS E286 zu bestimmen, wurden weitere Experimente zur Bestimmung dieses pK-Werts durchgeführt. Liegt der pK-Wert der AS E286 in einem pH-Bereich, in dem das Protein nicht denaturiert, so kann man mit der Aufnahme von $R_4 - O$ Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten den pK bestimmen. Bei pH 8 liegt die AS E286 im protonierten Zustand vor, da im redox-induzierten Differenzspektrum ein Bandenmuster bei $(-)/1745/(+)/1735\text{ cm}^{-1}$ zu beobachten ist. Mit steigendem pH sollte, für den Fall, dass der pK-Wert erreicht wird, dieses Bandenmuster verschwinden, da E286 dann im deprotonierten Zustand vorliegt und somit nicht mehr im Bereich oberhalb 1700 cm^{-1} absorbiert. In der folgenden Abbildung 3.4-3 sind $R_4 - O$ Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Der pH wurde zwischen pH 6 und pH 9,5 variiert. Zur besseren Übersicht sind nur die Differenzspektren bei pH 6, pH 8 und pH 9,5 abgebildet.

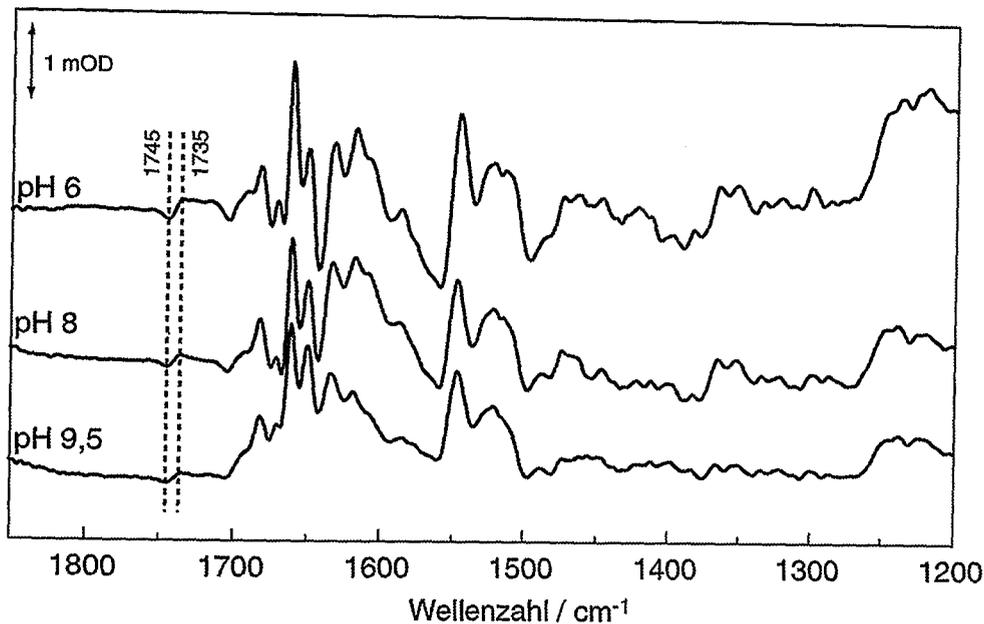


Abbildung 3.4-3 Dargestellt sind R₄ - O Differenzspektren, aufgenommen bei pH 6, pH 8 und pH 9,5. Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 4.1-1.

Man erkennt, dass das auf die Umgebungsänderung der AS E286 zurückzuführende Bandenmuster bei (-)1745/(+)1735 cm⁻¹ in dem untersuchten pH-Bereich erhalten bleibt. Der pK-Wert der AS E286 liegt klar über 9,5. Es war nicht möglich, bei pH-Werten oberhalb von 10 zu messen, da die rekonstituierte CcO denaturierte bzw. der Oxidase-Film sich ablöste. Untersuchungen mit der Rinderherzoxidase haben gezeigt, dass bei Fotolyse-Experimenten im vollreduzierten, CO gebundenen Zustand das ebenfalls der AS E286 zugeordnete Bandenmuster bei (+)1750/(-)1739 cm⁻¹ bis zu einem pH von 9,3 beobachtet werden kann (Heitbrink et al., 2002). Demzufolge liegt bei der Rinderherzoxidase der pK-Wert der AS E286 ebenfalls über 9,3.

3.4.4 Intermediatspektren

Die in der Einleitung beschriebenen Intermediate **F** und **P** sind wichtige Zwischenzustände des Funktionszyklus der CcO. Erstmals beobachtet wurden sie bei isolierten Mitochondrien, bei denen durch Änderung des elektrochemischen Protonengradienten ein der physiologischen Richtung entgegengesetzter Elektronenfluss induziert wurde (Wikström, 1981; Wikström and Morgan, 1992). Weitere Experimente haben gezeigt,

dass diese Intermediate ausgehend vom oxidierten Protein (**O**) durch die Zugabe von Elektronen und Sauerstoff induziert werden können und somit auch Teil des physiologischen Funktionszyklus sind (Babcock and Ferguson-Miller, 1996; Babcock and Wikström, 1992; Morgan et al., 1996). Ein weiterer Ansatz, die beschriebenen Intermediate zu beobachten, ist die Verwendung von Wasserstoffperoxid (siehe Abbildung 3.4-4). Dieses Molekül beinhaltet genau diejenigen die Bestandteile, welche im reduktiven Teil des Funktionszyklus benötigt werden (2H^+ , 2e^- und O_2). Es ist somit möglich, durch Zugabe von Wasserstoffperoxid zur oxidierten CcO den reduktiven Teil zu umgehen und nur den oxidativen Teil zu beobachten (Konstantinov et al., 1998; Vygodina et al., 1998; Vygodina et al., 1997). Variiert man den pH und die Konzentration an Wasserstoffperoxid, so ist es möglich, reine Intermediatspektren zu erlangen (Fabian and Palmer, 1995; Junemann et al., 2000; Vygodina and Konstantinov, 1989; Weng and Baker, 1991; Wrigglesworth, 1984).

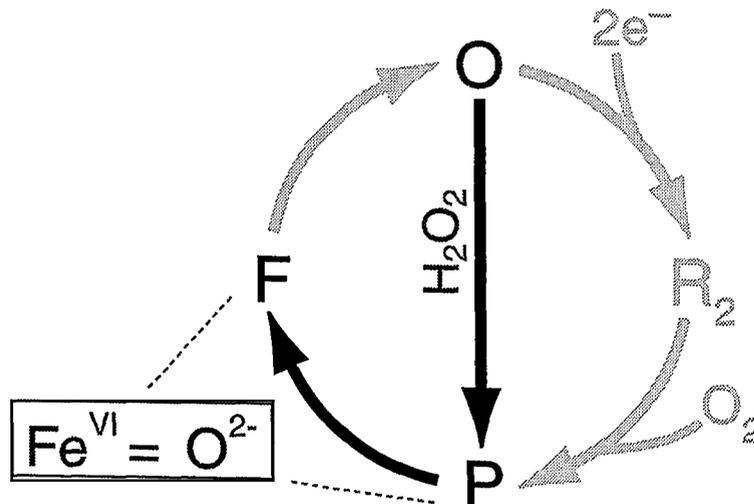


Abbildung 3.4-4 Schematische Darstellung des Funktionszyklus der CcO. Durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von Wasserstoffperoxid und Variation des pH-Werts lässt sich der reduktive Teil des Funktionszyklus umgehen und die Intermediate **F** und **P** erzeugen. Die beiden Zustände **P** und **F** sind bezogen auf Häm a_3 isoelektrisch.

Pecoraro et al. (Pecoraro et al., 2001) haben gezeigt, dass man durch Zugabe von 1 mM Wasserstoffperoxidlösung bei pH 8,5 zur oxidierten CcO das reine Oxoferryl Intermediat **F** generieren kann. Durch die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Häm a_3 erkennt man im **F minus O** Differenzspektrum (**F – O**) eine positive Bande bei 580 nm in der α -Region sowie eine positive und eine negative Bande bei 434 bzw. 414 nm

in der Soret-Region (siehe Abbildung 3.4-5) im UV/Vis Spektralbereich (Bickar et al., 1982; Brittain et al., 1996; Wrigglesworth, 1984). Um nachzuweisen, dass auch mit der rekonstituierten CcO dieses Intermediat erzeugt werden kann, wird folgender Versuche durchgeführt: 100 μ l der rekonstituierten CcO Lösung von *R. sphaeroides* werden auf die Innenseite einer Quarzglasküvette gegeben und unter einem leichten Stickstoffstrom getrocknet. Der so entstandene Film wird durch Zugabe von etwa 2 ml 50 mM Phosphatpuffer und 100 mM KCl bei pH 8,5 rehydratisiert und ein Spektrum aufgenommen. Eine Stammlösung mit 100 mM H₂O₂, 50 mM Phosphatpuffer und 100 mM KCl bei pH 8,5 wird zum rehydratisierten Film gegeben, so dass die Endkonzentration an Wasserstoffperoxid bei ~1 mM liegt.

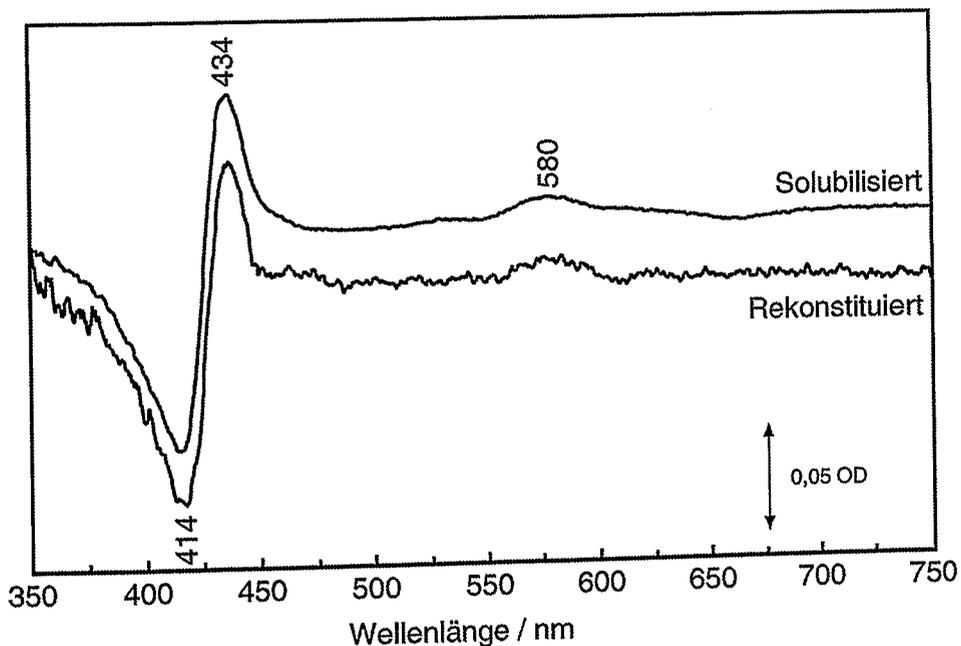


Abbildung 3.4-5 F – O Differenzspektren der solubilisierten (oberes Spektrum) CcO in Lösung und der rekonstituierten (unteres Spektrum) CcO als Film von *R. sphaeroides*. Das Spektrum der rekonstituierten CcO wurde skaliert auf die Differenz-Bande der solubilisierten CcO in der Soret-Region. Zur besseren Übersicht wurde das Spektrum der solubilisierten CcO mit einem konstanten Offset versehen. Versuchsbedingungen siehe Text.

Anhand der Differenzspektren erkennt man, dass sowohl die solubilierte als auch die rekonstituierte CcO im Zustand **F** ist. Bei der rekonstituierten CcO ist es weiterhin möglich, durch Austausch der Wasserstoffperoxidlösung gegen wasserstoffperoxidfreie Lösung den Grundzustand (**O**) wieder herzustellen. Man kann somit die Zuständen **F** und **O** der CcO durch einen Wechsel der Pufferbedingungen zyklisch erzeugen.

Im IR wurden bis heute keine Differenzspektren veröffentlicht, die die Sauerstoffchemie der CcO berücksichtigt. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass es bei Transmission-Experimenten nicht möglich ist, die chemische Zusammensetzung des Puffers zu ändern. Im Gegensatz dazu bietet die ATR-Technik den Vorteil, dass der Puffer ausgetauscht und die chemische Zusammensetzung somit variiert werden kann. Aus diesem Grund wird folgender Versuch durchgeführt: Der CcO-Film wird, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, präpariert und mit demselben Puffer rehydratisiert, der auch bei der Aufnahme der UV/Vis-Spektren zum Einsatz kam. Nachdem der Film äquilibriert ist, wird der Durchflussaufsatz auf den ATR-Diamanten montiert. Die Aufnahme der F – O Differenzspektren erfolgt durch die Messung der Referenz (O) unter kontinuierlichem Pufferfluss. Durch Nutzung eines Dreiwegeventils wird der Puffer gegen wasserstoffperoxidhaltigen Puffer (siehe oben) ausgetauscht, so dass die Probe nun kontinuierlich mit dem zweiten Puffer umspült wird. Durch die Aufnahme des Probenspektrums erhält man das F – O Differenzspektrum. In der folgenden Abbildung ist ein solches Spektrum dargestellt. Bei diesem Spektrum handelt es sich um das Mittel aus 5 Experimenten mit jeweils 5000 aufgenommenen Spektren. Die Versuche werden sowohl in H₂O als auch in D₂O Puffer durchgeführt.

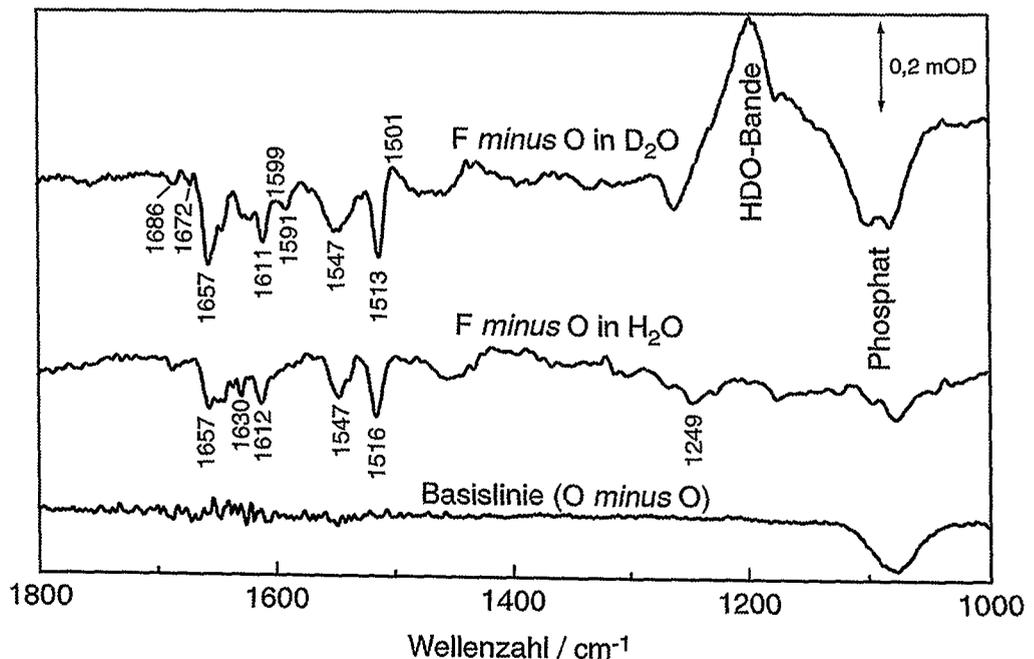


Abbildung 3.4-6 F – O Differenzspektren der CcO von *R. sphaeroides* aufgenommen in D₂O (oberes Spektrum) bzw. in H₂O Puffer (mittleres Spektrum). Versuchsbedingungen sind: 50 mM Phosphat, 100 mM KCl, pH 8,5, 1mM H₂O₂ und 20 °C.

Vergleicht man die in H₂O- und D₂O-Puffer aufgenommenen Spektren, so erkennt man, dass es sowohl Banden gibt, die sich verschieben (1516/1513 cm⁻¹) als auch Banden, die keine Isotopenverschiebung zeigen (z. B. 1547 cm⁻¹). Da durch den Isotopenaustausch die H₂O Biegeschwingung bei 1645 cm⁻¹ zu 1450 cm⁻¹ (HOD) bzw. 1210 cm⁻¹ (D₂O) verschoben wird, ist die Gesamtabsorption im Amid I Bereich geringer. Somit ist das Signal/Rausch-Verhältnis in diesem Bereich in D₂O besser als in H₂O. Dieses lässt den Schluss zu, dass die in H₂O gemessenen Differenzbanden im Amid I Bereich real sind und nicht auf Rauschen zurückgeführt werden können. Die Tatsache, dass die positiven Banden eine geringere Intensität haben als die negativen, zeigt darüber hinaus, dass die Umgebung des bZ im Zustand **F** weniger polar ist als im Zustand **O**. Bei der Interpretation der Daten muss berücksichtigt werden, dass das größte Signal im **F** – **O** Differenzspektrum um den Faktor 10 kleiner ist als das größte Signal im **R**₄ – **O** Differenzspektrum. Die Signale entsprechen somit bezüglich ihrer Intensität in etwa dem als Umgebungsänderung der AS E286 zugeordneten Bandenmuster bei 1745/1735 cm⁻¹ im **R**₄ – **O** Differenzspektrum. Dieses bedeutet, dass die vollständige Reduktion aller Redoxzentren vermutlich wesentlich stärkere Änderungen im Protein induziert als die Reaktion mit Wasserstoffperoxid. Darüber hinaus ist es möglich, dass die schwächeren Signale im **F** – **O** Differenzspektrum auch zum Teil auf eine geringere Population der an der Reaktion beteiligten CcO zurückzuführen ist.

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse verschiedener Veröffentlichungen zusammengefasst und mit den Resultaten verglichen. Ausgewählt wurden zwei Untersuchungen, die mit Hilfe der Resonanz-Raman-Technik den Zustand **O** für die Rinderherzoxidase und die Oxidase von *P.denitrificans* (Heibel et al., 1993) sowie für die CcO von *R. sphaeroides* (Lee et al., 2000) untersucht haben. Mit der Resonanz Raman Spektroskopie kann man selektiv die Schwingungen der Kofaktoren Häm a und Häm a₃ untersuchen.

Schwingung	Rinderherz RR [cm ⁻¹] ⁸	<i>P. denitrificans</i> RR [cm ⁻¹] ⁸	<i>R. sphaeroides</i> RR [cm ⁻¹] ⁹	<i>R. sphaeroides</i> IR diese Arbeit [cm ⁻¹]
Fe a ν_{10}	1639	1634	1634	1630
Fe a ₃ ν_{10}	1609	1610		1612
Fe a ν_{11}	1546			1547

Tabelle 3-1 Zuordnung einzelner Schwingungen der Kofaktoren mit Hilfe der Resonanz-Raman-Technik und Vergleich mit Ergebnissen unserer IR-Messungen.

Während des Funktionszyklus werden vier Elektronen beim Übergang vom Intermediat **A** in den Zustand **P** auf den gebundenen Sauerstoff übertragen. Zwei der Elektronen stellt Häm a₃ zur Verfügung und ein Elektron kommt vom Cu_B. Die Quelle des vierten Elektrons ist bis heute nicht eindeutig nachgewiesen und somit Gegenstand der Diskussion. Eine Möglichkeit, als Elektronendonator zu fungieren, stellt die AS Tyrosin 288 dar. Proshlyakov et al. (Proshlyakov et al., 2000) schlagen vor, dass Y244 (Rinderherz-Nummerierung), welches kovalent an ein Histidin gebunden ist, während des Funktionszyklus ein Radikal bildet. Untersuchungen am Photosystem II haben gezeigt, dass dort ein Tyrosin während des Funktionszyklus ein Radikal bilden kann (Berthomieu et al., 1998; Hienerwadel et al., 1997) und somit in der Lage ist, sowohl ein Elektron als auch ein Proton zur Verfügung zu stellen. Y288 bildet keine kovalente Bindung mit einem benachbarten Histidin bei der CcO von *R. sphaeroides* (Svenson Ek, eingereicht). Trotz dieses strukturellen Unterschieds zur Rinderherzoxidase könnte Y288 dennoch der Ursprung des vierten Elektrons sein. Beim Übergang von **P** nach **F** ist der transmembrane Transport zweier Protonen gekoppelt an einen Elektronentransfer in das bZ. Das Ziel dieses Elektrons ist höchstwahrscheinlich Y288. Ob parallel zu diesem Elektronentransfer auch ein Proton in das bZ gebracht wird, ist nicht bekannt. Somit besteht die Möglichkeit, dass Y288 in einem deprotonierten Zustand vorliegt.

Um zu überprüfen, ob, und wenn ja welche, Differenzbanden auf die Deprotonierung zurückzuführen sind, werden pH-Differenzspektren der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin aufgenommen. Die Messungen der Absolutspektren erfolgt jeweils bei pH 12 und pH 8 mit der ATR-Technik. Anschließend wird die Differenz pH 12 *minus* pH 8 berechnet.

⁸ (Heibel et al., 1993)

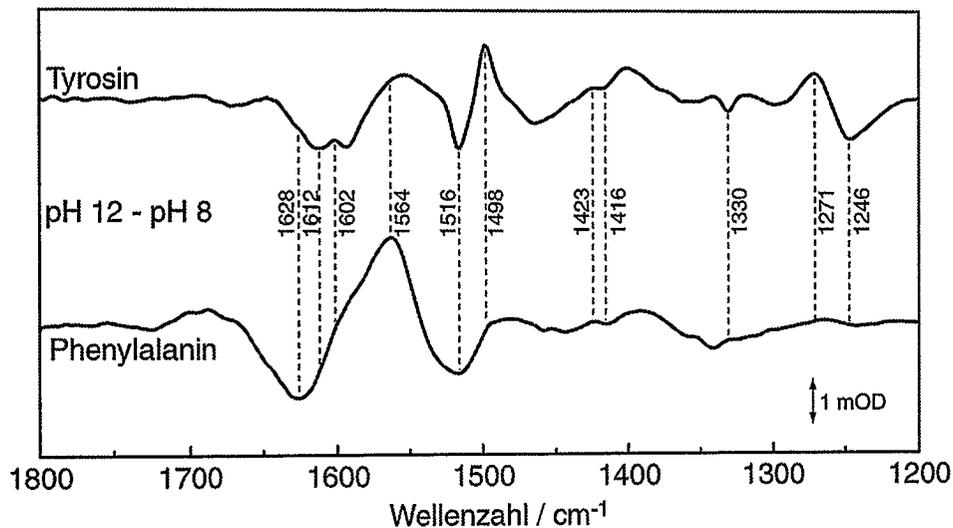


Abbildung 3.4-7 pH-Differenzspektren der AS Tyrosin (oberes Spektrum) und Phenylalanin (unteres Spektrum). Die Konzentration der AS-Lösungen lag bei ~ 2 mM in 50 mM Phosphat und 100 mM KCl. Die Titration der Lösungen wurde mit 5 M KOH durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 20°C mit der ATR-Technik. Die Spektren wurden Basislinien korrigiert.

Die Phenolgruppe des Tyrosins hat einen pK -Wert von ~ 10 . Durch die Aufnahme von pH-Differenzspektren zwischen pH 12 und pH 8 erhält man die Differenz zwischen deprotonierter (positive Banden) und protonierter (negative Banden). Vergleicht man dieses Spektrum mit dem pH-Differenzspektrum von Phenylalanin, so kann man gezielt die Banden zuordnen, die auf die Protonierung zurückzuführen sind. Problematisch ist allerdings die Tatsache, dass ebenfalls die Aminogruppe der AS titriert wird ($pK_{\text{Tyrosin}}: 9,11$; $pK_{\text{Phenylalanin}}: 9,24$) und demzufolge auch dadurch Differenzbanden im Spektrum erscheinen. Die Banden der Spektren in Abbildung 3.4-7 lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- (a) Man erkennt Differenzbanden mit identischer Wellenzahl in beiden Spektren. Diese Banden sind entweder direkt der Deprotonierung der Aminogruppe zuzuordnen oder einer Schwingung, die mit dieser gekoppelt ist. Beispiele sind die breite Bande bei 1654 cm^{-1} sowie die Signale bei 1423 cm^{-1} und 1416 cm^{-1} . Die Bande bei 1628 cm^{-1} ist im Differenzspektrum von Phenylalanin stärker ausgeprägt als bei Tyrosin. Dieses Signal kann der pH-induzierten Änderung der OH-Streckschwingung des Wassers zugeordnet werden (Daten nicht dargestellt).

⁹ (Lee et al., 2000)

- (b) Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um solche Banden, die nur im Tyrosin-Differenzspektrum auftauchen. Diese sind entweder direkt der Deprotonierung der Phenolgruppe oder einer gekoppelten Schwingung zuzuordnen. Man sieht deutlich, dass Banden bei 1246 cm^{-1} , 1271 cm^{-1} , 1330 cm^{-1} , 1602 cm^{-1} und 1612 cm^{-1} nur bei Tyrosin zu beobachten sind. Darüber hinaus gibt es noch ein Bandenmuster bei $1516/1498\text{ cm}^{-1}$ im Tyrosin-Spektrum, welches nur teilweise im Phenylalanin-Spektrum zu beobachten ist.

Legt man diese Ergebnisse zugrunde und vergleicht sie mit Literaturdaten (Hienerwadel et al., 1997), so kommt man zu folgendem Ergebnis:

Tyrosin-Differenzspek. [cm^{-1}] (Abb. 3.4-7)	F – O Differenzspek. [cm^{-1}] (Abb. 3.4-6)	Zuordnung [cm^{-1}] (Hienerwadel et al., 1997)
(protoniert) 1246	1249	1248 $\nu_7^a(\text{CO})$ und $\delta(\text{COH})$
(deprotoniert) 1271		1275 $\nu_7^a(\text{CO})$ und $\delta(\text{COH})$
(deprotoniert) 1498	1501 (nur in D_2O)	1500 $\nu_{19}(\text{CC})$
(protoniert) 1516	1516	1518 $\nu_{19}(\text{CC})$
(deprotoniert) 1602		1600 $\nu_{8a}(\text{CC})$
(protoniert) 1612	1612	1616 $\nu_{8a}(\text{CC})$

Tabelle 3-2 Vergleich und Zuordnung der beobachteten Banden anhand der angegebenen Literatur.

Vergleicht man die in den Tabellen 3-1 und 3-2 zusammengefassten Ergebnisse, so lässt sich folgende Zuordnung treffen: Die im F – O Differenzspektrum beobachtete Banden bei 1547 und 1630 cm^{-1} können Schwingungen des Häm a zugeordnet werden. Die Signale bei 1249 und 1516 cm^{-1} dagegen werden eindeutig durch die deprotonierten Form eines Tyrosins hervorgerufen. Schwieriger ist die Zuordnung allerdings mit der Bande bei 1612 cm^{-1} . Bei dieser Wellenzahl absorbiert sowohl eine Schwingung des Häm a_3 als auch eine Schwingung des Tyrosinats.

Ein weiterer Vergleich mit Literaturwerten bestätigt die oben durchgeführte Zuordnung: Die negative Banden bei 1516 cm^{-1} entspricht in Übereinstimmung mit Literaturwerten (Venyaminov and Kalnin, 1990) der Ringschwingung eines protonierten Tyrosins. Die dementsprechend deprotonierte Form dieser Schwingung absorbiert bei 1501 cm^{-1} in D_2O und ist nicht aufgelöst in H_2O (Chirgadze et al., 1975). Eine weitere in der Literatur beschriebene Bande bei 1615 cm^{-1} wurde nur in D_2O beobachtet und ist ebenfalls einem protonierten Tyrosin zugeordnet (Chirgadze et al., 1975). Das entsprechende Signal in unserem Differenzspektrum liegt etwa drei Wellenzahlen

verschoben bei 1612 cm^{-1} . Eine weitere positive Bande bei 1602 cm^{-1} in H_2O und 1603 cm^{-1} in D_2O , wird einer Schwingung des protonierten Tyrosins zugeordnet. Man erkennt wiederum nur in D_2O eine Bande bei 1599 cm^{-1} , die dieser Schwingung entsprechen könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Daten Hinweise dafür geben, dass Y288 beim Übergang in den Zustand F sehr wahrscheinlich deprotoniert wird. Berücksichtigt man die sehr kleinen Signale und die Tatsache, dass im Bereich der Tyrosinschwingungen auch Hämschwingungen beobachtet werden können (siehe Tabelle 3.1 und 3.2), ist diese Zuordnung allerdings noch spekulativ. Weitere Experimente zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnis und Untersuchungen mit Mutanten sind nötig, um die Zuordnung zu bestätigen.

4 Diskussion

Die Cytochrom-c-Oxidase ist eine komplexe biologische Maschine, die einen elektrochemischen Gradienten über einer Membran aufbaut. Getrieben wird dieser Prozess durch die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Neben den vier Protonen, die durch die Membran gepumpt werden, müssen noch vier weitere Protonen für die Sauerstoffchemie aufgenommen werden. Die Resultate dieser Arbeit spiegeln den Versuch wider, mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Struktur und den während des Funktionszyklus ablaufenden Prozessen zu erlangen. Die Strategie war hierbei, die Methoden und Präparationen kontinuierlich so zu verändern und zu optimieren, dass mehr und mehr Aussagen über physiologische Aspekte möglich wurden.

Kapitel 3.1 beschreibt zeitaufgelöste Experimente mit der *vollreduzierten*, CO gebundenen CcO. Hierbei handelt es sich um einen Zustand, der in der Natur nicht beobachtet wird bzw. nicht Teil des physiologischen Funktionszyklus ist. Allerdings binden CO und O₂ im Protein nicht nur an der gleichen Stelle, sondern gehen auch beide eine transiente Bindung mit Cu_B ein bevor sie an Häm a₃ binden (Bailey et al., 1996; Einarsdottir et al., 1993; Oliveberg and Malmstrom, 1992; Verkhovsky et al., 1994). Aussagen, die aufgrund von Untersuchungen mit CO gemacht werden, können somit in vielen Fällen auf O₂ erweitert werden und erlauben demzufolge auch beispielsweise Rückschlüsse auf die Sauerstoffbindung und die Sauerstoffreduktion. Voraussetzung für die Bindung von O₂ ist die Reduktion des bZ. Der Transfer des ersten Elektrons zum Cu_B wird kontrolliert durch die Aufnahme eines Protons (Verkhovsky et al., 1995) höchstwahrscheinlich durch den K-Kanal oder durch die Verschiebung einer Aminosäureseitengruppe im K-Kanal (K362) (Sigurdson, 2001). Durch die starke antikooperative Redoxwechselwirkung zwischen Cu_B und Häm a₃ verbleibt das zweite Elektron beim Häm a (Blair et al., 1986). Die Bindung von O₂ an Cu_B und die anschließende Weiterleitung zum Häm a₃ stabilisiert die reduzierte Form des Häm a₃ und damit den Transfer des zweiten Elektrons in das bZ. Durch diesen Elektronentransfer wird ein zweites Proton wahrscheinlich durch den D-Kanal aufgenommen (Wikström et al., 2000). Dieser Prozess stellt eine Schutzfunktion dar: Es wird vermieden, dass Sauerstoff an das nur mit einem Elektron reduzierte bZ bindet und möglicherweise reaktive Sauerstoffradikale gebildet werden. Durch die Bindung von O₂ an Cu_B könnte ein Signal induziert werden, welches die hydrophobe Tasche zwischen E286 und dem bZ so verändert, dass Protonen für das bZ und somit für die Sauerstoffchemie bereitgestellt werden können. Die Interpretation der hier vorge-

stellten Daten bestätigt genau dieses Szenario. Die transiente Bindung von CO an Cu_B ist zeitlich gekoppelt an eine Änderung der AS E286. Die Zuordnung des K-Kanals als Weg für die chemischen Protonen und des D-Kanals für die gepumpten Protonen lässt sich durch unsere Daten nicht bestätigen. Vielmehr weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der D-Kanal bei der Sauerstoffbindung beteiligt ist. Ob dieser Kanal erst beim Übergang vom reduktiven in den oxidativen Teil oder schon vorher involviert ist, lässt sich mit Fotolyse-Experimenten der halbreduzierten CcO untersuchen (siehe folgende Diskussion).

Um einen Vergleich der Rinderherzoxidase mit der bakteriellen CcO durchzuführen, wurden Fotolyse-Experimente mit der vollreduzierten, CO gebundenen CcO von *R. sphaeroides* wiederholt. Bei diesen Versuchen wurde die Temperatur von -20 °C, wie bei der Rinderherzoxidase, auf 20 °C erhöht, um unter Bedingungen zu messen, die näher an den physiologischen Gegebenheiten liegen. Die Differenzspektren beider Oxidasen zeigen vergleichbare Banden. Einen wichtigen Unterschied findet man allerdings in der Region oberhalb von 1700 cm⁻¹. Hier sieht man bei der Rinderherzoxidase ein Bandenmuster, welches einer durch die Fotolyse induzierten Änderung von E286 zugeordnet wurde (siehe oben). Dieses Muster lässt sich nicht bei der CcO von *R. sphaeroides* beobachten. Damit muss bei künftigen Analysen berücksichtigt werden, dass trotz der großen Homologie der Rinderherzoxidase und der CcO von *R. sphaeroides* es offenbar Unterschiede zwischen den Proteinen gibt. Es war demzufolge nicht möglich, die zeitliche Kopplung der AS E286 mit der transienten Bindung des CO an Cu_B ebenfalls für die bakterielle CcO nachzuweisen.

Im nächsten Schritt (Kapitel 3.2) wurde die *halbreduzierte*, CO gebundene CcO von *R. sphaeroides* untersucht. Im Gegensatz zum Zustand der vollreduzierten, CO gebundenen CcO induziert man durch die Fotolyse des CO einen Elektronentransfer zwischen den Kofaktoren. Folglich kann man im Differenzspektrum nicht nur die direkt von CO induzierten Änderungen beobachten, sondern auch solche Signale, die auf einen Elektronentransfer zurückzuführen sind. Dieses ist ein wesentlicher Schritt zur Untersuchung des physiologischen Funktionszyklus. Die Analyse der Daten ergibt, dass der K-Kanal bei Aufnahme der Protonen im reduktiven Teil des Funktionszyklus involviert ist. Darüber hinaus deuten die Experimente mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Deprotonierung der AS E286 hin.

Somit ergibt sich zusammen mit den Ergebnissen der vollreduzierten Oxidase folgendes Bild: Die Ladung des zweiten Elektrons muss ebenso wie beim ersten Elektron durch die Aufnahme eines Protons kompensiert werden. Auf der Basis von Blitzlichtfotolyse-Experimenten im UV/Vis mit der halbreduzierten, CO gebundenen CcO

schlagen Sigurdson et al. (Sigurdson et al., 2002) ein an das oxidierte Häm a_3 gebundenes Hydroxid als Protonenakzeptor bei der Rückkehr des Elektrons vor. In diesem Modell wird das Proton allerdings durch den K-Kanal aufgenommen. Dies lässt sich nicht mit unseren Ergebnissen bestätigen. Wikström et al. beschreiben dagegen Versuche, die die Aufnahme des zweiten Protons durch den D-Kanal während des reduktiven Teils des Funktionszyklus postulieren (Wikström et al., 2000). In diesem Modell reagiert ein im bZ gebundenes Hydroxid durch die Aufnahme des ersten Protons zu Wasser und wird in die hydrophobe Tasche zwischen E286 und dem bZ verschoben. Dieser Schritt macht das bZ für den Transport des zweiten Protons durch den D-Kanal zugänglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit der halbreduzierten Oxidase zeigen eine Beteiligung der AS E286 beim zweiten Elektronentransfer und bestätigen somit Wikströms Modell. Weitere Hinweise für diese Hypothese liefern Messungen im IR mit der Rapid-Scan-Technik an der CcO von *P. denitrificans* (Rost et al., 1999). Hier wird ebenfalls beschrieben, dass bei der Rückkehr des zweiten Elektrons zum oxidierten Häm a_3 vermutlich die am Ende des D-Kanals lokalisierte Aminosäure E278¹⁰ beteiligt ist. Es bleibt allerdings die Frage offen, ob – wie bei Wikström beschrieben – der D-Kanal erst durch eine Verschiebung eines Wassermoleküls aktiviert werden muss, oder ob er bereits – wie bei Sigurdson beschrieben – zugänglich für das bZ ist. Diese Frage lässt sich nicht mit Blitzlichtfotolyse-Experimenten der halbreduzierten CcO klären, da der erste Elektronentransfer in das bZ nicht beobachtet werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zeitaufgelösten Experimente gezeigt haben, dass die AS E286 eine Schlüsselfunktion einnimmt. Sowohl bei der Bindung von CO (O_2 -Analogon) als auch beim Elektronentransfer ist eine Beteiligung dieser AS und damit auch des D-Kanals nachweisbar.

Der große Vorteil der Transmissions-Spektroskopie, dass die Proben in einer abgeschlossenen Küvette unter konstanten Bedingungen gemessen werden können, ist gleichzeitig auch limitierend für einige Experimente. Aus diesem Grund wurden Versuche mit der ATR-Technik begonnen. Im Kapitel 3.3 konnte durch Untersuchungen im UV/Vis und im IR zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Rekonstitution der CcO in Proteoliposomen keinen negativen Einfluss auf die Integrität des binuklearen Zentrums und der Hämgruppen sowie deren Funktion hat.

¹⁰ *P. denitrificans* Nummerierung entspricht E286 bei *R. sphaeroides*.

Durch die Analyse von $R_4 - O$ Differenzspektren des WT und einiger Mutanten (Kapitel 3.4.1) konnte das beschriebene Bandenmuster bei $(-)/1745/(+)/1735 \text{ cm}^{-1}$ für die CcO von *R. sphaeroides* eindeutig auf eine Umgebungsänderung der AS E286 zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass man mit Hilfe der ATR-Spektroskopie Aussagen über einzelne AS im Protein treffen kann. vorschlagen

Der letzte Schritt bestand nun darin, ein durch die UV/Vis Spektroskopie charakterisiertes Intermediat des Funktionszyklus im IR zu untersuchen (Kapitel 3.4.4). Die Analyse der Messungen ergab, dass im $F - O$ Differenzspektrum Banden zu erkennen sind, die der Deprotonierung eines Tyrosins zugeordnet werden können.

Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid zur oxidierten CcO bilden sich die Intermediate **P** und **F**. Die Variation des pH-Werts und der Wasserstoffperoxidkonzentration ermöglicht die Erzeugung des reinen Intermediats **F**. Während des Funktionszyklus werden vier Elektronen beim Übergang vom Intermediat **A** in den Zustand **P** auf den gebundenen Sauerstoff übertragen. Zwei der Elektronen stellt Häm a_3 zur Verfügung, ein Elektron kommt vom Cu_B . Die Quelle des vierten Elektrons ist bis heute nicht eindeutig nachgewiesen und somit Gegenstand der Diskussion. Vorgeschlagen wird, dass Tyrosin 288 bei der CcO als Elektronendonator fungiert. Proshlyakov et al. (Proshlyakov et al., 2000) zeigten, dass Y244 (Rinderherz-Nummerierung), welches kovalent an ein Histidin gebunden ist, während des Funktionszyklus ein Radikal bildet. EPR-Messungen von McMillan et al. (MacMillan et al., 1999) liefern ebenfalls Hinweise darauf, dass es sich um ein Tyrosin handelt, welches im Zustand **P** ein Radikal bildet. Y288 bildet keine kovalente Bindung mit einem benachbarten Histidin bei der CcO von *R. sphaeroides* (Svenson Ek, eingereicht). Trotz dieses strukturellen Unterschieds zur Rinderherzoxidase könnte Y288 dennoch der Ursprung des vierten Elektrons sein. Untersuchungen am Photosystem II haben darüber hinaus gezeigt, dass dort gleichfalls ein Tyrosin während des Funktionszyklus ein Radikal bilden kann (Berthomieu et al., 1998; Hienerwadel et al., 1997) und somit in der Lage ist, sowohl ein Elektron als auch ein Proton zur Verfügung zu stellen. Erzeugt man den Zustand **F**, wie in unseren Versuchen durchgeführt, mit einem Überschuss an Wasserstoffperoxid (bei pH 8), so bildet sich der Zustand **P** nur transient (Pecoraro et al., 2001). Durch die Oxidation eines zweiten Wasserstoffperoxidmoleküls bildet sich der Zustand **F**. Da das bei dieser Reaktion frei werdende Elektron vermutlich auf das Radikal übertragen wird, sollte im Zustand **F** nur noch die deprotonierte Form vorliegen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente am terminalen Enzym der Atmungskette – der Cytochrom-*c*-Oxidase – durchgeführt. Untersucht wurde die Rinderherzoxidase sowie die Oxidase des Bakteriums *Rhodobacter sphaeroides*. Das Ziel der Experimente war es, molekulare Informationen zum Mechanismus des Funktionszyklus zu erlangen und damit den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion aufzuklären. Zu diesem Zweck kamen zeitaufgelöste Transmissions-Messungen und Gleichgewichts-Messungen mit der ATR-Technik zum Einsatz. Sowohl methodisch als auch präparativ wurden verschiedene Strategien verfolgt:

Mit der vollreduzierten, CO gebundenen Rinderherzoxidase konnte erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, mit einer Zeitauflösung von 5 μ s Differenzspektren über den Bereich von 2200 bis 950 cm^{-1} aufzunehmen. Die Analyse der Daten ergibt, dass die transiente Bindung des fotolysierten CO an Cu_B sowie die Strukturänderung einer etwa 12 Å entfernten Aminosäure kinetisch gekoppelt sind. Diese AS ist Teil des D-Kanals und spielt vermutlich eine entscheidende Rolle beim Transport von Protonen ins binukleare Zentrum bzw. über die Membran. Die Ergebnisse lassen auf einen Mechanismus schließen, der den Eintritt des Sauerstoffs unter Beteiligung der Aminosäure E286 kontrolliert.

Mit Hilfe der Ergebnisse der halbreduzierten, CO gebundenen CcO konnte erstmals nachgewiesen werden, dass der Elektronentransfer vom Häm a_3 zum Häm a vermutlich an die Deprotonierung der oben schon beschriebenen AS E286 gekoppelt ist. Folglich ist nicht nur der K-Kanal am reduktiven Teil des Funktionszyklus beteiligt, sondern auch der D-Kanal, was gängigen Modellen der Literatur widerspricht.

Es konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Rekonstitution der CcO in Proteoliposomen keinen Einfluss auf das Protein hat; somit konnte die *ATR-Technik* für weitere Experimente genutzt werden.

Die Auswertung der Redox-Differenzspektren des Wildtyps und der Mutanten, aufgenommen mit Hilfe der ATR-Technik, ergab die präzise Zuordnung eines Bandenmusters im Differenzspektrum. Dieses Signal konnte eindeutig der Umgebungsänderung der AS E286 zugewiesen werden.

Zum ersten Mal konnte im IR ein Intermediatspektrum des oxidativen Teils des Funktionszyklus aufgenommen werden. Die Interpretation des **F – O** Differenzspek-

trums demonstrierte, dass ein Tyrosin beim Übergang in den Zustand F involviert ist und vermutlich deprotoniert vorliegt.

6 Anhang

A Bandenzuordnung

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Licht *minus* Dunkel Differenzspektren der vollreduzierten, CO gebundenen Rinderherzoxidase und der halbreduzierten, CO gebundenen CcO von *R. sphaeroides* dargestellt. Den Maxima bzw. Minima unserer Messungen wurde eine mögliche Zuordnung anhand der Literatur gegenübergestellt (Behr et al., 1998; Hellwig et al., 1999; Park et al., 1996; Puustinen et al., 1997).

Rinderherz vollreduziert		Zuordnung	<i>R. sphaeroides</i> halbreduziert	
Dunkel [cm ⁻¹]	Licht [cm ⁻¹]		Dunkel [cm ⁻¹]	Licht [cm ⁻¹]
	2062	(CuB-)CO (α)		2062
1963		(a ₃ Fe-) ¹² CO	1967	
1918		(a ₃ Fe-) ¹³ CO		
	1750	v(C=O) Glu 286		
1739		v(C=O) Glu 286	1745	
		v(C=O) Glu 101	1724	
	1666	Formyl vC=O		1662
1660		Formyl vC=O	1654	
1627		Vinyl v(C α =C β)		
	1614	Vinyl v(C α =C β); v10?		1620
		v(CO) CHO Häm a; v37 Häm a		1606
		v38.; Häm a		1549
		Häm Propionat	1537	
1535		v38; CuHis		
	1512	v3, v11		
1476		v28; Imid		
	1466	v28; Imid		
1459		v39; δ_{C} CH ₃ ; δ CH ₂ (Ring)		
	1450	FeHis; v28		
1444		FeHis; v28	1446	
		Häm Propionat	1390	
1376		v41, v4	1377	
	1364	v41, v4		1367
1356		v4		
	1352	v4		1352
1306		Vinyl δ CH=; v21	1308	
	1283	v42	1281	
1274		Fe/Cu;His		1375

	1265	Fe/Cu:His	1267	
1234		His:FeCO Formyl vC _α -CO	1234	
1142		v43: FeHis	1142	
	1107	Fe/Cu:His; Vinyl	1107	
1088		P=O		1099
	1079	Vinyl δ _α -CH ₂		
960		'HOOP' (hydrogen out of plane)		

Tabelle A-1 Vergleich und Zuordnung der beobachteten Banden an der angegebenen Literatur.

B Funktionalitätstest der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mutanten wurden hinsichtlich ihres Redox-Verhaltens im UV/Vis und im IR überprüft. Bei den Messungen im UV/Vis wurde darüber hinaus die Ligandenbindung (CO) getestet. In der folgenden Abbildung sind vollreduzierte, CO gebundene Absolutspektren der CcO in 50 mM Phosphat und 100 mM KCl bei pH 8,5 dargestellt.

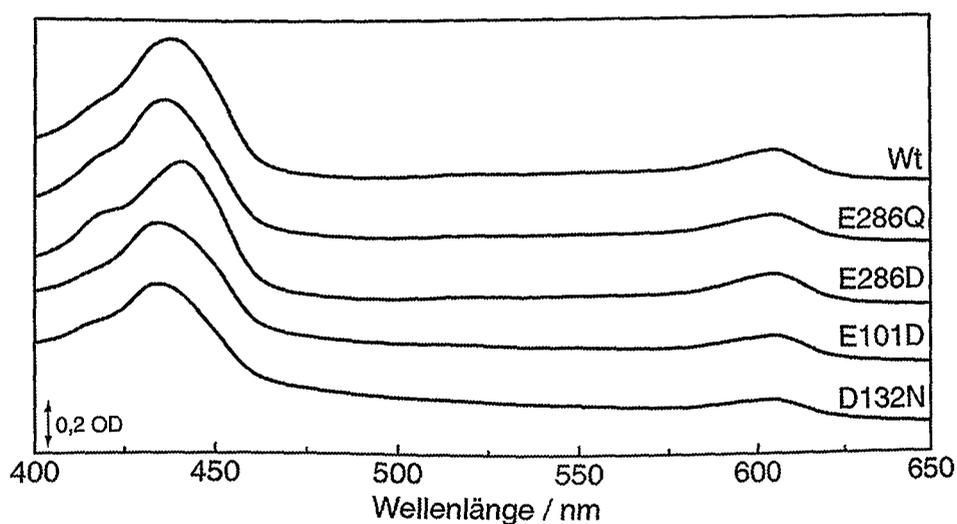


Abbildung B-1 Redox-Spektren der vollreduzierten, CO gebundenen CcO. Die Spektren wurden mit der solubilisierter Oxidase in Lösung aufgenommen. Versuchsbedingungen: 50 mM Phosphat, 100 mM KCl und pH 8,5.

Die Spektren der Mutanten zeigen die typischen Absorptionsmaxima, welche in Kapitel 2.4.4 bereits ausführlich beschrieben sind. In der α -Region erkennt man durch die Reduktion des Häm a eine Bande bei ~ 607 nm und eine Schulter bei ~ 590 nm, die die Bindung von CO an das reduzierte Häm a₃ beschreibt. In der Soret-Region ist

neben dem Bandenmaximum bei ~ 435 nm (CO gebunden an Häm a_3) eine Schulter bei ~ 445 nm zu sehen (reduziertes Häm a). Leichte Verschiebungen der Absorptionsmaxima kann man auf die Mutation selber zurückführen. Es ist allerdings eindeutig, dass die Mutanten mit dem Wildtyp vergleichbare Ergebnisse zeigen und somit in bezug auf die Hämgruppen normale Redoxreaktionen aufweisen.

Die nächste Abbildung stellt $R_4 - O$ Differenzspektren der Mutanten und vom WT dar. Alle Differenzspektren wurden anhand eines Oxidase-Films mit der ATR-Technik gemessen.

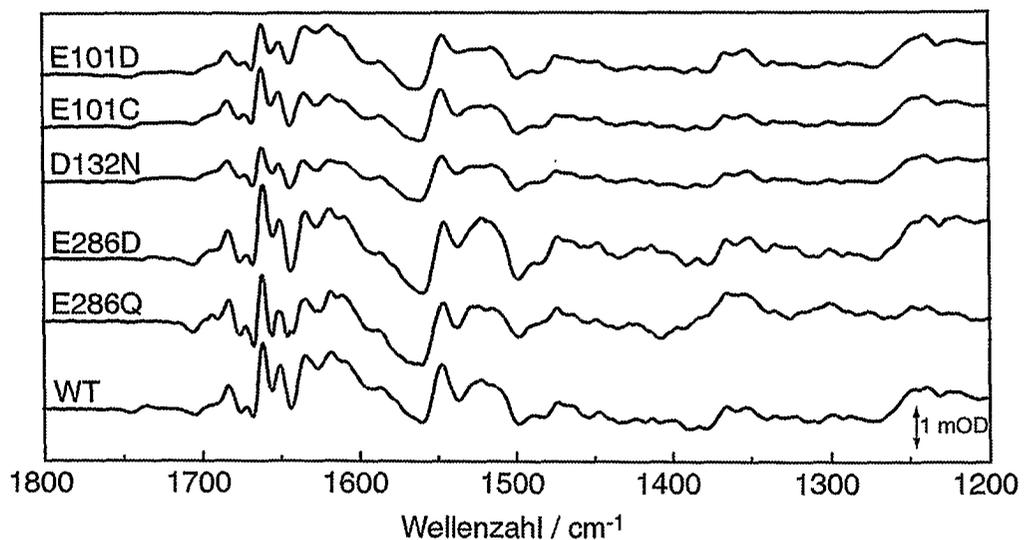


Abbildung B-2 $R_4 - O$ Differenzspektren der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten und des WT. Die Spektren wurden mit der ATR-Technik aufgenommen. Versuchsbedingungen: 50 mM Phosphat, 100 mM KCl, pH 8,5 (plus 10 mM Dithionit im reduzierenden Puffer) bei 20 °C.

Auch bei diesen Spektren erkennt man, dass die Mutanten und WT fast identische Differenzbanden zeigen. Kleinere Verschiebungen oder die Auslöschung einiger Signale sind auf die Mutation selber zurückzuführen. Da die IR-Spektroskopie nicht nur Änderungen der Hämgruppen, sondern auch Schwingungen der bei der Redoxreaktion beteiligten AS detektiert, kann man folgendes feststellen: die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten zeigen ein dem WT vergleichbares Redox-Verhalten und sind folglich im Bezug auf die getestete Funktion *aktiv*.

C Schwellen/Schrumpfen

Zur Untersuchung der Effekte, die unterschiedliche Ionenkonzentrationen auf einen Oxidasefilm haben, wird folgender Versuch durchgeführt: Ein Oxidasefilm wird präpariert und zum einen bei 50 mM Phosphat, 100 mM KCl und pH 8 sowie zum anderen bei 50 mM Phosphat, 250 mM KCl und pH 8 gemessen. Die Differenz ist in der folgenden Abbildung dargestellt und wird mit einem pH-induzierten Differenzspektrum der CcO (pH 10 – pH 7) verglichen.

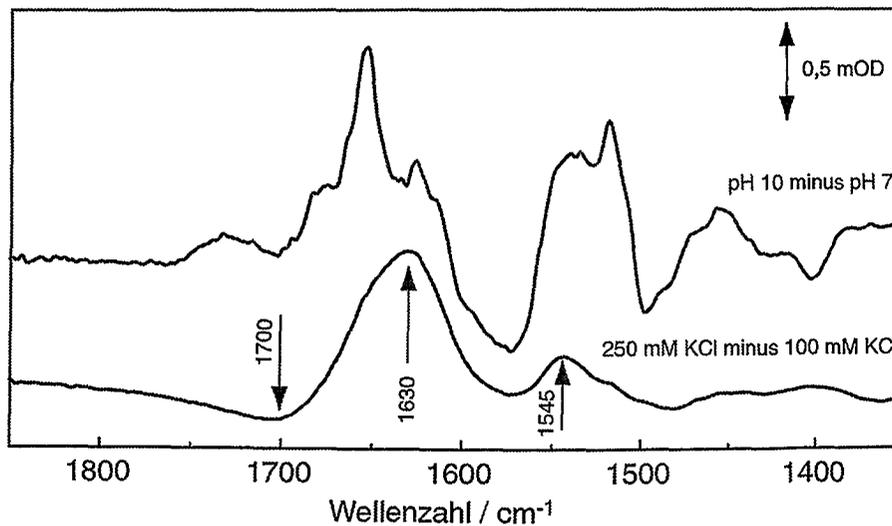


Abbildung C-1 Dargestellt sind zwei Differenzspektren der CcO, aufgenommen mit der ATR-Technik. Das obere Spektrum stellt ein pH-induziertes Spektrum dar. Versuchsbedingungen waren hier: 100 mM KCl, 50 mM Phosphat und pH 10 bzw. pH 7. Das untere Spektrum verdeutlicht ein Salz-induziertes Spektrum. Versuchsbedingungen waren: 50 mM Phosphat, pH 8 und 100 mM KCl bzw. 250 mM KCl. Alle Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen

Bei Betrachtung des unteren Spektrums sieht man, dass mit steigender Ionenkonzentration die Konzentration an Protein im Strahlengang steigt. Erkennbar wird dieses durch die positiven Banden bei 1630 cm^{-1} (Amid I) und 1545 cm^{-1} (Amid II). Gleichzeitig wird Wasser aus dem Strahlengang verdrängt, was zu einer negativen Bande bei 1700 cm^{-1} führt. Die Überlagerung der negativen Wasserbande mit der positiven Amid I Bande führt zu einem relativ niedrigen Absorptionsmaximum der Amid I Bande. Die Änderung der Proteinkonzentration im Strahlengang ist auf die bessere Abschirmung der negativ geladenen Oberflächencarboxylate und Lipidkopfgruppen durch die erhöhte Ionenkonzentration zurückzuführen (Schrumpfen). Beim Vergleich des Salz-induzierten Differenzspektrums mit dem pH-induzierten Spektrum erkennt

man, dass ein Teil der breiten Untergrundsignale im pH-induzierten Spektrum auf eine Veränderung der Ionenkonzentration basieren.

D Abkürzungen

ADP	Adenosin 5'diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'triphosphat
	ATR attenuated total reflection
	bZ binukleares Zentrum
CcO	Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltosid
FTIR	Fourier Transform Infrarot
IR	Infrarot
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidohosphat
N-Seite	negative Seite (Ort der Protonen Aufnahme)
P-Seite	positive Seite (Ort der Protonen Abgabe)
RR	Resonanz Raman
SVD	<i>singular value decomposition</i> (Singularwertzerlegung)
UE	Untereinheit
UV/Vis	Ultraviolett/ <i>Visible</i>

E Nomenklatur

Die Abkürzung D132N bezeichnet eine Mutante, bei der die Aminosäure 132 – ein Aspartat – durch ein Asparagin ausgetauscht wurde. Für den Fall, dass die Aminosäure nicht Bestandteil der Untereinheit I ist, wurde die entsprechende Untereinheit durch einen weiteren Index – in Form einer Römischen Ziffer – dargestellt: E101C^{II}.

Alle angegebenen Numerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf die Numerierung von *R. sphaeroides*. Abweichungen von dieser Regel sind im Text vermerkt.

F Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin o. Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin o. Glutaminsäure

7 Literaturverzeichnis

1. 1989. The Merck Index.
2. Adelothe, P., P. Brzezinski, and B.G. Malmstrom. 1995. Internal electron transfer in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 34:2844-2849.
3. Adelothe, P., M. Karpefors, G. Gilderson, F.L. Tomson, R.B. Gennis, and P. Brzezinski. 2000. Proton transfer from glutamate 286 determines the transition rates between oxygen intermediates in cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1459:533-539.
4. Antholine, W.E., D.H. Kastrau, G.C. Steffens, G. Buse, W.G. Zumft, and P.M. Kroneck. 1992. A comparative EPR investigation of the multicopper proteins nitrous-oxide reductase and cytochrome c oxidase. *Eur J Biochem* 209:875-881.
5. Babcock, G.T. and S. Ferguson-Miller. 1996. Heme/Copper Terminal Oxidases. *Chem Rev* 96:2889-2907.
6. Babcock, G.T. and M. Wikström. 1992. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356:301-309.
7. Bailey, J.A., C.A. James, and W.H. Woodruff. 1996. Flow-flash kinetics of O₂ binding to cytochrome c oxidase at elevated [O₂]: observations using high pressure stopped flow for gaseous reactants. *Biochem Biophys Res Commun* 220:1055-1060.
8. Barowy, W. and H. Sakai. 1984. Time-Resolved FTS of Molecular and Atomic IR Emission. *Infrared Phys.* 24:251-256.
9. Behr, J., P. Hellwig, W. Mäntele, and H. Michel. 1998. Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*: direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate ¹³C labeling. *Biochemistry* 37:7400-7406.
10. Behr, J., H. Michel, W. Mäntele, and P. Hellwig. 2000. Functional properties of the heme propionates in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence from FTIR difference spectroscopy and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 39:1356-1363.
11. Berthomieu, C., R. Hienerwadel, A. Boussac, J. Breton, and B.A. Diner. 1998. Hydrogen bonding of redox-active tyrosine Z of photosystem II probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* 37:10547-10554.
12. Bickar, D., J. Bonaventura, and C. Bonaventura. 1982. Cytochrome c Oxidase Binding of Hydrogen Peroxide. *Biochemistry* 21:2661-2666.

13. Bisson, R., G. Schiavo, and C. Montecucco. 1987. ATP Induces Conformational Changes in Mitochondrial Cytochrome *c* Oxidase. Effect on the Cytochrome *c* Binding Site. *Journal of Biological Chemistry*. 262:5992-5998.
14. Blair, D.F., W.R.J. Ellis, H. Wang, H.B. Gray, and S.I. Chan. 1986. Spectroelectrochemical study of cytochrome *c* oxidase: pH and temperature dependences of the cytochrome potentials. Characterization of site-site interactions. *J Biol Chem* 261:11524-11537.
15. Bolwien, C. Zeitauflösende Schwingungsspektroskopie an Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin. 2001. Institut für biologische Informationsverarbeitung 2, FZ-Jülich. Doktorarbeit
16. Bratton, M.R., M.A. Pressler, and J.P. Hosler. 1999. Suicide inactivation of cytochrome *c* oxidase: catalytic turnover in the absence of subunit III alters the active site. *Biochemistry* 38:16236-16245.
17. Brittain, T., R.H. Little, C. Greenwood, and N.J. Watmough. 1996. The reaction of *Escherichia coli* cytochrome *bo* with H₂O₂: evidence for the formation of an oxyferryl species by two distinct routes. *FEBS Lett* 399:21-25.
18. Brunori, M., A. Giuffrè, E. D'Itri, and P. Sarti. 1997. Internal electron transfer in Cu-heme oxidases. Thermodynamic or kinetic control? *J Biol Chem* 272:19870-19874.
19. Brzezinski, P. and B.G. Malmstrom. 1985. The reduction of cytochrome *c* oxidase by carbon monoxide. *FEBS Lett* 187:111-114.
20. Brzezinski, P. and B.G. Malmstrom. 1987. The mechanism of electron gating in proton pumping cytochrome *c* oxidase: the effect of pH and temperature on internal electron transfer. *Biochim Biophys Acta* 894:29-38.
21. Calhoun, M.W., J.W. Thomas, and R.B. Gennis. 1994. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem Sci* 19:325-330.
22. Chirgadze, Y.N., O.V. Fedorov, and N.P. Trushina. 1975. Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers* 14:679-694.
23. Dodson, E.D., X.J. Zhao, W.S. Caughey, and C.M. Elliott. 1996. Redox dependent interactions of the metal sites in carbon monoxide-bound cytochrome *c* oxidase monitored by infrared and UV/visible spectroelectrochemical methods. *Biochemistry* 35:444-452.
24. Dyer, R.B., O. Einarsdottir, P.M. Killough, J.J. Lopez-Garriga, and W.H. Woodruff. 1989. Transient Binding of Photodissociated CO to Cu_B⁺ of Eukaryotic Cytochrome Oxidase at Ambient Temperature. Direct Evidence from Time-Resolved Infrared Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 111:7657-7659.
25. Dyer, R.B., K.A. Peterson, P.O. Stoutland, and W.H. Woodruff. 1994. Picosecond infrared study of the photodynamics of carbonmonoxy- cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* 33:500-507.

26. Einarsdottir, O. 1995. Fast reactions of cytochrome oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1229:129-147.
27. Einarsdottir, O., R.B. Dyer, D.D. Lemon, P.M. Killough, S.M. Hubig, S.J. Atherton, J.J. Lopez-Garriga, G. Palmer, and W.H. Woodruff. 1993. Photodissociation and recombination of carbonmonoxy cytochrome oxidase: dynamics from picoseconds to kiloseconds. *Biochemistry* 32:12013-12024.
28. Fabian, M. and G. Palmer. 1995. The interaction of cytochrome oxidase with hydrogen peroxide: the relationship of compounds P and F. *Biochemistry* 34:13802-13810.
29. Fetter, J., M. Sharpe, J. Qian, D. Mills, S. Ferguson-Miller, and P. Nicholls. 1996. Fatty acids stimulate activity and restore respiratory control in a proton channel mutant of cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* 393:155-160.
30. Fetter, J.R., J. Qian, J. Shapleigh, J.W. Thomas, A. Garcia-Horsman, E. Schmidt, J. Hosler, G.T. Babcock, R.B. Gennis, and S. Ferguson-Miller. 1995. Possible proton relay pathways in cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1604-1608.
31. Fiamingo, F.G., R.A. Altschuld, P.P. Moh, and J.O. Alben. 1982. Dynamic interactions of CO with $a_3\text{Fe}$ and Cu_B in cytochrome c oxidase in beef heart mitochondria studied by Fourier transform infrared spectroscopy at low temperatures. *J Biol Chem* 257:1639-1650.
32. Friedrich, T., A. Abelmann, B. Brors, V. Guenebaut, L. Kintscher, K. Leonard, T. Rasmussen, D. Scheide, A. Schlitt, U. Schulte, and H. Weiss. 1998. Redox components and structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta* 1365:215-219.
33. Friedrich, T., B. Brors, P. Hellwig, L. Kintscher, T. Rasmussen, D. Scheide, U. Schulte, W. Mäntele, and H. Weiss. 2000. Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta* 1459:305-309.
34. Georgiadis, K.E., N.I. Jhon, and O. Einarsdottir. 1994. Time-resolved optical absorption studies of intramolecular electron transfer in cytochrome c oxidase [published erratum appears in *Biochemistry* 1994 Nov 1;33(43):12936]. *Biochemistry* 33:9245-9256.
35. Greenwood, C., M.T. Wilson, and M. Brunori. 1974. Studies on Partially Reduced Mammalian Cytochrome Oxidase. *Biochem J* 137:205-215.
36. Gronholz, J. and Herres, W. Understanding FT-IR Data Processing. 1985. Catalog
37. Hallen, S., P. Brzezinski, and B.G. Malmstrom. 1994. Internal electron transfer in cytochrome c oxidase is coupled to the protonation of a group close to the bimetallic site. *Biochemistry* 33:1467-1472.
38. Harris, D.A. 1995. Bioenergetics at a Glance.

39. Heberle, J. and C. Zscherp. 1996. ATR/FT-IR difference spectroscopy of biological matter with microsecond time resolution. *Appl. Spectrosc.* 50:588-596.
40. Heibel, G.E., P. Hildebrandt, B. Ludwig, P. Steinrucke, T. Soulimane, and G. Buse. 1993. Comparative resonance Raman study of cytochrome c oxidase from beef heart and *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 32:10866-10877.
41. Heitbrink, D., H. Sigurdson, C. Bolwien, P. Brzezinski, and J. Heberle. 2002. Transient Binding of CO to CuB in Cytochrome c Oxidase is Dynamically Linked to Structural Changes around a Carboxyl Group: A Time-Resolved Step-Scan FTIR Investigation. *Biophys J* in press.
42. Hellwig, P., J. Behr, C. Ostermeier, O.M. Richter, U. Pfitzner, A. Odenwald, B. Ludwig, H. Michel, and W. Mäntele. 1998. Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* investigated by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 37:7390-7399.
43. Hellwig, P., S. Grzybek, J. Behr, B. Ludwig, H. Michel, and W. Mäntele. 1999. Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a(3) redox reactions in the cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*: Separation of heme a and a(3) contributions and assignment of vibrational modes. *Biochemistry* 38:1685-1694.
44. Hellwig, P., B. Rost, U. Kaiser, C. Ostermeier, H. Michel, and W. Mäntele. 1996. Carboxyl group protonation upon reduction of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy. *FEBS Lett* 385:53-57.
45. Hellwig, P., T. Soulimane, G. Buse, and W. Mäntele. 1999. Similarities and dissimilarities in the structure-function relation between the cytochrome c oxidase from bovine heart and from *Paracoccus denitrificans* as revealed by FT-IR difference spectroscopy. *FEBS Lett* 458:83-86.
46. Hienerwadel, R., A. Boussac, J. Breton, B.A. Diner, and C. Berthomieu. 1997. Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling. *Biochemistry* 36:14712-14723.
47. Hill, B.C. 1991. The reaction of the electrostatic cytochrome c-cytochrome oxidase complex with oxygen. *J Biol Chem* 266:2219-2226.
48. Hofacker, I. and K. Schulten. 1998. Oxygen and proton pathways in cytochrome c oxidase. *Proteins* 30:100-107.
49. Hoganson, C.W., M.A. Pressler, D.A. Proshlyakov, and G.T. Babcock. 1998. From water to oxygen and back again: mechanistic similarities in the enzymatic redox conversions between water and dioxygen. *Biochim Biophys Acta* 1365:170-174.
50. Hosler, J.P., S. Ferguson-Miller, M.W. Calhoun, J.W. Thomas, J. Hill, L. Lemieux, J. Ma, C. Georgiou, J. Fetter, and J. Shapleigh. 1993. Insight into the active-site structure and function of cytochrome oxidase by analysis of

- site-directed mutants of bacterial cytochrome aa₃ and cytochrome bo. *J Bioenerg Biomembr* 25:121-136.
51. Hosler, J.P., J. Fetter, M.M. Tecklenburg, M. Espe, C. Lerma, and S. Ferguson-Miller. 1992. Cytochrome aa₃ of *Rhodobacter sphaeroides* as a model for mitochondrial cytochrome c oxidase. Purification, kinetics, proton pumping, and spectral analysis. *J Biol Chem* 267:24264-24272.
 52. Hunte, C. 2001. Insights from the structure of the yeast cytochrome bc₁ complex: crystallization of membrane proteins with antibody fragments. *FEBS Lett* 504:126-132.
 53. Iwata, S. 1998. Structure and function of bacterial cytochrome c oxidase. *J Biochem (Tokyo)* 123:369-375.
 54. Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig, and H. Michel. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376:660-669.
 55. Junemann, S., P. Heathcote, and P.R. Rich. 2000. The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1456:56-66.
 56. Kadenbach, B., M. Huttemann, S. Arnold, I. Lee, and E. Bender. 2000. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase [In Process Citation]. *Free Radic Biol Med* 29:211-221.
 57. Karpefors, M., C.E. Slutter, J.A. Fee, R. Aasa, B. Kallebring, S. Larsson, and T. Vanngard. 1996. Electron paramagnetic resonance studies of the soluble CuA protein from the cytochrome ba₃ of *Thermus thermophilus*. *Biophys J* 71:2823-2829.
 58. Konstantinov, A.A., S. Siletsky, D. Mitchell, A. Kaulen, and R.B. Gennis. 1997. The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9085-9090.
 59. Konstantinov, A.A., T. Vygodina, N. Capitanio, and S. Papa. 1998. Ferrocyanide-peroxidase activity of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1363:11-23.
 60. Lee, H.M., T.K. Das, D.L. Rousseau, D. Mills, S. Ferguson-Miller, and R.B. Gennis. 2000. Mutations in the putative H-channel in the cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* show that this channel is not important for proton conduction but reveal modulation of the properties of heme a. *Biochemistry* 39:2989-2996.
 61. Liao, G.L. and G. Palmer. 1996. The reduced minus oxidized difference spectra of cytochromes a and a₃. *Biochim Biophys Acta* 1274:109-111.
 62. Lübben, M. and K. Gerwert. 1996. Redox FTIR difference spectroscopy using caged electrons reveals contributions of carboxyl groups to the catalytic mechanism of haem- copper oxidases. *FEBS Lett* 397:303-307.

63. Lübben, M., A. Prutsch, B. Mamat, and K. Gerwert. 1999. Electron transfer induces side-chain conformational changes of glutamate-286 from cytochrome bo3 [In Process Citation]. *Biochemistry* 38:2048-2056.
64. MacMillan, F., A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, and H. Michel. 1999. Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry* 38:9179-9184.
65. Michel, H. 1998. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12819-12824.
66. Michel, H. 1999. Bioenergetics - Proton pumping by cytochrome c oxidase. *Nature* 402:602-603.
67. Michel, H. 1999b. Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping--a discussion. *Biochemistry* 38:15129-15140.
68. Mitchell, D.M. and R.B. Gennis. 1995. Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* by Ni⁽²⁺⁾-NTA affinity chromatography. *FEBS Lett* 368:148-150.
69. Mitchell, R. and P.R. Rich. 1994. Proton uptake by cytochrome c oxidase on reduction and on ligand binding. *Biochim Biophys Acta* 1186:19-26.
70. Morgan, J.E., M.I. Verkhovskiy, and M. Wikström. 1994. The histidine cycle: a new model for proton translocation in the respiratory heme-copper oxidases. *J Bioenerg Biomembr* 26:599-608.
71. Morgan, J.E., M.I. Verkhovskiy, and M. Wikström. 1996. Observation and assignment of peroxy and ferryl intermediates in the reduction of dioxygen to water by cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 35:12235-12240.
72. Nicoletti, F., H. Witt, B. Ludwig, M. Brunori, and F. Malatesta. 1998. *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: a kinetic study on the two- and four-subunit complexes. *Biochim Biophys Acta* 1365:393-403.
73. Nyquist, R.M., D. Heitbrink, C. Bolwien, T.A. Wells, R.B. Gennis, and J. Heberle. 2001. Perfusion-induced redox differences in cytochrome c oxidase: ATR/FT-IR spectroscopy. *FEBS Lett* 505:63-67.
74. Ogura, T., S. Hirota, D.A. Proshlyakov, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, and T. Kitagawa. 1996. Time-Resolved Resonance Raman Evidence for Tight Coupling between Electron Transfer and Proton Pumping of Cytochrome c Oxidase upon the Change from the Fe^V Oxidation Level to the Fe^{IV} Level. *J. Am. Chem. Soc.* 118:5443-5449.
75. Oliveberg, M., P. Brzezinski, and B.G. Malmstrom. 1989. The effect of pH and temperature on the reaction of fully reduced and mixed-valence cytochrome c oxidase with dioxygen. *Biochim Biophys Acta* 977:322-328.
76. Oliveberg, M. and B.G. Malmstrom. 1991. Internal electron transfer in cytochrome c oxidase: evidence for a rapid equilibrium between cytochrome a and the bimetallic site. *Biochemistry* 30:7053-7057.

77. Oliveberg, M. and B.G. Malmstrom. 1992. Reaction of dioxygen with cytochrome c oxidase reduced to different degrees: indications of a transient dioxygen complex with copper-B. *Biochemistry* 31:3560-3563.
78. Ostermeier, C., A. Harrenga, U. Ermler, and H. Michel. 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.
79. Page, C.C., C.C. Moser, X. Chen, and P.L. Dutton. 1999. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402:47-52.
80. Park, S., L.P. Pan, S.I. Chan, and J.O. Alben. 1996. Photoperturbation of the heme a_3 -Cu_B binuclear center of cytochrome c oxidase CO complex observed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys J* 71:1036-1047.
81. Pecoraro, C., R.B. Gennis, T.V. Vygodina, and A.A. Konstantinov. 2001. Role of the K-channel in the pH-dependence of the Reaction of Cytochrome c Oxidase with Hydrogen Peroxide. *Biochemistry* 40:9695-9708.
82. Proshlyakov, D.A., T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, E.H. Appelman, and T. Kitagawa. 1994. Selective resonance Raman observation of the "607 nm" form generated in the reaction of oxidized cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 269:29385-29388.
83. Proshlyakov, D.A., T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, and T. Kitagawa. 1996. Microcirculating system for simultaneous determination of Raman and absorption spectra of enzymatic reaction intermediates and its application to the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry* 35:76-82.
84. Proshlyakov, D.A., T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, and T. Kitagawa. 1996b. Resonance Raman/absorption characterization of the oxo intermediates of cytochrome c oxidase generated in its reaction with hydrogen peroxide: pH and H₂O₂ concentration dependence. *Biochemistry* 35:8580-8586.
85. Proshlyakov, D.A., M.A. Pressler, C. DeMaso, J.F. Leykam, D.L. DeWitt, and G.T. Babcock. 2000. Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244. *Science* 290:1588-1591.
86. Puustinen, A., J.A. Bailey, R.B. Dyer, S.L. Mecklenburg, M. Wikström, and W.H. Woodruff. 1997. Fourier Transform Infrared Evidence for Connectivity between Cu_B and Glutamic Acid 286 in Cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36:13195-13200.
87. Puustinen, A. and M. Wikström. 1999. Proton exit from the heme-copper oxidase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:35-37.
88. Rigaud, J.L., D. Levy, G. Mosser, and O. Lambert. 1998. Detergent removal by non-polar polystyrene beads. *Eur Biophys J* 27:305-319.

89. Riistama, S., G. Hummer, A. Puustinen, R.B. Dyer, W.H. Woodruff, and M. Wikström. 1997. Bound water in the proton translocation mechanism of the haem-copper oxidases. *FEBS Lett* 414:275-280.
90. Riistama, S., A. Puustinen, A. Garcia-Horsman, S. Iwata, H. Michel, and M. Wikström. 1996. Channeling of dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1275:1-4.
91. Riistama, S., A. Puustinen, M.I. Verkhovskiy, J.E. Morgan, and M. Wikström. 2000. Binding of O(2) and its reduction are both retarded by replacement of valine 279 by isoleucine in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 39:6365-6372.
92. Rost, B., J. Behr, P. Hellwig, O.M. Richter, B. Ludwig, H. Michel, and W. Mäntele. 1999. Time-Resolved FT-IR Studies on the CO Adduct of *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase: Comparison of the Fully Reduced and the Mixed Valence Form. *Biochemistry* 38:7565-7571.
93. Sakai, H. and R.C. Murphy. 1978. Improvements in time resolved Fourier spectroscopy. *Applied Optics* 17:1342-1346.
94. Sakai, M. and H. Takahashi. 1996. One-electron photoreduction of flavin mononucleotide: time-resolved resonance Raman and absorption study. *Journal of Molecular Structure* 379:9-18.
95. Shapleigh, J.P. and R.B. Gennis. 1992. Cloning, sequencing and deletion from the chromosome of the gene encoding subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* 6:635-642.
96. Sharrock, M. and T. Yonetani. 1977. Low-Temperature Flash Photolysis Studies of Cytochrome Oxidase and its Environment. *Biochim Biophys Acta* 462:718-730.
97. Sigurdson, H. Mechanistic design of structural elements controlling proton pumping in cytochrome c oxidase. 2001. Department of Biochemistry and Biophysics, The Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University. Thesis
98. Sigurdson, H., M. Bränden, A. Namslauer, and P. Brzezinski. 2002. Ligand binding reveals protonation events at the active site of cytochrome c oxidase; The K-pathway is used for the transfer of H⁺ rather than OH⁻. *Im Druck* In press.
99. Sistrom, W.R. 1960. *J. Gen. Microbiol* 22:778-785.
100. Soulimane, T., G. Buse, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, R. Huber, and M.E. Than. 2000. Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from *thermus thermophilus*. *EMBO J* 19:1766-1776.
101. Száraz, S., D. Oesterhelt, and P. Ormos. 1994. pH-induced structural changes in bacteriorhodopsin studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys J* 67:1706-1712.
102. Thomas, J.W., L.J. Lemieux, J.O. Alben, and R.B. Gennis. 1993. Site-directed mutagenesis of highly conserved residues in helix VIII of subunit I

- of the cytochrome bo ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*: an amphipathic transmembrane helix that may be important in conveying protons to the binuclear center. *Biochemistry* 32:11173-11180.
103. Thorgeirsson, T.E., J.W. Lewis, S.E. Wallace-Williams, and D.S. Kliger. 1992. Photolysis of rhodopsin results in deprotonation of its retinal Schiff's base prior to formation of metarhodopsin II. *Photochem Photobiol* 56:1135-1144.
 104. Thorgeirsson, T.E., S.J. Milder, L.J. Miercke, M.C. Betlach, R.F. Shand, R.M. Stroud, and D.S. Kliger. 1991. Effects of Asp-96---Asn, Asp-85---Asn, and Arg-82---Gln single-site substitutions on the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 30:9133-9142.
 105. Tollin, G. 1995. Use of Flavin Photochemistry to Probe Intraprotein and Interprotein Electron Transfer Mechanisms. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27:303-309.
 106. Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa. 1995. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 269:1069-1074.
 107. Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136-1144.
 108. van Gelder, B.F. 1966. On Cytochrome c Oxidase I. The Extinction Coefficients of Cytochrome c and Cytochrome a₃. *Biochim Biophys Acta* 118:36-46.
 109. Vanneste, W.H. 1966. The stoichiometry and absorption spectra of components a and a-3 in cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 5:838-848.
 110. Venyaminov, S.Y. and N.N. Kalnin. 1990. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* 30:1243-1257.
 111. Verkhovsky, M.I., J.E. Morgan, and M. Wikström. 1994. Oxygen binding and activation: early steps in the reaction of oxygen with cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 33:3079-3086.
 112. Verkhovsky, M.I., J.E. Morgan, and M. Wikström. 1995. Control of electron delivery to the oxygen reduction site of cytochrome c oxidase: a role for protons. *Biochemistry* 34:7483-7491.
 113. Vygodina, T. and A. Konstantinov. 1989. Effect of pH on the spectrum of cytochrome c oxidase hydrogen peroxide complex. *Biochim Biophys Acta* 973:390-398.
 114. Vygodina, T.V., N. Capitanio, S. Papa, and A.A. Konstantinov. 1997. Proton pumping by cytochrome c oxidase is coupled to peroxidase half of its catalytic cycle. *FEBS Lett* 412:405-409.

115. Vygodina, T.V., C. Pecoraro, D. Mitchell, R. Gennis, and A.A. Konstantinov. 1998. Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 37:3053-3061.
116. Weng, L.C. and G.M. Baker. 1991. Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase. *Biochemistry* 30:5727-5733.
117. Wikström, M., A. Jasaitis, C. Backgren, A. Puustinen, and M.I. Verkhovskiy. 2000. The role of the D- and K-pathways of proton transfer in the function of the haem-copper oxidases. *Biochim Biophys Acta* 1459. (2. -3.):514. -20. 1459:514-520.
118. Wikström, M. 1981. Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4051-4054.
119. Wikström, M. and J.E. Morgan. 1992. The dioxygen cycle. Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction. *J Biol Chem* 267:10266-10273.
120. Woodruff, W.H., O. Einarsdottir, R.B. Dyer, K.A. Bagley, G. Palmer, S.J. Atherton, R.A. Goldbeck, T.D. Dawes, and D.S. Kliger. 1991. Nature and functional implications of the cytochrome a3 transients after photodissociation of CO-cytochrome oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2588-2592.
121. Wrigglesworth, J.M. 1984. Formation and reduction of a 'peroxy' intermediate of cytochrome c oxidase by hydrogen peroxide. *Biochem J* 217:715-719.
122. Yamazaki, Y., H. Kandori, and T. Mogi. 1999. Effects of subunit I mutations on redox-linked conformational changes of the *Escherichia coli* bo-type ubiquinol oxidase revealed by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Biochem (Tokyo)* 126:194-199.
123. Yonetani, T. 1960. Studies on Cytochrome Oxidase. *J. Biol. Chem.* 235:845-852.
124. Yoshikawa, S., K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M.J. Fei, C.P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, and T. Tsukihara. 1998. Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* 280:1723-1729.
125. Zaslavsky, D. and R.B. Gennis. 1998. Substitution of lysine-362 in a putative proton-conducting channel in the cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* blocks turnover with O₂ but not with H₂O₂. *Biochemistry* 37:3062-3067.
126. Zscherp, C. and J. Heberle. 1997. Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N, and O of the bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 101:10542-10547.

127. Zundel, G. and H. Merz. 1984. On the role of hydrogen bonds and hydrogen-bonded systems with large proton polarizability for mechanisms of proton activation and conduction in bacteriorhodopsin. *Prog Clin Biol Res* 164:153-164.

Vielen Dank an:

...Joachim Heberle, der mich in den letzten drei Jahren super unterstützt hat. Seine Betreuung ging sicherlich weit über das normale Maß hinaus. Und was er mir ebenfalls gezeigt hat: man sollte es kaum glauben, aber man kann auch mit seinem Chef viel Spaß haben...

...Georg Büldt, für die Möglichkeit, in seinem Institut meine Doktorarbeit anzufertigen, und für sein offenes Ohr bei jeder Art von Problemen...

...Carsten Bolwien und Rebecca Nyquist, die in den vergangenen Jahren zu sehr guten Freunden geworden sind und niemals müde wurden, meine deutsche und englische Rechtschreibung auf ein ansehnliches Niveau zu bringen. Darüber hinaus waren sie sich auch nie zu schade, mir die dunklen Seiten der Physik bzw. der Chemie der Lipide zu erhellen...

...Frau Gehrman, Christian Baeken und Ilona Ritter für die immer währende Hilfsbereitschaft besonders bei den unangenehmen Dingen eines Wissenschaftlerlebens: Bestellungen tätigen, Reiseformulare ausfüllen und Anträge schreiben...

...Dirk Fastermann und Andreas Eckhoff für die vielen unterhaltsamen Gespräche am Mittagstisch...

...Ulf Eidhoff und Jörg Labahn für permanenten Gesprächsstoff in der Literaturecke...

...Mona Schlesinger für die Hilfe bei meinen Exkursionen in die Biochemie...

...die namentlich hier nicht aufgeführten Bewohner des IBI-2 für die nette Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Gritli und meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen während der letzten Jahre!

Forschungszentrum Jülich



Jül-3969
Februar 2002
ISSN 0944-2952